

بررسی ارتباط بین اثر پیش‌شرطی‌سازی هایپراکسی متناوب بر سطح پروتئین مبادله‌گر سدیم-کلسیم 1 و میزان حجم سکتة مغزی در مدل سکتة مغزی رت

اکرام محمدی¹، محمدرضا بیگدلی²

1- کارشناس ارشد، گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

2- دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران. bigdelimohammadreza@yahoo.com

تاریخ دریافت: 93/10/28 تاریخ پذیرش: 94/1/15

چکیده

مقدمه و هدف: مطالعات اخیر بیان می‌کنند که هایپراکسی (*Hyperoxia*) نورموباریک (*HO*)، آسیب ناشی از هایپواکسی اکسیژن‌رسانی مجدد را در مغز کاهش داده و بیان مبادله‌گر سدیم-کلسیم 1 را افزایش می‌دهد. هدف از این تحقیق، تعیین رابطه اثر *HO* بر مبادله‌گر سدیم-کلسیم 1 (*Na⁺/Ca²⁺ Exchanger 1, NCX1*) و حجم ایسکمی (*Infarct Volume:IV*) در مدل جانوری سکتة است.

روش کار: رت‌ها به دو گروه آزمایشی تقسیم شدند. اولین گروه در معرض هایپراکسی 95% به مدت 6 روز، هر روز به مدت 4 ساعت و گروه دوم به عنوان کنترل در معرض اکسیژن 21% در همان اتاقک قرار گرفت. هر گروه اصلی به 2 زیرگروه انسداد شریان میانی مغزی (*MCAO*) و دست‌نخورده (*Intact*) تقسیم شدند. بعد از 2، 5، 10 و 15 روز پس از تیمار، زیر گروه *MCAO* به مدت 60 دقیقه در معرض *MCAO* سمت راست قرار گرفتند. بعد از 24 ساعت ریپرفیوژن، حجم ایسکمی در زیرگروه‌های *MCAO* اندازه‌گیری شد. بیان *NCX1* در مغز در زیرگروه‌های دست‌نخورده در نواحی کور، پنومبرا و ساب‌کورتکس ارزیابی گردید. یافته‌ها: پیش‌شرطی‌سازی با هایپراکسی، *IV* را کاهش و باعث افزایش بیان *NCX1* در پنومبرا و ساب‌کورتکس شده و به تدریج در طول 15 روز پس از تیمار اثرات هایپراکسی از بین رفت.

نتیجه‌گیری: اگرچه مطالعات بیشتر برای شفاف‌سازی مکانیسم‌های دخیل در مقاومت به ایسکمی نیازمند است، می‌توان بیان کرد که هایپراکسی با بیان *NCX1* و کاهش *IV* مرتبط بوده و این نتایج تأییدکننده یک نقش نوروپروتکتیو برای *NCX1* در تولید محافظت به ایسکمی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: مبادله‌گر سدیم-کلسیم 1، هایپراکسی، ایسکمی مغزی، محافظت عصبی، حجم سکتة

مقدمه

در برابر آثار زیان‌آور ایسکمی کشنده، طولانی و متوالی القا می‌کند (9). پیش‌شرطی‌سازی در مغز، قلب و سایر ارگان‌ها به یک فرایند سازشی طبیعی بر می‌گردد که می‌تواند توسط انواع آسیب‌های کمتر از حد کشندگی (مانند هایپواکسی گذرا) القا شود و مقاومت بافت را در مقابل ایسکمی متعاقب با پتانسیل کشندگی، افزایش دهد. این مقاومت سلولی سازشی، یک توانایی اساسی در سلول‌های زنده است و به آن‌ها اجازه می‌دهد که در معرض استرس دوام پیدا نمایند (21).

تحریکات آسیب‌رسان در مقادیر پائین و زیر آستانه آسیب‌رسان به سلول، پاسخ سازشی القا می‌کند که مغز را در برابر استرس‌های دیگر حاصل از همین تحریکات آسیب‌رسان حفاظت می‌نماید (27). مقاومت به ایسکمی (*Ischemic Tolerance (IT)*) یک پدیده‌درون‌زاد است که در مقابل آسیب بعدی ایسکمی مقاومت ایجاد می‌کند (12). پیش‌شرطی‌سازی به ایسکمی پدیده‌ای است که در آن دوره‌های کوتاه آسیب خفیف زیر حد کشنده، حفاظت قدرتمندی را

مطالعه دوام *IT* ایجاد شده توسط هایپراکسی از نظر کلینیکی مهم است (13). *NCX* یکی از مهم ترین مکانیسم های سلولی برای خروج کلسیم می باشد (6). در واقع *NCX* (Na^+/Ca^{2+} Exchanger) یک آنتی پورتر غشایی است که کلسیم را از سلول بیرون می کند و از انرژی ذخیره شده در شیب الکتروشیمیایی سدیم استفاده می کند، بدین طریق که سدیم بر اساس گرادیان خود از غشای پلاسمایی وارد می شود تا با یون کلسیم به صورت کوانترانسپورت مبادله گردد. *NCX* یک یون کلسیم را در ازای ورود 3 یون سدیم خارج می کند (30). این مبادله گر به طور معمول در غشای پلاسمایی، میتوکندری، شبکه اندوپلاسمایی سلول های تحریکی یافت می شود (24، 11). سه ایزوفرم متفاوت (*NCX1*، *NCX2* و *NCX3*) با ژن های مجزا در پستانداران کد می شوند (20، 19، 13) و از نظر خصوصیات بیوفیزیکی مشترک هستند اما حساسیت های متفاوتی به سطوح *ATP* دارند و به طور متفاوت در دوران تکوینی و افراد بالغ بیان می گردند (30، 23، 16). در مطالعه ای دریافتند که با به کارگیری آنتی-سنس های اولیگو نوکسی نوکلئوتید بر علیه محصول ژنی *NCX1*، آسیب ایسکمی و نقص نورولوژیک شدیدتری ایجاد می شود. در مجموع، نتایج این مطالعه نشان داد که اثر محافظت عصبی اعمال شده توسط خانواده *NCX*، حین آسیب ایسکمی، عمدتاً توسط محصولات ژنی *NCX1* ایفا می گردد (25). اخیراً نشان داده شده است که پیش شرطی سازی توسط هایپراکسی متناوب (*InHO*، *Intermittent hyperoxia*)، بیان انتقال دهنده های گلو تامات (*glutamate transporters*)، *EAATs* (*Excitatory Amino-Acid transporters*)، آنزیم تبدیل کننده تومور نکروزیز فاکتور α (*Tumor Necrosis Factor \alpha*)، فاکتور هسته ای کاپا (*NFkB*) (6، 3) و مبادله گر سدیم-کلسیم 1 (18)

گزارش شده که پیش شرطی سازی به ایسکمی مغزی از طریق القای ایسکمی زیر حد کشنده بعد از 1 تا 7 روز خون رسانی مجدد، نورون ها را از آسیب ناشی از دوره های ایسکمی طولانی تر بعدی محافظت می کند، حالتی که به طور طبیعی نورون های *CA1* هیپوکامپ را از بین می برد (27). هم چنین گزارشات نشان داده اند که پیش شرطی سازی توسط *Sevoflurane*، آپوتوز القا شده توسط ایسکمی را حداکثر تا 7 روز پس از آسیب ایسکمی کاهش می دهد و بعد از 14 روز هیچ تفاوتی بین گروه کنترل و گروه تیمار شده مشاهده نمی گردد (7). گزارشات اخیر نشان داده است که هایپراکسی می تواند باعث القا *IT* شده و در مقابل آسیب مغزی و بیماری های تخریب کننده نورونی محافظت ایجاد نماید (3). مشخص گردیده که *IT* القا شده توسط *HO*، حجم سکنه، امتیاز نقص نورولوژیک (*neuro deficit score*) *NDS*، ادم مغزی و نفوذ پذیری سد خونی مغزی را کاهش می دهد (5). اثر نوروپروتکتیو القا شده توسط *HO* (*hyperoxia*) پاسخ های سازشی ویژه ای را ایجاد می کند که شامل تعدادی تغییرات سلولی و بیوشیمیایی، از جمله هموستازی متابولیک و برنامه ریزی ژنی می باشد. تغییرات در مسیرهای متابولیک عموماً عمر کوتاه داشته و برگشت پذیرند در حالی که بیان ژنی که به دنبال آن رخ می دهد یک پروسه دوام دار بوده و ممکن است در نهایت منجر به تغییرات دائمی در الگوی بیان ژنی شوند (3). ممکن است القا و حفظ *IT* مغز توسط تغییرات در بیان میانجی های مختلف، شامل گیرنده های *NMDA* (*N-methyl-D-aspartic acid*) (10)، فاکتورهای آنتی-آپتوتیک (28)، اینترلوکین 1 (22، 21) رادیکال های آزاد اکسیژن (26)، فاکتور هسته ای کاپا (4) و فاکتورهای دیگر ایجاد شود. ممکن است نتایج محافظت عصبی *HO* کاربردهای کلینیکی مهمی داشته باشد. بنابراین،

به مدت 2، 5، 10 و 15 روز قرار گرفت. دومین گروه اصلی به طور مشابه در جعبه هایپراکسی قرار گرفته و در معرض هوای اتاق (اکسیژن 21 درصد) طبق دوره-های ذکر شده قرار گرفت. 2، 5، 10، 15 روز بعد از تیمار، زیر گروه های $(O-HO)MCAO$ و $(O-RA)$ به مدت 60 دقیقه در معرض جراحی $MCAO$ قرار گرفتند. 24 ساعت پس از خون رسانی مجدد، حجم سکنه اندازه گیری شد. در زیر گروه شم (S)، همه ی مراحل به غیر از $MCAO$ شبیه گروه RA بود. در هر زیر گروه دست نخورده، همه ی مراحل شبیه گروه های HO و RA بود، فقط جراحی $MCAO$ روی آن ها اعمال نشد. سرانجام 2، 5، 10، 15 روز پس از تیمار، حیوانات زیر گروه های دست نخورده $I-2HO(n=6)$ ، $I-5HO$ ، $I-10HO(n=6)$ ، $I-15HO(n=6)$ و شم به منظور اندازه گیری میزان پروتئین $NCX1$ در نواحی کور، پنومبرا و ساب کورتکس در نیمکره راست مغز کشته شدند.

جعبه هایپراکسی

تمام رت ها به مدت یک هفته در اتاق حیوانات نگهداری شدند. تمامی درزهای این جعبه (650×350×450 میلی متر) به طور کامل گرفته و یک مجرای ورودی و یک مجرای خروجی هوا دارد. ماده-سودالایم (Soda Lime) (جاذب دی اکسید کربن) در داخل جعبه قرار گرفتادی-اکسید کربن تولیدی را جذب کند. بدین ترتیب، امکان تغییر غلظت گاز داخل جعبه به حد اقل می رسد. اکسیژن خالص)

90

درصد) یا هوای اتاق به میزان 5 لیتر در دقیقه به رت تیمار حیوانات بهج عبه هوای متصل شد. توسط اکسیژن متر که دارای الکترو دحس-گراکسیژن است، میزان غلظت اکسیژن در نوبت دم (با میانگین 25 درجه سانتی گراد) اندازه گیری شد.

ایسکمی موضعی مغزی ($MCAO$)

را در مغز رت تغییر می دهد. هدف از این تحقیق بررسی ارتباط بین اثر پیش شرطی-سازیهایپراکسیمتتاوبرسطحپروئتینمبادله گرسدیم-کلسیم 1 و میزان حجم سکنه مغزیدرمدلسکتهمغزیرت است.

مواد و روش ها

مدل جانوری و گروه بندی

در این مطالعه از موش های صحرایی

دالی ($Sprague$ - Rat)، نژاد اسپیراگو- دالی ($Sprague$ - $Dawley$) در محدوده وزنی 250-350 گرم که از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی استخراج شده و تحت مقررات نگهداری و کار تحقیقاتی حیوانات آزمایشگاهی (با حرارت کنترل شده 24 ± 2 درجه سانتی گراد، 12 ساعت تاریکی، 12 ساعت روشنایی) و آب و غذای مخصوص حیوان ($pellet$) به میزان کافی و همواره در دسترس، استفاده شد. آزمایشات حداقل یک هفته پس از سازگار شدن رت ها با محیط حیوان خانه، انجام می-شد.

جامعه مورد بررسی از حیوانات به طور تصادفی انتخاب شده و زمین آن ها نیز به طور تصادفی دو گروه نورموکسی (NO یا RA) و هایپراکسی (HO) و یک گروه 6 تایی (شم) (S) انتخاب شدند که در قفس-های مخصوص تحت شرایط پرفورمینگه داری می شدند. هر گروه اصلی به دو زیر گروه O (انسداد شریان میانی مغز $Middle Cerebral Artery Occlusion MCAO$) و دست نخورده (I) (I intact) (به ترتیب $n=45$ و $n=30$) برای ارزیابی فاکتورهای مختلف، حجم سکنه و سطح بیان $NCX1$ تقسیم شدند. اولین گروه اصلی در یک جعبه هایپراکسی قرار گرفت و در معرض اتمسفر هایپراکسیک (اکسیژن 90 درصد) به طور متناوب (هر روز 4 ساعت متوالی به مدت 6 روز متوالی) قرار گرفت. سپس این گروه اصلی در اتاق با هوای معمولی

رت ها بعد از توزین، با دارو ویکلراتهیدرات (مرک
آلمان)

بهمیزان 400 میلیگرم در کیلوگرم وزن بدن بیهوش شدند.

جراحی مدل سازی MCAO مطابق دستورالعمل لونگا و همکارانش (17) انجام می گردد.

به طور خلاصه تحت جراحی میکروسکوپی، یک نخبیهنایلونا زطریقته ECA (External Carotid Artery) وارد رگ شریانی راست شد و تا رسیدن به ACA (Anterior Cerebral Artery) از میان ICA (Internal Carotid Artery) با پتریگوپالاتین

بسته داد مهاد هشد (14). در اثر تماس نخبیه و ACA جریان خون از هر طرفه MCA (Middle Cerebral Artery) بسته شد.

این بسته شدن از طریق احساس مقاومت در پیشروینخ و ورود حدود 20 میلیمتر طول نخ از تنه ECA مشخص گردید. بعد از 60 دقیقه ایسکمی، برقراری مجدد جریان خون صورت گرفت. دمایدن از طریق رگ کتوم

انداز هگیر بود در حدود 37 درجه سانتی گراد حفظ شد.

ارزیابی حجم بافتی ناشی از سکنه مغزی (IV)

چون رت های مورد آزمایش عموماً بعد از 72 ساعت از شروع انسداد می مردند، 24 ساعت پس از جراحی ایسکمی، ارزیابی رفتاری انجام شد. به منظور ارزیابی IV، ابتدا رت ها با 800mg/kg کلرال هیدرات کشته شدند، سپس مغزشان به سرعت خارج و در دمای 4 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه در سالین سرد قرار داده شدند. در مرحله بعد، مغز در ماتریکس مغز قرار داده شده و به طور کرونال از لوب فرونتال به مقاطع 2 میلی متر با تیغ برش زده و به مدت 15 دقیقه در محلول 2 درصد TTC، 3، 5 تری فنیل تترازولیوم کلراید (TTC) (مرک، آلمان) در دمای 37 درجه سانتی گراد برای رنگ آمیزی حیاتی در آون انکوبه شدند. نواحی از بافت که دچار آسیب ایسکمیک شده بود به رنگ سفید و نواحی سالم به رنگ صورتی در آمدند. سپس از برش ها با استفاده از دوربین دیجیتال (DSC-W310) قابل اتصال به کامپیوتر عکس برداری شد (شکل 1).

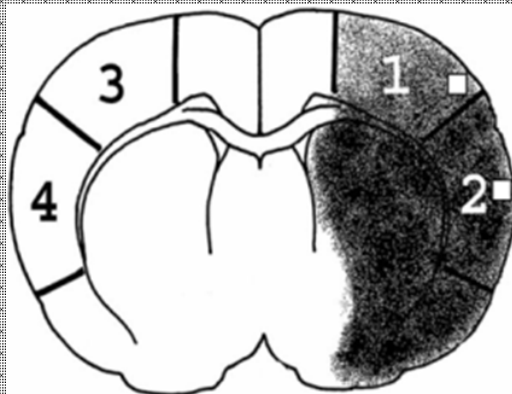


شکل 1- برش های مغزی رنگ آمیزی شده با TTC (2، 3، 5 تری فنیل تترازولیوم کلراید)، در گروه های مختلف که در معرض انسداد شریان میانی مغزی (MCAO) قرار گرفته بودند.

2، 5، 10 و 15 روز پس از تیمار، رت‌های گروه‌ششم (S) و زیرگروه (*I*) *intact* از دو گروه هاپیراکسی (HO) و نورموکسی (RO)، توسط ماده بیهوشی کلرال هیدرات (800mg/kg) کشته شدند و مغزشان به سرعت خارج شد. سپس نواحی کور، پنومبرا و ساب کورتکس در نیمکره راست مغزها مطابق شکل 2، جدا شده (12) و توسط سونیکاتور در دمای 4 درجه سانتی‌گراد در 4 حجم بافر حاوی 0/025 گرم سدیم دئوکسی کولات، 0/08 NaCl، 0/01 گرم SDS، 0/003 گرم EDTA، یک قرص مهارکننده پروتئاز (Rosh)، تریس - اسید هیدروکلرید با pH 7 در 20 درجه سانتی‌گراد هموژن شدند.

در پایان، مساحت ناحیه IV هر برش در نواحی کور، پنومبرا و ساب کورتکس، با استفاده از نرم افزار *Image Tool* اندازه‌گیری و با حاصل ضرب مساحت‌های مذکور در ضخامت 2 میلی‌متر و جمع اعداد حاصل از 8 برش حجم ناحیه آسیب بافتی با روش Swanson محاسبه گردید (29).

حجم تصحیح شده ناحیه آسیب دیده = (حجم ناحیه آسیب دیده - حجم نیمکره راست) - حجم نیمکره چپ
آماده کردن نمونه‌های مغزی جهت انجام وسترن بلات



شکل 2- تقسیم بندی نواحی کور، پنومبرا و ساب کورتکس بر اساس تعریف *lei* و همکارانش. نواحی 1 و 3 پنومبرا، نواحی 2 و 4 کور و نواحی زیرین ساب کورتکس می‌باشند.

ساعت در دمای اتاق قرار گرفته و متعاقباً با آنتی‌بادی اولیه اختصاصی مونوکلونال آنتی‌موس برای *NCX1* (1: 1000) (Abcam, C2C12) و بتا اکتینین (1 : 1000) (Santa Cruz) انکوبه شدند. سپس کاغذها با آنتی‌بادی ثانویه (antirabbit) (10000 : 1) (Dakocytomation, Denmark) و آنتی‌موس (1:2000) (Abcam, ab6728) به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگه داشته شدند. پروتئین‌های مورد نظر که با آنتی‌بادی اولیه اختصاصی خود شناسایی شده بودند با

آنالیز وسترن بلات

هموژن محتوی 60 میکروگرم از پروتئین کل، از نیمکره راست مغزی زیرگروه‌های (گروه شم S)، هاپیراکسی (HO-I) و (RA-O) به همراه پروتئین (*Ladder*) بارگذاری شدند و پروتئین‌ها بر اساس اندازه‌شان در ژل SDS-PAGE (الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید) (90 میلی‌آمپر) از هم جدا شدند. پروتئین‌ها به کاغذ (Poly Vinylidene) PVDF منتقل شدند. کاغذها در محلول فلاکینگ (Fluoride) منتقل شدند. کاغذها در محلول فلاکینگ (GE Health Care, Amersham) به مدت یک

استفاده از کیت کیمولومینسانس (*Enhanced Chemiluminescence, Amersham Biosciences*) بر روی فیلم عکاسی آشکار شدند. پس از اسکن کردن و انتقال تصاویر فیلم‌ها به کامپیوتر، دانسیته باندهای پروتئینی توسط نرم‌افزار *image j* مورد ارزیابی قرار گرفت.

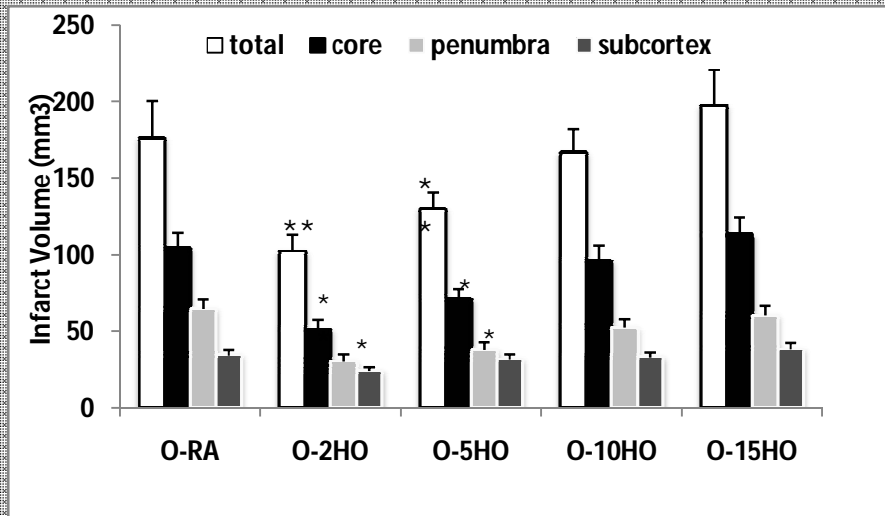
استفاده از کیت کیمولومینسانس (*Enhanced Chemiluminescence, Amersham Biosciences*) بر روی فیلم عکاسی آشکار شدند. پس از اسکن کردن و انتقال تصاویر فیلم‌ها به کامپیوتر، دانسیته باندهای پروتئینی توسط نرم‌افزار *image j* مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

پیش شرطی سازی با *HO* باعث کاهش *IV* در تمامی نواحی مغزی، 2 روز پس از آخرین تیمار می‌شود. این اثر افزایش یافته به تدریج تا 15 روز پس از آخرین تیمار از بین رفته و به حد کنترل باز می‌گردد. تغییرات *IV*، در 2، 5، 10 و 15 روز پس از آخرین تیمار در نمودار 1 به تصویر کشیده شده است.

تحلیل آماری

تماماً آنالیزها با کمک نرم افزار *SPSS V. 16* انجام و بیان *NCX1* و حجم سکنه با استفاده از آنالیز *Anova* یک طرفه تجزیه و تحلیل و داده‌ها به صورت میانگین و انحراف معیار نمایش داده شد. ارتباط بین سطح پروتئین



نمودار 1- اثر هایپراکسی بر میزان حجم آسیب بافتی ناشی از ایسکمی در کل نیمکره راست پس از اعمال مدل ایسکمی *MCAO* در گروه کنترل (*O-RA*) و گروه هایپراکسی (*HO*) در فواصل زمانی 2، 5، 10 و 15 روز پس از آخرین تیمار نشان داده می‌شود. مقادیر نشان داده شده معرف $mean \pm SEM$ می‌باشد. $P < 0/01$ ، $P \leq 0/05$ * اختلاف از گروه کنترل را نشان می‌دهد.

پیش شرطی سازی با *HO* باعث افزایش بیان *NCX1* در نواحی پنومبرا و ساب کورتکس، 2 روز پس از آخرین تیمار می‌شود. این اثر افزایش یافته به تدریج تا 15 روز پس از آخرین تیمار از بین رفته و به حد کنترل باز می‌گردد. بیان *NCX1* در ناحیه کور 2 روز پس از هایپراکسی در مقایسه با گروه کنترل، تغییر معناداری نداشت (شکل 3). ارتباط بین روند تغییرات *IV* و پروتئین *NCX1* در نواحی کور، پنومبرا و ساب کورتکس 2، 5، 10 و 15 روز پس از آخرین تیمار، در نمودارهای 2، 3 و 4 به تصویر کشیده شده است. هیچ رابطه معنی داری بین تغییرات *IV* و *NCX1* در ناحیه کور وجود ندارد ($P=0/116$). رابطه‌ی معناداری بین تغییرات *IV* و *NCX1* در ناحیه پنومبرا و ساب کورتکس وجود دارد (*penumbra*; $P=0/05$) (*subcortex*; $P=0/001$) ($P=$

پیش شرطی سازی با *HO* باعث افزایش بیان *NCX1* در نواحی پنومبرا و ساب کورتکس، 2 روز پس از آخرین تیمار می‌شود. این اثر افزایش یافته به تدریج تا 15 روز پس از آخرین تیمار از بین رفته و به حد کنترل باز می‌گردد. بیان *NCX1* در ناحیه کور 2 روز پس از هایپراکسی در مقایسه با گروه کنترل، تغییر معناداری نداشت (شکل 3). ارتباط بین روند تغییرات *IV* و پروتئین *NCX1* در نواحی کور، پنومبرا و ساب کورتکس 2، 5، 10 و 15 روز پس از آخرین تیمار، در نمودارهای 2، 3 و 4 به تصویر کشیده شده است. هیچ رابطه معنی داری بین تغییرات *IV* و *NCX1* در ناحیه کور وجود ندارد ($P=0/116$). رابطه‌ی معناداری بین تغییرات *IV* و *NCX1* در ناحیه پنومبرا و ساب کورتکس وجود دارد (*penumbra*; $P=0/05$) (*subcortex*; $P=0/001$) ($P=$

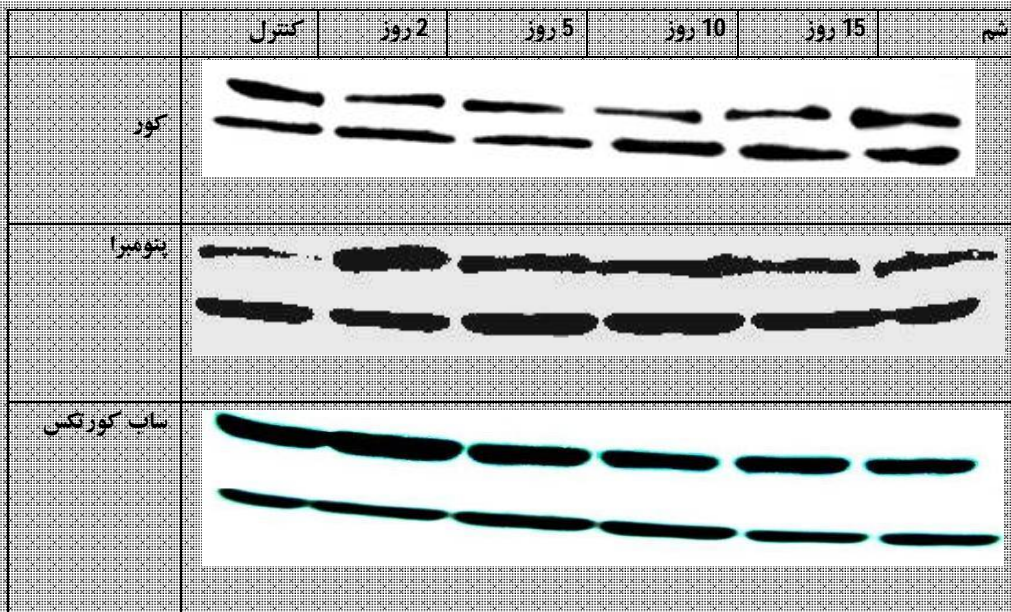
بحث و نتیجه گیری

مطالعات قبلی نشان داد که هایپراکسی متناوب که *IT* را القا می کند، نقش مهمی در کاهش *NDS*، حجم سکنه، ادم مغزی و نفوذپذیری سد خونی مغزی دارد (5). هم چنین نشان داده شده که هایپراکسی باعث تغییر بیان *Nuclear Factor Kappa-B* (*NF-kB*)، *EAAT*، *Light-Chain-Enhancer Of Activated B Cells* (*LC3*)، *Tumor Necrosis Factor Alpha* (*TNF-α*) و آنزیم تبدیل کننده *TNF-α* می شود (8). نتایج این کار تحقیقی نیز نشان داد که پیش شرطی سازی با *HO*، حجم سکنه را کاهش داده و باعث افزایش بیان *NCXI*، دو روز پس از اعمال آخرین تیمار، در اکثر نواحی مغزی (پنومبرا و ساب کورتکس) در رت گردیده است. این اثر افزایش یافته به تدریج تا 15 روز پس از آخرین تیمار به حالت کنترل بازگشت می کند. پیش شرطی سازی هایپراکسی بر بیان پروتئین *NCXI* در ناحیه کور اثر افزایشی نداشت. یافته های ما تایید می کنند که *NCXI* نقش محافظ عصبی در مغز دارد و باعث ایجاد *IT* در مغز می گردد. در واقع، مهار فارماکولوژیکی *NCX* منجر به آسیب شدید سلولی می شود که این آسیب از طریق افزایش غلظت سدیم داخل سلولی (1) یا از طریق افزایش آزادسازی آمینو اسیدهای تحریکی، حالتی که در اجرای عمل عکس سیستم سین ترانسپورتر گلوتامات رخ می دهد (2، 31). همچنین نشان داده شده است که به کارگیری *ODNS* (*Oligo Deoxy Nucleotides*) بر علیه محصولات ژنی *NCXI* آسیب ایسکمی و نقص نورولوژیک شدیدتری را ایجاد می کند (15). هایپراکسی با تولید *ROS* اضافی و عوامل احتمالی دیگر، باعث فعال کردن مسیرهای داخل سلولی شده که در نهایت روی بیان ژن *NCXI* در سلول های این ناحیه اثر گذاشته و باعث افزایش تولید

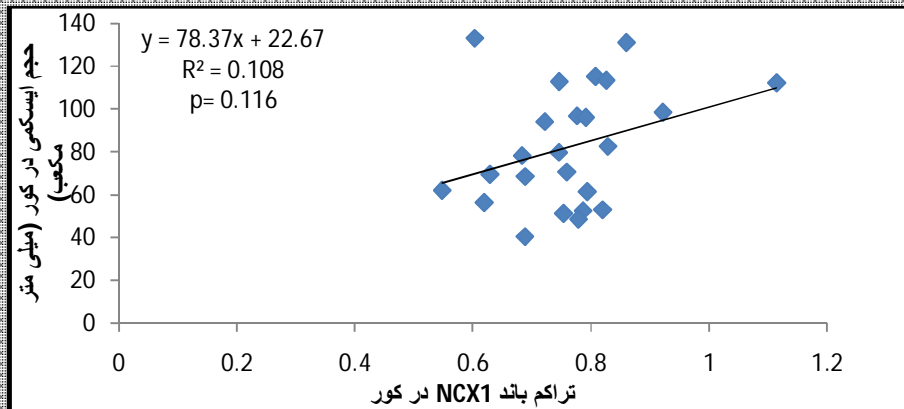
پروتئین *NCXI* در فاصله 2 روز پس از اعمال آخرین تیمار شده است (18). با توجه به این که هیچ تفاوت چشمگیری بین زیرگروه های شم و کنترل وجود ندارد، می توان گفت که پیش شرطی سازی با *HO*، حجم سکنه را با افزایش بیان نوروپروتکتیوهای هم چون *NCXI* کاهش می دهد. طبق یافته های این تحقیق، پیش شرطی با هایپراکسی، 2 روز پس از آخرین تیمار باعث افزایش بیان *NCXI* در نواحی پنومبرا و ساب کورتکس شده بود، و این سطح بیان افزایش یافته به تدریج 5، 10 و 15 روز پس از آخرین تیمار به سطح کنترل بر می گردد، به عبارتی هایپراکسی اثر خود را در این فاصله 15 روز از دست می دهد، از طرف دیگر مشاهده شد که پیش تیمار با هایپراکسی، 2 روز پس از آخرین تیمار باعث کاهش حجم ایسکمی در نواحی کور، پنومبرا و ساب کورتکس می گردد و تا 15 روز پس از اعمال آخرین تیمار، حجم ایسکمی به سطح کنترل بازگشته و افزایش می یابد. رابطه معنی داری بین روند تغییرات *NCXI* و حجم ایسکمی در نواحی پنومبرا و ساب کورتکس وجود دارد، که این امر می تواند نشان دهنده این موضوع باشد که *NCXI* به عنوان یک فاکتور نوروپروتکتیو عمل کرده و باعث کاهش حجم ایسکمی در پنومبرا و ساب کورتکس شده است. سیر نزولی سطح پروتئین *NCXI* در روزهای 5، 10 و 15 روز به طور معکوس با سیر صعودی حجم ایسکمی در این بازه زمانی همبستگی پیرسون دارد. بهتر است یادآوری شود که در فاز اولیه آسیب آنوکسی نوروئی، مود برعکس (*Reverse Mood*) *NCX* باعث ورود بیش از اندازه کلسیم و افزایش غلظت کلسیم داخل سلولی می شود. این حالت می تواند برای نورون ها مفید باشد، زیرا این حالت متعاقباً باعث کاهش بار سدیم داخل سلولی می گردد و از تورم و مرگ سلولی جلوگیری

آنوکسی نوروئی؛ نوروئی؛ وقتی بگذارد، از این رو کاربرد مهمی در پاتوفیزیولوژی دارد. مطالعات بیشتر به منظور بسط این مشاهدات لازم است. در پایان، امید است که استراتژی‌های جدید محافظت مغزی برای کسانی که در معرض خطر سکنه و یا کسانی که خون‌رسانی مغزشان کاهش یافته است (حین جراحی) توسعه یابد.

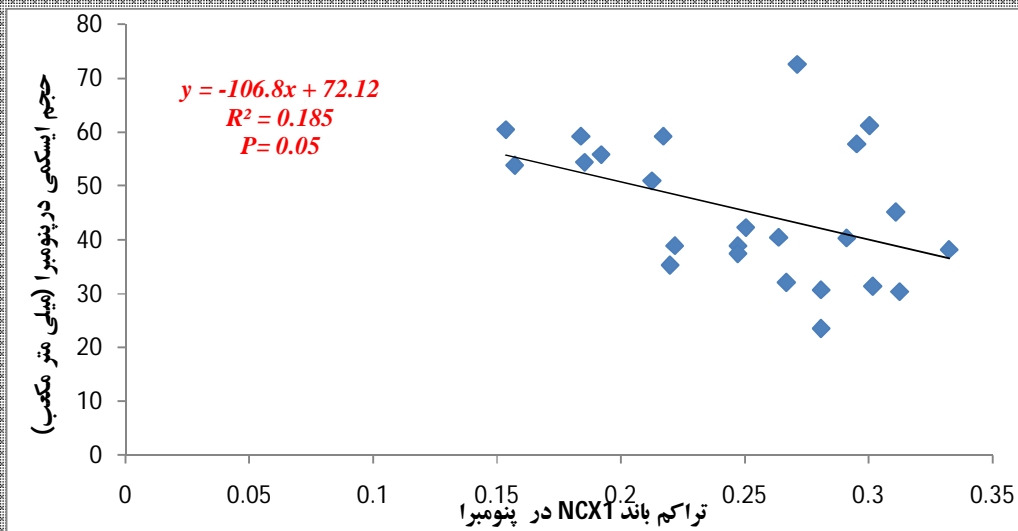
به عمل می‌آورد (7). از طرف دیگر، در فاز تاخیری کلسیم سلول بیش از اندازه زیاد شد، *NCX* در حالت *forward* (*Forward Mood*) خود وارد عمل شده و باعث کاهش کلسیم داخل سلولی می‌گردد. از این رو نورونها را از "سمیت سلولی القا شده توسط کلسیم" محافظت می‌کند (1). در مجموع، داده‌های ما پیشنهاد می‌کند که تغییر بیان *NCX1* در پیش شرطی سازی هایپراکسی می‌تواند روی مکانیسم محافظت عصبی اثر



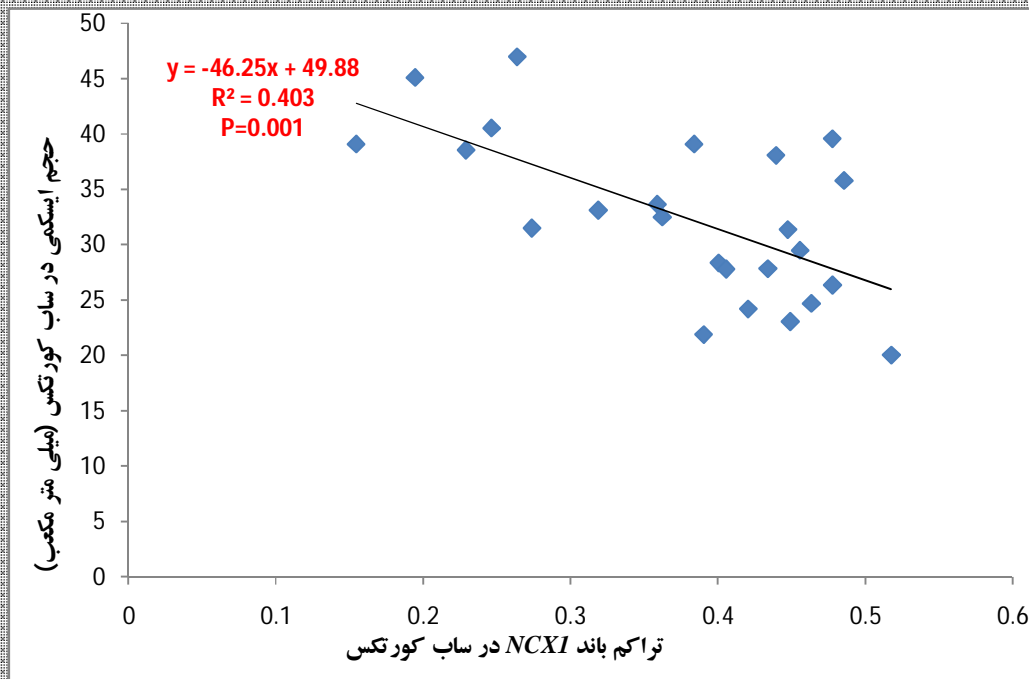
شکل 3- اثر پیش شرطی سازی هایپراکسی بر بیان پروتئین *NCX3* در نواحی کورتکس، پنتومیرا و ساب کورتکس در گروه‌های مورد مطالعه.



نمودار 2- تغییرات حجم سکنه مغزی بودا نسبت به بیان *NCX1* در ناحیه کورتکس مغزی، 2، 5، 10 و 15 روز پس از تیمار هایپراکسی. تغییرات معنی دار مشاهده شد ($P = 0.0116$).



نمودار 3- رابطه معکوس بین حجم سکنه مغز بودا سیسپرو تین NCX1 در ناحیه هیپو امپتری، 2، 5، 10 و 15 روز پس از تیمار با هیپراکسی ارتباط معنیداری ($R^2 = 0/05$ $p = 0/185$) بین کاهش سطح بیان NCX1 و افزایش حجم سکنه ($Pearson\ Correlation = 0/329$) وجود دارد.



نمودار 4- رابطه معکوس بین حجم سکنه مغز بودا سیسپرو تین NCX1 در ناحیه ساب کورتکس مغزی، 2، 5، 10 و 15 روز پس از تیمار با هیپراکسی ارتباط معنیداری ($R^2 = 0/403$ $p = 0/001$) بین کاهش سطح بیان NCX1 و افزایش حجم سکنه ($Pearson\ Correlation = -0/635$) وجود دارد.

منابع

1. Amoroso, S., De Maio, M. Russo, G.M., Catalano, ABassi, A., Montagnani, S. (1997). Pharmacological evidence that the activation of the Na^+ / Ca^{2+} exchanger protects C6 glioma cells during chemical hypoxia.

British Journal of Pharmacology, 121 (2); 303-309.

2. Amoroso, S., De Maio, M. Russo, G.M., Catalano, ABassi, A., Montagnani, S. (1993). Inhibition of the Na^+ / Ca^{2+} exchanger enhances anoxia and glucopenia-induced [3H]

- aspartate release in hippocampal slices. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 264 (2); 515-520.
3. Bigdeli, M.R. (2011). Neuroprotection caused by hyperoxia preconditioning in animal stroke models. *TheScientificWorldJOURNAL*, 11; 403-421.
4. Bigdeli, M.R., Hajizadeh, S., Froozandeh, M., Heidarianpour, A., Rasoulilian, B., Asgari, A.R. (2008). Normobaric hyperoxia induces ischemic tolerance and upregulation of glutamate transporters in the rat brain and serum TNF-[alpha] level. *Experimental neurology*, 212 (2); 298-306.
5. Bigdeli, M.R., Hajizadeh, S., Froozandeh, M., Heidarianpour, A., Rasoulilian, B., Asgari, A.R. (2007). Prolonged and intermittent normobaric hyperoxia induce different degrees of ischemic tolerance in rat brain tissue. *Brain Research*, 1152; 228-233.
6. Bigdeli, M.R., M. Rahnema, Khoshbaten, A. (2009). Preconditioning with sublethal ischemia or intermittent normobaric hyperoxia up-regulates glutamate transporters and tumor necrosis factor-[alpha] converting enzyme in the rat brain. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 18(5); 336-342.
7. Codaccioni, J.L., Velly, L.J., Moubarik, C., Bruder, N.J., Pisano, P.S., Guillet, B.A. (2009). Sevoflurane preconditioning against focal cerebral ischemia: inhibition of apoptosis in the face of transient improvement of neurological outcome. *Anesthesiology*, 110 (6); 1271-1278.
8. Dipolo, R., Beaugé, L. (2006). Sodium/Calcium exchanger: influence of metabolic regulation on ion carrier interactions. *Physiological reviews*, 86(1); 155-203.
9. Downey, J.M., Cohen, M.V., Ytrehus, K., Liu, Y. (1994). Cellular mechanisms in ischemic preconditioning: the role of adenosine and protein kinase Ca. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 723(1); 82-98.
10. Gonzalez-Zulueta, M., Feldman, A.B., Klesse, L.J., Kalb, R.G., Dillman, J.F., Parada, L.F. (2000). Requirement for nitric oxide activation of p21ras/extracellular regulated kinase in neuronal ischemic preconditioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97 (1); 436-441.
11. Kiedrowski, L., Brooker, G., Costa, E., Wroblewski, J.T. (1994). Glutamate impairs neuronal calcium extrusion while reducing sodium gradient. *Neuron*, 12 (2); 295-300.
12. Kitagawa, K., Matsumoto, M., Tagaya, M., Hata, R., Ueda, H., Niinobe, M. (1990). Ischemic tolerance phenomenon found in the brain. *Brain Research*, 528(1); 21-24.
13. Konstas, AA., Goldmakher, GV., Lee, T.Y., Lev, MH. (2009). The orectic basis and technical implementations of CT perfusion in acute ischemic stroke, part 1 :theoretic basis. *American Journal of Neuroradiology*, 30(4); 662-668.
14. Lei, B., Popp, S., Capuano-Waters, C., Cottrell, JE., Kass, IS. (2004). Lidocaine attenuates apoptosis in the ischemic penumbra and reduces infarct size after transient focal cerebral ischemia in rats. *Neuroscience*, 125(3); 691-701.
15. Li, Z., Matsuoka, S., Hryshko, L.V., Nicoll, D.A., Bersohn, M.M., Burke, E.P. (1994). Cloning of the NCX2 isoform of the plasma membrane Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Journal of Biological Chemistry*, 269(26); 17434.
16. Linck, B., Qiu, Z., He, Z., Tong, Q., Hilgemann, D.W., Philipson, K.D. (1998). Functional comparison of the three isoforms of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX1, NCX2, NCX3). *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 274(2); C415-C423.
17. Longa, E.Z., Weinstein, P.R., Carlson, S., Cummins, R. (1989). Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 20 (1); 84-91.
18. Mohammadi, E., Bigdeli, M. R. (2013). Effects of preconditioning with normobaric hyperoxia on Na/Ca exchanger in the rat brain. *Neuroscience*, 237; 277-284.
19. Nicoll, D.A., Longoni, S., Philipson, K.D. (1990). Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *Science*, 250(4980); 562-565.
20. Nicoll, D.A., Quednau, B.D., Qui, Z., Xia, Y.R., Lysis, A.J., Philipson, K.D. (1996). Cloning of a third mammalian Na⁺/Ca²⁺ exchanger, NCX3. *Journal of Biological Chemistry*, 271 (40); 24914-24921.
21. Obrenovitch, T.P. (2008). Molecular physiology of preconditioning-induced brain tolerance to ischemia. *Physiological Reviews*, 88(1); 211-247.
22. Ohtsuki, T., Ruetzler, C.A., Tasaki, K., Hallenbeck, J.M. (1996). Interleukin-1 mediates induction of tolerance to global ischemia in gerbil hippocampal CA1 neurons.

- Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 16(6); 1137-1142.
23. Papa, M., Canitano, A., Boscia, F., Castaldo, P., Sellitti, S., Porzig, H. (2003). Differential expression of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger transcripts and proteins in rat brain regions. *The Journal of Comparative Neurology*, 461(1); 31-48.
24. Patterson, M., Sneyd, J., Friel, D.D. (2007). Depolarization-induced calcium responses in sympathetic neurons: relative contributions from Ca^{2+} entry, extrusion, ER/mitochondrial Ca^{2+} uptake and release, and Ca^{2+} buffering. *The Journal of General Physiology*, 129(1); 29.
25. Pignataro, G., Gala, R., Cuomo, O., Tortiglione, A., Giaccio, L., Castaldo, P. (2004). Two Sodium/Calcium exchanger gene products, *NCX1* and *NCX3*, play a major role in the development of permanent focal cerebral ischemia. *Stroke*, 35(11); 2566-2570.
26. Ravati, A., Ahlemeyer, B., Becker, A., Klumpp, S., Kriegelstein, J.I. (2001). Preconditioning induced neuroprotection is mediated by reactive oxygen species and activation of the transcription factor nuclear factor B. *Journal of neurochemistry*, 78(4); 909-919.
27. Romera, C., Hurtado, O., Botella, S.H., Lizasoain, I., Cárdenas, A., Fernández-Tomé, P. (2004). In vitro ischemic tolerance involves upregulation of glutamate transport partly mediated by the TACE/ADAM17 tumor necrosis factor- α pathway. *The Journal of Neuroscience*, 24(6); 1350-1357.
28. Shimazaki, K., Ishida, A., Kawai, N. (1994). Increase in *bcl-2* oncoprotein and the tolerance to ischemia-induced neuronal death in the gerbil hippocampus. *Neuroscience Research*, 20(1); 95-99.
29. Swanson, R.A., Morton, M.T., Tsao-Wu, G., Savalos, R.A., Davidson, C., Sharp, F.R. (1990). A semiautomated method for measuring brain infarct volume. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 10(2); 290-293.
30. Yu, L., Colvin, R.A. (1997). Regional differences in expression of transcripts for $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger isoforms in rat brain. *Molecular Brain Research*, 50 (1-2); 285-292.
31. Yu, S.P., Choi, D.W. (1997). $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchange currents in cortical neurons: concomitant forward and reverse operation and effect of glutamate. *European Journal of Neuroscience*, 9(6); 1273-1281.

Archive