مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۴، شماره ۳/ مرداد و شهریور ۱۳۹۱/ ۵۰-۴۰

مقاله پژوهشی

اثر هیپراکسی نورموباریک متناوب و فعالیت پروتیئن کیناز C بر نفوذپذیری سد خونی – مغزی در رت

فیروزه علویان[۱]، دکتر سهراب حاجی زاده[۱]*، دکتر محمدرضا بیگدلی[۲]، دکتر محمد جوان[۱]

[۱] گروه فیزیولوژی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، [۲] گروه زیست شناسی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۰/۸/۱۶ اصلاح نهایی: ۹۰/۱۱/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۱/۲/۱۶

چکیده:

زمینه و هدف: **اخیراً نشان داده شده هیپراکسی نورموباریک متناوب اثر درمانی قابل ملاحظه ای در درمان ایسکمی حاد دارد. در مطالعه حاضر اثر هیپراکسی نورموباریک متناوب و فعالیت پروتیئن کیناز C در نفوذپذیری سد خونی – مغزی، همچنین ارزیابی رفتاری در رت بررسی شده است.**

روش بررسی: **در این مطالعه تجربی ۳۶ رت نژاد ویستار به ۶ گروه شش تایی شامل: نورموکسی (شم)، نورموکسی +Chelerythrin chloride (CHEL)، نورموکسی +سکته، نورموکسی + سکته + CHEL، هیپراکسی + سکته و هیپراکسی + سکته+ CHEL تقسیم شدند. از CHEL مهارگر سیستمیک پروتیئن کیناز C، به منظور بررسی اثر پروتیئن کیناز C استفاده شد، در گروه های هیپراکسی، اکسیژن خالص با غلظت ۹۵٪ و گروه های نورموکسی اکسیژن ۲۱٪ به مدت ۲۴ ساعت و ۶ روز پیوسته فراهم شد. ۲۴ ساعت بعد رت های گروه سکته به مدت ۶۰ دقیقه تحت انسداد شریان کاروتید اصلی راست قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت از جریان خون مجدد، نفوذپذیری سد خونی – مغزی و نقایص رفتاری مورد بررسی قرار گرفت. داده ها به کمک آزمون های آماری آنالیز واریانس دو راهه و Bonferroni تجزیه و تحلیل شد.**

یافته ها: **پیش شرطی سازی با هیپراکسی نورموباریک نقص های نورولوژیک و نفوذپذیری سد خونی – مغزی را کاهش داد. با مهار پروتیئن کیناز C، نقص های نورولوژیک افزایش یافت که با به کارگیری هیپراکسی، کاهش معنی داری داشت (P<۰/۰۰۱). مهار پروتیئن کیناز C بدون ارتباط با هیپراکسی باعث بهبود عملکرد سد خونی – مغزی شد (P<۰/۰۰۱).**

نتیجه گیری: **با به کارگیری هیپراکسی و زیرواحدهای ویژه ای از پروتیئن کیناز C، استحکام سد خونی – مغزی بیشتر شده و امتیاز نقص های رفتاری در جریان سکته بهبود می یابد.**

واژه های کلیدی: سکته، پیش شرطی سازی، هیپراکسی، پروتیئن کیناز C، کلریترین کلراید.

مقدمه:

یکی از مهم ترین عوامل ناتوانی و مرگ ایسکمی مغزی است (۱)، تحریکات آسیب رسان در دوزهای پایین و زیر آستانه آسیب رسان باعث القاء پاسخ های سازشی است که مغز را در برابر استرس های بعدی حاصل از همین تحریکات آسیب رسان (تحمل) و دیگر تحریکات آسیب رسان (تحمل متقابل) حفاظت می کند، این پدیده اصطلاحاً پیش شرطی سازی نامیده می شود. پیش شرطی سازی پدیده ای درون زاد است که مسئول افزایش تحمل بافت مغزی در برابر آسیب های بعد از سکته مغزی است که طی آن نورون ها از اثرات زیان آور ایسکمی مغزی که در طی و پس از سکته ایجاد می شود، محافظت می شوند (۲)، طی پیش شرطی سازی، اعمال دوره‌های کوتاه ایسکمی و جریان مجدد قبل از القاء یک دوره ایسکمی طولانی

*نویسنده مسئول: تهران- دانشگاه تربیت مدرس-دانشکده پزشکی- گروه فیزیولوژی پزشکی- تلفن: ۸۲۸۸۴۵۲۱-۰۲۱، E-mail:hajizads@modares.ac.ir

www.SID.ir

مدت، سبب کاهش عوارض ناشی از ایسکمی و جریان مجدد بعدی است. پیش شرطی سازی به ایسکمی ممکن است اجزای عصبی، میوکاردی، عروقی را درگیر سازد که فرایندهای متعدد سلولی را جامعیت می‌دهد تا در نهایت منجر به کاهش مصرف انرژی و آسیب ناشی از خون رسانی مجدد شود. پیش شرطی سازی پدیده ای دو مرحله ای است که دارای مرحله اولیه و ثانویه است: مرحله اولیه کوتاه مدت و مستقل از ستنز پروتئین است، در حالی که مرحله ثانویه بلند مدت است و با تغییر بیان ژن بروز می کند (۳). عوامل متعددی مانند: هیپوکسی (۴)، ایسکمی (۲)، رسپتورهای ان متیل دی آسپارتات (NMDA) (۵) و استرس اکسیداتیو (۶) فرایند تحمل مغز در برابر ایسکمی را القاء می کنند. یکی از روش های موثر برای افزایش مقاومت بافت ها در برابر ایسکمی، استفاده از روش هیپرکسی نورموباریک می باشد. این روش آثار سمی و جانبی روش‌های قبلی را ندارد، هزینه پایینی داشته و قابلیت پیاده سازی بالینی را دارد (۷). هیپراکسی ارائه اکسیژن افزایش یافته اتمسفری است (۸). پیش شرطی سازی با هیپراکسی نورموباریک، القاگر حفاظت عصبی در مغز از طریق شکل گیری رادیکال های آزاد اکسیژن می باشد (۹). در تحقیقی نشان داده شد که هیپراکسی نورموباریک، جریان خون مغز و اکسیژن رسانی را بهبود می بخشد (۱۰). همچنین Bigdeli و همکاران نشان دادند که هیپراکسی نورموباریک باعث القاء افزایش تحمل بافت مغزی است (۷). القای این مقاومت از طریق تنظیم افزایشی ناقلین گلوتامات مغز و سطوح TNFαی سرم صورت می گیرد که نتیجه آن کاهش حجم سکته، امتیازهای نقایص نورولوژیک، ادم مغزی و نفوذپذیری سد خونی – مغزی است. هیپراکسی با افزایش استحکام سد خونی – مغزی، با تاثیر روی محتوی و هموستازی آب مغز، تنظیم کننده حجم سلولی نورون ها و آستروسیت ها به طور مستقیم است، که این وضعیت می تواند به واسطه تولید گونه های آزاد اکسیژن و TNFα در بافت مغز باشد (۱۱).

یکی از تظاهرات بالینی آسیب دستگاه عصبی مرکزی پس از ایسکمی مغزی، شکل گیری ادم مغزی ناشی از شکسته شدن سد خونی – مغزی است. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، ادم مغزی بعد از انواع آسیب ها را کاهش می دهد (۱۲). این امر بیان می کند که اکسیژن رادیکالی نقش مهمی در شکستن سد خونی – مغزی ایفاء می نماید. روشن شدن پاسخ این سوال که هیپراکسی نورموباریک چگونه و با چه مکانیسم هایی قادر به ایجاد تحمل به ایسکمی است، می تواند منشاء اطلاعات فیزیولوژیکی و کاربردی مفیدی باشد.

فعال شدن پروتیئن کیناز C (PKC) ممکن است به عنوان محرک فاکتورهای نسخه برداری عمومی در قلب و مغز عمل نماید، که می تواند شروع کننده مسیرهای سیگنالی متفاوت القاء کننده تحمل به ایسکمی باشد (۱۳). توزیع ناهمگن PKC در نواحی ویژه مغز بیانگر فعالیت های خاص آن می باشد (۱۴). PKC نوعی هیستون پروتئین کیناز است که به وسیله فسفولیپیدها، دی آسیل گلیسرول و کلسیم فعال می شود. نتیجه فعالیت این دسته از آنزیم ها شامل بسیاری وقایع سلولی و فیزیولوژی نظیر افزایش رهایی انتقال دهنده های عصبی، غیر حساس شدن رسپتورها و تعدیل کانال های یونی می باشد (۱۵). به نظر می رسد که تقریباً هر نوع استرس زیر کشنده، سلول ها را در برابر استرس های کشنده، مقاوم و صاحب تحمل به ایسکمی سازد. به طوری که افزایش های متعاقب کلسیم سیتوزولی، حاصل فعال سازی گیرنده NMDA حین پیش شرطی سازی است. این افزایش یون کلسیم ممکن است روند پیام رسانی آبشاری را پیش ببرد. این امر بیان می کند که مسیر حفاظتی عصبی ممکن است فعال سازی القائی PKC را درگیر سازد (۱۶). شواهد قوی مبنی بر درگیری PKC در القای تحمل با پیش شرطی سازی در قلب وجود دارد، به طوری که افزایش گذرای کلسیم در قلب، دی آسیل گلیسرول را فعال می کند که

Archive of SID

www.SID.ir

به دنبال آن انواع زیرگروه هایی PKC فعال شده و سپس فسفوریلاسیون چندین پروتئین غشایی درگیر در حفاظت عصبی رخ می دهد (۱۷).

PKC یکی از مهمترین عوامل تنظیم کننده اتصالات محکم سد خونی – مغزی می باشد. این فاکتور به واسطه اثر بر روی بخش هایی مانند مولکول های چسباننده ماتریکس، اتصالات سلول – سلول و سیتواسکلت، ساختار سد خونی – مغزی را متاثر می سازد، به طوری که ثابت شده PKC موجب فسفوریلاسیون پروتئین occluding اتصالات محکم (۱۸)، اکتین اسکلت سلولی و مولکول های چسباننده ماتریکس بین سلولی شده، که نتیجه آن افزایش نفوذپذیری پاراسلولار اندوتلیال و به هم خوردن اتصالات محکم است (۱۸).

همچنین ثابت شده فعالیت زیر واحدهایی از PKC در پاسخ به گونه های آزاد اکسیژن افزایش می یابد (۱۴)، به طوری که در یک آزمایش، وقتی سلول ها در معرض اکسیژن ۹۵ درصد قرار گرفتند، افزایش ۲ برابر در فعالیت زیر واحدهایی از PKC مشاهده شد (۱۳).

به هر حال نقش PKC در القای تحمل به ایسکمی به واسطه هیپراکسی هنوز به خوبی شناخته نشده و فعال شدن PKC تحت اثر اکسیدان ها مشوق ما در تحقیق نقش PKC در مدل سکته مغزی و شرایط هیپراکسی، بر نفوذپذیری سد خونی – مغزی و ارزیابی رفتاری می باشد. لذا این پژوهش با هدف روشن تر کردن برخی آثار مهم و فیزیولوژیکی هیپراکسی نورموباریک بر مغز انجام شده و می تواند به صورت بالقوه اطلاعات کاربردی بالینی جالب توجهی را به همراه داشته باشد. اطلاعات حاصل از این پژوهش می تواند بستری فراهم کند تا برای جلوگیری از بروز سکته مغزی به آثار پیش شرطی سازی، گرایش به وجود آید.

روش بررسی:

این مطالعه از نوع تجربی بوده و از موش های نر نژاد ویستار (۲۵۰ تا ۳۵۰ گرم) استفاده شد. نمونه گیری و گروه بندی به طور تصادفی صورت گرفت. رت ها با سیکل روشنایی – تاریکی ۱۲ ساعته، دمای حدود ۲۵ درجه سانتی گراد و دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. کلیه اصول اخلاقی مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفت. محل انجام آزمایش ها، در دانشگاه تربیت مدرس تهران بود.

با توجه به نظر متخصص آماری و منابع مشابه و هدف مطالعه در هر گروه ۶ رت مورد آزمایش قرار گرفتند، حیوانات در ۶ گروه، که شامل: نورموباریک نورموکسی (شم)، نورموباریک نورموکسی (شم)+ CHEL، نورموباریک نورموکسی سکته، نورموباریک نورموکسی سکته + CHEL، هیپراکسی نورموباریک سکته و هیپراکسی نورموباریک سکته + CHEL. ۶ رت، داخل قفس بزرگ و با آب و غذای کافی در جعبه ای به ابعاد $2\ mm$ ۶۵۰×۳۵۰×۴۵۰، از جنس شیشه محکم، با مجرایی برای عبور شلنگ متصل به کپسول اکسیژن قرار می گرفتند. در گروه های هیپراکسی، اکسیژن خالص با غلظت ۹۵ درصد (به مدت ۶ روز پیوسته، هر روز ۴ ساعت) فراهم شد. غلظت اکسیژن به وسیله حسگر حساس به اکسیژن (Lutron-Do5510 oxygen sensor, Taiwan) مداوم کنترل می شد. برای افزایش دقت آزمایش، یک الکترود سنجش اکسیژن نیز در کنار جعبه تعبیه می شد تا غلظت اکسیژن داخل جعبه را اندازه گیری کند (Do5510 oxygen sensor, Taiwan – Lutron). سودالیم (BDH Limited, Poole, England) که نوعی جاذب CO_2 است در گوشه های جعبه قرار گرفت بدین ترتیب، امکان تغییر غلظت گاز داخل جعبه به حداقل می رسید. گروه های نورموکسی به همین شکل در جعبه قرار می گرفتند با این تفاوت که در معرض

Archive of SID

www.SID.ir

اکسیژن ۲۱ درصد هوای اتاق قرار داشتند. پس از خارج کردن از جعبه، رت ها به مدت ۲۴ ساعت در شرایط آزمایشگاه نگهداری شدند (۱۹،۷).

جهت ایجاد مدل سکته مغزی، ۲۴ ساعت پس از خارج کردن رت ها از جعبه، حیوانات وزن شده و به وسیله کلرال هیدرات (۴۰۰ mg/kg) (Merck,Germany) و به شکل داخل صفاقی بیهوش شدند. سپس به کمک میکروسکوپ جراحی، شکافی در خط میانی گردن ایجاد شد، تا شاخه راست کاروتید و شاخه اکسترنال آن نمایان شود. شاخه راست کاروتید و شاخه اکسترنال با دقت از عصب واگ و بافت های مجاور جدا شد، پایه کاروتید راست و شاخه اکسترنال را با نخ بخیه محکم بسته، سپس شاخه اینترنال و سرخرگ پتریگو پالاتین با کلمپ بسیار ظریف موقت مسدود شد. سوراخ کوچکی در کاروتید راست ایجاد نموده و نخ نایلون ۳-۰ را با دقت حدود ۲۲-۲۰ میلی متر از آن عبور داده تا حدی که سر نخ نایلونی، ابتدای سرخرگ سری جلویی را لمس کند و مقاومت ملایم حس شود (۲۰،۷). در طول جراحی درجه حرارت رکتال کنترل می شد-(Citizen 513w) و حدود ۳۷ درجه سانتی گراد به وسیله گرم کردن و یا خنک کردن سطحی ثابت می ماند. ریت تنفسی – قلبی و غلظت گازها در رنج فیزیولوژیک کنترل می شد. جریان خون مغز نیز پیوسته با دستگاه لیزر داپلر (LDF; Moor Instrument, UK)، برای اطمینان از ایجاد مدل سکته (در ایجاد ایسکمی موفق بیش از ۲۵٪ کاهش جریان خون از خط پایه لازم است) کنترل شد. جریان خون مجدد با خارج کردن نخ نایلونی، بعد از ۱ ساعت برقرار شد (۷). سپس محل باز شده گردن، بخیه شده و حیوانات به داخل قفس های مجزا منتقل می شدند. گروه های شم در همان شرایط گروه سکته به جز عدم عبور نخ نایلونی تیمار شدند.

معاینه های نورولوژیک بعد از ۲۴ ساعت از جریان مجدد خون انجام شد. در طول ۲۴ ساعت بعد از شروع انسداد تا قربانی شدن حیوان مراقبت های ویژه انجام می گرفت. یافته های نورولوژیکی در ۵ مقیاس دسته بندی شدند (۲۰): شماره صفر (۰): هیچ گونه عارضه نورولوژیک نشان نمی دهد، شماره یک: نارسایی کامل در انتهای پنجه های جلویی، (که یک نقص نورولوژیک کانونی خفیف در نظر گرفته شده). شماره دو: به چپ چرخیدن (نقص نورولوژیک کانونی متوسط)، شماره ۳: افتادن سمت چپ (نقص کانونی شدید)، رت های شماره ۴ به طور خود بخودی نمی توانند راه روند و سطح هوشیاری پایین دارند و رت هایی که طی ۲۴ ساعت بعد جراحی می میرند در صورتی که بعد از رنگ آمیزی بخش وسیعی از مغزشان آسیب دیده باشد و مرگ منحصر به سکته مغزی باشد، به آنها شماره ۵ داده می شد.

استحکام سد خونی- مغزی توسط اندازه گیری میزان خروج اوانس بلو (EB) ارزیابی می شد. نخست، رت ها از طریق ورید دم محلول اوانس بلوی ۲ درصد را به اندازه ۴ میلی لیتر در کیلوگرم وزن بدن بعد از ۳۰ دقیقه ایسکمی دریافت کردند. ۲۴ ساعت بعد از جریان مجدد خون، رت ها تحت بی هوشی، از ناحیه قفسه سینه باز شدند و با ۲۵۰ میلی لیتر سالین از طریق بطن چپ از وجود اوانس بلو داخل رگی پاک شدند تا زمانی که مایع پرفیوز بی رنگ از دهلیز راست خارج شود. سپس، مغز حیوان خارج می شد. سپس نواحی کرتکس و مرکز مغز با دقت مجزا می شدند. برای اندازه گیری میزان خروج EB، بافت مغز در ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات هموژن شده و برای رسوب پروتئین به آن ۲/۵میلی لیتر اسید تری کلرواستیک ۶۰ درصد اضافه شد. سپس ۳ دقیقه با ورتکس به هم زده شد و ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد خنک شد. آنگاه به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. در نهایت، جذب نوری اوانس بلو در بخش رویی توسط اسپکتوفتومتر (Genova, Jenway) در جذب ۶۱۰ نانو متر اندازه گیری شد و مطابق منحنی استاندارد غلظت آن محاسبه گردید (۲۱،۷).

Archive of SID

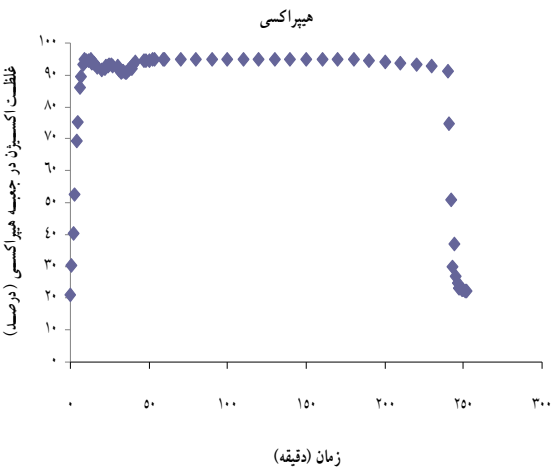
www.SID.ir

Chelerythrin Chloride (CHEL) بـه عنـوان مهـارگر اختـصاصی PKC انتخـاب و از شـرکت سـیگما خریداری شـد. دوز مـصرفی، ۱ mg/kg و بـه شـکل زیـر پوستی به مدت ۶ روز، حدود ۲۰ دقیقه قبل از قرار دادن حیوانات در جعبه مخصوص تزریق شد.

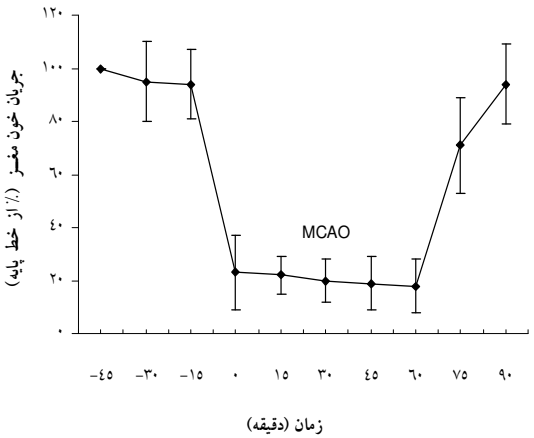
پارامترهای فیزیولـوژیکی بـا اسـتفاده از آزمـون آنالیز واریانس دو راهـه و آزمـون متعاقـب Bonferroni مورد آنالیز قرار گرفت. امتیازهای نقص نورولوژیـک بـا استفاده از آزمون کروسکال والیس و آزمون تعقیبی دان مورد تجزیه و تحلیل قـرار گرفـت. بـرای بررسـی توزیـع مشاهدات از آزمـون کولمـوگراف اسـمیرنوف اسـتفاده شد. تمام آنالیزها با کمک نرم افزار Graph Pad Prism انجام شـد. P<۰/۰۵ از لحـاظ آمـاری معنـی دار در نظـر گرفته شد.

یافته ها:

محتـوای اکـسیژن (٪) داخـل جعبـه اکـسیژن در شـرایط نورموکـسی (۲۱٪) و هیپراکـسی نورموباریـک (۹۵٪) بود (نمـودار شـماره ۱). بـر اسـاس ارزیـابی هـای آزمایش گازهای خونی شریانی، فـشار اکـسیژن شـریانی گروه هیپراکسی بسیار بالاتر (۸/۸±۳۵۲/۱ میـلی متـر



نمودار شـماره ۱: تغییـرات غلظـت اکـسیژن در گـروه هیپراکسی در واحد زمان



نمودار شماره ۲: تغییرات جریان خون مغزی قبل، حین و بعد از ایسکمی. مدل سکته
Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAO)

جیوه) از فشار اکـسیژن شـریانی در شـرایط نورموکـسی بـود (۹۲/۸±۱/۶۵ میلـی متـر جیـوه) (P<۰/۰۰۱). در بررسی تغییـرات جریـان خـون شـریان مرکـزی، جریـان خون مغزی حین ایسکمی به زیر ۲۵ درصـد خـط پایـه و طبیعی کاهش یافت (نمودار شماره ۲).

درمـدل MCAO(Middle Cerebral Artery Occlusion)، میانگین امتیاز نقص نورولوژیک، با به کار بردن هیپراکـسی، به طور قابل ملاحظه ای کاهش یافت. مهار PKC بـه وسـیله CHEL باعث افزایش میانگین امتیاز نقص نورولوژیـک، در گروه های نورموکسی و هیپراکسی شد، که این افـزایش در گروههای نورموکسی که CHEL دریافت کـرده بودنـد بـه طـور معنـی داری نـسبت بـه سـایر گـروه هـا بیـشتر بـود (P<۰/۰۵) (جدول شماره ۱).

در رت هایی که بـه واسـطه قـرار گـرفتن در معـرض MCAO هیچ گونه نقص نورولوژیک مشاهده نـشده بـود، بـا تزریق ایوانس بلو (EB)، این رنـگ در ناحیـه مرکـزی سـکته مـشاهده شـد. ایـن مـدرک نـشان داد کـه در کلیـه رت هـای مـذکور انسداد شریان مرکزی مغز صورت گرفته بود، ولی به دلیل پدیده تحمل به ایسکمی، به ویـژه در ناحیه قشـر مغـز، استحکام سـد خونی – مغزی افزایش یافته بود.

Archive of SID

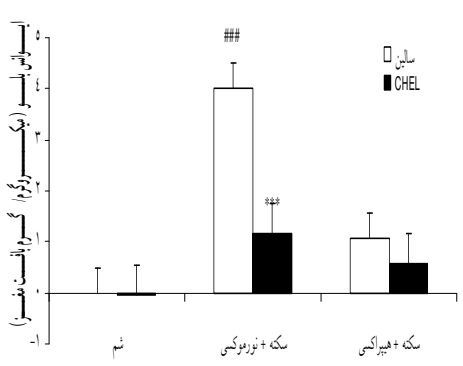
www.SID.ir

جدول شماره ۱: اثر هیپراکسی و CHEL بر نقایص نورولوژیک در گروه های سکته

گروه	تعداد نقص های نورولوژیک هر گروه					تعداد کل	میانه
	۰	۱	۲	۳	٤		
سکته	۱۰	٤	٤	٥	۱	۲٤	۲/۱۲
*سکته + هیپراکسی	۱۰	۸	٦	۰	۰	۲٤	۰/۸۳
**سکته + CHEL	۰	۱	٥	۹	۹	۲٤	۳/۰۸
†سکته +هیپراکسی +CHEL	٤	٥	۸	۲	٥	۲٤	۱/۹٥
کل	۲٤	۱۸	۲۳	۱٦	۱٥	۹٦	-

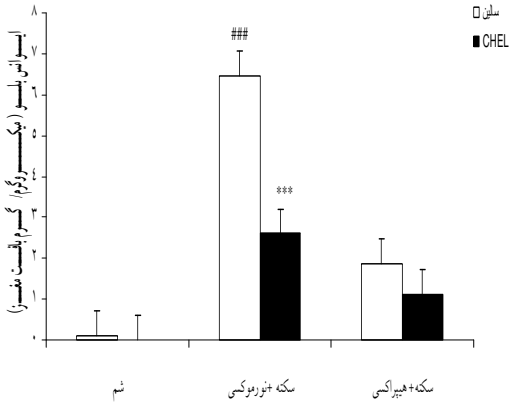
*$P<۰/۰۰۱$ نسبت به گروه سکته و سکته + CHEL $P=۰/۰۰۲$ نسبت به گروه سکته +هیپراکسی+CHEL
**$P<۰/۰۰۱$ نسبت به گروه سکته و $P=۰/۰۰۳$ نسبت به گروه سکته +هیپراکسی+CHEL †$P>۰/۰٥$ نسبت به گروه سکته
- امکان محاسبه وجود ندارد.

CHEL=Chelerythin Chloridc (1mg/kg)



نمودار شماره ۳: نفوذپذیری سد خونی – مغزی در ناحیه کرتکس گروه های مورد آزمایش
*** $P<۰/۰۰۱$ نسبت به گروه نورموکسی – سکته+ سالین و هیپراکسی–سکته +CHEL
$P<۰/۰۰۱$ نسبت به گروه شم. شم: نورموکسی

CHEL =Chelerythin Chlordc (1mg/kg)



نمودار شماره ۴: نفوذپذیری سد خونی – مغزی در ناحیه مرکز گروه های مورد آزمایش
*** $P<۰/۰۰۱$ نسبت به گروه نورموکسی – سکته+ سالین و هیپراکسی–سکته +CHEL
$P<۰/۰۰۱$ نسبت به گروه شم. شم: نورموکسی

CHEL =Chelerythin Chlordc (1mg/kg)

تشکیل ادم مغزی در گروه های نورموکسی – سکته در هر دو ناحیه کرتکس و مرکز، با افزایش نفوذپذیری سد خونی – مغزی در ۲۴ ساعت مرتبط بود. در هر دو ناحیه مغز، گروه های نورموکسی – سکته در مقایسه با گروه های شم افزایش معنی داری در خروج ایوانس بلو داشتند. در گروه نورموکسی - سکته که CHEL دریافت نموده بودند در مقایسه با گروه نورموکسی – سکته، نفوذپذیری سد خونی – مغزی و خروج ایوانس بلو به طور معنی داری در هر دو ناحیه کاهش یافت ($P<۰/۰۰۱$). در گروه های هیپراکسی - سکته و هیپراکسی – سکته + CHEL، در مقایسه با گروه نورموکسی – سکته، میزان نفوذپذیری سد خونی – مغزی و خروج ایوانس بلو در هر دو ناحیه به طور معنی دار کاهش یافت ($P<۰/۰۰۱$) (نمودارهای شماره

www.SID.ir

۳ و ۴). در گروه های انسداد شریان مرکزی مغز، ایوانس بلو عموماً در ناحیه مرکزی دیده می شد.

بحث:

بر اساس نتایج به دست آمده از این مطالعه، در گروههای سکته، هر دو ناحیه کرتکس و نواحی مرکزی مغز میزان نفوذپذیری سد خونی – مغزی در مقایسه با گروه های کنترل به طور معنی داری افزایش یافت. این یافته با مطالعات قبلی انجام شده در این زمینه مطابق است (۲۱،۷). سد خونی – مغزی به واسطه اتصالات محکم اندوتلیال عروق شکل گرفته، تغییرات التهابی نورون ها می توانند سبب تخریب این سد و در نتیجه مرگ سلولی شوند (۲۲). مطالعات نشان داده که شکسته شدن سد خونی – مغزی می تواند نتیجه فعال شدن متالوپروتئینازهای ماتریکس که خانواده ای از اندوپپتیدازها هستند باشد. سوبسترای اختصاصی این آنزیم ها پروتئین های موجود در ماتریکس خارج سلولی اندوتلیالی مانند فیبرونکتین، لامینین و کلاژن هستند. سلول های اندوتلیالی، گلیاها، پریسیتها و نورونها می توانند اشکال غیر فعال این آنزیم ها را بیان کنند (۲۳) که این اشکال غیر فعال توسط فرآیندهایی چون التهاب به فرم فعال تبدیل می شوند. نشان داده شده که متالوپروتئینازهای ماتریکس می توانند سبب مهاجرت نوتروفیل ها به بافت و در نتیجه ایجاد چرخه معیوب برای افزایش التهاب شوند (۲۴). مطالعات همچنین اثر متالوپروتئینازهای ماتریکس بر تخریب پروتئین های مسئول ایجاد اتصالات محکم، از جمله اکلودین و کلودین طی ایسکمی را نشان داده است (۲۵). آزمایش های ما در حمایت از کارهای قبلی نشان داد که پیش شرطی سازی با هیپراکسی نورموباریک می تواند باعث کاهش امتیاز نقص نورولوژیکی و بهبود عملکرد سد خونی – مغزی شود (۷). اگرچه نتایج این تحقیق نشان می دهد که هیپراکسی در مغز رت به واسطه کاهش میزان نفوذپذیری سد خونی – مغزی و بهبود نقص نورولوژیک، حفاظت عصبی القاء می کند، اما هیپراکسی آثار دیگری نیز دارد که می تواند به واسطه آنها تحمل به ایسکمی را در مغز رت تقویت نماید. این آثار عبارتند از: هیپراکسی می تواند باعث رگ زایی و افزایش تراکم عروق در واحد حجم شود (۲۶). هیپراکسی می تواند باعث مهار تجمع نوتروفیل ها شود و از آسیب مغزی بکاهد (۲۷). Wada و همکارانش نشان دادند که گونه های آزاد اکسیژن و Bcl-2 که به عنوان مهار کننده آپوپتوز عمل می کنند، بعد از قرار گرفتن مکرر در معرض هیپراکسی افزایش می یابند و باعث افزایش توان زیستی نورونی می شوند (۲۸). از طرف دیگر، افزایش رادیکال های آزاد اکسیژن و سوپراکسید دیسموتاز با کاهش بیان فاکتور القائی HIF1α ارتباط دارد که گفته می شود عملکرد سد خونی – مغزی را از طریق کاهش HIF1α عروقی بهبود می بخشد (۲۹).

مهار PKC به طور معنی داری موجب کاهش نفوذپذیری سد خونی – مغزی هر دو ناحیه مغز، در گروه های سکته شد. این در حالی است که مهار PKC تقریباً اثری معادل با هیپراکسی داشت. PKC، نوعی سرین – ترئونین کیناز است که نقش مهمی در تعدیل نفوذپذیری سد خونی – مغزی و تنظیم اتصالات محکم دارد. PKC ۱۱ ایزوزیم دارد. ایزوفورم های PKC آنزیم های هموگ، با اعمال ویژه می باشند که موقعیت Subcellular دارند، که تعدادی از آنها برای فعال شدن نیاز به کلسیم دارند (α, γ, BI, BII). اما μ, ε, η, δ, θ, ζ, λ مستقل از کلسیم عمل می کنند. کلسیم در روند آبشاری فسفوریلاسیون پروتئین هایی نظیر اکتین و پروتئین های درگیر در ساختار سد خونی – مغزی، واسطه بوده و به موجب فسفوریلاسیون، انسجام سد خونی – مغزی را کاهش می دهند. در زمان ایسکمی α, BI, BII فعال شده و نفوذپذیری سد کاهش میابد اما با هیپراکسی زیر واحدهای μ, ε, η, δ, θ, ζ, λ فعالند (۳۰). اگر چه در پژوهش حاضر با مهار PKC، از

Archive of SID

www.SID.ir

فعالیت زیر واحدهای وابسته به کلسیم جلوگیری شد که نتیجه آن بهبود عملکرد سد خونی – مغزی بود اما اثر هیپراکسی در گروه های دریافت کننده مهار با گروه هایی که سالین دریافت کردند تفاوت معنی داری نداشت، که بیانگر این مطلب است که هیپراکسی و PKC از مسیرهایی متفاوت در بهبود عملکرد سد خونی – مغزی نقش دارند و این احتمال وجود دارد که هیپراکسی از طریق مسیرهایی خاص منجر به فعال شدن زیر واحدهایی از PKC شده که مستقل از کلسیم عمل می کنند.

همچنین امتیاز نقص نورولوژیکی در گروه های هیپراکسی کاهش معنی داری را نشان داد، این یافته در تایید کارهای قبلی انجام شده است (۲۱،۷). علاوه بر این هیپراکسی امتیاز تقص نورولوژیک در گروه های دریافت کننده CHEL را کاهش داد، این آثار می توانند تا حدی تحمل به ایسکمی را وساطت کند و اهمیت هیپراکسی و PKC در بهبود عملکرد رفتاری را نشان می دهد. بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق به نظر می رسد از یک طرف PKC در بهبود فعالیت های عملکردی رفتاری موثر باشد و از طرف دیگر با مهار آن عملکرد سد خونی – مغزی بهبود می یابد. با در نظر گرفتن این نکته که PKC چندین زیر واحد دارد، احتمال درگیری انواعی از این زیر واحدها در شرایط متفاوت وجود دارد که در کارهای آینده، با استفاده از متدهای مولکولی می توان میزان بیان هر یک از ایزوزیم های PKC، گروه های ذکر شده در آزمایش ما را مورد بررسی قرار داد تا بتوان قضاوت دقیق تری ارائه نمود و سپس با استفاده از آگونیست و یا آنتاگونیست های متناسب، مسیر مورد نظر موثر را انتخاب نمود. به منظور بررسی مکانیسم دقیق و اینکه چگونه به کارگیری همزمان هیپراکسی و PKC منجر به بهبود عملکرد رفتاری است، مطالعات بیشتری لازم است.

نتیجه گیری:

هیپراکسی در زمان سکته باعث کاهش میزان نقص نورولوژیک و بهبود عملکرد سد خونی – مغزی می شود. مهار PKC باعث افزایش میزان امتیاز نقاص نورولوژیک و بهبود عملکرد سد خونی – مغزی است. هیپراکسی اثر قابل توجهی بر فعالیت PKC در استحکام سد خونی – مغزی نداشته و از مسیری مستقل عمل کرده، اما موجب کاهش امتیاز نقص نورولوژیک در گروه های با مهار PKC می شود. احتمالاً هیپراکسی در استحکام سد خونی – مغزی از طریق مسیرهایی متفاوت از PKC عمل می کند و یا سبب فعال شدن زیر واحدهایی از PKC می شود که مستقل از کلسیم هستند. این آثار تا حدی می تواند تحمل به ایسکمی را وساطت کند. لذا، طراحی موادی که قادر به تقلید آثار انسداد گذرای شریان مرکزی باشند، روش و استراژی جدیدی در پیدایش داروها به وجود خواهد آورد که در به حداقل رساندن آسیب های نورونی طی ایسکمی موثر خواهد بود.

تشکر و قدردانی:

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس تهران انجام شده است. از مشاوره علمی و موثر دکتر مانی و همکاری خانم ها فاطمه محققی و اعظم عسگری نیز تشکر و قدردانی می شود.

منابع:

1. Murray C, Lopez A. Mortality by cause for eight regions of the world Global Burden of Disease Study. Lancet. 1997 May; 349(9061): 1269-76.

Archive of SID
www.SID.ir

2. Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Hata R, Ueda H, Niinobe M, et al. Ischemic tolerance phenomenon found in the brain. Brain Res. 1990 Sep; 528(1): 21-4.

3. Motabagani M. Histological changes in the alveolar structure of the rat lung after exposure to hyperoxia. Ital J Anat Embryol. 2005 Oct-Dec; 110(4): 209-23.

4. Gidday J, Fitzgibbons J, Shah A, Park T. Neuroprotection from ischemic brain injury by hypoxic preconditioningin the neonatal rat. Neurosci Lett. 1994 Feb; 168(1-2): 221-4.

5. Kato H, Liu Y, Araki T, Kogure K. but not anisomycin, inhibits the induction of tolerance to ischemia in the gerbil hippocampus. Neurosci Lett. 1992; 139: 118-21.

6. Ohtsuki T, Matsumoto M, Kuwabara K, Kitagawa K, Suzuki K, Taniguchi N, et al. Influence of oxidative stress on induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. Brain Res. 1992 Dec; 599(2): 246-52

7. Bigdeli MR, Hajizadeha S, Foroozandeh M, Rasulian B, Heidarianpour A, Khoshbaten A. Prolonged and intermittent normobaric hyperoxia induce different degrees of ischemic tolerance in rat brain tissue. Brain Res. 2007 Jun; 1152: 228-33.

8. Prass K, Wiegand F, Schumann P, Ahrens M, Kapinya K, Harms C, et al. Hyperbaric oxygenation induced tolerance against focal cerebral ischemia in mice is strain dependent. Brain Res. 2000 Jul; 871(1): 146-50.

9. Ravati A, Ahlemeyer B, Becker A, Klumpp S, Krieglstein J. Preconditioning-induced neuroprotection is mediated by reactive oxygen species and activation of the transcription factor nuclear factor-κB. J Neurochem. 2001 Aug; 78(4): 909-19.

10. Shin H, Dunn A, Jones P, Boas D, Lo E, Moskowitz M, et al. Normobaric hyperoxia improves cerebral blood flow and oxygenation, and inhibits peri-infarct depolarizations in experimental focal ischaemia. Brain. 2007 Jun; 130(Pt 6): 1631-42

11. Bigdeli MR, Khoshbaten A. In vivo preconditioning with normobaric hyperoxia induces ischemic tolerance partly by triggering tumor necrosis factor-α converting enzyme/tumor necrosis factor-α/nuclear factor. Neuroscience. 2008 May; 153(3): 671-8.

12. Warner D, Sheng H, Batinić-Haberle I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. Experimental Biology. J Exp Biol. 2004 Aug; 207(Pt 18): 3221-31.

13. Perez-Pinzon MA, Dave KR, Raval AP. Role of Reactive Oxygen Species and Protein Kinase C in Ischemic Tolerance in the Brain. Antioxid Redox Signal. 2005 Sep-Oct; 7(9-10): 1150-7.

14. Thornton J, Striplin S, Liu G, Swafford A, Stanley A, Van Winkle D, et al. Inhibition of protein synthesis does not block myocardial protection afforded by preconditioning. Am J Physiol. 1990 Dec; 259(6 Pt 2): H1822-5.

15. Tamatani M, Mitsuda N, Matsuzaki H, Okado H, Miyake S, Vitek M, et al. A pathway of neuronal apoptosis induced by hypoxia/reoxygenation: roles of nuclear factor-kappaB and Bcl-2. J Neurochem. 2000 Aug; 75(2): 683-93.

16. Grabb M, Choi D. Ischemic tolerance in murine cortical cell culture: critical role for NMDA receptors. J Neurosci. 1999 Mar; 19(5): 1657-62.

17. Chen L, Hahn H, Wu G, Chen C, Liron T, Schechman D, et al. Opposing cardioprotective actions and parallel hypertrophic effects of delta PKC and epsilon PKC. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Sep; 98(20): 11114-9.

18. Harhaj N, Felinski E, Wolpert E, Sundstrom J, Gardner T, Antonetti D. VEGF activation of protein kinase C stimulates occludin phosphorylation and contributes to endothelial permeability.. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006 Nov; 47(11): 5106-15.

Archive of SID

www.SID.ir

19. Bigdeli MR, Rasoulian B, Meratan AA. In vivo normobaric hyperoxia preconditioning induces different degrees of antioxidant enzymes activities in rat brain tissue. Eur J Pharmacol. 2009 Jun; 611(1-3): 22-9.

20. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke. 1989 Jan; 20(1): 84-91

21. Mohagheghi F, Bigdeli MR, Rasoulian B, Hashemi P, Rashidi Pour M. The neuroprotective effect of olive leaf extract is related to improved blood–brain barrier permeability and brain edema in rat with experimental focal cerebral ischemia. Phytomedicine. 2011; 18(2-3): 170-5.

22. Lakhan SE, Kirchgessner A, Hofer M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic Approaches. J Transl Med. 2009 Nov; 7: 97

23. Del Zoppo G. Microglial activation and matrix protease generation during focal cerebral ischemia. Stroke. 2007 Feb; 38(2 Suppl): 646-51.

24. Karin E, Sandoval, Ken A. Witt Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. Neurobiol Dis. 2008 Nov; 32(2):200-19.

25. Yang Y. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. J Cereb Blood Flow Metab. 2007 Apr; 27(4): 697-709.

26. Helms A, Whelan H, Torbey M. Hyperbaric oxygen therapy of cerebral ischemia. Cerebrovasc Dis. 2005; 20(6): 417-26.

27. Zhang R, Chopp M, Jiang N, Tang W, Protak J, Manning A, et al. Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient but not permanent middle cerebral artery occlusion in the Wistar rat. Stroke. 1995; 26: 1438−43.

28. Wada K, Kiyazawa T, Nomura N, Yano A, Tsuzuki N, Nawashiro H, et al. Mn - SOD and Bcl-2 expression after repeated hyperbaric oxygenation. Acta Neurochir Suppl. 2000; 76: 285-90.

29. Ostrowski R, Colohan A, Zhang J. Mechanisms of hyperbaric oxygen-induced neuroprotection in a rat model of subarachnoid hemorrhage. J Cereb Blood Flow Metab. 2005 May; 25(5): 554-71.

30. Fleegal MA, Hom S, Borg LK, Davis TP. Activation of PKC modulates blood-brain barrier endothelial cell permeability changes induced by hypoxia and posthypoxic reoxygenation. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005 Nov; 289(5): H2012-9.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2012 July, Aug; 14(3): 40-50. *Original article*

Effect of intermittent normobaric hyperoxia and PKC activity on blood - brain barrier (BBB) permeability

Alaviyan F (PhD student)[1], Hajizadeh S (PhD)[1]*, Bigdely MR (PhD)[2], Javan M (PhD)[1]
[1]Psychiatry Dept., Tarbiat Modares University, Tehran, I.R.Iran; [2]Biology sciences Dept., Shahid Behshti University, Tehran, I.R.Iran.
Received: 6/Nov/2011 Revised: 14/Feb/2012 Accepted: 21/Apr/2012

Background and aims: Studies have recently shown that intermittent normobaric hyperoxia has a significant therapeutic effect on the treatment of acute ischemia, this effect so-called preconditioning. In this study intermittent normobaric effect of hyperoxia and PKC activity in the BBB permeability and behavioral assessment were evaluated.
Methods: In this experimental study 36 wistar rat were divided to 6 groups as follow: normoxi (shem), normoxi+CHEL, normoxi+halt, normoxi+halt+CHEL, hyproxi+halt, hyperoxi+halt+CHEL, (n=6) in each group. Chelerythrin chlorid (CHEL) was used as a systemically inhibitor of PKC. 24 hours later, rats were subjected to 60 min of right middle cerebral artery occlusion (MCAO). The hyperoxia and normoxia groups were exposed to 95% and 21% respectively, for 4 h/day, 6 continuous days. After 24 h reperfusion, neurological deficit scores and BBB permeability was assessed. Data were analyzed using two way ANOVA and Bonferroni test.
Results: Preconditioning with intermittent normobaric hyperoxia decreased neurologic deficit scores and BBB permeability. Inhibition of PKC resulted in the increase of neurologic deficit scores; which improved with hyperoxia ($P<0.001$). PKC inhibition, independent of hyperoxia improved the BBB function ($P<0.001$).
Conclusion: With the deployment of hyperoxia and specific subunits of PKC during the stroke, stability of BBB integrity and improvement of neurological deficit scores occur.

Keyword: **Chelerythrin chloride, Stroke, Preconditioning, PKC, Hyperoxia.**

Archive

Cite this article as: Alaviyan F, Hajizadeh S, Bigdely MR, Javan M. Effect of intermittent normobaric hyperoxia and PKC activity on blood - brain barrier (BBB) permeability. J Sharekord Univ Med Sci. 2012 July, Aug; 14(3): 40-50.

*Corresponding author:
Medical physiology Dept., Medical faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. Iran, Tel: 00982182884521, E-mail:hajizads@modares.ac.ir

www.SID.ir