

Evaluating the Effect of Estrogen and Progesterone on Expression of EAAT2 and EAAT3 Glutamate Transporters Following Focal Cerebral Ischemia in Rats

Majid Amiri Motlagh¹, Mohammad Ali Atlasi², Zeinab Vahidinia¹, Sayyed Alireza Talaei³, Zeinab Rezazadeh Lavaf⁴, Abolfazl Azami Tameh^{2*}

1. M.Sc Student, Anatomical Sciences Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran
2. Associate Professor, Anatomical Sciences Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran
3. Assistant Professor, Physiology Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran
4. B.Sc Student, Anatomical Sciences Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

Received: 14 Jun 2017, Accepted: 12 Jul 2017

Abstract

Background: Glutamate is the most widespread excitatory neurotransmitter in the mammalian central nervous system (CNS) and plays major role in the pathogenesis of ischemia brain injury. Glutamate transporters have a major role in glutamate removal and maintain its concentration below excitotoxic levels. Although estrogen's and progesterone's neuroprotective effects were well-described, the exact molecular mechanism has yet to be determined. This study has investigated estrogen and progesterone effect on glutamate transporters expression in the ischemic penumbra/peri-infarct region in rat.

Materials and Methods: Adult male Wistar rats were subjected to transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO) for 1 h. Estrogen and progesterone combination was immediately injected after tMCAO subcutaneously. Sensorimotor functional tests for evaluating behavioral deficits and TTC staining for measurement of infarct volume were performed 24 h after MCAO. Real-time PCR technique was used for gene expression analysis of glutamate transporters EAAT2 and EAAT3.

Results: The combination of estrogen and progesterone could significantly reduce lesion volume. Also, hormone therapy could improve ischemic neurological disorders. After hormone therapy, gene expression of glutamate transporters EAAT2 and EAAT3 did not show significant changes.

Conclusion: Combined estrogen–progesterone treatment significantly reduces neurological deficits and infarct volume; these effects are independent of the glutamate transporters signaling pathways.

Keywords: Estrogen, Glutamate transporters, Ischemic stroke, Progesterone, Rats

*Corresponding Author:

Address: Anatomical Sciences Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

Email: aazami@kaums.ac.ir

بررسی تأثیر هورمون‌های استروژن و پروژسترون بر تغییرات بیان ژن انتقال دهنده‌های EAAT2 و EAAT3 گلوتامات به دنبال مدل ایسکمی مغزی فوکال در موش صحرائی

مجید امیری مطلق^۱، محمدعلی اطلسی^۲، زینب وحیدی نیا^۱، سید علیرضا طلایی^۳، زینب رضازاده لواف^۴، ابوالفضل اعظمی طامه*

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران
۲. دانشیار، مرکز تحقیقات علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران
۳. استادیار، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران
۴. دانشجوی کارشناسی، مرکز تحقیقات علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۳/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۶/۴/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: گلوتامات فراوان‌ترین نوروترانسمیتر تحریکی در مغز پستانداران است و نقش عمده‌ای در پاتوژنز آسیب مغزی ایسکمیک بازی می‌کند. انتقال دهنده‌های گلوتامات نقش اصلی در خارج‌سازی گلوتامات دارند و غلظت آن را در مقادیری کم‌تر از مقادیر ایجاد کننده سمیت تحریکی حفظ می‌کنند. نقش حفاظت عصبی استروژن و پروژسترون در برابر آسیب ایسکمیک مشخص شده است؛ با این وجود، مکانیسم مولکولی آن به طور کامل مشخص نیست. این مطالعه به تأثیر هورمون استروژن و پروژسترون بر بیان انتقال دهنده‌های گلوتامات در ناحیه حاشیه ایسکمی در موش صحرائی می‌پردازد.

مواد و روش‌ها: موش‌های صحرائی نر بالغ نژاد ویستار در معرض انسداد موقتی شریان مغزی میانی (MCAO) برای یک ساعت قرار گرفتند و بلافاصله بعد از آن دوز ترکیبی استروژن و پروژسترون به حیوان‌ها تزریق شد. تست عملکرد حسی حرکتی برای ارزیابی نقایص رفتاری و رنگ‌آمیزی TTC جهت بررسی تغییرات حجم ناحیه اینفارکت ۲۴ ساعت بعد از MCAO انجام شد. از تکنیک real-time PCR برای مطالعه میزان بیان ژن انتقال دهنده‌های گلوتامات EAAT2 و EAAT3 استفاده شد.

یافته‌ها: دوز ترکیبی استروژن و پروژسترون به طور معنی‌داری توانست حجم ضایعه را کاهش دهد. هم‌چنین، هورمون درمانی توانست اختلالات عصبی حرکتی را در موش‌های ایسکمیک بهبود دهد. بررسی‌های میزان بیان ژن انتقال دهنده‌های گلوتامات EAAT2 و EAAT3 تغییر معنی‌داری را بعد از هورمون درمانی نشان ندادند.

نتیجه‌گیری: دوز ترکیبی استروژن و پروژسترون می‌تواند حجم ضایعه را کاهش داده و اختلالات عصبی حرکتی را در موش‌های ایسکمیک بهبود دهد، اگرچه این بهبودی مستقل از مسیر سیگنالی انتقال دهنده‌های گلوتامات است.

واژگان کلیدی: استروژن، انتقال دهنده‌های گلوتامات، سکنه مغزی ایسکمیک، پروژسترون، موش صحرائی

*نویسنده مسئول: ایران، کاشان، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات علوم تشریح

Email: aazami@kaums.ac.ir

مقدمه

سکته مغزی دومین علت شایع مرگ و میر و علت اصلی ناتوانی‌های نورولوژیکی طولانی مدت است (۱). حدود ۸۷ درصد سکته‌های مغزی ناشی از انسداد عروقی توسط ترومبوز یا آمبولی (نوع ایسکمیک) و ۱۳ درصد ناشی از پاره شدن عروق مغزی (نوع هموراژیک) می‌باشد (۲). به دنبال سکته مغزی، آبشاری از وقایع مولکولی شامل سمیت تحریکی، افزایش سطح کلسیم داخل سلولی، استرس اکسیداتیو و التهاب شروع می‌شوند که در نهایت به مرگ سلولی نکروتیک و آپوپتوتیک منتج می‌شوند (۲). زمانی که ایسکمی مغزی رخ می‌دهد، سلول‌های ناحیه مرکز ایسکمی (Core)، دستخوش مرگ سلولی نکروتیک شده و از بین می‌روند. درحالی که در حاشیه آن منطقه‌ای وجود دارد که جریان خون ضعیفی از عروق جانبی می‌گیرد (Penumbra) و قابلیت نجات از طریق درمان‌های پس از سکته برای آن‌ها وجود دارد. بنابراین یکی از اهداف اصلی مداخلات نوروپروتکتیو حفاظت و نجات نورون‌ها در این منطقه است (۴). گلوتامات نوروترانسمیتر تحریکی عمده در سیستم عصبی مرکزی پستانداران بوده و به عنوان عامل نوروتوکسیک در چندین اختلال عصبی مثل ایسکمی و صرع در نظر گرفته می‌شود. در طول ایسکمی، گلوتامات در مقادیر زیاد از نورون‌ها و آستروسیت‌ها به فضای خارج سلولی آزاد شده و سبب افزایش کلسیم سلولی اساساً از طریق اثر روی گیرنده‌های (N-methyl-D-aspartate (NMDA) نفوذپذیر به کلسیم می‌شود. مقدار اضافی کلسیم منجر به نکروز و فروپاشی ساختارهای سلول شامل پروتئین‌ها، DNA و فسفولیپیدهای غشایی می‌شود (۵). در شرایط فیزیولوژیکی، گلوتامات آزاد شده در فضای سیناپسی سریعاً توسط انتقال دهنده‌های اسید آمینه تحریکی transporters excitatory amino acid (EAATs) که روی آستروسیت‌ها و نورون‌ها قرار گرفته‌اند، برداشت می‌شود (۶). EAATها نقش اصلی در خارج سازی گلوتامات دارند و غلظت آن را در مقادیری کم‌تر از مقادیر ایجادکننده

سمیت تحریکی حفظ می‌کنند. تاکنون ۵ انتقال دهنده با تمایل بالای اتصال به گلوتامات و وابسته به سدیم که عبارتند از ۵- EAAT ۱ شناسایی شده‌اند. EAAT1 و EAAT2 اغلب در سلول‌های آستروگلیال قرار دارند. در حالی که EAAT3 و EAAT4 در غشای نورونی توزیع شده‌اند. EAAT3 فراوان‌ترین انتقال دهنده نورونی است و به طور برجسته در نورون‌های هیپوکامپ، مخچه و عقده‌های قاعده‌ای حضور دارد. EAAT5 در سلول‌های عقده‌ای شبکه و در گیرنده‌های نوری و سلول‌های دو قطبی واقع در شبکه قرار گرفته است (۷). شواهدی وجود دارد که اختلال در انتقال گلوتامات به دلیل کاهش یا از دست دادن فعالیت یا بیان انتقال دهنده آن می‌تواند به عنوان یک دلیل اصلی برای تعدادی از اختلالات عصبی باشد (۸). با وجود پیشرفت‌ها درباره پاتوفیزیولوژی ایسکمی، تعداد مداخلات موجود برای درمان سکته ایسکمیک بسیار محدود است و موثرترین روش شناخته شده آن استفاده از فعال کننده پلازمینوژن بافتی (tPA) (Tissue plasminogen activator) است، ولی با توجه به این موضوع که بازه زمانی درمان با tPA ۳ ساعت است، بنابراین فقط درصد کمی از بیمارانی که دچار سکته ایسکمیک حاد شده‌اند، قادر به دریافت آن هستند. در ضمن درمان ترومبولیتیک خطر خون‌ریزی مغزی را افزایش می‌دهد که این موضوع می‌تواند استفاده از این دارو را برای بیماران محدود کند. بنابراین نیاز حیاتی برای توسعه درمان‌های جایگزین وجود دارد (۹). مطالعات نشان داده‌اند که هورمون‌های استروئیدی مثل استروژن و پروژسترون اثرات حفاظت عصبی قابل توجهی بر علیه بیماری‌های نورودژنراتیو دارند (۱۰). استفاده از استروژن و پروژسترون به تنهایی یا به صورت ترکیبی فوراً قبل یا بعد از ایسکمی مغزی موقتی، حجم اینفارکت و نقایص رفتاری همراه با سکته مغزی را در هر دو جنس در مدل‌های حیوانی کاهش می‌دهد (۱۱). اگرچه استروژن و پروژسترون به عنوان عوامل حفاظت عصبی شناخته می‌شوند، مکانیسم دقیق حفاظت عصبی ناشی از آن‌ها هنوز به طور کامل مشخص نشده است. شواهد نشان می‌دهند که اثر حفاظت عصبی

حیوان‌ها علاوه بر ایسکمی موقت یک ساعته، دوز ترکیبی هورمون استروژن و پروژسترون را دریافت کردند.

روش جراحی و ایجاد مدل ایسکمی مغزی موضعی

برای القای ایسکمی موضعی موقتی از روش فیلامنت یا انسداد داخل عروقی که قبلاً شرح داده شده با اصلاحات جزئی استفاده شد (۱۱). به طور خلاصه حیوان‌ها با گاز ایزوفلوران ۳ درصد (Baxter, USA) بیهوش شدند و روند بیهوشی با ایزوفلوران ۳-۱ درصد به همراه مقدار یک لیتر در دقیقه اکسیژن از طریق ماشین بیهوشی ایزوفلوران (Eickemeyer, Germany) ادامه یافت. پوست ناحیه سر در خط وسط برش داده شد تا نقطه برگما، درز ساژیتال و کروئال نمایان شوند، سپس استخوان جمجمه با مختصات ۴ میلی‌متر خارج و ۲ میلی‌متر خلف نقطه برگما در دو طرف نازک و نوک پروب سیستم لیزر داپلر (Moor Instruments, England) در روی نقطه نازک شده با چسب مخصوص ثابت شده و جریان خون MCA (Middle Cerebral Artery) دو نیمکره ثبت شد. نقطه نصب پروب به طور غیر مستقیم بر روی تته شریان مغزی میانی قرار داشته و مانیتور دستگاه عددی را به عنوان مبنای پایه جریان خون در این شریان نشان می‌داد. سپس حیوان‌ها را به وضعیت سوپاین روی warm pad با دمای 37 ± 0.5 درجه خوابانده و دست‌ها در طرفین ثابت شدند و یک برش طولی در خط وسط قسمت قدامی گردن آن‌ها ایجاد گردید. بعد از کنار زدن پوست، غدد بزاقی و عضلات، غلاف کاروتید در معرض دید قرار گرفت، به دنبال آن شریان کاروتید مشترک و شاخه‌هایش از بافت هم‌بند و عصب واگ جدا شدند. مونوفیلانت مخصوص (Middle Cerebral Artery Occlusion) MCAO (Doccol, USA) با پوشش سیلیکون (Doccol, USA) با ایجاد برش کوچکی به داخل شریان کاروتید مشترک و سپس شاخه داخلی آن هدایت شد تا یک مقاومت ظریف در مقابل هدایت کاتتر به سمت جلو احساس شود و جریان خون (CBF) (Cerebral Blood Flow) به کمتر از نصف جریان مبنای ثبت شده برسد. این مقاومت ظریف

استروژن ممکن است از طریق سیستم‌های نوروترنسمیتر تحریکی به خصوص گیرنده‌ها و انتقال دهنده‌های گلوتامات میانجی‌گری شود (۱۲). مشخص شده است که استروژن بیان انتقال دهنده‌های گلوتامات EAAT1 و EAAT2 را در آستروسیت‌ها افزایش می‌دهد که این می‌تواند یک مکانیسم حفاظت عصبی کلیدی به وسیله کاهش سطح گلوتامات خارج سلولی باشد (۱۳). با توجه به اهمیت انتقال دهنده‌های گلوتامات در حفاظت عصبی، در این مطالعه به بررسی تأثیر استروژن و پروژسترون بر روند بیان دو انتقال دهنده گلوتامات EAAT2 و EAAT3 پس از ایسکمی در موش صحرائی پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر یک مطالعه مشاهده‌ای و مداخله‌ای می‌باشد که بر روی ۳۰ سر موش صحرائی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۳۰۰-۲۳۰ گرم که در بخش حیوان‌خانه دانشگاه علوم پزشکی کاشان پرورش یافته بودند انجام گرفت. قبل از شروع فرآیند پژوهش، مجوز کار با حیوانات از کمیته اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی کاشان دریافت شد. حیوانات در قفس‌های استاندارد و محیط کنترل شده (دمای $22-24^{\circ}\text{C}$ و چرخه ۱۲ ساعت روشنایی/تاریکی) با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. این مطالعه با تصویب کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کاشان و طبق پروتکل اصول کار با حیوانات انجام گردید.

گروه‌های آزمایش

موش‌ها به طور تصادفی به سه گروه (۶ سر موش در هر گروه) تقسیم شدند که عبارت بودند از: گروه کنترل؛ در این گروه جراحی بدون انسداد شریان مغزی میانی انجام گرفت، گروه ایسکمی؛ در این گروه حیوانات در معرض ایسکمی موقت یک ساعته قرار گرفتند و گروه هورمون؛ در این گروه

شمارش تعداد جداره‌های لمس شده طی یک دقیقه ارزیابی شد: اگر طی این زمان حیوان حرکت نکرده و هیچ جداری را لمس نمی‌کرد نمره صفر می‌گرفت، اگر شدیداً حیوان تحت تأثیر قرار گرفته و در راه رفتن تلو تلو می‌خورد و قادر به بلند شدن برای لمس جداره‌ها نبود نمره ۱ دریافت می‌کرد، اگر حیوان مختصر تحت تأثیر قرار گرفته و به اطراف حرکت کرده اما جداری را لمس نمی‌کرد و در حرکت کردن مردد بود، با این حال سرانجام به سمت یکی از لبه بالایی بلند می‌شد نمره ۲ می‌گرفت و اگر به اطراف حرکت کرده و در جعبه دور زده و حداقل سه جدار را لمس می‌کرد نمره ۳ دریافت می‌کرد.

توانایی کشیدن دست‌ها با بلند کردن حیوان به وسیله دم از لبه میز و مشاهده تناسب و تقارن کشیدن اندام‌های جلویی ارزیابی شد: اگر اندام جلویی سمت راست حرکت نمی‌کرد و کاملاً به سینه چسبیده بود نمره صفر می‌گرفت، اگر اندام جلویی سمت راست را کمی حرکت می‌داد ولی کشیده نمی‌شد نمره ۱ دریافت می‌کرد، اگر اندام جلویی سمت راست کمتر از چپ کشیده می‌شد نمره ۲ می‌گرفت و اگر هر دو اندام جلویی راست و چپ کاملاً کشیده شده و مثل هم بود نمره ۳ دریافت می‌کرد. رفتار راه رفتن با قرار دادن حیوان روی زمین و مشاهده نوع راه رفتن ارزیابی شد: اگر حیوان هیچ حرکتی نداشت نمره صفر می‌گرفت، اگر متمایل به راست راه می‌رفت نمره ۱ دریافت می‌کرد، اگر دور خود می‌چرخید نمره ۲ می‌گرفت و اگر مستقیم راه می‌رفت نمره ۳ دریافت می‌کرد.

توانایی بالارفتن از سطح شیب‌دار با قرار دادن حیوان روی یک نردبان شیب‌دار با ارتفاع یک متر که فاصله بین پله‌های آن حدود ۱/۵ سانتی‌متر و عرض آن ۳۰ سانتی‌متر بود ارزیابی شد: اگر حیوان نمی‌توانست از نردبان بالا برود و به جای صعود دور خود چرخیده یا می‌افتاد نمره ۱ دریافت می‌کرد، اگر سمت راست حیوان ضعیف بود و نمی‌توانست به محکمی سمت چپ به نرده‌ها چنگ زده و به زور بالا می‌رفت نمره ۲ می‌گرفت و اگر راحت بالا رفته و محکم به نرده‌های نردبان چنگ می‌زد نمره ۳ دریافت می‌کرد.

نشان‌گر آن است که سر حلقوی کاتتر، شریان مغزی میانی را در محل خروج از حلقه ویلیس مسدود کرده است؛ در این حالت، شریان مغزی میانی چپ از خون‌رسانی توسط حلقه ویلیس محروم می‌شود. بدین ترتیب خون‌رسانی در شریان مغزی میانی قطع و ناحیه‌ای از مغز که توسط این شریان خون‌رسانی می‌شود دچار ایسکمی می‌شود. پس از ۶۰ دقیقه مونوفیلانت به آرامی خارج شده و خون‌رسانی مجدد برقرار شد. در این حالت خون از طریق حلقه ویلیس دوباره به شریان مغزی میانی باز می‌گردد و ریپرفیوژن اتفاق می‌افتد که دستگاه لیزرداپلر تا نزدیکی عدد مبنا افزایش می‌یابد. سپس محل جراحی بخیه زده شد و حیوان به قفس برگردانده شد. لازم به ذکر است که فقط حیواناتی در این مطالعه وارد شدند که افت جریان خون بیش از ۵۰ درصد داشتند و حیواناتی که دچار هموراژی شدند از مطالعه حذف شدند.

روش تزریق هورمون به حیوان

استروئیدها (Sigma, Germany) ابتدا در اتانول حل شدند و سپس در روغن کنجد رقیق شدند تا غلظت نهایی آن‌ها در حجم $1500 \mu\text{l}$ به دست بیاید. غلظت استفاده شده برای استروژن $25 \mu\text{g/kg}$ و پروژسترون 10 mg/kg بود. برای تزریق بلافاصله بعد از خارج کردن مونوفیلانت و قبل از به هوش آمدن حیوان‌ها، استروئید به صورت زیرپوستی در فاصله بین ۲ گوش موش‌های صحرائی با استفاده از سرنگ انسولین تزریق شد.

روش ارزیابی اختلالات رفتاری

۲۴ ساعت پس از ایسکمی و قبل از کشتن حیوانات، اختلالات نورولوژیکی در حیوانات (۱۱) ارزیابی شد. در این تست فعالیت خود به خودی، توانایی کشیدن دست‌ها، رفتار راه رفتن، توانایی بالارفتن از سطوح شیب‌دار و حس عمقی تنه و سر بررسی شد. فعالیت خودبه‌خودی با گذاشتن موش‌ها در وسط جعبه‌ای با ابعاد 80×130 و عمق ۲۰ سانتی‌متر و مشاهده فعالیت حیوان و

ضرب مساحت نواحی مذکور برش‌ها در ضخامت ۲ میلی‌متر برش به دست آمد.

تعیین میزان بیان ژن به روش Real-time PCR

جهت استخراج کل RNA، حدود ۵۰ تا ۷۰ میلی‌گرم از کورتکس در ناحیه حاشیه ایسکمی که در برش‌های رنگ آمیزی شده با TTC مشخص شده بود را جدا کرده و در ۱ ml محلول RNX-Plus هموزن گردید (CinnaGen, Iran). سپس به نسبت ۱ به ۵ با کلروفورم مخلوط و به مدت ۱۵ ثانیه به ورتکس شد. محصول در 4°C ، ۱۰ دقیقه، ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. فاز آبی محتوی RNA برداشته شد، هم حجم آن ایزوپروپانول اضافه شد و با همدیگر مخلوط شدند. سپس به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ انکوبه و در 4°C ، ۱۰ دقیقه، ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. رسوب حاوی RNA در اتانول شستشو و در ۲۰ μl آب RNASE-Free حل گردید. غلظت RNA با روش اسپکتروفتومتری مورد سنجش قرار گرفت (Eppendorff, Germany) و نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ به عنوان تخلیص مطلوب تعریف گردید. سنتز cDNA (complementary DNA) با استفاده از ۱ μg از RNA و با استفاده از Random Primer و آنزیم Reverse transcriptase (Bioneer, Korea) انجام گرفت. اندازه‌گیری سطوح بیان mRNA ژن‌های EAAT2 و EAAT3 با روش کمی Realtime PCR و با استفاده از Primix syber green (BioRad, Germany) انجام شد. مخلوط واکنش در حجم نهایی ۱۰ μl انجام شد و هر واکنش به صورت duplicate صورت پذیرفت. طراحی پرایمرهای EAAT2 و EAAT3 و ژن HPRT به عنوان کنترل داخلی با استفاده از نرم افزار Primer3 صورت گرفت و توسط شرکت سیناکلون سنتز شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آمده است:

حس عمقی تنه با لمس کردن ناحیه تنه و مشاهده واکنش به تحریک ارزیابی شد: اگر سمت راست به تحریک پاسخ نمی‌داد نمره ۱ می‌گرفت، اگر سمت راست به تحریک ضعیف پاسخ می‌داد نمره ۲ دریافت می‌کرد و اگر به تحریک هر دو طرف با چرخش سر یا پرش و به طور مشابه پاسخ می‌داد نمره ۳ می‌گرفت.

حس عمقی سر با لمس کردن سبیل حیوان ارزیابی شد: اگر سمت راست به تحریک پاسخ نمی‌داد نمره ۱ دریافت می‌کرد، اگر سمت راست به تحریک ضعیف پاسخ می‌داد نمره ۲ می‌گرفت و اگر به تحریک هر دو طرف با چرخش سر یا پرش و به طور مشابه پاسخ می‌داد نمره ۳ دریافت می‌کرد. در پایان، نمرات ۶ پارامتر ارزیابی رفتاری برای هر حیوان جمع شد. کم‌ترین نمره تست رفتاری ۳ و بیش‌ترین آن ۱۸ می‌باشد.

ارزیابی حجم سکنه مغزی

بعد از ارزیابی اختلالات نورولوژیکی، حیوانات تحت بیهوشی عمیق کشته شده، سر آن‌ها جدا شد و به سرعت مغزها خارج شدند و برای سخت شدن و قوام‌گیری به مدت ۴ دقیقه در یخچال قرار داده شدند. سپس با تیغ‌های مخصوص و با استفاده از دستگاه ماتریکس مغزی برش‌هایی به ضخامت ۲ میلی‌متر از قدام تا خلف مغز زده شد. جهت رنگ آمیزی، برش‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد در محلول ۱ درصد تری فیل تترازولیوم کلراید (TTC) (2,3,5-triphenyltetrazolium) قرار داده شدند. سپس مقاطع به صورت سریال از قدام به خلف داخل پتری دیش مرتب شده و با دوربین دیجیتال از برش‌ها عکس گرفته شد. بعد از انتقال تصاویر به کامپیوتر با استفاده از نرم افزار ImageJ (version 1.44p, USA) مساحت نواحی سفید و قرمز به ترتیب به عنوان نواحی آسیب دیده و نرمال اندازه‌گیری شدند. حجم نواحی آسیب دیده و نرمال برش‌ها از طریق محاسبه حاصل

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه حاضر

primer name	Primer sequence	Product size (bp)
EAAT3 rat Fwd	Cctggtccaagcctgttttc	160
EAAT3 rat Rev	tgagtacaggcccacgattt	
EAAT2 rat Fwd	Ctgcccgttaaataaccgctc	248
EAAT2 rat Rev	gtcagtgagagcaggagggtt	
HPRT Rat Fwd	Gctcgagatgtcatcaaggaga	108
HPRT Rat Rev	tcagcgctttaatgtaatccagc	

محاسبه میزان بیان ژن‌های مورد نظر با روش منحنی استاندارد (standard curve) انجام شد و مقادیر بیان به صورت Relative Quantity از دستگاه ثبت شد.

آنالیز آماری

برای مقایسه تفاوت بیان ژن‌های هدف بین گروه‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) استفاده شد. هنگامی که تفاوت معناداری وجود داشت، پس آزمون Tukey برای مقایسه دو به دو گروه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز آزمون رفتاری با استفاده از تست Kruskal-Wallis انجام شد. اختلاف داده‌ها با $p \leq 0.05$ معنی‌دار تلقی گردیدند. داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای معیار میانگین (Mean \pm SEM) بیان شده است.

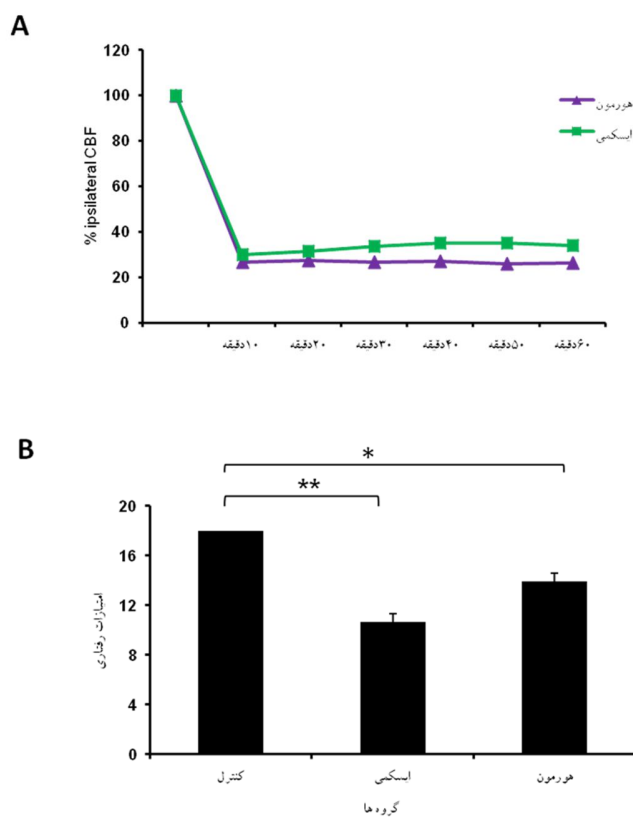
یافته‌ها

ثبت جریان خون موضعی مغز و ارزیابی اختلالات رفتاری حاصل از ایسکمی مغزی

تغییرات مداوم جریان خون ناحیه ثبت شده در طی دوره آزمایش در گروه‌های مختلف در نمودار A ۱ نمایش داده شده است. با استفاده از مونیتورینگ لیزر داپلر، فقط حیواناتی که کاهش جریان خون موضعی مغز rCBF (Regional Cerebral Blood Flow) بیش‌تر از ۵۰

درصد در مقایسه با مقادیر baseline داشتند در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند. همان‌طور که در شکل A ۱ نشان داده شده است، به دنبال وقوع انسداد شریان مغزی میانی مقادیر میانگین rCBF در همه گروه‌ها به میزان تقریباً ۶۰ درصد در مقایسه با مقادیر baseline افت کرده است. ضمناً در طی ۶۰ دقیق دوره انسداد تغییر قابل ملاحظه در جریان خون کاهش یافته در گروه‌های مختلف مشاهده نشد.

در نمودار B ۱ امتیازات حاصل از نمره دهی رفتاری برای گروه‌های مورد مطالعه نشان داده شده است. تمام حیوانات، از نظر اختلالات رفتاری قبل از شروع آزمون و ۲۴ ساعت بعد از جراحی، مورد ارزیابی قرار گرفتند. همان‌طور که در نمودار مشاهده می‌شود، هیچ‌گونه اختلال رفتاری در گروه کنترل مشاهده نشد. اما موش‌ها، نقص‌های نورولوژیکی شدیدی را بعد از ایسکمی نشان دادند و نمره رفتاری در گروه ایسکمی 10.6 ± 0.6 بود. نتایج حاصل از آنالیز داده‌ها در گروه هورمون افزایش معنی‌داری را در مقایسه با گروه ایسکمی نشان داد ($p < 0.05$) (13.9 ± 0.6) (نمودار B ۱).



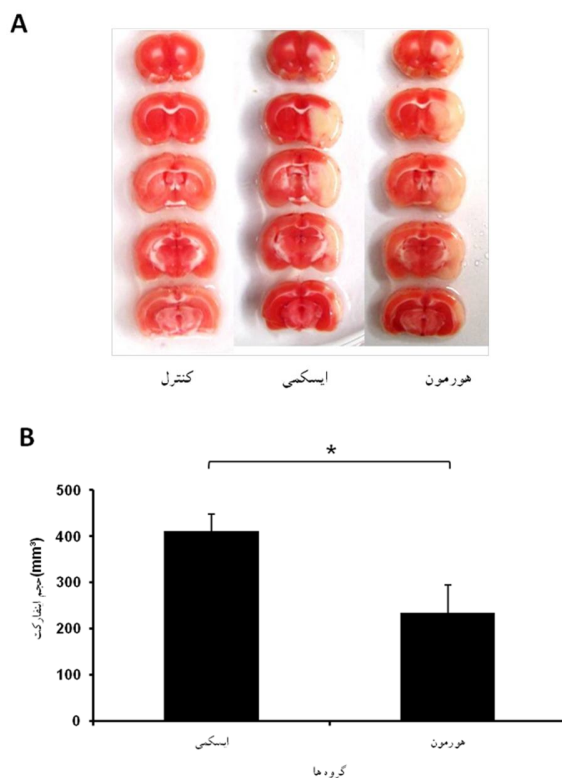
شکل ۱: مقدار rCBF و عملکرد نورولوژیکی بعد از القای ایسکمی مغزی فوکال در گروه‌های مورد مطالعه (A) اندازه‌گیری مقدار جریان خون موضعی مغزی (rCBF) با استفاده از لیزر داپلر در محدوده شریان مغزی میانی ipsilateral قبل و در طول ۱ ساعت ایسکمی.

(B) بهبود رفتاری ۲۴ ساعت بعد از ایسکمی در گروه‌های مختلف آنالیز شد. شواهد اختلال رفتاری در موش‌های گروه کنترل مشاهده نشد و بالاترین امتیاز قابل کسب به دست آمد. نقص نورولوژیکی شدید در گروه ایسکمی مشاهده شد و هورمون درمانی به طور چشم‌گیری، نقص‌های نورولوژیکی را در مقایسه با گروه ایسکمی بهبود داد ($P < 0.01$ و $P \leq 0.05$).

(شکل ۲. A). نمودار ۲، مقایسه کمی حجم ضایعه مغزی ناشی از ایسکمی را در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد. میانگین حجم ناحیه اینفارکت در گروه درمان شده با استروژن و پروژسترون $(35 \pm 233.88 \text{ mm}^3)$ در مقایسه با حجم اینفارکت در گروه ایسکمی $(60 \pm 434.28 \text{ mm}^3)$ کاهش معنی‌داری داشت ($P \leq 0.05$)

تأثیر هورمون‌های استروئیدی بر حجم اینفارکت

حجم اینفارکت ۲۴ ساعت بعد از ایسکمی با استفاده از رنگ آمیزی TTC اندازه‌گیری شد. در تصاویر تهیه شده از برش‌های عرضی رنگ آمیزی شده با TTC در گروه کنترل، هیچ‌گونه علامتی از ضایعه ناشی از ایسکمی مشاهده نشد. در حالی که حجم اینفارکت گسترده‌ای در گروه ایسکمی دیده شد

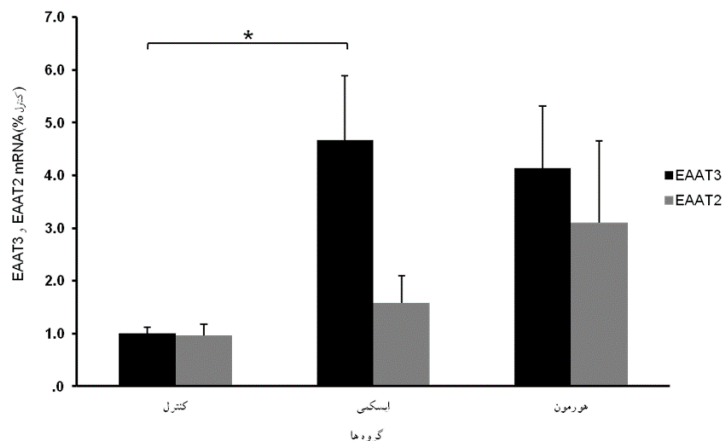


شکل ۲. تغییرات حجم ناحیه اینفارکت بعد از هورمون درمانی در مدل MCAO (A) تصاویر نمونه از بافت‌های مغزی رنگ شده با TTC. اینفارکتی در گروه کنترل مشاهده نشد در حالی که حجم اینفارکت گسترده‌ای در گروه ایسکمی دیده شد. هورمون درمانی حجم اینفارکت را کاهش داد. (B) آنالیز داده‌های حاصل از اندازه‌گیری حجم ناحیه اینفارکت در گروه‌های هورمون و ایسکمی ($P \leq 0.001$ ، $P \leq 0.01$ و $P \leq 0.05$ در مقایسه با گروه ایسکمی).

مشخص شده است، آنالیز داده‌ها نشان‌گر افزایش معنی‌دار بیان ژن EAAT3 در گروه ایسکمی ($1/2 \pm 4/8$) در مقایسه با گروه کنترل ($0/2 \pm 1$) است ($P \leq 0.05$). در حالی که بیان ژن EAAT2 بعد از ایسکمی تغییر معنی‌داری نداشت. هورمون درمانی تغییر معنی‌داری در بیان ژن این پروتئین‌ها در مقایسه با ایسکمی ایجاد نکرد.

تأثیر هورمون‌های استروئیدی بر بیان ژن EAAT3 و EAAT2 بعد از القای ایسکمی فوکال با استفاده از تکنیک real-time PCR

تأثیر تزریق دوز ترکیبی استروژن و پروژسترون بلافاصله بعد از القا ایسکمی، بر روی بیان انتقال دهنده‌های گلوتامات نوع ۲ (EAAT2) و نوع ۳ (EAAT3) با تکنیک RealtimePCR بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۳



شکل ۳. تغییرات بیان ژن EAAT2 و EAAT3 بعد از هورمون درمانی در مدل MCAO

آنالیز نتایج حاصل از تغییر بیان ژن EAAT3 و EAAT2 افزایش معنی‌دار بیان ژن EAAT3 و عدم تغییر قابل توجه بیان ژن EAAT2 در ناحیه حاشیه‌ای در گروه ایسکمی نسبت به کنترل نشان داد. هورمون درمانی تغییر معنی‌داری در بیان ژن این پروتئین‌ها در مقایسه با ایسکمی ایجاد نکرد.

بحث

زیرا مطالعات قبلی نشان داده‌اند که فرمول ترکیبی، بیش‌ترین اثر حفاظتی را دارد (۱۱). نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر نشان داد که تجویز هورمون‌های استروژن و پروژسترون به صورت ترکیبی می‌تواند ضایعه مغزی را به طور چشم‌گیری در گروه هورمون در مقایسه با گروه ایسکمی کاهش دهد. ساله و همکاران نشان داده‌اند استروژن موجب کاهش حجم ناحیه اینفارکت در چندین مدل ایسکمی می‌شود (۱۵). وانگ و همکاران نشان دادند پروژسترون به تنهایی هم می‌تواند در کاهش حجم ضایعه در مغز موش صحرایی موثر باشد (۱۶). در این تحقیق علاوه بر ارزیابی حجم سگته مغزی، اختلالات نورولوژیکی بعد از سگته مغزی نیز در موش صحرایی مورد ارزیابی قرار گرفت. شایان ذکر است، ایجاد ایسکمی مغزی با یک سری اختلالات حسی- حرکتی وسیع همراه است. در مطالعه حاضر درمان با استروژن و پروژسترون به صورت ترکیبی میزان اختلالات حسی حرکتی را نیز به میزان زیادی بهبود بخشید. دانگ و همکاران نشان داده‌اند که tMCAO موجب

نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که تزریق هورمون‌های استروژن و پروژسترون به صورت ترکیبی بعد از ایسکمی فوکال موقتی، علاوه بر این که میزان ضایعه ایسکمیک در ناحیه مغز را کاهش داده، سبب بهبود اختلالات حسی حرکتی در گروه‌های درمان نیز شده است. هم‌چنین در بررسی‌ها مشخص گردید که مصرف هورمون‌های استروژن و پروژسترون سبب تغییر قابل توجهی در بیان ژن انتقال دهنده‌های گلوتامات EAAT2 و EAAT3 نشده است.

تأثیرات درمانی هورمون‌های استروئیدی نظیر پروژسترون و استروژن در آسیب‌های ناشی از سگته نشان داده شده است. در حالی که اکثر تحقیقات روی استروژن به عنوان منبع اصلی حفاظت عصبی مشاهده شده در حیوانات ماده تمرکز کرده‌اند، شواهد زیادی نشان می‌دهد که پروژسترون هم نقش مفیدی در مغز آسیب دیده بازی می‌کند (۱۴). در این مطالعه دوز ترکیبی استروژن و پروژسترون انتخاب شده است،

کاهش معنی‌دار نمره تست رفتاری شده و درمان با استروژن و پروژسترون به صورت ترکیبی باعث بهبود عملکرد رفتاری می‌شود (۱۱). لی و همکارانش بیان می‌دارند که نقایص رفتاری در موش‌های تحت درمان با استروژن بهبود می‌یابد (۱۷). اتیف و همکاران نشان دادند که تجویز پروژسترون در دوز mg/kg ۸ به طور معنی‌داری آسیب مغزی را کاهش داده و نقایص نورولوژیکی را بهبود می‌بخشد (۱۸). تزریق استروژن و پروژسترون به تنهایی یا به صورت ترکیبی قبل یا بعد از ایسکمی فوکال موقتی، حجم اینفارکت را کاهش می‌دهد و نقایص رفتاری مرتبط با ایسکمی را در هر دو جنس در مدل‌های حیوانی بهبود می‌دهد (۱۱). در مطالعه‌ای نشان داده شده است که تجویز هورمون‌های استروئیدی به صورت ترکیبی حجم اینفارکت را کاهش داده و نقایص نورولوژیکی را بهبود می‌دهد (۱۹).

مولکول مهم به کار رفته در تخریب عصبی و مرگ سلولی نورونی، نوروترانسمیتر تحریکی گلوتامات است. نشان داده شده است که به دنبال آسیب مغزی و هایپوکسی در مغز، آزادسازی اضافی گلوتامات و تحریک بیش از اندازه گیرنده‌های گلوتامات اتفاق می‌افتد که در نتیجه سبب سمیت تحریکی نورونی می‌شود (۲۰). به دلیل عدم تخریب آنزیمی گلوتامات در فضای خارج سلولی، خارج سازی گلوتامات آزاد شده به وسیله انتقال دهنده‌های اسیدهای آمینه تحریکی صورت می‌گیرد. انتقال دهنده‌های مذکور که در سلول‌های گلیال احاطه کننده فضای سیناپس و در نورون‌ها وجود دارند، نقش اصلی در حذف گلوتامات از فضای خارج سلولی و شکاف سیناپسی و حفظ غلظت گلوتامات خارج سلولی در مقادیری کمتر از مقادیر ایجاد کننده سمیت تحریکی بازی می‌کنند (۲۱). مطالعات متعدد اثرات ایسکمی روی EAATs را بررسی کرده و تغییرات الگوهای بیان آن‌ها را نشان داده‌اند. کاهش بیان انتقال دهنده‌های گلوتامات به دنبال بیماری‌های نورودژنراتیو مثل آلزایمر، ایسکمی و آسیب‌های مغزی تروماتیک نشان داده شده است و تصور می‌شود که به مرگ سلولی مشاهده شده تحت شرایط پاتولوژیکال مختلف کمک می‌کند (۲۲). مطالعات

زیادی تنظیم کاهشی بیان EAAT2 را بعد از ایسکمی مغزی در جوندگان نشان داده‌اند. یک کاهش قابل توجه در بیان EAAT2 mRNA در منطقه CA1 هیپوکامپ در ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از ایسکمی مغزی عمومی موقتی در موش صحرایی مشخص شده است (۲۳). هم‌چنین در کورتکس ipsilateral کاهش قابل توجه در بیان EAAT2 mRNA ۲۴ و ۷۲ ساعت بعد از MCAO در جوندگان نشان داده شده است. درباره EAAT3 می‌توان گفت در یک مطالعه انجام شده روی هیپوکامپ موش، سطوح پروتئین و EAAT3 mRNA در ۲۴ ساعت بعد از MCAO تغییری پیدا نکرد (۲۴). علاوه بر این، اطلاعات درباره بیان EAAT3 در کورتکس مبهم است. راثو و همکاران کاهش قابل توجه در سطح پروتئین و EAAT3 mRNA را در ۲۴ و ۷۲ ساعت بعد از MCAO در موش صحرایی مشاهده کرده‌اند (۲۵). در حالی که در مطالعه دیگری تغییری در بیان EAAT3 در ۲۴ ساعت در همان مدل ایسکمی در موش سوری مشاهده نکرده‌اند (۲۴). به طور متضاد با گزارش‌های مبنی بر کاهش سطوح انتقال دهنده‌های گلوتامات، افزایش سطوح انتقال دهنده‌های گلوتامات هم در مدل‌های حیوانی مشخص شده است. مطالعات با استفاده از کشت‌های سلولی و مدل‌های تجربی افزایش در EAAT1 و EAAT2 بعد از ایسکمی حاد یا هیپوکسی-ایسکمی را نشان داده‌اند (۲۶). در مطالعه‌ای که به وسیله تائو و همکاران انجام شد با استفاده از تکنیک ایمونوهیستوشیمی افزایش در ایمونواستینینگ EAAT1 در مناطق ایسکمیک در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از انسداد شریان کاروتید مشترک یک طرفه در نوزادان موش صحرایی مشاهده شد که نشان می‌دهد انتقال دهنده‌های گلوتامات در یک پاسخ جبرانی به آسیب ممکن است افزایش یابند (۲۷). هم‌چنین در مطالعه‌ای مشخص شد که بیان EAAT3 در نورون‌های هرمی هیپوکامپ موش صحرایی در طول یک دوره حاد صرع افزایش می‌یابد (۲۸). مطالعات نشان دادند که ایسکمی موقتی مغز جلویی افزایش در سطح EAAT3 را در نورون‌های هرمی منطقه CA1

می‌دهد (۱۲). دوز استروژن و زمان تزریق هورمون می‌تواند در این رابطه اهمیت داشته باشد.

نتیجه گیری

در مجموع پژوهش حاضر نشان داد که دوز ترکیبی استروژن و پروژسترون به طور معنی دار توانست حجم ضایعه را کاهش دهد، هم‌چنین هورمون درمانی توانست اختلالات عصبی حرکتی را در موش‌های ایسکمی شده بهبود دهد، اگرچه این بهبودی مستقل از مسیر سیگنالی انتقال دهنده‌های گلوتامات بود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کاشان به جهت حمایت مالی پژوهش حاضر (طرح شماره ۹۳۱۷۷) اعلام می‌دارند. این مقاله مربوط به نتایج پایان نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول می‌باشد.

منابع

1. Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, De Simone G, et al. Heart disease and stroke statistics—2010 update A report from the American Heart Association. *Circulation*. 2010;121(7):46-215.
2. Broughton BR, Lim R, Arumugam TV, Drummond GR, Wallace EM, Sobey CG. Post-stroke inflammation and the potential efficacy of novel stem cell therapies: focus on amnion epithelial cells. *Front Cell Neurosci*. 2013;6:1-9.
3. Barone FC. Ischemic stroke intervention requires mixed cellular protection of the penumbra. *Curr Opin Investig Drugs* (London, England: 2000) 2009;10(3):220-3.
4. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(3):231-41.

هیپوکامپ القا می‌کند اما سطح انتقال دهنده‌های گلوتامات EAAT1 و EAAT2 بدون تغییر باقی مانده (۲۹) یا کاهش می‌یابد (۲۳). افزایش بیان انتقال دهنده‌های گلوتامات در آستروسیت‌ها و میکروگلیا / ماکروفاژها ممکن است یک پاسخ حفاظتی به سطح بالای گلوتامات خارج سلولی بعد از حمله ایسکمیک باشد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که تنظیم افزایشی بیان EAAT با حفاظت عصبی ارتباط دارد (۳۰). در این تحقیق، بیان EAAT3 mRNA ۲۴ ساعت بعد از MCAO افزایش یافت در حالی که بیان ژن EAAT2 تغییر معنی‌داری نداشت. این افزایش ممکن است یک مکانیسم خود جبرانی موثر در ترمیم عصبی یا محدود کننده مرگ سلولی پس از ایسکمی را منعکس کند که می‌تواند به دلیل افزایش غلظت گلوتامات خارج سلولی در طول ایسکمی باشد. هم‌چنین مشابه با مطالعه ما راثو و همکاران نشان دادند که سطح پروتئین EAAT2 در کورتکس به دنبال ایسکمی عمومی موقتی تغییر پیدا نمی‌کند (۳۱). اختلاف آشکار در بیان EAATs بین مطالعات مختلف و مطالعه ما ممکن است به دلیل شرایط مختلف آزمایش و تکنیک‌های مورد استفاده یا مناطق مختلف آنالیز شده (به عنوان مثال، ماده خاکستری در مقابل سفید) باشد.

در این مطالعه تجویز استروژن و پروژسترون بلافاصله بعد از القا ایسکمی موجب تغییر معنی‌دار در بیان ژن انتقال دهنده‌های گلوتامات EAAT2 و EAAT3 در ناحیه حاشیه ایسکمی نشد. در یک مطالعه مشابه نیز تغییر قابل توجهی در سطوح پروتئین‌های EAAT1 و EAAT2 در پاسخ به درمان با استرادیول مشاهده نشده است (۱۳). با این حال مطالعه پاولاک و همکاران نشان دادند که استروژن بیان و عملکرد دو انتقال دهنده گلوتامات EAAT1 و EAAT2 را در آستروسیت‌های مغز میانی افزایش می‌دهد و از این طریق می‌تواند یک مکانیسم کلیدی حفاظت عصبی به وسیله کاهش سطح گلوتامات خارج سلولی فراهم کند (۳۲). هم‌چنین در یک مطالعه دیگر نشان داده شده است که estradiol - 17β باز جذب گلوتامات و بیان EAAT2 را در آستروسیت‌ها افزایش

5. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 1999;79(4):1431-568.
6. Hazell AS. Excitotoxic mechanisms in stroke: an update of concepts and treatment strategies. *Neurochem Int.* 2007;50(7):941-53.
7. Maragakis NJ, Rothstein JD. Glutamate transporters in neurologic disease. *Arch Neurol.* 2001;58(3):365-70.
8. Krzyżanowska W, Pomierny B, Filip M, Pera J. Glutamate transporters in brain ischemia: to modulate or not? *Acta Pharmacol Sin* 2014;35(4):444-62.
9. Noor R, Wang CX, Shuaib A. Hyperthermia masks the neuroprotective effects of tissue plasminogen activator. *Stroke.* 2005;36(3):665-9.
10. Ishrat T, Sayeed I, Atif F, Stein DG. Effects of progesterone administration on infarct volume and functional deficits following permanent focal cerebral ischemia in rats. *Brain res.* 2009;1257:94-101.
11. Dang J, Mitkari B, Kipp M, Beyer C. Gonadal steroids prevent cell damage and stimulate behavioral recovery after transient middle cerebral artery occlusion in male and female rats. *Brain Behav Immun* 2011;25(4):715-26.
12. Liang Z, Valla J, Sefidvash-Hockley S, Rogers J, Li R. Effects of estrogen treatment on glutamate uptake in cultured human astrocytes derived from cortex of Alzheimer's disease patients. *J Neurochem* 2002;80(5):807-14.
13. Cimarosti H, O'Shea RD, Jones NM, Horn AP, Simão F, Zamin LL, et al. The effects of estradiol on estrogen receptor and glutamate transporter expression in organotypic hippocampal cultures exposed to oxygen--glucose deprivation. *Neurochem Res* 2006;31(4):483-90.
14. Gibson CL, Gray LJ, Bath PM, Murphy SP. Progesterone for the treatment of experimental brain injury; a systematic review. *Brain.* 2008;131(2):318-28.
15. Saleh TM, Connell BJ, Legge C, Cribb AE. Estrogen attenuates neuronal excitability in the insular cortex following middle cerebral artery occlusion. *Brain res.* 2004;1018(1):119-29.
16. Wong R, Renton C, Gibson CL, Murphy SJ, Kendall DA, Bath PM. Progesterone treatment for experimental stroke: an individual animal meta-analysis. *J Cereb Blood Flow Metab* 2013;33(9):1362-72.
17. Li J, Siegel M, Yuan M, Zeng Z, Finnucan L, Persky R, et al. Estrogen enhances neurogenesis and behavioral recovery after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2011;31(2):413-25.
18. Atif F, Yousuf S, Sayeed I, Ishrat T, Hua F, Stein DG. Combination treatment with progesterone and vitamin D hormone is more effective than monotherapy in ischemic stroke: the role of BDNF/TrkB/Erk1/2 signaling in neuroprotection. *Neuropharmacology.* 2013;67:78-87.
19. Ulbrich C, Zendedel A, Habib P, Kipp M, Beyer C, Dang J. Long-term cerebral cortex protection and behavioral stabilization by gonadal steroid hormones after transient focal hypoxia. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2012;131(1):10-6.
20. Guyot L, Diaz F, O'regan M, McLeod S, Park H, Phillis J. Real-time measurement of glutamate release from the ischemic penumbra of the rat cerebral cortex using a focal middle cerebral artery occlusion model. *Neurosci Lett* 2001;299(1):37-40.
21. Shahraki A, Ghahghaei A, Zakeri Z. Glutamate transporters and excitotoxicity in nervous system. *J Gorgan Uni Med Sci.* 2011;13(3):1-15.
22. Sims K, Robinson M. Expression patterns and regulation of glutamate transporters in the developing and adult nervous system. *Crit Rev Neurobiol* 1998;13(2):169-97.
23. Yeh TH, Hwang HM, Chen JJ, Wu T, Li AH, Wang HL. Glutamate transporter function of rat hippocampal astrocytes is impaired following the global ischemia. *Neurobiol Dis* 2005;18(3):476-83.

24. Ketheeswaranathan P, Turner NA, Spary EJ, Batten TF, McColl BW, Saha S. Changes in glutamate transporter expression in mouse forebrain areas following focal ischemia. *Brain res.* 2011;1418:93-103.
25. Rao VLR, Bowen KK, Dempsey RJ. Transient focal cerebral ischemia down-regulates glutamate transporters GLT-1 and EAAC1 expression in rat brain. *Neurochem Res* 2001;26(5):497-502.
26. Arranz AM, Gottlieb M, Pérez Cerdá F, Matute C. Increased expression of glutamate transporters in subcortical white matter after transient focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* 2010;37(1):156-65.
27. Tao F, Lu S, Zhang L, Huang Y, Sun F. Role of excitatory amino acid transporter 1 in neonatal rat neuronal damage induced by hypoxia-ischemia. *Neuroscience.* 2001;102(3):503-13.
28. Voutsinos Porche B, Koning E, Clément Y, Kaplan H, Ferrandon A, Motte J, et al. EAAC1 glutamate transporter expression in the rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006;26(11):1419-30.
29. Gottlieb M, Domercq M, Matute C. Altered expression of the glutamate transporter EAAC1 in neurons and immature oligodendrocytes after transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000;20(4):678-87.
30. Ganel R, Ho T, Maragakis NJ, Jackson M, Steiner JP, Rothstein JD. Selective up-regulation of the glial Na⁺-dependent glutamate transporter GLT1 by a neuroimmunophilin ligand results in neuroprotection. *Neurobiol Dis* 2006;21(3):556-67.
31. Rao VLR, Rao AM, Dogan A, Bowen KK, Hatcher J, Rothstein JD, et al. Glial glutamate transporter GLT-1 down-regulation precedes delayed neuronal death in gerbil hippocampus following transient global cerebral ischemia. *Neurochem Int* 2000;36(6):531-7.
32. Pawlak J, Brito V, Küppers E, Beyer C. Regulation of glutamate transporter GLAST and GLT-1 expression in astrocytes by estrogen. *Brain Res Mol Brain Res* 2005;138(1):1-7.