

Evaluation of ERK activity on Ischemic Tolerance-induced by Preconditioning with Intermittent Normobaric Hyperoxia in the Rat Model of Stroke

Firoozeh Alavian¹, Sohrab Hajizadeh^{2*}, Mohammad Javan², Roham Mazloom³

1. Assistant Professor, PhD of Medical Physiology, Department of Basic Sciences, Farhangian University, Tehran, Iran.

2. Professor, PhD of Medical Physiology, Department of Physiology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

3. Assistant Professor, PhD of Medical Physiology, Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran.

Received: 10 Jul 2017, Accepted: 2 Aug 2017

Abstract

Background: Recent studies indicate that hyperoxia has a significant therapeutic effect in the acute ischemic injury. The role of intracellular kinases, including ERK, has been posed in the phenomenon of ischemic tolerance. In the present study, the effect of intermittent normobaric hyperoxia on the activity of ERK in the stroke model was studied

Material and Methods: This is an experimental study. Animals include 4 groups (sham, hyperoxia–sham, stroke and hyperoxia–stroke); each group consisted of 6 male Wistar rats in the weight range of 250 to 350 grams. Hyperoxia groups were exposed to 95% inspired oxygen for 4 h/day and 6 consecutive days. Oxygen concentration in the control groups was 21% (normoxia, room air). After 24h, the stroke group animals were subjected to 60 min of right middle cerebral artery occlusion (MCAO). After 24h reperfusion, neurological deficit scores (NDS) and ERK activity were assessed.

Results: 5 hours after MCAO, stroke groups showed a significant increase in ERK activity in the cortex ($p < 0.01$) and subcortex ($p < 0.001$). At the same time, hyperoxia significantly increased the activity of ERK in cortex compared to the normoxia group ($p < 0.05$). In subcortex, hyperoxia had no significant effect on ERK activity. Twenty-four hours after MCAO, stroke groups showed a significant reduction in ERK activity in the cortex ($p < 0.001$) and subcortex ($p < 0.05$). 24hr after MCAO, The activity of ERK in the hyperoxia groups; in both cortex and subcortex areas was significantly higher than that of the normoxia groups ($p < 0.05$). Also, hyperoxia caused a significant decrease in NDS ($p = 0.0220$).

Conclusion: Increased levels of ERK activity in the hyperoxia groups can be used to protect the nervous system, but the presence of other malicious factors may have been more effective in some cases, so that hyperoxia alone hasn't been able to prevent stroke progression.

Keywords: ERK, Neural injury, Normobaric hyperoxia, Stroke.

* Corresponding author:

Address: Department of Physiology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Email: hajizads@modares.ac.ir

بررسی میزان فعالیت ERK در پدیده تحمل به ایسکمی القاء شده به واسطه پیش شرطی سازی با هایپراکسی نورموباریک متناوب در مدل سکتة مغزی موش سفید بزرگ آزمایشگاهی

فیروزه علویان^۱، سهراب حاجی زاده^{۲*}، محمد جوان^۲، رهام مظلوم^۲

۱. استادیار، دکتری تخصصی فیزیولوژی پزشکی، گروه علوم پایه، دانشگاه فرهنگیان، تهران، ایران.

۲. استاد، دکتری تخصصی فیزیولوژی پزشکی، گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۳. استادیار، دکتری تخصصی فیزیولوژی پزشکی، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۶/۴/۱۹، تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: مطالعات اخیر نشان می‌دهد که هایپراکسی اثر درمانی مناسبی در درمان آسیب ایسکمی حاد دارد. در پدیده تحمل به ایسکمی نقش کینازهای داخل سلولی از جمله ERK (Extracellular signal regulated kinase) مطرح است. در مطالعه حاضر، اثر هایپراکسی نورموباریک متناوب بر روی میزان فعالیت ERK در مدل سکتة مغزی مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: این مطالعه از نوع تجربی می‌باشد. حیوانات شامل ۴ گروه (شاهد، شاهد-هایپراکسی، سکتة و هایپراکسی-سکتة) و هر گروه شامل ۶ حیوان نر نژاد ویستار، در محدوده وزنی ۲۵۰ تا ۳۵۰ گرم بودند. اکسیژن استنشاقی با غلظت ۹۵ درصد، روزانه ۴ ساعت و به مدت ۶ روز متوالی (هایپراکسی) و در گروه‌های کنترل با همان شرایط و غلظت اکسیژن ۲۱ درصد (نورموکسی) استفاده شد. ۲۴ ساعت بعد، حیوانات گروه سکتة به مدت ۶۰ دقیقه تحت انسداد شریان میانی کاروتید (MCAO) قرار می‌گرفتند. ۵ و ۲۴ ساعت پس از برقراری جریان خون مجدد، امتیاز نقایص عصبی و فعالیت ERK مورد بررسی قرار می‌گرفت.

یافته‌ها: ۵ ساعت پس از اعمال MCAO، گروه‌های سکتة نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری در فعالیت ERK در قشر مغز ($p < 0/01$) و مرکز مغز ($p < 0/001$) داشتند. در همین زمان، هایپراکسی سبب افزایش معنی‌دار فعالیت ERK در قشر مغز شد ($p < 0/05$). در مرکز مغز، هایپراکسی تأثیر معنی‌داری بر روی فعالیت ERK نداشت. ۲۴ ساعت پس از MCAO، گروه‌های سکتة نسبت به شاهد، کاهش معنی‌داری در فعالیت ERK در نواحی قشر ($p < 0/001$) و مرکز مغز ($p < 0/05$) نشان دادند. میزان فعالیت ERK در گروه‌های هایپراکسی در هر دو ناحیه قشر و مرکز مغز به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه نورموکسی بیشتر بود ($p < 0/05$). هم‌چنین، هایپراکسی سبب کاهش امتیاز نقایص عصبی شد ($p = 0/022$).

نتیجه‌گیری: افزایش فعالیت ERK در گروه هایپراکسی در جهت حفاظت عصبی عمل کرده، ولی چون در مواردی سایر عوامل مخرب قوی‌تر عمل نموده‌اند، هایپراکسی به‌تنهایی نتوانسته از پیشرفت اثرات مخرب سکتة ممانعت نماید.

واژگان کلیدی: هایپراکسی نورموباریک، سکتة مغزی، آسیب نوروئی، ERK

*نویسنده مسئول: ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، گروه فیزیولوژی

Email: hajizads@modares.ac.ir

مقدمه

سکته مغزی به عنوان عامل مهم مرگ و ناتوانی در سراسر جهان مطرح است. با وجود پیشرفت‌های چشم‌گیر دهه‌های گذشته در پیش‌گیری، درمان و توان‌بخشی بیماران با سکته مغزی، همچنان چالش‌های فراوانی در روش‌های درمانی موجود باقی است (۱، ۲). یکی از روش‌های پیش‌گیری، پیش‌شرطی سازی ایسکمی یا IP (Ischemic preconditioning) است. IP به منزله انطباق مغز به ایسکمی کشنده؛ زمانی که فرد برای اولین بار در معرض دوز خفیفی از یک عامل استرس‌زای زیر کشنده قرار می‌گیرد است که می‌تواند سبب افزایش تحمل بافت مغزی در برابر آسیب‌های بعدی سکته مغزی شود (۳). IP ممکن است فرآیندهای متعدد سلولی را جامعیت دهد تا در نهایت منجر به کاهش آسیب شود (۴). از زمان ابداع IP تاکنون، روش‌های پیش‌شرطی سازی مختلفی از جمله هایپراکسی نورموباریک شناخته شده است. در واقع، هایپراکسی اعمال فشار اکسیژن با غلظت بالا (بین ۸۵ تا ۹۵ درصد) می‌باشد و هایپراکسی نورموباریک، اعمال هایپراکسی با فشاری معادل فشار در سطح دریا است. هایپراکسی نورموباریک عوارض جانبی روش‌های قبلی را ندارد و امکان پیاده‌سازی بالینی را دارد (۵). هایپراکسی سبب القاء حفاظت عصبی مغزی از طریق شکل‌گیری رادیکال‌های آزاد اکسیژن یا ROS (Reactive Oxygen Species) است؛ به طوری که انسداد تجمع آغازین ROS توسط آنتی‌اکسیدان‌ها، پیش‌شرطی سازی عصبی را تخفیف می‌دهد. باتوجه به اینکه تولید بیش از حد ROS منجر به هدایت مسیرهای سلولی به طرف مرگ می‌شود، کنترل آزادسازی ROS در جلوگیری از آسیب عصبی فوق‌العاده‌ای دارد. از طرف دیگر، بافت مغزی به طور مناسبی با عوامل دفاعی آنتی-اکسیدانت تجهیز نشده؛ بنابراین ROS و سایر رادیکال‌های آزاد و اکسیدان‌هایی که از سلول‌های دچار التهاب تولید می‌شوند، زندگی بافت‌های اطراف کانون ایسکمی را تهدید می‌کنند

(۶). پیش‌شرطی با هایپراکسی نورموباریک جریان خون مغزی و به تبع آن، اکسیژن‌رسانی بافت مغز را بهبود می‌بخشد (۷). این روش با افزایش استحکام سد خونی - مغزی، در تنظیم حجم سلولی نورون‌ها و آستروسیت‌ها نیز نقش مهمی دارد (۵، ۸). روشن شدن پاسخ این سؤال که هایپراکسی نورموباریک چگونه و با چه مکانیسم‌هایی قادر به ایجاد مقاومت در برابر ایسکمی است، می‌تواند منشأ اطلاعات کلینیکی و کاربردی مفیدی در پیش‌گیری و درمان سکته مغزی باشد. بدون شک، هایپراکسی اثر حفاظتی خود را از طریق مسیرهای سیگنالینگ داخل سلولی متعددی اعمال می‌کند که شناخت این مسیرها در تحقق اهداف درمانی هایپراکسی می‌تواند مؤثر باشد (۹، ۱۰). مسیر سیگنالینگ MAPK (Mitogen-activated protein kinases) به‌طور گسترده‌ای در سال‌های گذشته مطالعه شده است. این مسیر نقش بحرانی در انتقال سیگنال از پروتئین کینازها و پروتئین فسفاتازها دارد. شناخته‌ترین کیناز در این مسیر ERK است (۱۱). مسیر سیگنالینگ ERK شامل تعدیل‌کننده‌هایی مهمی است که برای رشد و تکثیر مناسب‌اند. این مسیر به وسیله فاکتورهای رشد، استرس اکسیداتیو، افزایش داخل سلولی سطوح کلسیم و تحریک رسپتورهای گلوتامات، فعال می‌شود (۱۲). محرک‌های استرس‌زا پاتوفیزیولوژیک، شامل القای تشنج، ایسکمی، تروما، درد احشایی و شوک الکتریکی به سرعت سبب فعال شدن MAPK ها در نواحی متنوعی از مغز می‌شوند (۱۳). روند آبخاری MAP کیناز در راه‌اندازی پاسخ‌های تکثیر سلولی توسط آگونیست‌هایی که پروتئین کیناز C را تحریک می‌کنند و توسط فاکتورهای رشدی که بر روی گیرنده‌های تیروزین کیناز عمل می‌کنند و منجر به فعال شدن Ras (Recovery Activation Signal) می‌شود نقش دارد. در روند آبخاری چه به واسطه پروتئین کیناز C و چه به واسطه Ras، موجب فعال شدن Raf (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma) کیناز شده که آن نیز MEK

در این مطالعه تجربی، از موش‌های نر نژاد ویستار (۲۵۰ تا ۳۵۰ گرم) استفاده شد. نمونه‌گیری و گروه‌بندی به‌طور تصادفی انجام شد. حیوانات شامل ۴ گروه، هر یک شامل ۶ حیوان بودند: گروه شاهد، گروه شاهد هایپراکسی، گروه سخته و گروه هایپراکسی سخته. حیوانات در شرایط استاندارد (دمای 23 ± 2 و سیکل روشنایی/ تاریکی ۱۲ ساعته؛ با شروع روشنایی در ساعت ۷ صبح) و دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. محل انجام آزمایش‌ها، در دانشگاه تربیت مدرس تهران بوده و کلیه اصول اخلاقی مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفت.

هایپراکسی نورموباریک و نورموکسی نورموباریک

مدل هایپراکسی در جعبه‌ای به ابعاد ۲ میلی متر $450 \times 350 \times 650$ و با غلظت ۹۵ درصد اکسیژن (به مدت ۶ روز پیوسته، هر روز ۴ ساعت) اعمال شد. غلظت اکسیژن به‌وسیله حسگر حساس به اکسیژن (Lutron-Do5510 (oxygen sensor, Taiwan) به‌طور پیوسته کنترل می‌شد. سودالیم (BDH Limited, Poole, England) به‌عنوان جاذب CO₂ در گوشه‌های جعبه قرار می‌گرفت. گروه‌های نورموکسی در همین شرایط در جعبه قرار می‌گرفتند؛ با این تفاوت که در معرض اکسیژن ۲۱ درصد اتاق قرار داشتند (۱۹).

ایجاد مدل سخته مغزی MCAO

حیوانات وزن شده و با کلرال هیدرات (Merck, Germany, 400mg/kg) به‌صورت داخل صفاقی بی‌هوش می‌شدند. سپس به کمک لوپ جراحی، پس از شکافتن پوست جلوی گردن و کنار زدن بافت‌های پوشاننده، شاخه راست کاروتید و شاخه اکسترنال آن نمایان شده و با دقت از عصب واگ و بافت‌های مجاور جدا می‌شد، پایه کاروتید راست و شاخه اکسترنال را با نخ بخیه محکم بسته، شاخه اینترنال و سرخرگ پتریگو پالاتین با کلیپ بسیار ظریف، موقتاً مسدود می‌شد. سپس، سوراخ کوچکی در

(MAP Kinase Kinase) را فعال می‌کند. MEK فسفریله شده و ERK را فعال و فسفریله می‌کند که آن نیز به‌نوبه خود فاکتورهای نسخه‌برداری، سوسترهای پروتئینی و سایر پروتئین کینازهایی که در به راه انداختن تکثیر سلولی و پاسخ‌های سلولی دیگر اهمیت دارند را فسفریله می‌کند. تغییر سطوح فعالیت فاکتورهای MAPK منجر به نسخه‌برداری تغییر یافته ژن‌هایی است که در سیکل سلولی مهم هستند. هم چنین، فعال شدن ERK باعث حفاظت نوروها تحت شرایط پاتولوژیک مانند تشنج، آلزایمر، ایسکمی مغزی و یا محرومیت از فاکتورهای نوروتروفیک است (۱۴، ۱۵). نقش حفاظتی ERK از طریق فعال شدن رسپتورهای تیروزین کینازی (۱۶)، القاء BCL2, Bad و NF- κ B یا مهار آزاد شدن سیتوکروم C اتفاق می‌افتد (۱۷). ارتباط میان مسیر MAPK و سخته مغزی از نیمه‌های سال ۱۹۹۰ مطالعه شده است. والتون و همکارانش تأثیر سخته مغزی بر روی فعال شدن مسیر MAPK را نشان دادند (۱۸). قبلاً هم ثابت شده که بیان انواع MAPKs، شامل ERK, p38 و JNK به میزان زیادی پس از MCAO (Middle cerebral artery occlusion) در مغز موش افزایش می‌یابد (۱۴). باوجود اطلاعات فوق، نقش ERK در القاء تحمل به ایسکمی شده توسط هایپراکسی هنوز ناشناخته است. با توجه به این‌که مقاومت‌سازی و حفاظت مغز در برابر آسیب‌های ایسکمی - جریان خون مجدد از مباحث اساسی در حوزه پیشگیری و درمان بیماری‌های مغزی است، یافته‌های این پژوهش ضمن روشن‌تر کردن برخی آثار مهم و فیزیولوژیکی هایپراکسی نورموباریک بر مغز می‌تواند بستری فراهم کند تا برای جلوگیری از بروز سخته مغزی به آثار پیش‌شرطی سازی، گرایش حاصل شود.

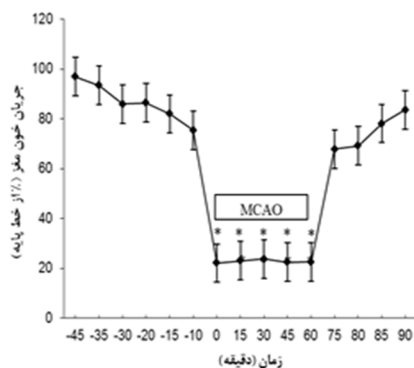
مواد و روش‌ها

حیوانات و شرایط آزمایشگاهی

ها به بیمارستان شریعتی منتقل شده و به کمک دستگاه
Arterial Blood Gas (ABG)، غلظت گازهای خون
تعیین شد.

بررسی تغییرات جریان خون شریان MCA

برای اطمینان از ایجاد مدل سکنه، کاهش جریان
خون مغز به حدود ۸۰ درصد از خط پایه لازم است. از شروع
جراحی تا زمان بسته شدن رگ مدتی طول می کشد؛ نقطه
صفر، زمان شروع سکنه است. پس از جریان مجدد نیز مدتی
طول می کشد تا جریان خون دوباره افزایش یابد که البته به
دلیل بسته شدن برخی مسیرها، جریان خون به ۱۰۰ درصد اولیه
نمی رسد (شکل ۱).



شکل ۱. تغییرات جریان خون مغزی قبل، حین و بعد از سکنه.
مدل سکنه مغزی (MCAO middle cerebral artery occlusion).
داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار، به کمک
آزمون واریانس یک طرفه و پس آزمون بون فرونی نمایش
داده شده‌اند و $p < 0.05$.

ارزیابی رفتاری نقایص عصبی

معاینه‌های آسیب عصبی ۲۴ ساعت پس از اعمال
سکنه-جریان خون مجدد انجام می شد. ۲۴ ساعت بعد از
شروع انسداد تا کشته شدن حیوان مراقبت‌های خاص انجام
می شد. یافته‌های آسیب عصبی با ۵ امتیاز شناسایی می شوند
(۵، ۲۱): امتیاز صفر (۰) هیچ گونه نقصی نشان نمی دهد؛ امتیاز
یک (نارسایی کامل در انتهای پنجه‌های جلویی) که یک
نقص عصبی کانونی خفیف در نظر گرفته می شود. شماره دو
(به چپ چرخیدن) نقص عصبی کانونی متوسط؛ شماره ۳

کاروتید راست ایجاد نموده و نخ نایلون ۰-۳ را با دقت، حدود
۲۲-۲۰ میلی متر از آن عبور داده تا جایی که سر نخ نایلونی
ابتدای سرخرگ سری جلویی را با احساس مقاومت ملایم
لمس کند. طی 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. سرعت
تنفسی - قلبی و غلظت گازها در محدوده فیزیولوژیک کنترل
می شد. جریان خون مغز نیز پیوسته با دستگاه لیزر داپلر
(LDF; Moor Instrument, UK) برای اطمینان از
ایجاد مدل سکنه (در ایجاد ایسکمی موفق بیش از ۸۰ درصد
کاهش جریان خون لازم است) (۲۰، ۱۹) استفاده شد. جریان
خون دوباره با خارج کردن نخ نایلونی بعد از ۱ ساعت برقرار
می شد. گروه‌های شاهد در همان شرایط گروه‌های سکنه،
به جز عدم عبور نخ نایلونی بیمار شدند.

اندازه گیری فشار خون و تعداد حرکات تنفسی، غلظت
گازهای خونی و pH خون

فشار خون حیوانات پس از بی هوشی، به کمک
دستگاه پاور لب (AD instrument Co, Australia)
اندازه گیری می شد؛ به این منظور، با استفاده از دستگاه
استریوتاکس و یک مته دندانپزشکی، سوراخی به قطر ۲
میلی متر بر روی جمجمه و سمت راست، در ۱ میلی متری
خلفی و ۵ میلی متری جانبی بریگما ایجاد می شد. سپس، یک
پروب لیزری سوزنی روی سخت شامه قرار می گرفت. ضبط
جریان، ۳۰ دقیقه قبل از انجام MCAO آغاز می شد و تا
زمانی که سیگنال لیزر داپلر به میزان قابل توجهی کاهش
می یافت (بیش از ۷۵ درصد کاهش جریان خون مغزی برای
القاء ایسکمی موفقیت آمیز ضروری است)، ادامه داشت. هم
چنین، میزان حرکات تنفسی از طریق شمارش تعداد حرکات
شکم حیوانات اندازه گیری شد. برای اندازه گیری غلظت
گازهای خونی و pH خون، نمونه برداری از شریان کاروتید
گردن؛ در دمای ۴ درجه سانتی گراد و با سوزن خمیده؛ جهت
جلوگیری از ورود هوا به درون خون انجام شد. سپس، نمونه

آماده کردن استاندارد: طبق پروتکل، ۶ اپندورف ۱/۵ میلی لیتری تهیه کرده (تهیه استاندارد حداکثر یک ساعت قبل از خواندن صورت می گیرد)؛ به اولین اپندورف ۴۵۰ میلی لیتر Assay Buffer اضافه کرده و به بقیه لوله ها ۲۵۰ میلی لیتر از این معرف اضافه کرده. به اولین لوله ۵۰ میکرو لیتر از محلول استاندارد اضافه و ورتکس کرده و ۵ دقیقه صبر می کنیم و دوباره ورتکس می نمایم. ۲۵۰ میلی لیتر از محلول اولین لوله را به لوله شماره ۲ اضافه کرده و ورتکس می کنیم. مجدداً ۲۵۰ میلی لیتر از لوله شماره ۲ به لوله شماره ۳ اضافه و ورتکس می کنیم. این کار را تا لوله شماره ۶ انجام داده و در نهایت ۲۵۰ میلی لیتر از لوله ۶ برداشته و بیرون می ریزیم.

آماده کردن بافر لیز RIPA: مهارکننده پروتئاز با غلظت ۰/۵ میکرو لیتر بر میلی لیتر و PMSF به میزان ۱ میلی مول، همچنین سدیم ارتوانادات با غلظت ۲ میلی مول و سدیم پیروفسفات با غلظت ۲۰ میلی مول بلافاصله قبل از استفاده به بافر بایستی اضافه شود (Sigma, Germany).

اندازه گیری غلظت پروتئین نمونه ها: در این مرحله از پلیت حاوی چاله های مخصوص که دارای آنتی بادی منوکلونال غیر متحرک برای اتصال به ERK فسفریله است استفاده شد و هر نمونه دو بار تکرار داشت. در این پلیت، دو چاله اول Blank می باشند. ابتدا، ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول استاندارد (از لوله ۱-۶) را به داخل چاله های مناسب اضافه کرده. ۱۰۰ میکرو لیتر از Assay Buffer به چاله بعد از استانداردها اضافه کرده؛ صفر پیکو گرم بر میلی لیتر که به عنوان کنترل با غلظت پروتئین صفر است. در مرحله بعد، ۱۰۰ میکرو لیتر از نمونه به داخل چاله های مناسب اضافه کرده (به جز چاله های استاندارد و کنترل) و بعد، با پارافیم در پلیت را محکم چسبانده و در دمای اتاق به مدت ۱ ساعت shake کرده. سپس، محتوی چاله ها را خالی کرده و ۴ مرتبه به وسیله بافر شستشو (حدود ۴۰۰ میلی لیتر برای هر چاله)، شستشو می دهیم. اضافه کردن ۱۰۰ میکرو لیتر از ERK Antibody (rabbit polyclonal) به چاله ها به جز Blank مرحله بعدی کار است

(افتادن به سمت چپ) نقص کانونی شدید؛ حیوانات شماره ۴ به طور خود به خودی نمی توانند راه بروند و سطح هوشیاری پایینی دارند و حیواناتی که طی ۲۴ ساعت بعد از جراحی می میرند در صورتی که بعد از رنگ آمیزی بخش وسیعی از مغز شان آسیب دیده باشد و مرگ منحصر به سکنه مغزی باشد، به آن ها شماره ۵ داده می شود.

اندازه گیری میزان فعالیت ERK

برای اندازه گیری میزان فعالیت ERK از کیت مخصوص استفاده شد. این کیت، مجموعه ای کامل برای تعیین فعالیت ERK در لیز سلولی است (۲۲، ۲۳) که از شرکت Enzo Life Sciences خریداری شد

آماده کردن نمونه ها: حیوانات ۵ یا ۲۴ ساعت پس از القاء MCAO با دوز بالای داروی کلرال هیدرات (۸۰۰ میلی گرم در کیلوگرم) بی هوش می شدند. پس از جدا نمودن پوست سر حیوان، استخوان جمجمه با دقت باز شده و مغز را به سرعت خارج نموده، نیمکره راست را جدا کرده، داخل لوله اپندورف قرار داده و بلافاصله به داخل تانک نیتروژن مایع انداخته می شدند تا نمونه ها سریع تا دمای ۱۸۰- درجه سانتی گراد فریز شوند. سپس، هر نمونه پس از جمع آوری به فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد انتقال می یافت. برای آماده کردن نمونه ها، آن ها را از فریزر خارج کرده و با استفاده از بافر لیز، نمونه ها را لیز کرده. سانتریفیوژ سلولی به مدت ۵ دقیقه و دور ۱۵۰۰ انجام شد. بخش شناور سطحی را جدا کرده و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری کرده. قبل از اندازه گیری، نمونه های فریز شده در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار می گرفتند.

آماده کردن بافر شستشو: حل کردن ۵۰ میلی لیتر از بافر غلیظ در ۹۵۰ میلی لیتر آب دیونیزه.

آماده کردن Assay Buffer: فوراً و قبل از اندازه گیری بایستی مهارکننده پروتئاز با غلظت ۰/۵ میکرو لیتر بر میلی لیتر و PMSF به میزان ۱ میلی مول به این معرف اضافه شود (Sigma, Germany).

تحلیل آماری

پارامترهای فیزیولوژیکی با استفاده از آزمون واریانس دوطرفه و پس آزمون بون فرونی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. امتیازهای نقص عصبی با استفاده از آزمون فیشر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تمام تجزیه و تحلیل‌ها با کمک نرم افزار Graph Pad Prism و رسم اشکال با استفاده از نرم افزار Excel انجام شد. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش گردیدند. $p < 0.05$ به عنوان حداقل سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

پارامترهای شرایط تجربی

غلظت اکسیژن داخل جعبه بر حسب درصد در شرایط نورموکسی نورموباریک (۲۱ درصد) و هایپراکسی نورموباریک (۸۵ تا ۹۵ درصد) در در نظر گرفته شد. بر اساس ارزیابی‌های گازهای خونی شریانی (جدول ۱)، فشار اکسیژن شریانی در شرایط هایپراکسی بسیار بالاتر از فشار اکسیژن شریانی در شرایط نورموکسی بود ($p < 0.0001$).

جدول ۱. ارزیابی پارامترهای pH، فشار اکسیژن، فشار دی‌اکسید کربن، فشارخون و سرعت تنفس در گروه‌های آزمایشی، ($p < 0.0001$ ، هایپراکسی در مقایسه با نورموکسی)

گروه‌ها	pH	فشار اکسیژن (میلی‌متر جیوه)	فشار دی‌اکسید کربن (میلی‌متر جیوه)	فشارخون (میلی‌متر جیوه)	سرعت تنفسی (هرتز)
شاهد	۷/۱/ \pm ۶۳	۹۰/۳۴ \pm ۲/۳۵	۴۱/۲۲/ \pm ۱۳	۸۵/۱۶ \pm ۴۳/۷۵	۲/۰۵/ \pm ۶۸
شاهد + هایپراکسی	۷/۲/ \pm ۱۱	۳۳۹/۶/ \pm ۴۴***	۴۰/۰۸/ \pm ۹۵	۸۳/۹۹ \pm ۸۲/۵۱	۱/۸۸/ \pm ۹۲
سکته + نورموکسی	۷/۳ \pm ۱۲	۹۴/۳۴ \pm ۲/۳۵	۴۰/۶۴ \pm ۱۵	۸۵/۲۴ \pm ۱۶/۶	۱/۵۷ \pm ۱۳۵
سکته + هایپراکسی	۷/۲ \pm ۱۰۹	۳۵۷/۴ \pm ۷/۵۸***	۴۰/۲ \pm ۰/۱۲	۸۴/۶۳ \pm ۱۲/۰۴	۱/۴۱ \pm ۱۷

بررسی تغییرات میانگین امتیازهای نقص عصبی

میانگین امتیازهای نقص عصبی به واسطه انسداد گذرای شریان مرکزی در گروه هایپراکسی به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت ($p = 0.022$) (جدول ۲).

جدول ۲. توزیع امتیازهای عصبی در هر گروه

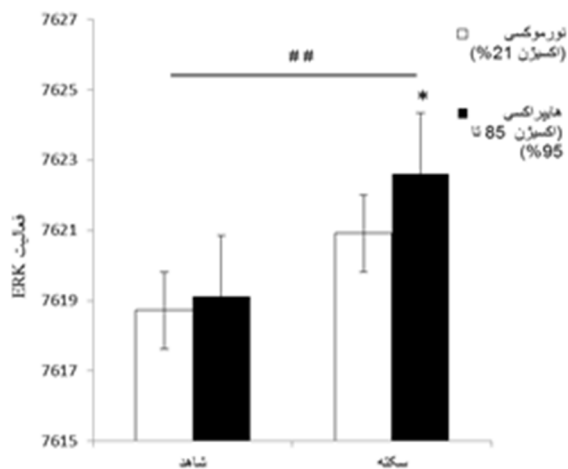
ردیف	گروه‌ها	تعداد نقص‌های عصبی هر گروه	تعداد کل	p
۱	سکته	۰ ۴ ۱۲ ۶ ۲	۲۴	p=0.0802
۲	سکته + هایپراکسی	۹ ۲ ۶ ۵ ۲	۲۴	p=0.0220
۳	کل	۹ ۶ ۱۸ ۱۱ ۴	۴۸	
	امتیاز شماره	۰ ۱ ۲ ۳ ۴		

اثر هایپراکسی بر فعالیت ERK

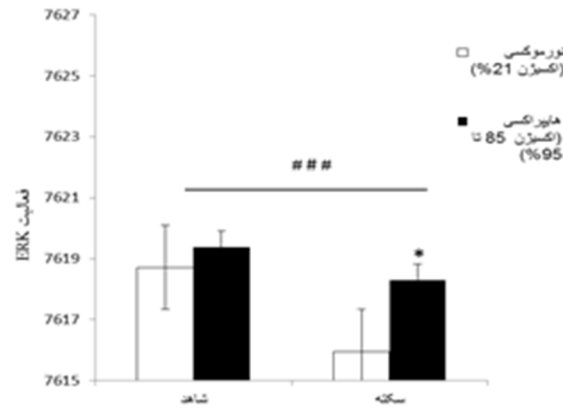
بررسی اثر هایپراکسی بر فعالیت ERK، ۵ ساعت پس از

ایجاد مدل MCAO

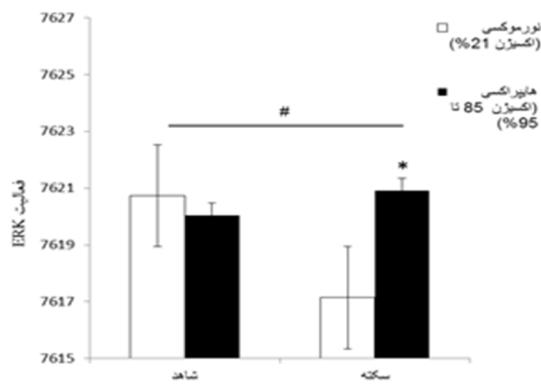
شکل ۲ میزان فعالیت ERK در قشر مغز، ۵ ساعت پس از القاء MCAO را نشان می‌دهد. مقایسه میانگین میزان فعالیت ERK نشان می‌دهد که در ناحیه قشر، گروه‌های سکته نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری در مقدار فعالیت ERK دارند (FStroke vs Sham=47.96, $p<0.01$). در این ناحیه هایپراکسی سبب افزایش معنی‌دار فعالیت این پروتئین در مقایسه با گروه نورموکسی شد (FHO vs RA=6.58, $p<0.05$). در ناحیه مرکزی مغز، ۵ ساعت پس از ایجاد مدل MCAO (شکل ۳)، میزان فعالیت ERK در گروه سکته به‌طور معنی‌دار بیش از گروه شاهد بود (FStroke vs Sham=19.99, $p<0.01$). هایپراکسی تأثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت ERK نسبت به گروه نورموکسی در این ناحیه نداشت (FHO vs RA=0.464, $p=0.508$).



شکل ۲. اثر هایپراکسی بر فعالیت ERK در قشر مغز پس از ۵ ساعت از اعمال MCAO. داده‌ها به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار، به کمک آزمون واریانس دوطرفه و پس از آزمون بن‌فرونی نمایش داده شده‌اند. $p<0.05$ ، گروه هایپراکسی نسبت به نورموکسی و $p<0.01$ ، گروه‌های سکته نسبت به گروه‌های شاهد سنجیده شده است.



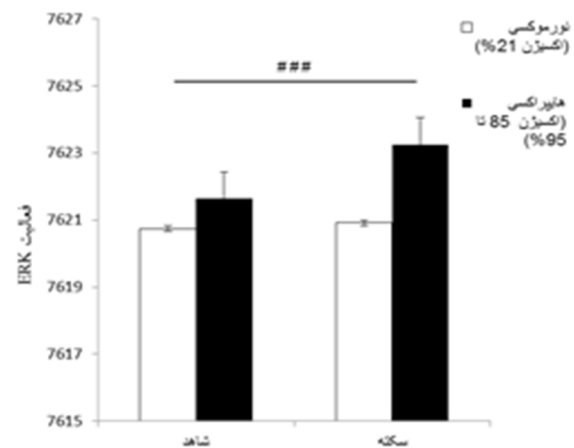
شکل ۴. اثر هایپراکسی بر فعالیت ERK در قشر مغز پس از ۲۴ ساعت از اعمال MCAO. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار، به کمک آزمون واریانس دوطرفه و پس آزمون بن فرونی نمایش داده شده‌اند. $p < 0.05^*$ ، گروه هایپراکسی نسبت به نورموکسی و $p < 0.001###$ ، گروه‌های سکتی نسبت به گروه‌های شاهد سنجیده شده است.



شکل ۵. اثر هایپراکسی بر فعالیت ERK در مرکز مغز پس از ۲۴ ساعت از به هوش آمدن حیوانات. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار، به کمک آزمون واریانس دوطرفه و پس آزمون بن فرونی نمایش داده شده‌اند. $p < 0.05^*$ ، گروه هایپراکسی نسبت به نورموکسی و $p < 0.05\#$ ، گروه‌های سکتی نسبت به گروه‌های شاهد سنجیده شده است.

بحث

در این مطالعه تأثیر هایپراکسی نورموباریک بر امتیاز نقایص عصبی و میزان فعالیت ERK بررسی شد. در این کار، با به کار بردن هایپراکسی در مدل MCAO، میانگین امتیاز نقایص عصبی به طور قابل معنی داری کاهش یافت. این یافته‌ها موافق با آزمایش‌های انجام شده قبلی مدل MCAO



شکل ۳. اثر هایپراکسی بر فعالیت ERK در مرکز مغز پس از ۵ ساعت از اعمال MCAO. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار، به کمک آزمون واریانس دوطرفه و پس آزمون بن فرونی نمایش داده شده‌اند. $p < 0.001###$ ، گروه‌های سکتی نسبت به گروه‌های شاهد سنجیده شده است.

بررسی اثر هایپراکسی در فعالیت ERK، ۲۴ ساعت پس از ایجاد مدل MCAO

مقایسه میانگین فعالیت ERK نشان می‌دهد که در ناحیه قشر مغز (شکل ۴)، ۲۴ ساعت پس از MCAO، گروه‌های سکتی نسبت به شاهد، کاهش معنی داری در فعالیت ERK نشان می‌دهند (FStroke vs Sham=28.48, $p < 0.001$). در این ناحیه میزان فعالیت ERK در گروه هایپراکسی به طور معنی داری در مقایسه با گروه نورموکسی بیشتر بود (FHO vs RA=17.37, $p < 0.05$). ۲۴ ساعت پس از القاء MCAO در ناحیه مرکزی مغز (شکل ۵)، میزان فعالیت ERK در گروه‌های سکتی به طور معنی دار کمتر از گروه‌های شاهد بود (FStroke vs Sham=6.42, $p < 0.05$). هایپراکسی سبب افزایش معنی دار فعالیت ERK در این ناحیه شد (FHO vs RA=7.646, $p < 0.05$).

ناحیه قشر و مرکز مغز داشتند. در ناحیه مرکز مغز نیز میزان فعالیت ERK در گروه‌های سکنه به‌طور معنی‌دار کمتر از گروه‌های شاهد بود؛ که با توجه به وجود ساختارهای حساسی چون آمیگدال، هیپوکمپ، تالاموس، هیپوتالاموس و هسته‌های حساس دیگر در این ناحیه، آسیب ناشی از کاهش فعالیت حفاظتی این فاکتور می‌تواند قابل تامل باشد. نقش ERK در مدل ایسکمی بحث‌برانگیز است؛ فعالیت ERK هم در جهت حفاظت نورونی و هم در بدتر شدن آسیب ایسکمی است. برای مثال، فعالیت آن ممکن است به‌وسیله تنظیم افزایشی $IL-1\beta$ سبب بدتر شدن التهاب و نکروز شود (۲۵). در گزارشی بیان شده که ERK سبب تنظیم مثبت بیان کاسپاز ۳ در مغز پس از ایسکمی می‌شود (۲۶). از طرف دیگر، استرادیول نقش حفاظت نورونی خود را از طریق فعال کردن ERK در مدل ایسکمی ایفا می‌کند (۲۷)؛ در این حال، فعال شدن ERK منجر به فسفوریلاسیون CREB می‌شود که موجب تنظیم مثبت ژن‌های هدف مهم حفاظت نورونی مانند فاکتورهای نوروتروفیک مغزی و فاکتور آنتی‌آپوپتوز Bcl-2 که در اینتگریتی غشا خارجی میتوکندری نقش دارد و یا با بلوک پروتئین پروآپوپتوتیک Bad، سبب بلوک آپوپتوز شود (۲۸). با در نظر گرفتن شواهد فوق، افزایش فعالیت ERK در گروه‌های هایپراکسی سبب القای مسیرهای حفاظت نورونی و بقای سلولی به دنبال سکنه مغزی است؛ هرچند، اثبات این مدعا نیاز به تحقیقات گسترده سلولی و مولکولی بعدی بر روی گیرنده‌های درگیر و واسطه‌های سیگنالینگ دارد. پیشنهاد می‌شود که فسفوریلاسیون $Raf-1$ ممکن است در غیرفعال شدن سریع آبخار Raf/ERK بعد از فعال شدن سریع اولیه نقش داشته باشد که در این حالت نوعی لوپ برقرار می‌شود. به‌طوری که ERK نیز بر روی فسفوریلاسیون Raf نقش کلیدی دارد. با توجه به اینکه $Raf-1$ یکی از سوسترهای ERK است حدس زده می‌شود که فعال شدن اولیه قوی ERK ممکن است Raf را فسفریله کرده و با فیدبک منفی دنبال شده است. در این شرایط، دو فرضیه مطرح

است (۵). نتایج سنجش غلظت اکسیژن نشان می‌دهد که نوسانات غلظت اکسیژن بین ۸۵-۹۵ درصد و میانگین غلظت اکسیژن ۹۰ درصد بوده است. ۱۰ درصد باقیمانده احتمالاً به دلیل نشت در دستگاه هایپراکسی و هم چنین CO_2 ناشی از تنفس حیوانات می‌باشد. هر چند از سودالایم (جاذب CO_2) استفاده کردیم تا CO_2 موجود در جعبه را جذب نماید با این وجود اثرات آن اجتناب‌ناپذیر می‌باشد. در پایان پیش‌شرطی با هایپراکسی، گازهای خونی شریانی تعدادی از رت‌ها مورد سنجش قرار می‌گرفت. نتایج بیان‌گر افزایش معنی‌دار فشار اکسیژن بود. این نتایج با سایر کارهای انجام شده در زمینه هایپراکسی مطابقت دارد (۵)، بنابراین شرط ایجاد هایپراکسی برقرار می‌باشد.

بررسی فعالیت ERK در زمان‌های مختلف پس از MCAO، بیان‌گر نوسان فعالیت ERK در گروه‌های مختلف و نواحی قشر و مرکز مغز است. براساس نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه، ۵ ساعت پس از جریان مجدد در ناحیه قشر، گروه‌های سکنه نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری در مقدار فعالیت ERK داشتند. در این ناحیه هایپراکسی، سبب افزایش معنی‌داری فسفوریلاسیون این پروتئین در مقایسه با گروه نورموکسی شد؛ اما در همین زمان، هایپراکسی اثر معنی‌داری بر روی فعالیت ERK در مرکز مغز نداشت. این تفاوت میان قشر و مرکز مغز احتمالاً ناشی از تفاوت میان سلول‌های مغز در این دو ناحیه و یا واسطه‌های مختلف فعال شده در مسیر سیگنالینگ است. از طرف دیگر، ممکن است به واسطه هایپراکسی، در نواحی مختلف مغز میزان بیان‌گیرنده‌های درگیر در شروع مسیر سیگنالینگ MAPK متفاوت باشد. پس از ۲۴ ساعت از جریان مجدد، در ناحیه قشر، گروه‌های سکنه نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری در میزان فعالیت ERK نشان دادند؛ که با توجه به کارهای قبلی انجام شده، بیان‌گر کاهش حفاظت نورونی در این ناحیه است (۲۴). در این زمان، گروه‌های هایپراکسی به‌طور معنی‌داری میزان فعالیت ERK بیشتری در مقایسه با گروه نورموکسی در هر دو

شود. احتمالاً پس از گذشت ۲۴ ساعت و با فعال شدن سایر عوامل مرگ سلولی و کاهش فسفوریلاسیون ERK، میزان پیشرفت اثرات سکنه بیشتر شده، به حدی که معمولاً پس از ۲۴ ساعت بسیاری از حیوانات زنده نمی‌مانند. با توجه به اینکه در هر دو حالت ۵ و ۲۴ ساعت پس از سکنه، هایپراکسی توانسته است سبب افزایش فعالیت ERK شود، به نظر می‌رسد فعالیت ERK بیشتر در حفاظت نورونی در گیر باشد تا مرگ و التهاب؛ بنابراین افزایش میزان فعالیت ERK در گروه هایپراکسی پس از ۲۴ ساعت در جهت حفاظت عصبی عمل نموده است ولی چون سایر عوامل مخرب قوی‌تر عمل نموده‌اند، هایپراکسی به‌تنهایی توانسته از پیشرفت سکنه ممانعت نماید. با توجه به موارد ذکر شده فوق ضرورت کارهای ایمنو در تعیین تفاوت ناحیه‌ای فسفوریلاسیون ERK ضروری به نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری

تفاوت اثر هایپراکسی در قشر و مرکز مغز ممکن است مربوط به مکانیسم‌های متفاوت بیوشیمیایی و سلولی باشد. به‌منظور بررسی مکانیسم دقیق و تفسیر نوسان هم‌زمان هایپراکسی و فعالیت ERK در زمان به‌کارگیری هم‌زمان سکنه و هایپراکسی، مطالعات بیشتری لازم است. در نهایت می‌توان امید داشت که استفاده از هایپراکسی نورموپاریک متناوب بتواند در به حداقل رساندن آسیب ایسکمی از طریق به‌کارگیری فاکتورهای حیاتی و یا به حداقل رساندن اثرات سمی فاکتورهای مرگ مؤثر باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. از مشاوره علمی و مؤثر دکترمانی تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از آقای دکتر حسن در تأمین داروی مهارکننده پروتئاز PMSF (Phenyl Methane Sulfonyl Fluoride) تقدیر می‌گردد.

می‌شود: ۱- دفسفوریلاسیون مستقیم Raf. ۲- مهار غیرمستقیم مهار ERK. در رابطه با تنظیم فیدبک منفی، زمانی که از PP2A (protein phosphatase 2A) استفاده شد و ERK فعال شد، تنظیم مثبت رونویسی از ژن‌های p21 و GAP43 (Growth Associated Protein 43) که مرتبط با تمایز هستند صورت می‌گیرد و با فسفوریلاسیون Raf و غیرفعال شدن ERK این فعالیت‌ها مهار می‌شود؛ بنابراین فعالیت حفاظت نورونی ERK در مراحل دوگانه یادشده فعالیت و غیرفعال شدن به‌وسیله ایسکمی زیر کشنده ممکن است با مهار تکثیر بیش‌ازحد سلول که در شکل‌گیری تومور و یا با مهار تمایز که سبب پیری و مرگ سلولی همراه باشد، جلوگیری شود (۲۹). در کار ما نیز احتمالاً کاهش میزان ERK فسفریله در جهت جلوگیری از تمایز و تکثیر سلولی باشد. البته لازم به یادآوری است که در بیشتر مطالعات، ماکزیمم فعالیت ERK بین ۳۰ دقیقه تا ۲ ساعت پس از خونرسانی مجدد است؛ باین وجود، سیگنال می‌تواند پس از ۶ ساعت و حتی طولانی‌تر نیز آشکار شود؛ هرچند ERK به‌طور عادی در گیر در رشد سلولی و تمایز است، فعال شدن طولانی مسیر ERK ممکن است در به هم زدن حیات سلولی مهم باشد (۳۰). به‌نظر می‌رسد، افزایش ERK قبل از ایسکمی در ارتباط افزایش حیات نوروون پس از ایسکمی باشد و پیش‌شرطی سازی سبب کاهش آپوپتوز حاصل از سکنه از طریق تنظیم مثبت ERK/ MAPK است. در هر صورت، مکانیسم فعالیت دوگانه ERK/MAPK مشخص نیست اما ممکن است با منشأ جایگاه سلولی، جفت شدن سیگنال و یا الگو زمانی ریلیز همراه باشد (۳۱). شواهد نشان می‌دهند که پیش‌شرطی سازی با هایپراکسی می‌تواند از طریق القاء فسفوریلاسیون ERK در نوروون‌ها و آستروسیت‌ها، در برابر آسیب‌های عصبی پس از سکنه مغزی محافظت ایجاد کند (۲۴). در کار ما نیز در ساعات اولیه پس از سکنه میزان فعالیت ERK افزایش داشت تا از پیشرفت اولیه آسیب نورونی جلوگیری شود و تکثیر و تمایز ضروری برای حیات فراهم

منابع

- Human Lung Cancer Cells through Oxidative Stress Mediated ERK Signaling. *Journal of Thoracic Oncology*. 2017; 12(1):S1144-S5.
10. Nyunoya T, Monick MM, Powers LS, Yarovinsky TO, Hunninghake GW. Macrophages survive hyperoxia via prolonged ERK activation due to phosphatase down-regulation. *Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280(28):26295-302.
11. Keyse SM. An emerging family of dual specificity MAP kinase phosphatases. *Biochim Biophys Acta*. 1995; 1265:152- 60.
12. Roux P, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004; 68:320-44.
13. Wang Y, Xu X, Su W, Wang Q, Zhu W, Chen F, et al. Activation and clinical significance of p38 MAPK signaling pathway in patients with severe trauma. *J Surg Res*. 2010; 161:119-25.
14. Wu DC, Ye W, Che XM, Yang GY. Activation of mitogen-activated protein kinases after permanent cerebral artery occlusion in mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000;20:1320-30.
15. Verma R, Harris NM, Friedler BD, Crapser J, Patel AR, Venna V, et al. Reversal of the detrimental effects of post-stroke social isolation by pair-housing is mediated by activation of BDNF-MAPK/ERK in aged mice. *Scientific reports*. 2016;6:25176.
16. Bing RH, Chun LL, Darren JP. Alteration of MAP Kinase Pathways After Transient Forebrain Ischemia *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2000;20:1089-95.
17. Lan-Feng C, Wei-Ti W, Vithal K G, Chi-Hsin L, Yung-Yen C, Chi-Mei H. Ischemic brain cell-derived conditioned medium protects astrocytes against ischemia through GDNF/ERK/NF-kB. *BRAIN RESEARCH*. 2008; 1239:24-35.
18. Walton KM, DiRocco R, Bartlett BA, Koury E, Marcy VR, Jarvis B, et al. Activation of p38MAPK in microglia after ischemia. *J Neurochem*. 1998; 70:1764- 7.
1. Canazza A, Minati L, Boffano C, Parati E, Binks S. Experimental models of brain ischemia: a review of techniques, magnetic resonance imaging, and investigational cell-based therapies. *Frontiers in neurology*. 2014; 5:19.
2. Faraji F, Ranjbar A, Eshrati B, Talaie A, Shafie N, Pirasteh S. Comparing the oxidative stress indexes of CVA patients with control group. *Arak Medical University Journal*. 2008; 11(3):109-16.
3. Vijayakumar T, Sangwan A, Sharma B, Majid A, Rajanikant GK. Cerebral ischemic preconditioning: the road so far ... *Molecular neurobiology*. 2015; 53(4):2579-93.
4. Ayodele M, Koch S. Ischemic Preconditioning in the Intensive Care Unit. *Current Treatment Options in Neurology*. 2017; 19(6):24.
5. Alavian F, Hajizadeh S, Bigdeli MR, Javan M. The role of protein kinase C in ischemic tolerance induced by hyperoxia in rats with stroke. *EXCLI journal*. 2012; 11:188.
6. Vincent J-L, Taccone FS, He X. Harmful Effects of Hyperoxia in Postcardiac Arrest, Sepsis, Traumatic Brain Injury, or Stroke: The Importance of Individualized Oxygen Therapy in Critically Ill Patients. *Canadian respiratory journal*. 2017;2017.
7. 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; 130:1631-42.
8. Shih C-C, Liao C-C, Sun M-F, Su Y-C, Wen C-P, Morisky DE, et al. A retrospective cohort study comparing stroke recurrence rate in ischemic stroke patients with and without acupuncture treatment. *Medicine*. 2015;94(39).
9. Joo H, Mo JY, Kim IK, Kang HH, Lee SH. P3. 01-041 Anti-Cancer Effect of Hyperoxia on
19. Bigdeli MR, Hajizadeh S, Froozandeh M, Rasulian B, Heidarianpour A, Khoshbaten A. Prolonged and intermittent normobaric hyperoxia induce different degrees of ischemic tolerance in

- rat brain tissue. Brain research. 2007; 1152:228-33.
20. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. stroke. 1989; 20:91-84(1)
21. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke. 1989; 20:84-91.
22. Chard T. An Introduction to Radioimmunoassay & Related Techniques. Elsevier. 1990.
23. Thiels E, et al. Extracellular signal-regulated kinase, synaptic plasticity, and memory. Neurosci. 2001; 12(4):327-45.
24. Wu H, Yang S-F, Dai J, Qiu Y-M, Miao Y-F, Zhang X-H. Combination of early and delayed ischemic postconditioning enhances brain-derived neurotrophic factor production by upregulating the ERK-CREB pathway in rats with focal ischemia. Molecular medicine reports. 2015;12(5):6427-34.
25. Wang Z, Wu D, Huang F, Yang G. Inhibition of MEK/ERK 1/2 pathway reduces pro-inflammatory cytokine interleukin-1 expression in focal cerebral ischemia. BRAIN RESEARCH. 2004; 996:55-66.
26. Wang X, Wang H, Xu L, Rozanski DJ, Sugawara T, Chan PH, et al. Significant neuroprotection against ischemic brain injury by inhibition of the MEK1 protein kinase in mice: exploration of potential mechanism associated with apoptosis. J Pharmacol. 2003; 304:172-8.
27. Yi H, Bao X, Tang X, Fan X, Xu H. Estrogen modulation of calretinin and BDNF expression in midbrain dopaminergic neurons of ovariectomised mice. Journal of chemical neuroanatomy. 2016; 77:60-7.
28. Kitagawa K. CREB and cAMP response element-mediated gene expression in the ischemic brain. FEBS J. 2007; 274:3210-7.
29. Melania A, Gianfriddo M, Vannucchi M, Cipriani S, Baraldi P, Giovannini M, et al. The selective A2A receptor antagonist SCH 58261 protects from neurological deficit, brain damage and activation of p38 MAPK in rat focal cerebral ischemia. BRAIN RESEARCH. 2006;1073-1074:470-80.
30. Irving E, Barone F, Reitha A, Hadingham S, Pardone A. Differential activation of MAPK/ERK and p38/SAPK in neurones and glia following focal cerebral ischaemia in the rat. Mol Brain Res. 2000; 77:65-75.
31. Diansan S, John Riley B, William M, Armstead, Renyu L. Salvonorin A Pretreatment Preserves Cerebrovascular Autoregulation After Brain Hypoxic/Ischemic Injury via Extracellular Signal-Regulated Kinase/Mitogen Activated Protein Kinase in Piglets. Neuroscience in Anesthesiology and Perioperative Medicine. 2012;114:1-5.