Physiology and Pharmacology, 11(3), 208 - 217
Fall 2007 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Study on the effect of neuroprotective prolonged and intermittent normobaric hyperoxia on serum level of TNF-α and glutamate transporters expression in rat brain

Mohammad Reza Bigdeli[1], Sohrab Hajizadeh[1*], Ali Khoshbaten[2], Mehdi Froozandeh[3]

1. Dept. Physiology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Trauma Research Center, Baqiyatallah (a.s.) Medical Sciences University, Tehran, Iran
3. Dept. Medical Biotechnology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Archive of SID

Abstract

Introduction: Prolonged and intermittent oxygen pre-exposure is associated with protection against ischemic reperfusion (IR) injury. In the current study, attempts were made to investigate the relationship between exposure to prolonged and intermittent normobaric hyperoxia (NBHO) and expression of excitatory amino acids transporters (EAATs) and TNF-α level.

Method: Rats were divided into four main experimental groups, each of 21 animals. The first two were exposed to 95% inspired NBHO 4 h/day for 6 consecutive days (intermittent NBHO) or for 24 continuous hours (prolonged NBHO). The second two groups considered as controls and were exposed to 21% oxygen in the same chamber (normobaric normoxia, NBNO). Each main group was subdivided to MCAO (middle cerebral artery occlusion), sham-operated (without MCAO) and intact (without any surgery) subgroups. After 24h, MCAO subgroups were subjected to 60 min of right MCAO. After 24 h reperfusion, neurologic deficit scores (NDS) were assessed in MCAO-operated subgroups. Immediately and 48 h after pretreatment, blood sampling were done for assessing level of serum TNF-α. The effect of intermittent and prolonged NBHO on EAATs expression level was also measured using western blotting.

Result: Preconditioning with prolonged and intermittent NBHO decreased NDS and up-regulated EAAT1, EAAT2, and EAAT3, significantly. Also, oxygen exposure of prolonged and intermittent NBHO increased the level of serum TNF-α.

Conclusion: Although further studies are needed to clarify the protective mechanisms OF hyperoxia, the intermittent and prolonged NBHO seems to partly exert their effects via increasing the serum level of TNF-α and up-regulation of glutamate transporters. However, the intermittent NBHO seems to have appropriate effects with low toxicity.

Keywords: Normobaric Hyperoxia, Brain ischemic tolerance, Stroke, Neuroprotection, Glutamate transporter, TNF-α, Rat

* Coresponding Author Email: hajizads@modares.ac.ir
Available online @: www.phypha.ir/ppj

www.SID.ir

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۱ (۳)، ۲۰۸ – ۲۱۷
پاییز ۱۳۸۶

بررسی اثر پیش شرطی سازی با هیپرکسی نورموباریک متناوب و پیوسته بر بیان ناقلین گلوتامات در مغز رت و سطح TNF-α سرم

محمدرضا بیگدلی، سهراب حاجی‌زاده*، علی خوش‌باطن، مهدی فروزنده
۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۲. گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...، تهران
۳. گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

دریافت: تیر ۸۶ بازبینی: شهریور ۸۶ پذیرش: شهریور ۸۶

چکیده

مقدمه: مطالعات اخیر بیان می‌کند که هیپرکسی نورموباریک (NBHO) متناوب و پیوسته باعث ایجاد پدیده تحمل به ایسکمی به منظور کاهش آسیب‌های مغزی حاصل از ایسکمی می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی رابطهNBHO با بیان ناقلین اسیدهای آمینه تحریکی (EAATs) و سطح TNF-α سرم است.

روش‌ها: رت‌ها به چهار گروه آزمایشی تقسیم شدند و هر گروه حاوی حدود ۲۰ حیوان بود. دو گروه اول به صورت پیوسته (۲۴ ساعت مداوم) و متناوب (۴ ساعت در روز به مدت ۶ روز) در معرض اکسیژن ۹۵٪ بنام NBHO متناوب و پیوسته قرار می‌گرفتند. دو گروه دوم به عنوان گروه‌های کنترل همانند دو گروه اول به صورت پیوسته و متناوب در معرض اکسیژن ۲۱٪ بنام نورموکسی نورموباریک (NBNO) قرار می‌گرفتند. هر گروه به سه زیر گروه بنام زیر گروه انسداد شریان مرکزی مغز (MCAO)، زیر گروه شم (جراحی بدون ایسکمی MCAO)، و زیر گروه دست نخورده (بدون هیچ گونه جراحی) تقسیم می‌شدند. بعد از ۲۴ ساعت برقراری جریان خون مجدد بعد از ۶۰ دقیقه ایسکمی، میزان نقص نورولوژیک (NDS) در زیر گروه MCAO بررسی می‌شد. بعد از ۴۸، رت‌ها برای نمونه برداری مغزی قربانی می‌شدند تا اثر NBHO پیوسته و متناوب بر روی تغییرات بیان ناقلین اسیدهای آمینه تحریکی (EAATs) و سطح TNF-α سرم مورد سنجش قرار گیرد.

یافته‌ها: پیش شرطی سازی با NBHO پیوسته و متناوب باعث کاهش میزان نقص نورولوژیک می‌شود. پیش درمانی با NBHO پیوسته و متناوب باعث افزایش بیان ناقلین اسیدهای آمینه تحریکی و سطح TNF-α سرم می‌شود.

نتیجه‌گیری: اگرچه مطالعات بیشتری برای وضوح مکانیسم‌های تحمل به ایسکمی لازم است، اما NBHO پیوسته و متناوب ظاهراً تا حدی آثارشان را از طریق افزایش بیان ناقلین اسیدهای آمینه تحریکی و سطح TNF-α سرم انجام می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: هیپرکسی نورموباریک، تحمل به ایسکمی مغزی، سکته مغزی، ناقلین اسیدهای آمینه تحریکی، سطح TNF-α سرم

مقدمه

تحریکات آسیب رسان در دوزهای پایین و کم، البته زیر آستانه‌ی آسیب رسان به سلول، پاسخ سازشی القا می‌کند که مغز را در برابر استرس‌های دیگر حاصل از همین تحریکات آسیب رسان (تحمل) یا دیگر تحریکات آسیب رسان (تحمل متقابل) حفاظت می‌کند [۲۹]. در بین استرس‌های مختلف، هیپوکسی [۵]، ایسکمی [۱۲]، تشنج [۲۴]، آنوکسی [۲۳]، افسردگی منتشر[1]

* نویسنده مسئول مکاتبات: hajizads@modares.ac.ir
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

[1]- Spreading depression

Archive of SID
www.SID.ir

[۱۵]، گرما [۲]، استرس اکسیداتیو [۲۰]، تیمار با اسیدهای چرب اشباع نشده [۲۱]، و مهار کننده‌های فسفوریلاسیون اکسیداتیو [۲۶] فرایند تحمل مغز در برابر ایسکمی[1] (کامل یا کانونی) را القا می‌کنند. اکثر این تحریکات به علت آثار سمی فاقد پتانسیل پیاده سازی بالینی هستند. به همین دلیل تحریکات غیر فارماکولوژیکی برای ایجاد پدیده تحمل به ایسکمی بیشتر مورد توجه قرار گرفته اند. یکی از این تحریکات غیر فارماکولوژیکی هیپرکسی است. اخیراً چندین گزارش وجود دارد که هیپرکسی نیز باعث بروز تحمل به ایسکمی می‌شود [۴،۱،۳۶].

مکانیسم‌های احتمالی متعددی در القا و حفظ پدیده تحمل به ایسکمی در مغز پیشنهاد شده اند. مکانیسم‌های مولکولی احتمالی شامل انواع وسیعی از میانجی هایی هستند که القای پروتئین‌های شوک گرمایی [۱۱]، گیرنده‌های NMDA [۹،۷،۱۰]، فاکتورهای آنتی آپوپتیک [۳۱]، اینتر لوکین-۱ [۲۰]، گیرنده‌های آدنوزینی و کانال‌های پتاسیمی وابسته به ATP [۸]، سوپراکسید دیسموتاز [۳۲]، گونه‌های اکسیژن واکنشی (ROS) [۲۵]، فعال سازی p21ras وابسته به نیتریک اکسید [۶]، متالوتیونین‌ها [۳۳]، فعال سازی گیرنده فاکتور رشد اندوتلیالی عروق و Akt [۳۴]، اریتروپویتین [۳۰]، کسپاز-۳ [۱۷]، و سایتوکین‌های پیش التهابی و NF-κB [۱۶] از این جمله اند.

در نهایت، نشان داده شده است که حفاظت عصبی حاصل از محرومیت به اکسیژن و گلوکز از افزایش گلوتامات خارج سلولی جلوگیری می‌کند و بازگیری گلوتامات از طریق افزایش بیان ناقلین گلوتامات افزایش می‌یابد [۲۹،۴]. بنابراین، ناقلین گلوتامات هدف اصلی مانورهای پیش شرطی سازی به ایسکمی هستند. از طرف دیگر، مطالعات نشان می‌دهد که TNF-α نقش مهمی در ایجاد پدیده تحمل به ایسکمی ایفا می‌کنند [۱۳]. TNF-α توسط پروتئاز غشایی موسوم به آنزیم تبدیل کننده TNF-α به حالت محلول در می‌آیند.

نشان داده شده است که پیش شرطی سازی با هیپرکسی نورموباریک متناوب و پیوسته باعث ایجاد درجات متفاوت پدیده تحمل به ایسکمی در مغز رت می‌شوند [۱]. بدین ترتیب، در این مطالعه اثر هیپرکسی نورموباریک متناوب و پیوسته بر تغییرات بیان ناقلین اسیدهای آمینه تحریکی (EAATs) و سطح TNF-α سرم مورد بررسی قرار می‌گیرند.

[1]- Ischemic tolerance

مواد و روش‌ها

رت‌های اسپراگو - دالی (۳۸۰-۲۵۰گرم) به طور تصادفی به چهار گروه حاوی ۲۰ حیوان تقسیم می‌شدند. دو گروه در درون جعبه اکسیژن با غلظت ۹۰ < تحت عنوان شرایط هیپرکسی قرار داده می‌شدند. از این دو گروه، یک گروه به صورت پیوسته (۲۴ ساعت) و دیگری به صورت متناوب (۴ ساعت در روز به مدت ۶ روز) در معرض اکسیژن بالای ۹۰ درصد قرار می‌گرفتند (NBHO). دو گروه دیگر وضعیت مشابه با دو گروه اول داشتند با این تفاوت که یک گروه به صورت پیوسته (۲۴ ساعت) و دیگری به صورت متناوب (۴ساعت در روز به مدت ۶ روز) در معرض اکسیژن ۲۱ درصد قرار می‌گرفتند (NBNO). حیوان‌ها سپس به مدت ۲۴ ساعت در هوای اتاق (۲۱ درصد) قرار می‌گرفتند. سپس هر کدام از این گروه‌ها به سه زیر گروه تقسیم می‌شدند. زیر گروه‌های اول به مدت ۶۰ دقیقه تحت جراحی انسداد شریان مرکزی (MCAO) قرار می‌گرفتند. ۲۴ ساعت بعد از لحاظ نقص‌های حرکتی نورولوژیک مورد مطالعه قرار می‌گرفتند. زیر گروه‌های دوم به عنوان گروه شم پروتوکل آزمایشی گروه اول را دریافت می‌کردند با این تفاوت که جراحی بدون MCAO در این حیوانات صورت می‌گرفت. زیر گروه‌های سوم به عنوان گروه دست نخورده پروتوکل آزمایشی گروه اول را دریافت می‌کردند با این تفاوت که هیچ گونه جراحی در آنها صورت نمی‌گرفت. این دو گروه برای بررسی اثر خالص پیش شرطی سازی با هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب بر میزان بیان ناقلین اسیدهای آمینه تحریکی (EAATs) و سطح TNF-α سرم طراحی شده بودند. علاوه بر این گروه دیگری بنام هیپرکسی نورموباریک متناوب با MCAO برای بررسی اثر توام هیپرکسی نورموباریک متناوب و ایسکمی حاصل از MCAO در نظر گرفته شده بود. برای ارزیابی سطح TNF-α در زیر گروه‌های دوم و سوم، بلافاصله و ۴۸ ساعت بعد از پیش درمان با هیپرکسی نورموباریک خون گیری انجام می‌شد.

۹ رت در داخل یک جعبه که تمامی درزهای آن به طور کامل گرفته شده است در ابعاد (۳۰×۳۵×۶۵) با دو مجرای ورودی و خروجی قرار داده می‌شدند. ماده‌ای بنام سودا لیم[2] (جاذب دی

[2]- soda lime

Archive of SID

www.SID.ir

اکسید کربن) در زیر جعبه قرار داده می‌شد تا دی اکسید کربن تولیدی را جذب کند. بدین ترتیب، امکان تغییر غلظت گاز داخل جعبه به حداقل می‌رسید. اکسیژن خالص (F_IO_2= ۰/۹۵) یا هوای اتاق در میزان ۳ لیتر در دقیقه برای تیمار جانوران به جعبه حاوی رت‌ها متصل می‌شد. برای افزایش دقت آزمایش یک الکترود سنجش اکسیژن نیز در کنار جعبه تعبیه می‌شد تا غلظت اکسیژن داخل جعبه را اندازه‌گیری کند. آزمایش ABG در هر دو آزمایش صورت می‌گرفت.

رت‌ها بعد از توزین با داروی کلرات هیدرات (مرک، آلمان) (۴۰۰ میلی گرم در کیلوگرم وزن بدن) هوش بری می‌شدند. جراحی مدل سازی MCAO مطابق دستورالعمل لونگا و همکارانش انجام می‌شد [۱۴]. به طور خلاصه، تحت جراحی میکروسکوپی، یک نخ بخیه نایلون ۳/۰ از طریق تنه ECA[1] وارد رگ می‌شد و تا رسیدن به ACA2 از میان ICA[3] با پتریگوپالاتین بسته ادامه داده می‌شد. در اثر تماس نخ بخیه و ACA جریان خون از هر طرف به MCA[4] بسته می‌شد. این بسته شدن از طریق احساس مقاومت و در پیشروی نخ و ورود حدود ۲۰ میلی متر طول نخ از تنه ECA مشخص می‌شد. بعد از ۶۰ دقیقه ایسکمی، برقراری مجدد جریان خون صورت می‌گرفت. دمای بدن از طریق رکتوم اندازه‌گیری می‌شد و میزان دمای در حوالی ۳۷ درجه حفظ می‌شد.

برای ارزیابی رفتاری حاصل از سکته معاینه‌های نورولوژیک بعد از ۲۴ ساعت انجام می‌شد. در طول ۲۴ ساعت بعد از شروع انسداد تا قربانی شدن حیوان مراقبت‌های ویژه انجام می‌شد. یافته‌های نورولوژیکی در ۵ مقیاس دسته‌بندی می‌شوند: شماره صفر (۰) هیچ گونه عارضه نورولوژیک نشان نمی‌دادند؛ شماره یک (نارسایی کامل در انتهای پنجه‌های جلویی)، که یک نقص نورولوژیک کانونی خفیف در نظر گرفته می‌شود. شماره دو (به چپ چرخیدن) نقص نورولوژیک کانونی متوسط؛ شماره ۳ (افتادن به سمت چپ) نقص کانونی شدید هستند؛ و رت‌های شماره ۴ به طور خود به خودی نمی‌توانند راه بروند و سطح هوشیاری پایین دارند [۱۴].

برای آنالیز وسترن بلات ناقلین گلوتامات، ابتدا برای هموژن کردن بافت مغز بافر هموژن را به صورت زیر آماده می‌کردیم. بافر حاوی ۳۲۰ میلی‌مولار سوکروز (مرک، آلمان)، یک میلی‌مولار دی- ال دی تیوتریتول[5]، ۱۰ میکرو گرم در میلی لیتر مهار کننده تریپسین سویبین[6] (مرک، آلمان)، ۲/. درصد SDS (مرک، آلمان)، ۱۰۰ میکرومولار ۱،۱۰- فنانترولین[7] (مرک، آلمان)، یک درصد PMSF و ۵۰ میلی مولار تریس (بوهرینگر- مانهیم، آلمان)، بود که در دمای ۲۰ درجه سلسیوس با HCl به pH ۷ رسانده می‌شد [۱۲].

در مرحله بعد حدود ۱۵۰ میلی‌گرم از بافت مغز (۴۸ ساعت بعد از پایان هیپرکسی پیوسته و متناوب یا نورموکسی) از ناحیه همسو با ناحیه آسیب مغزی را جدا می‌کردیم. بافت جدا شده را در دمای ۴ درجه سلسیوس در ۴ حجم حاوی بافر هموژن قرار می‌دادیم [۸]. سپس به واسطه دستگاه سونیکاتور به مدت ۱۰ ثانیه، ۵/. دور در ثانیه و دامنه ۶۰ درصد بافت مغزی را هموژن می‌کردیم. سپس به مدت ۱۰ دقیقه بافر حاوی محلول هموژن را با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتریوفوژ می‌کردیم. سپس، ۱۰ میکرولیتر محلول هموژن را با بافر نمونه 2x مخلوط کرده و به مدت ۵ دقیقه می‌جوشاندیم. ۴۰ میکرو گرم از آن را در روی چاهک‌های ژل لود می‌کردیم، همچنین نردبان وزن مولکولی پروتئینی (Fermentas, SM0671) به اندازه ۵ میکرو لیتر در یکی از چاهک‌ها لود می‌شد. پروتئین‌ها بر اساس اندازه در SDS-PAGE[8] ۱۰ ٪ جدا می‌شدند.

قبل از اضافه کردن آنتی بادی‌های پروتئین‌های مورد نظر، غشا PVDF به واسطه ماده بلوک کننده۹ (GE Health care, Amersham) به مدت یک ساعت بلوک می‌شد. پروتئین‌ها بر روی غشای PVDF با آنتی بادی‌های پلی کلونال اختصاصی علیه ناقل گلوتامات نوع ۱ (Covalab, UK Ltd) (EAAT1/GLAST) با رقت ۱:۲۰۰۰ حاصل از خرگوش: یا با آنتی بادی‌های پلی کلونال اختصاصی علیه ناقل گلوتامات نوع ۲ (Covalab, UK Ltd) (EAAT2/GLT-1) با رقت ۱:۲۰۰۰ حاصل از خرگوش: یا با آنتی بادی‌های پلی کلونال اختصاصی

[1]- External carotid artery
[2]- Anterior cerebral artery
[3]- Internal carotid artery
[4]- Middle cerebral artery

[5]- DL-dithiothreitol
[6]- soybean trypsin inhibitor
[7]- 1,10-phenanthroline
[8]- Sodium Dodecyl Sulfate polyacrilamid gel electerophoresis
[9]- Blocking reagent

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱- وضعیت گازهای خون شریانی و تنفسی در پایان تیمار با هیپرکسی نورموباریک

گروه های آزمایشی	pH	PCO_2 (mmHg)	PO_2 (mmHg)	میزان تنفس (هرتز)
NBNO متناوب	۷/۴±۰/۰۳	۴۱/۱۶±۱/۴	۹۲/۸±۳/۳	۱/۶۲±۰/۰۹
NBHO متناوب	۷/۳±۰/۰۲	۳۹/۲±۱/۹	۳۵۱/۱±۱۷/۶	۱/۳۷±۰/۱۲
NBNO پیوسته	۷/۳۷±۰/۰۵۲	۴۰/۲±۱/۳	۹۳/۲±۵/۲	۱/۶۰±۰/۱۱
NBHO پیوسته	۷/۳۵±۰/۰۲۷	۳۷/۸±۲/۳۸	۳۶۳±۱۴/۳	۱/۲۴±۰/۱۲

علیه ناقل گلوتامات نوع ۳ (EAAT3/EAAC1) (Chemicon) با رقت ۱:۲۰۰۰ حاصل از بز: یا با آنتی بادی اختصاصی علیه بتا-اکتین (Prosci-incorporated) به مدت یک ساعت انکوبه می‌شدند. ناقلین گلوتامات و بتا-اکتین به واسطه آنتی بادی اختصاصی اولیه شناسایی می‌شدند و به آنها اتصال می‌یافتند. سپس آنتی بادی‌های ثانویه اختصاصی خرگوش متصل به HRP (Dakocytomation, Denmark) برای شناسایی آنتی بادی‌های علیه ناقلین گلوتامات ۱ و۲ و بتا-اکتین با رقت ۱/۱۰۰۰۰ و آنتی بادی‌های ثانویه اختصاصی بز متصل به HRP (RAY- بیوتک، ایران) برای شناسایی آنتی بادی‌های علیه ناقل گلوتامات نوع ۳ با رقت ۱/۱۰۰۰ مورد استفاده قرار می‌گرفت. انکوباسیون آنتی بادی ثانویه به مدت یک ساعت در دمای اتاق صورت می‌گرفت. بعد از شستشوی غشای PVDF مخلوتی از سوبسترای A ,B (ECL,Amersham Biosciences) در تاریکی بر روی غشا اضافه می‌شد و در اثر واکنش آنها با 1HRP نور تولید می‌شد. آنگاه فیلم حساس رادیولوژی را به مدت ۱ دقیقه بر روی بلات قرار می‌دادیم تا فیلم رادیولوژی را متاثر سازد. بدین ترتیب وجود پروتئین آشکار می‌شد.

برای سنجش الیزا، بعد از خون گیری ۱ ساعت و ۴۸ ساعت بعد از پیش درمان، بلافاصله سرم از لخته خونی جدا می‌شد. تعیین غلظت TNF-α سرم توسط کیت الیزا TNF-α رت براساس دستور العمل کیت انجام می‌شد (Bander Medsystem, Austeria). به طور خلاصه، بعد از شستشو با بافر نمونه، نمونه‌ها به چاهک‌ها به صورت نمونه و استاندارد اضافه می‌شدند. هر یک از چاهک‌های مزبور پوشیده از آنتی بادی ضد TNF-α بودند. سپس آنتی بادی ضد TNF-α متصل به بیوتین برای اتصال به TNF-α که به آنتی بادی ضد TNF-α ته چاهک متصل است اضافه می‌شد. آنگاه به مدت یک ساعت انکوباسیون انجام می‌شد. سپس به واسطه بافر شستشو چاهک‌ها شسته می‌شدند. سپس استرپتوویدین-HRP برای اتصال به آنتی بادی ضد TNF-α متصل به بیوتین اضافه می‌شد. بعد از انکوباسیون، استرپتوویدین- HRP غیر متصل شستشو می‌شدند و سپس محلول سوبسترا حاوی تترا متیل بنزودین و ۰/۰۲٪ پراکسید هیدروژن برای واکنش با HRP به چاهک‌ها اضافه می‌شد. واکنش به واسطه اضافه کردن اسید متوقف می‌شد و غلظت TNF-α سرم به واسطه جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شد (Start Fax-2100, USA).

داده‌های امتیاز نقص رفتاری نورولوژیک به صورت میانه، داده‌های غلظت TNF-α سرم، میزان بیان ناقلین گلوتامات، و گازهای خونی شریانی به صورت Mean ± SEM بیان شده است. غلظت TNF-α سرم، میزان بیان ناقلین گلوتامات، و گازهای خونی شریانی از طریق one-way ANOVA test و t-test محاسبه شده اند. امتیاز نقص‌های نورولوژیک با استفاده از Mann-Whitney U test آنالیز شده است. $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شده است.

یافته‌ها

بر اساس ارزیابی‌های آزمایش گازهای خون شریانی (ABG) فشار اکسیژن شریانی در شرایط هیپرکسی بسیار بالاتر از فشار اکسیژن شریانی در شرایط نورموکسی است (جدول ۱).

میانه امتیازهای نقص نورولوژیک (NDS) به واسطه قرارگیری در معرض هیپرکسی نورموباریک به طور قابل ملاحظه کاهش می‌یابد. میانه امتیازهای نقص نورولوژیک در گروه‌های هیپرکسی نوموباریک متناوب و پیوسته و نورموکسی نورموباریک متناوب و پیوسته در جدول ۲ نشان داده شده است. در رت‌های که به واسطه قرار گرفتن در معرض هیپرکسی هیچ گونه نقص نورولوژیک مشاهده نشده بود، با تزریق اوانس آبی، این رنگ در ناحیه مرکزی

[1]- Horse radish peroxidase

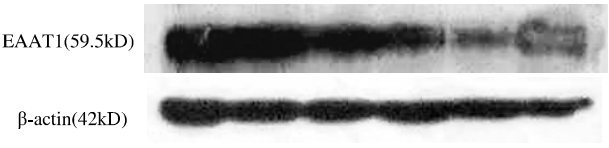
Archive of SID
www.SID.ir

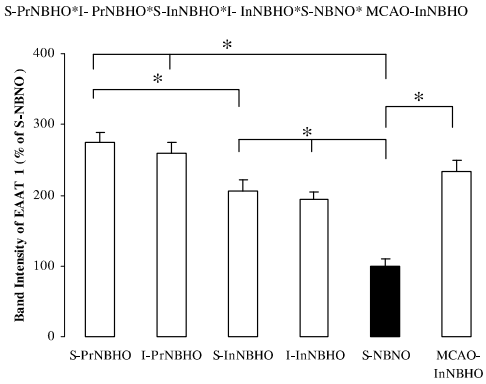
جدول ۲- توزیع امتیازهای نورولوژیک در هر گروه و مقایسه آماری آنها. همانطوری که ملاحظه می‌کنید مقایسه گروه‌های ردیف ۱:۲و ۳:۴ معنی دار است اما ۲:۴ معنی دار نیست.

شماره	گروه های آزمایشی	تعداد نقص های نورولوژیک در هر گروه						تعداد کل	میانه	نتایج آماری (مقدار P)
		۰	۱	۲	۳	۴	۵			
۱	NBNO متناوب	۰	۲	۴	۲	۰	۰	۸	۲	۱:۲ معنی دار ($P<0.05$)
۲	NBHO متناوب	۳	۳	۱	۰	۰	۰	۷	۰	۲:۴ غیر معنی دار
۳	NBNO پیوسته	۰	۲	۵	۱	۰	۰	۸	۲	۳:۴ معنی دار ($P<0.05$)
۴	NBHO پیوسته	۲	۴	۱	۰	۰	۰	۷	۱	-

سکته مشاهده می‌شد. این مدرک نشان می‌دهد که در کلیه رت‌هایی مذکور انسداد شریان مرکزی مغز صورت گرفته است ولی به دلیل بروز پدیده تحمل به ایسکمی القایی هیپرکسی به ویژه در ناحیه پنومبرا استحکام سد خونی- مغزی افزایش یافته است.

شکل ۱ نشان می‌دهد که هیپرکسی نورموباریک پیوسته (S-PrNBHO) و متناوب (S-InNBHO) در مقایسه با نورموکسی نورموباریک (S-NBNO) باعث افزایش بیان ژن ناقل گلوتامات نوع یک می‌شوند. همچنین نشان می‌دهد که اثر هیپرکسی نورموباریک پیوسته نسبت به هیپرکسی نورموباریک متناوب بر افزایش بیان ژن ناقل گلوتامات نوع یک بیشتر است. اثر توام هیپرکسی نورموباریک متناوب و ایسکمی (MCAO-InNBHO) در مقایسه با نورموکسی نورموباریک باعث افزایش بیان ژن ناقل گلوتامات نوع یک شده است.

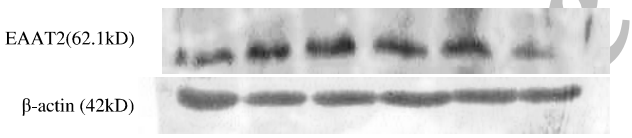


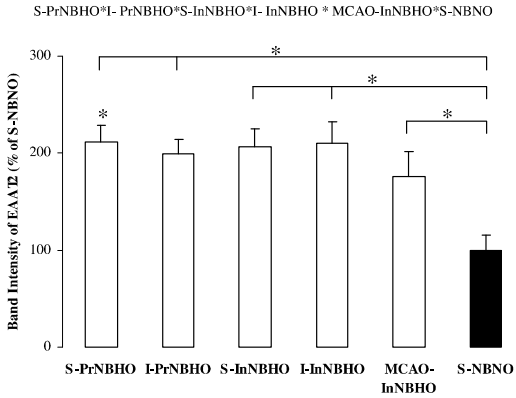


شکل ۱- آنالیز وسترن بلات مقایسه میزان بیان پروتئین EAAT1/GLAST در مغز رت‌های گروه شم (S-PrNBHO) و گروه دست نخورده (I-PrNBHO) هیپرکسی نورموباریک پیوسته، گروه شم (S-InNBHO) و گروه دست نخورده (I-InNBHO) هیپرکسی نورموباریک متناوب، گروه شم نورموکسی نورموباریک (S-NBNO)، و اثر توام ایسکمی و هیپرکسی نورموباریک متناوب (MCAO-InNBHO) را نشان می‌دهد. مقایسه با گروه کنترل انجام شده است ($P<0.001$=*). بتا اکتین به عنوان لودینگ کنترل برای نورمالیزه کردن بکار رفته است.

تفاوت آماری گروه‌های مذکور معنی دار است (شکل ۱).

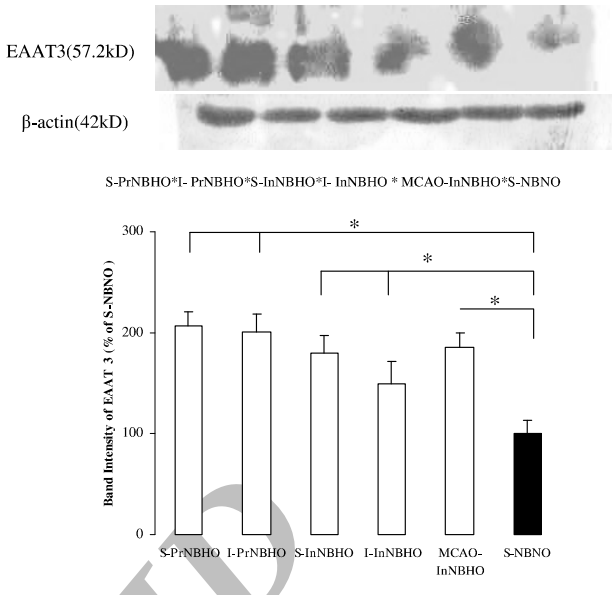
شکل ۲ نشان می‌دهد که هیپرکسی نورموباریک پیوسته (S-PrNBHO) و متناوب (S-InNBNO) در مقایسه با نورموکسی نورموباریک (S-NBNO) باعث افزایش بیان ژن ناقل گلوتامات نوع ۲ می‌شوند. همچنین نشان می‌دهد که اثر هیپرکسی نورموباریک پیوسته نسبت به هیپرکسی نورموباریک متناوب بر افزایش بیان ژن ناقل گلوتامات نوع دو معنی داری نیست. اثر توام هیپرکسی نورموباریک متناوب و ایسکمی (MCAO-InNBHO) در مقایسه با نورموکسی نورموباریک باعث افزایش بیان ژن ناقل گلوتامات نوع دو شده است. تفاوت آماری گروه‌های مذکور در مقایسه با نورموکسی نورموباریک معنی دار است (شکل ۲).





شکل ۲- آنالیز وسترن بلات مقایسه میزان بیان پروتئین ناقل گلوتامات نوع ۲ (EAAT2/GLT-1) در مغز رت‌های گروه شم (S-PrNBHO) و گروه دست نخورده (I-PrNBHO) هیپرکسی نورموباریک پیوسته، گروه شم (S-InNBHO) و گروه دست نخورده (I-InNBHO) هیپرکسی نورموباریک متناوب، گروه شم نورموکسی نورموباریک (S-NBNO)، و اثر توام ایسکمی و هیپرکسی نورموباریک متناوب (MCAO-InNBHO) را نشان می‌دهد. مقایسه با گروه کنترل انجام شده است ($P<0.001$=*). بتا اکتین به عنوان لودینگ کنترل برای نورمالیزه کردن بکار رفته است.

www.SID.ir



شکل ۳- آنالیز وسترن بلات مقایسه میزان بیان پروتئین ناقل گلوتامات نوع ۳ (EAAT3/EAAC1) در مغز رت‌های گروه شم (S-PrNBHO) و گروه دست نخورده (I-PrNBHO) هیپرکسی نورموباریک پیوسته، گروه شم (S-InNBHO) و گروه دست نخورده (I-InNBHO) هیپرکسی نورموباریک متناوب، گروه شم نورموکسی نورموباریک (S-NBNO)، و اثر توام ایسکمی (MCAO) و هیپرکسی نورموباریک متناوب را نشان می‌دهد. مقایسه با گروه کنترل انجام شده است (P<0.001=*). بتا اکتین به عنوان لودینگ کنترل برای نورمالیزه کردن بکار رفته است.

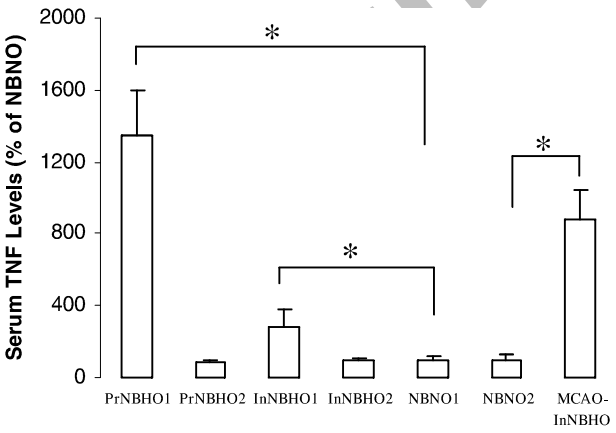
شکل ۳ نشان می‌دهد که هیپرکسی نورموباریک پیوسته (S-PrNBHO) و متناوب در مقایسه با نورموکسی نورموباریک (S-NBNO) باعث افزایش بیان ژن ناقل گلوتامات نوع ۳ می‌شوند. همچنین نشان می‌دهد که اثر هیپرکسی نورموباریک پیوسته نسبت به هیپرکسی نورموباریک متناوب بر افزایش بیان ژن ناقل گلوتامات نوع سه معنی داری نیست. اثر توام هیپرکسی نورموباریک متناوب و ایسکمی (MCAO-InNBHO) در مقایسه با نورموکسی نورموباریک باعث افزایش بیان ژن ناقل گلوتامات نوع سه شده است. تفاوت آماری گروه‌های مذکور در مقایسه با نورموکسی نورموباریک معنی‌دار است (شکل ۳).

شکل ۴ نشان می‌دهد که هیپرکسی نورموباریک پیوسته (PrNBHO1) و متناوب (InNBHO1) بلافاصله بعد از پیش درمان، در مقایسه با نورموکسی نورموباریک (NBNO1) باعث افزایش غلظت TNF-α سرم می‌شوند. همچنین نشان می‌دهد که اثر هیپرکسی نورموباریک پیوسته نسبت به هیپرکسی نورموباریک متناوب بر افزایش غلظت TNF-α سرم بیشتر است. اثر توام هیپرکسی نورموباریک متناوب و ایسکمی (MCAO-InNBHO) در مقایسه با نورموکسی نورموباریک و هیپرکسی نورموباریک متناوب باعث افزایش غلظت TNF-α سرم شده است. هیپرکسی نورموباریک پیوسته (PrNBHO2) و متناوب (InNBHO2) بعد از ۴۸ ساعت از پیش درمان، در مقایسه با نورموکسی نورموباریک (NBNO2) بر تغییر غلظت TNF-α سرم معنی دار نیست. تفاوت آماری گروه‌های مذکور در مقایسه با نورموکسی نورموباریک معنی دار است (شکل ۴).

بحث

مدل MCAO به واسطه نخ بخیه ایجاد می‌شود و یک مدل مطمئن و قابل تکرار در مدل‌های حیوانی سکته مغزی است [۳]. شرایط فیزیولوژیک در طی آزمایش در محدوده طبیعی نگاه داشته می‌شد. البته، در گروه‌های هیپرکسی به علت غلظت بالای اکسیژن، محتوی اکسیژن افزایش می‌یافت و فرکانس تنفس کاهش می‌یافت.

بر اساس نتایج این مطالعه نشان داده شده است که هیپرکسی نورموباریک پیوسته به علت کاهش امتیاز نقص نورولوژیک در اثر ۶۰ دقیقه ایسکمی در مقایسه با گروه نورموکسی نورموباریک، باعث ایجاد قابلیت تحمل به ایسکمی شده است. ژانگ و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۳ با انجام این آزمایش پدیده تحمل به ایسکمی بعد از ۲۴ ساعت هیپرکسی نورموباریک پیوسته را گزارش کرده‌اند [۳۶]. همچنین گزارش کرده‌اند که هیپرکسی نورموباریک پیوسته کمتر از ۲۴ ساعت



شکل ۴- تغییرات سطح TNF-α سرم در گروه‌های هیپرکسی نورموباریک (NBHO) و نورموکسی نورموباریک (NBNO) متناوب (In) و پیوسته (Pr) و هیپرکسی نورموباریک متناوب توام با ایسکمی (MCAO-InNBHO) بلافاصله (NBHO1, NBNO1) و بعد از ۴۸ ساعت (NBHO2, NBNO2) ازپایان هیپرکسی و نورموکسی نورموباریک (P<0.01=*).

www.SID.ir

پدیده تحمل به ایسکمی را نشان نمی‌دهند و با تزریق رفته گرهای ROS دقیقا قبل از ۲۴ ساعت هیپرکسی نورموباریک پیوسته پدیده تحمل به ایسکمی نشان داده نشده است [۳۶]. نتایج این پژوهش با نتایج ژانگ و همکارانش همخوانی دارد. بنابراین، هیپرکسی نورموباریک پیوسته احتمالاً با افزایش ROS مسیر پیام رسانی سلولی پیش شرطی سازی ایسکمی را به راه می‌اندازد.

در پژوهش‌های قبل نشان داده شده است که هیپرکسی نورموباریک متناوب باعث ایجاد تحمل به ایسکمی در مغز می‌شود [۱]. همچنین نشان داده شده است که ۴ ساعت هیپرکسی نورموباریک منفرد پدیده تحمل به ایسکمی را در مغز نشان نمی‌دهد [۳۶]. دونگ و همکارانش نشان داده‌اند که پیش درمان با هیپرکسی هیپرباریک (۲/۵ اتمسفر) و هیپرکسی نورموباریک به صورت یک ساعت در روز به مدت ۵ روز باعث ایجاد پدیده تحمل به ایسکمی در نخاع خرگوش شده است [۴]. نتایج پژوهش حاضر نتایج دونگ و همکارانش را تایید می‌کند. بنابراین، تحمل به ایسکمی در بافت‌های مغزی مورد آزمایش بر اساس مدت زمان و مقدار غلظت اکسیژن متفاوت خواهد بود. کمیت و کیفیت تجویز اکسیژن در القای تحمل به ایسکمی، عوارض جانبی، و مسمومیت‌های آن بر روی بدن اهمیت دارد.

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب باعث افزایش بیان ژن ناقل گلوتامات نوع یک می‌شود. همچنین نشان داده شده است که اثر هیپرکسی نورموباریک پیوسته نسبت به هیپرکسی نورموباریک متناوب بر افزایش بیان ژن ناقل گلوتامات نوع ۱ بیشتر بوده است. به عبارت دیگر، کیفیت تجویز هیپرکسی نورموباریک در میزان بیان ژن موثر است. تاکنون گزارشی مبنی بر ایجاد تحمل به ایسکمی به واسطه افزایش بیان ژن ناقل گلوتامات نوع یک از طریق هیپرکسی در مغز منتشر نشده است. اما نشان داده شده است که در اثر پیش شرطی سازی ایسکمی از طریق دوره‌های کوتاه ایسکمی در شرایط in vitro [۲۴] میزان بیان ژن ناقل گلوتامات نوع یک افزایش می‌یابد. همچنین در شرایط in vivo نشان داده شده است [۲۴] که میزان بیان ژن ناقل گلوتامات نوع یک در اثر دوره‌های کوتاه ایسکمی تغییر نمی‌کند. از طرف دیگر، یاماشیتا و همکارانش در شریط in vivo نقش ناقلین گلوتامات نوع ۴ و۱ (EAAT4 و EAAT1/GLAST) را در سلول‌های پورکینژ مخچه موش جهش یافته بعد از آسیب حاصل از ایسکمی مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که موش‌های جهش یافته ناقل گلوتامات نوع ۱ نسبت به موش‌های جهش یافته ناقل گلوتامات نوع ۴ آسیب پذیرتر بودند [۳۵]. نتایج مزبور نشان می‌دهد که ناقل گلوتامات نوع ۱ نقش مهمی در جلوگیری از بروز آثار سمی حاصل از تحریک[1] می‌تواند داشته باشد. بنابراین، یکی از عوامل کاهش میزان نقص‌های نورولوژیک و ایجاد پدیده تحمل به ایسکمی افزایش ناقل گلوتامات نوع ۱ است.

گزارش شده است که میزان ناقل گلوتامات نوع ۱ به واسطه مهار گیرنده TNF-α تغییر پیدا نمی‌کند [۲۴]. این مطلب نشان می‌دهد که افزایش بیان ژن ناقل گلوتامات نوع ۱ در مسیر پیام رسانی TNF-α قرار ندارد.

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب باعث افزایش بیان ژن ناقل گلوتامات نوع ۲ می‌شود. تاکنون گزارشی مبنی بر ایجاد تحمل به ایسکمی به واسطه افزایش بیان ژن ناقل گلوتامات نوع ۲ از طریق هیپرکسی در مغز منتشر نشده است. اما نشان داده شده است که در اثر پیش شرطی سازی ایسکمی از طریق دوره‌های کوتاه ایسکمی در شرایط in vitro [۲۹] میزان بیان ژن ناقل گلوتامات نوع ۲ افزایش می‌یابد. همچنین در شرایط in vivo نشان داده شده است [۲۴] که میزان بیان ژن ناقل گلوتامات نوع ۲ در اثر دوره‌های کوتاه ایسکمی افزایش می‌یابد. از طرف دیگر، گزارش شده است که ناقل گلوتامات نوع ۲ (EAAT2/GLT1) بعلت مسوولیت اساسی که در بازگرداندن گلوتامات دارد، نقش مهمی در قشر مغز ایفا می‌کند [۲۷]. حذف ژنتیکی ناقل گلوتامات نوع ۲ به مقدار زیادی باعث افزایش گلوتامات خارج سلولی، آسیب نورونی و ادم مغزی بعد از ایسکمی مغزی می‌شود [۱۹]. بنابراین، افزایش میزان بیان ناقل گلوتامات نوع ۲ ممکن است در جلوگیری از آسیب مغزی ناشی از ایسکمی مفید باشد. بدین ترتیب، افزایش بیان ناقل گلوتامات نوع ۲ برای کاهش غلظت گلوتامات خارج سلولی عملی و مفید است [۲۴]. نشان داده شده است که TNF-α بیان EAAT2/GLT1 را افزایش می‌دهد و گرفتن گلوتامات را

[1]- Excitotoxicity

Archive of SID

www.SID.ir

بعد از تجویز LPS بالا می‌برد [۲۹]. علاوه بر این، اثبات شده است که TNF-α هم بیان و هم عملکرد ناقلین مواد مختلف را می‌افزاید [۲۹،۲۴]. بنابراین، افزایش بیان ناقل گلوتامات نوع ۲ می‌تواند به عنوان یکی از عوامل ایجاد کننده پدیده تحمل به ایسکمی مطرح باشد. یافته‌های این تحقیق نیز با یافته‌های محققین مذکور همخوانی دارد.

نشان داده شده است که میزان بیان ژن ناقل گلوتامات نوع ۲ به واسطه مهار گیرنده TNF-α تغییر نمی‌کند [۲۴]. در حالی که ایسکمی کوتاه مدت گذرا باعث افزایش بیان ناقل گلوتامات نوع ۲ می‌شود. این واقعیت نشان می‌دهد که افزایش بیان ناقل گلوتامات نوع ۲ در حالت ایسکمی زیر کشنده در مسیر پیام رسانی TNF-α قرار ندارد [۲۴]. احتمالاً مسیرهای دیگری وجود دارد که ایسکمی از طریق آن باعث افزایش بیان ناقل گلوتامات نوع ۲ شده است.

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب باعث افزایش بیان ژن ناقل گلوتامات نوع ۳ می‌شود. تاکنون گزارشی مبنی بر ایجاد تحمل به ایسکمی به واسطه افزایش بیان ژن ناقل گلوتامات نوع ۳ از طریق هیپرکسی در مغز منتشر نشده است. اما نشان داده شده است که در اثر پیش شرطی سازی ایسکمی از طریق دوره‌های کوتاه ایسکمی در شرایط in vitro [۲۹] میزان بیان ژن ناقل گلوتامات نوع ۳ افزایش می‌یابد. همچنین در شرایط in vivo نشان داده شده است [۲۴] که میزان بیان ژن ناقل گلوتامات نوع ۳ در اثر دوره‌های کوتاه ایسکمی افزایش می‌یابد. از طرف دیگر، نشان داده شده است که گیرنده TNF-α افزایش بیان ژن ناقل گلوتامات نوع ۳ (EAAT3/EAAC1) را بعد از پیش شرطی سازی به ایسکمی مغزی وساطت می‌کند [۲۴]. همچنین شواهدی وجود دارد که ناقل گلوتامات نوع ۳ بعد از ایسکمی ناشی از MCAO دچار تنظیم افزایشی می‌شوند. افزایش بیان ناقل گلوتامات نوع ۳ بعد از ایسکمی ممکن است تا حدی به تولید TNF-α و مسیر (TACE/TNF-α) وابسته باشد [۲۹، ۲۴]. نتایج این تحقیق نیز نشان می‌دهد که تغییرات TNF-α و میزان بیان ژن ناقل گلوتامات نوع ۳ رابطه مستقیم دارند.

مطالعات نشان می‌دهد که اکسیژن رسانی مجدد منجر به انفجار تولید ROS می‌شود و میتوکندری به عنوان منبع تولید و حس‌گر ROS محسوب می‌شود [۱۸]. افزایش ROS حاصل از جریان خون مجدد باعث افزایش آسیب بافتی شده و موجب افزایش تولید TNF-α و سایر سیتوکین‌ها می‌شود. بدین ترتیب TNF-α از طریق گیرنده خود احتمالاً به واسطه فعال سازی NF-κB میزان بیان ژن ناقلین گلوتامات را در سلول‌های عصبی افزایش می‌دهد [۲۴، ۳۳]. علاوه بر این ژن‌های دیگری در پروفیل پیش شرطی سازی وجود دارد که باعث افزایش روند سازگاری سلول با شرایط سخت ایسکمی می‌شود که شامل افزایش زمان انعقاد خون و افزایش اینترلوکین‌ها هستند. ژن هایی که روند سازشی برای ایسکمی در بافت را به صورت پدیده تحمل به ایسکمی به نمایش می‌گذارند عبارتند از: افزاینده‌های میزان اکسیژن تحویلی، تنظیم کننده‌های انرژی و متابولیسم و افزاینده‌های توان بقایی سلول و توانایی تکثیر آن.

در مجموع، TNF-αتولیدی علاوه بر افزایش ناقل گلوتامات نوع ۳ که در این تحقیق نیز نشان داده شده است، ممکن است آثار دیگری نیز از طریق مسیرهای دیگر اعمال کند و باعث القای بیان ژن سایر ژن‌های پیش شرطی سازی شود. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که ناقل گلوتامات نوع ۳ در شرایط هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب افزایش می‌یابد و این افزایش با افزایش غلظت TNF-α سرم رابطه مستقیم دارد.

نتیجه گیری، نتایج این تحقیق نشان می‌دهد: (۱) هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب تحمل به ایسکمی را به وجود می‌آورند و باعث کاهش میزان نقص نورولوژیک می‌شوند. (۲) هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب بیان ناقلین گلوتامات را در درجات مختلف افزایش می‌دهند. این اثر تا حدی می‌تواند تحمل به ایسکمی را وساطت کند. (۳) استفاده از روش هیپرکسی نورموباریک متناوب برای القای پدیده تحمل به ایسکمی مناسب‌تر است. لذا، استفاده از هیپرکسی نورموباریک یا طراحی موادی که قادر به تقلید از آثار هیپرکسی نورموباریک در افزایش بیان و فعالیت ناقلین گلوتامات باشند، روش و استراتژی جدیدی در پیدایش داروها به وجود خواهد آورد که در به حداقل رساندن آسیب‌های نورونی طی ایسکمی مغزی یا حین پیشروی بیماری‌های مزمن تحلیل عصبی درگیر با اثر سمی ناشی از تحریک کمک خواهد کرد.

Archive of SID
www.SID.ir

منابع

[1] 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 Res*** 1152 (2007) 228-233.

[2] Chopp M, Chen H, Ho KL, Dereski MO, Brown E, Hetzel FW, Welch KM, Transient hyperthermia protects against subsequent forebrain ischemic cell damage in the rat. ***Neurology*** 39 (1989)1396–1398.

[3] Dittmar M, Spruss T, Schuierer G, Horn M, External carotid artery territory ischemia impairs outcome in the endovascular filament model of middle cerebral artery occlusion in rats. ***Stroke*** 34 (2003) 2252-2257.

[4] Dong H, Xiong L, Zhenghua Z, Chen S, Hou L, Sakabe T, Preconditioning with hyperbaric oxygen and hyperoxia induce tolerance against spinal cord ischemia in rabbits. ***Anesthesiology*** 96 (2002) 907-12.

[5] Gidday JM, Fitzgibbons JC, Shah AR, Park TS, Neuroprotection from ischemic brain injury by hypoxic preconditioning in the neonatal rat. ***Neurosci Lett*** 168 (1994) 221– 224.

[6] Gonzalez-Zulueta M, Feldman AB, Klesse LJ, Kalb RG, Dillman JF, Parada LF, Dawson TM, Dawson VL, Requirement for nitric oxide activation of p21 (ras)/extracellular regulated kinase in neuronal ischemic preconditioning. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 97 (2000) 436–441.

[7] Grabb MC, Choi DW, Ischemic tolerance in murine cortical cell culture: critical role for NMDA receptors. ***J Neurosci*** 19 (1999) 1657–1662.

[8] Heurteaux C, Lauritzen I, Widmann C, Lazdunski M, Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors and KATP channels in cerebral ischemic preconditioning. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 92 (1995) 4666–4670.

[9] Kasischke K, Ludolph AC, Riepe MW, NMDA antagonists reverse increased hypoxic tolerance by preceding chemical hypoxia. ***Neurosci Lett*** 214 (1996) 175–178.

[10] Kato H, Araki T, Murase K, Kogure K, Induction of tolerance to ischemia: alterations in second-messenger systems in the gerbil hippocampus. ***Brain Res Bull*** 29 (1992) 559–565.

[11] Kirino T, Tsujita Y, Tamura A, Induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. ***J Cerebr Blood F Met*** 11 (1991) 299 –307.

[12] Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Hata R, Ueda H, Niinobe M, Handa N, Fukunaga R, Kimura K, Mikoshiba K, Ischemic tolerance phenomenon found in the brain. ***Brain Res*** 528 (1990) 21–24.

[13] Liu J, Ginis I, Spatz M, Hallenbeck JM, Hypoxic preconditioning protects cultured neurons against hypoxic stress via TNF-α and ceramide. ***Am J Physiol-Cell Ph*** 278 (2000) C144–C153.

[14] Longa E, Weinstein P, Carlson S, BS, Cummins R, Reversible Middle Cerebral Artery Occlusion without Craniectomy in Rats. ***Stroke*** 20 (1989) 84-91.

[15] Matsushima K, Hogan MJ, Hakim AM, Cortical spreading depression protects against subsequent focal cerebral ischemia in rats. ***J Cerebr Blood F Met*** 16 (1996) 221–226.

[16] Mattson MP, Culmsee C, Yu Z, Camandola S, Roles of nuclear factor kappa B in neuronal survival and plasticity. ***J Neurochem*** 74 (2000) 443– 456.

[17] McLaughlin BA, Hartnett KA, Erhardt KA, Legos JL, White RF, Barone FC, Aizenman E, Caspase 3 activation is essential for neuroprotection in preconditioning. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 100 (2003) 715–720.

[18] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA, Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. ***Circulation*** 74 (1986) 1124 – 1136.

[19] Namura S, Maeno H, Takami S, Jiang XF, Kamichi S, Wada K, Nagata I, Inhibition of glial glutamate transporter GLT-1 augments brain edema after transient focal cerebral ischemia in mice. ***Neurosci Lett*** 324 (2002)117–120.

[20] Ohtsuki T, Matsumoto M, Kuwabara K, Kitagawa K, Suzuki K, Taniguchi N, Kamada T, Influence of oxidative stress on induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. ***Brain Res*** 599 (1992) 246–252.

[21] Patel AJ, Honore´ E, Maingret F, Lesage F, Fink M, Duprat F, Lazdunski MA, Mammalian two pore domain mechanogated S-type K+ channel. ***EMBO J*** 17 (1998) 4283–4290.

[22] Perez-Pinzon MA, Mumford PL, Rosenthal M, Sick TJ, Anoxic preconditioning in hippocampal slices: role of adenosine. ***Neuroscience*** 75 (1996) 687–694.

[23] Plamondon H, Blondeau N, Heurteaux C, Lazdunski M, Mutually protective actions of kainic acid epileptic

Archive of SID

www.SID.ir

preconditioning and sublethal global ischemia on hippocampal neuronal death: involvement of adenosine A1 receptors and KATP channels. ***J Cerebr Blood F Met*** 19 (1999) 1296 –1308.

[24] Pradillo J, Hurtado O, Romera C, Cardenas A, Fernandez-Tome P, Alonso-Escolano D, Lorenzo P, Moro M, Lizasoain, TNF-R1 mediayes increased neuronal membrane EAAT3 experession after in vivo cerebral ischemic preconditioning. ***J Neurosci*** 138 (2006) 1171–1178.

[25] 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*** 78 (2001) 909–919.

[26] Riepe MW, Esclaire F, Kasischke K, Schreiber S, Nakase H, Kempski O, Ludolph AC, Dirnagl U, Hugon J, Increased hypoxic tolerance by chemical inhibition of oxidative phosphorylation: "chemical preconditioning." ***J Cerebr Blood F Met*** 17 (1997) 257–264.

[27] Robinson MB, The family of sodium-dependent glutamate transporters: a focus on the GLT-1/EAAT2 subtype. ***Neurochem Int*** 33 (1998) 479–491.

[28] Romera C, Hurtado O, Botella S, Lizasoain I, Cardenas A, Fernandez-Tome P, Leza J, Lorenzo P, Moro M, In Vitro Ischemic Tolerance Involves Upregulation of Glutamate Transport Partly Mediated by the TACE/ADAM17–Tumor Necrosis Factor- α Pathway. ***J Neurosci*** 24 (6) (2004) 1350 –1357.

[29] Rosenzweig HL, Minami M, Lessov NS, Coste SC, Stevens SL, Henshall DC, Meller R, Simon RP, Stenzel-Poore MP, Endotoxin preconditioning protects against the cytotoxic effects of TNFalpha after stroke: a novel role for TNFalpha in LPS-ischemic tolerance. ***J Cerebr Blood F Met*** 2007 (In press).

[30] Ruscher K, Freyer D, Karsch M, Isaev N, Megow D, Sawitzki B, Priller J, Dirnagl U, Meisel A, Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model. ***J Neurosci*** 22 (2002) 10291–10301.

[31] Shimazaki K, Ishida A, Kawai N, Increase in bcl-2 oncoprotein and the tolerance to ischemia-induced neuronal death in the gerbil hippocampus. ***Neurosci Res*** 20 (1994) 95–99.

[32] Toyoda T, Kassell NF, Lee KS, Induction of ischemic tolerance and antioxidant activity by brief focal ischemia. ***Neuroreport*** 8 (1997) 847– 851.

[33] Trendelenburg G, Prass K, Priller J, Kapinya K, Polley A, Muselmann C, Ruscher K, Kannbley U, Schmitt AO, Castell S, Wiegand F, Meisel A, Rosenthal A, Dirnagl U, Serial analysis of gene expression identifies metallothionein-II as major neuroprotective gene in mouse focal cerebral ischemia. ***J Neurosci*** 22 (2002) 5879–5888.

[34] Wick A, Wick W, Waltenberger W, Weller M, Dichgans J, Schulz JB, Neuroprotection by hypoxic preconditioning requires sequential activation of vascular endothelial growth factor receptor and Akt. ***J Neurosci*** 87 (2002) 7415-7421.

[35] Yamashita A, Makita K, Kuroiwa T, Tanaka K, Glutamate transporters GLAST and EAAT4 regulate postischemic Purkinje cell death: An in vivo study using a cardiac arrest model in mice lacking GLAST or EAAT4. ***Neurosci Res*** 55 (2006) 264–270.

[36] Zhang X, Xiong L, Hu W, Zheng Y, Zhu Z, Liu Y, Chen S, Wang X, Preconditioning with prolonged oxygen exposure induces ischemic tolerance in the brain via oxygen free radical formation. ***Can J Anesth*** 51 (2004) 3 258–263.

Archive of SID

www.SID.ir