



The Effect of Normobaric Hyperoxia on Superoxide Dismutase Activity and Neurological Deficits in an Animal Model of Huntington disease

Mohammad Reza Bigdeli*, Mehdi Rahnema

Dept. Biology, Islamic Azad University- Zanjan Branch, Zanjan, Iran

Received: 4 Dec 2008

Revised: 3 Feb 2009

Accepted: 19 Feb 2009

Abstract

Introduction: recent studies have shown that normobaric hyperoxia (HO) can induce excitotoxicity and oxidative stress tolerance (ETT) in a variety of organs such as brain. In this study, we examined the effect of intermittent doses of normobaric hyperoxia (HO) on the neurological deficit and superoxide dismutase activity in the brain tissue of an animal model of Huntington's disease.

Methods: Rats were divided into 3 groups. The first group was exposed to HO intermittently (4h × 6 days; HO) and the second 2 main groups acted as controls, and were exposed to 21% oxygen in the same chamber (room air, RA) or discontinuously (4h × 6 days; InRA). HO and RA groups were immediately given 20 mg/kg of 3-nitropropionic acid for 6 days, Administration of 3-nitropropionic acid generates an animal model of Huntington disease, because Huntington disease is a neurodegenerative disorder. Then, ETT induced by HO was measured by the evaluation of neurological deficits such as string, limb withdrawal, inclined plane, beam balance test, and assessment of superoxide dismutase activity.

Results: Our findings indicated that HO is involved in the induction of ETT. Pretreatment with HO significantly improved neurological deficits including string, limb withdrawal, inclined plane, beam balance test. Preconditioning with HO significantly increased superoxide dismutase activity.

Conclusion: Although further studies are needed to clarify the mechanisms of excitotoxicity tolerance, pretreatment with HO seems to partly exert its effects through the enhancement of cell viability and superoxide dismutase activity.

Keywords: brain preconditioning, normobaric hyperoxia, Huntington, excitotoxicity, tolerance, neurological deficits.

* Corresponding author e- mail: bigdelimohammadreza@yahoo.com
Available online @: www.phypha.ir/ppj

بررسی اثر پیش شرطی سازی هیپرکسی نورموباریک بر فعالیت

سوپراکسید دیسموتاز و نارسایی‌های نورولوژیک در مدل بیماری هانتینگتون

محمد رضا بیگدلی*، مهدی رهنما

گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، زنجان

دریافت: ۱۳ آذر ۸۷ بازبینی: ۱۴ بهمن ۸۷ پذیرش: ۳۰ بهمن ۸۷

چکیده

مقدمه: مطالعات اخیر بیان می‌کند که هیپرکسی نورموباریک (HO) باعث ایجاد پدیده تحمل به اکسیتوتوکسیسیته و استرس اکسیداتیو در انواع اندام‌ها به خصوص مغز می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی اثر پیش شرطی سازی هیپرکسی نورموباریک بر نارسایی‌های نورولوژیک و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بافت مغز در مدل جانوری بیماری هانتینگتون است.

روش‌ها: در این آزمایش رت‌ها در سه گروه دسته‌بندی می‌شوند. جانوران در گروه اول اکسیژن بالای ۹۰ درصد به مدت ۴ ساعت در روز به مدت ۶ روز استنشاق می‌کردند. جانوران گروه دوم و سوم هوای اتاق (RA) استنشاق می‌کردند. بلافاصله بعد از پایان پیش شرطی سازی، مدل سازی بیماری هانتینگتون با تزریق داخل صفاقی روزانه ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن اسید نیتروپروپیونیک (3-NP) در شش روز انجام می‌شد.

یافته‌ها: پیش شرطی سازی با HO باعث ایجاد پدیده تحمل به اکسیتوتوکسیسیته می‌شود. پیش شرطی سازی با HO در مقایسه با هوای اتاق باعث کاهش معنی‌دار نقص نورولوژیک مانند تعادل بر روی میله، زمان عقب کشیدن اندام حرکتی، زمان پنجه گیری، افتادن از سطح شیب‌دار می‌شد. همچنین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در شرایط هیپرکسی افزایش می‌یافت.

نتیجه‌گیری: اگرچه مطالعات بیشتری برای وضوح مکانیسم‌های بهبود دهنده پیش شرطی سازی لازم است، اما HO ظاهراً تا حدی آثارشان را از طریق مقاوم سازی سلولها با پیش شرطی سازی و افزایش میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید انجام می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: هیپرکسی نورموباریک، هانتینگتون، پیش شرطی سازی، نارسایی‌های نورولوژیک.

مقدمه

همدیگر میان کنش می‌دهند و منجر به اختلالات رفتاری و نوروشیمیایی می‌شوند [۱۲، ۱۷]. در مدل رت هانتینگتون با اسید ۳- نیتروپروپیونیک (3-NP) احتمالاً هر سه مکانیسم درگیرند [۱]. اسید ۳- نیتروپروپیونیک به صورت غیرقابل برگشت سوکسینات دهیدروژناز را مهار می‌کند. سوکسینات دهیدروژناز آنزیمی سراسری در غشای در مجموعه دوم زنجیره انتقال الکترون و چرخه کربس است. این مهار، عملکرد میتوکندری را به خطر می‌اندازد و منجر به تخلیه ATP، استرس اکسیداتیو و فعال سازی گیرنده‌های NMDA از طریق افزایش غلظت

بیماری‌های تحلیل بر عصبی مانند بیماری‌های آلزایمر، پارکینسون، و هانتینگتون بیماری‌های چند عاملی هستند که در آنها مکانیسم‌هایی از قبیل اکسیتوتوکسیسیته (سمیت حاصل از تحریک^۱)، نقص عملکردی میتوکندری، و استرس اکسیداتیو با

* نویسنده مسئول مکاتبات: bigdelimohammadreza@yahoo.com

وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

1. Excitotoxicity

گلو تامات می شوند [۷۶].

همان طوری که گفته شد، بیماری هانتینگتون یک بیماری تحلیل عصبی است که مبنای آن سمیت حاصل از تحریک و استرس اکسیداتیو است که منجر به تخریب سلولی و آسیب بافتی می شود. همچنین همان طوری که ذکر شد هیپرکسی با ایجاد گونه های واکنشی اکسیژن (reactive oxygen species: ROS) نوعی شرایط زیر کشنده استرس اکسیداتیو را مهیا می سازد. بنابراین یکی از روش های مقابله با گونه های واکنشی اکسیژن افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز است. به همین جهت در این مطالعه فرض بر این است که با شرایط زیر کشنده استرس اکسیداتیو حاصل از هیپرکسی نورموباریک می توان سلول های عصبی را برای مقابله با سمیت حاصل از تحریک و استرس اکسیداتیو آماده کرد. بر این اساس، هدف از این مطالعه بررسی پیش شرطی سازی با هیپرکسی نورموباریک بر بهبود نقص های نورولوژیک و میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در بیماری هانتینگتون است.

مواد و روش ها

در این تحقیق ۲۱ رت نر بالغ Sprague-Dawley با وزن ۲۰۰-۲۵۰ گرم که در شرایط استاندارد (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی؛ دسترسی آسان به آب و غذا؛ دمای اتاق ۲۵-۲۰ درجه سانتی گراد) نگهداری می شدند. در این آزمایش رت ها به طور تصادفی در سه (به تعداد هر کدام ۷ سر) با استفاده از روش تصادفی به صورت زیر گروه بندی می شدند. جانوران گروه اول (کنترل) و دوم (اسید ۳-نیتروپروپیونیک؛ 3-NP+RA) هوای اتاق استنشاق (RA) می کردند؛ جانوران در گروه سوم اکسیژن بالای ۹۰ درصد به مدت ۴ ساعت در روز به مدت ۶ روز استنشاق می کردند (3NP+HO). بعد از پایان پیش شرطی سازی برای ایجاد مدل هانتینگتون تحت تزریق شش روز اسید نیتروپروپیونیک قرار می گرفتند. بعد از ۲۴ ساعت، برای ارزیابی فعالیت های رفلکسی، حرکتی و تعادلی از آزمایش های روتین رفتاری استفاده می شد که عبارتند از: برای سنجش توان حرکتی تعادلی از روش ارزیابی میزان تعادل بر روی میله، برای سنجش توان رفلکس های حرکتی از روش ارزیابی عقب کشیدن اندام حرکتی، برای سنجش توان تعادل حرکتی زاویه ای از روش صفحه سطح شیب دار، و برای سنجش قدرت اجرای حرکت

پاتولوژی مدل 3-NP به واسطه تحلیل انتخابی جسم مخطط شناخته می شود که با آلودگی استروگلیایی که با افزایش بیان پروتئین اسیدی فیبریلی گلیال (GFAP) مرتبط است اتفاق می افتد [۲،۲۲]. نرون های گابارژیک به طور خاص مستعد مسمومیت القایی 3-NP هستند که هنوز علت آن ناشناخته است [۱۷]. علائم رفتاری در رت هایی که در معرض دوزهای پایین و مزمن 3-NP از طریق اختلال فعالیت حرکتی شناخته می شود [۷۶].

در بین رت های بیمار شده با 3-NP، واکنش های پاتولوژیکی و رفتاری بسیار متغیری وجود دارد [۱۵،۷]. اثر نژاد و سن رت بر میزان واکنش های پاتولوژیکی دخالت دارد. مثلاً، رت های ۴ و ۱۲ ماه نسبت به رت های ۱ ماهه مستعد تر هستند [۱۱]. اختلاف علائم رفتاری ممکن است به دوز و روش تجویز سم بستگی داشته باشد. به طوری که دوز پایین و مزمن از طریق تزریق داخل صفاقی پاسخ دو مرحله ای القا می کند، ابتدا هیپواکتیویته^۲ و سپس هیپراکتیویته^۱، در حالی که دوزهای حاد تنها هیپراکتیویته القا می کند [۲،۷]. تصور می شود که نقص های رفتاری در نتیجه تحلیل جسم مخطط و مهار سوکسینات دهیدروژناز باشند [۳]. از طرف دیگر، نشان داده شده است که حفاظت عصبی ناشی از پیش زمینه سازی به ایسکمی^۱ (IPC) پدیده ای درون زاد است که تحمل به ایسکمی را در اندام های مختلف مانند قلب، کلیه و مغز القا می کند. اولین بار کیتاگوا [۲۰] در سال ۱۹۹۰ دریافت که رت هایی که تحت ۵ دقیقه ایسکمی کلی مغزی زیر کشنده قرار می گیرند کاهش مرگ سلولی CA1 در هیپوکامپ را به نمایش می گذارند. پدیده IPC بعدها توسط عوامل دیگر از جمله هیپرکسی نورموباریک نیز به اثبات رسیده است [۴،۵]. هیپرکسی نورموباریک بر خلاف سایر روش های پیش شرطی سازی که فاقد پتانسیل پیاده سازی بالینی هستند می تواند به صورت بالینی مورد استفاده قرار گیرد. به همین دلیل استفاده از عوامل غیر فارماکولوژیکی مفید به نظر می رسد.

1. Striatal
2. Hypoactivity
3. Hyperactivity
4. Ischemic Preconditioning

و دو سوراخ به قطر ۴ سانتی متر برای اندام‌های حرکتی جلویی وجود داشت. موش‌ها در این صفحه قرار داده می‌شدند به طوری که ابتدا اندام‌های حرکتی عقبی آنها در سوراخ‌های عقبی قرار داده می‌شدند. آنگاه اندام‌های جلویی نیز به همان صورت در سوراخ‌های جلویی قرار داده می‌شدند. مدت زمانی که طول می‌کشید تا اولین و دومین (مقابل) اندام حرکتی عقبی جمع شود ثبت می‌شد. بدین ترتیب اختلاف زمان بین جمع شدن اولین و دومین اندام حرکتی عقبی محاسبه می‌شد. این آزمایش به عنوان روشی برای اندازه‌گیری اختلالات عملکردی اندام حرکتی عقبی انجام می‌شد که شاخصی از میزان وسعت تحلیل جسم مخطط در مغز موش هاست [۲۷]. این آزمایش سه بار به فاصله‌های زمانی ۴۵ دقیقه انجام می‌شدند و میانگین آن گزارش می‌شد.

در آزمایش صفحه سطح شیب‌دار مطابق روش ریولین و تاتور [۲۵] میزان عملکرد حرکتی در موش‌ها اندازه‌گیری می‌شد. صفحه شیب‌دار دارای دو صفحه است که به وسیله لولایی به همدیگر وصل شده‌اند و با همدیگر می‌توانند زاویه‌های متغییری ایجاد کنند. این زاویه می‌تواند تا ۹۰ درجه ادامه داشته باشد. حداکثر زمانی که موش می‌توانست با حداکثر شیب به مدت ۵ ثانیه خود را روی شیب نگاه دارد به عنوان شاخص ثبت می‌شد. برای ارزیابی قدرت پنجه‌گیری به موش‌ها اجازه داده می‌شد که با پنجه دست سیم استیل به قطر ۲ میلی متر و طول ۳۵ سانتی متر را بگیرند. در این حالت موش با ارتفاع ۵۰ سانتی متری بالای سیم نگاه داشته می‌شد، مدت زمانی که موش می‌توانست این میله را نگاه دارد ثبت می‌شود. مدت زمان لازم برای جدا شدن دست موش به عنوان قدرت پنجه‌گیری در نظر گرفته می‌شد [۲۶].

نمونه‌ها (۱۵۰ میلی گرم از بافت نیمکره راست) در یک میلی‌لیتر بافر (۳۲/۰ مول در لیتر ساکاروز، ۱ میلی مول در لیتر EDTA، و ۱۰ نانومول در لیتر تریس هیدروکلرید با pH ۷/۴) با هموژنیزر شیشه تفلون هموژن می‌شدند. هموژن با سرعت ۱۳۶۰۰ g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ می‌شدند و سوپر ناتانت جمع‌آوری می‌شد و برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز مورد استفاده قرار می‌گرفت [۲۹]. غلظت پروتئین بر اساس روش برادفورد [۹] با استفاده از استاندارد آلبومین سرم گاوی اندازه‌گیری می‌شد.

پنجه دست از روش ارزیابی قدرت پنجه‌گیری.

تحریکات آسیب رسان در دوزهای پایین و کم، البته زیر آستانه ی آسیب رسان به سلول (هیپرکسی نورموباریک)، پاسخ سازشی القا می‌کند که مغز را در برابر استرس‌های دیگر حاصل از همین تحریکات آسیب رسان (تحمل (Tolerance)) یا دیگر تحریکات آسیب رسان (تحمل متقابل مانند بیماری هانتینگتون (Cross tolerance)) حفاظت می‌کند. جانوران در داخل یک جعبه که تمامی درزهای آن به طور کامل گرفته شده بود در ابعاد (۳۰*۳۵*۶۵) با دو مجرای ورودی و خروجی قرار می‌دادیم. ماده‌ای بنام سودا لیم^۱ (جاذب دی اکسید کربن) در زیر جعبه قرار می‌دادیم تا دی اکسید کربن تولیدی را جذب کند تا احتباس دی اکسید کربن تولیدی در جعبه اکسیژن رخ ندهد. بدین ترتیب، امکان تغییر غلظت گاز داخل جعبه به حداقل می‌رسید. اکسیژن خالص ($F_{iO_2} > 0.9$) یا هوای اتاق در میزان ۳ لیتر در دقیقه برای تیمار جانوران به جعبه حاوی رت‌ها متصل می‌شد. برای افزایش دقت آزمایش یک الکتروود سنجش اکسیژن نیز در کنار جعبه تعبیه می‌شد تا غلظت اکسیژن داخل جعبه را اندازه‌گیری کند. آزمایش ABG در هر دو آزمایش صورت می‌گرفت. در این آزمایش خون‌گیری شریانی از کاروتید انجام می‌شد.

برای ایجاد مدل بیماری هانتینگتون، رت‌های نر بالغ در گروه‌های دوم و سوم برای ایجاد مدل جانوری هانتینگتون به مدت شش روز تحت تزریق روزانه داخل صفاقی اسید نیتروپروپیونیک (سیگما) (3-NP؛ ۲۰ میلی گرم در کیلوگرم محلول در سالیان با تطابق pH حدود ۷) قرار می‌گرفتند [۷۶]. گروه اول به عنوان گروه کنترل همانند گروه اول و دوم تحت تزریق سالیان قرار می‌گرفتند.

آزمایش ارزیابی تعادل بر روی میله به منظور سنجش میزان توانایی رت‌ها در عبور از یک میله باریک افقی (۱×۱۰ سانتی متر) صورت می‌گرفت. موش‌ها به صورت عمودی از بالا بر روی این میله که فاصله آن از زمین یک متر بود گذاشته می‌شدند [۱۶].

در آزمایش ارزیابی عقب کشیدن اندام حرکتی موش‌ها در یک صفحه با اندازه‌های ۳۰×۳۰ و ارتفاع ۲۰ سانتی متر که دارای چهار سوراخ بود قرار داده می‌شدند. به طوری که دو سوراخ عقبی به قطر ۵ سانتی متر برای اندام‌های حرکتی عقبی

1. soda lime

جدول ۱- وضعیت گازهای خون شریانی و تنفسی در پایان تیمار با هیپرکسی و نورموکسی نورموباریک (n=6, *P<0.001).

گروه‌های آزمایشی	pH	PCO ₂ (mmHg)	PO ₂ (mmHg)	میزان تنفس (هرتز)
RA کنترل	۷/۴±۰/۰۹	۴۱/۶±۱/۹۵	۹۲/۳±۴/۵۱	۱/۶۱±۰/۱۲
3-NP+RA	۷/۳۷±۰/۰۸	۴۰/۳±۱/۸۹	۹۳/۱±۲/۵۳	۱/۵۹±۰/۲۳
3-NP+HO	۷/۳۵±۰/۰۸	۳۹/۳±۲/۱	۳۵۵±۱۹/۳۹*	۱/۲۹±۰/۲۲

یافته‌ها

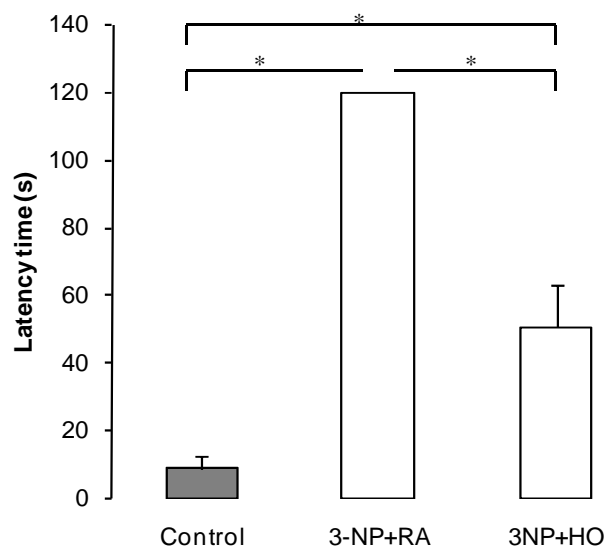
بر اساس ارزیابی‌های گازهای خون شریانی (ABG) فشار اکسیژن شریانی در شرایط هیپرکسی بسیار بالاتر (P<0.001, n=6) از فشار اکسیژن شریانی در شرایط نورموکسی است (جدول ۱).

همه موش‌هایی که ۳-نیتروپروپیونیک اسید را به تنهایی دریافت کرده بودند و در شرایط نورموکسی نورموباریک قرار گرفته بودند (گروه اول)، در عبور از میان میله باریک افقی ۱×۱۰۰ سانتی‌متر ناتوان بودند و برای آنها زمان ۱۲۰ ثانیه در نظر گرفته شده است (شکل ۱). در حالی که موش‌هایی که به عنوان کنترل سالیین دریافت کرده بودند این میله را با میانگین زمانی ۳/۷±۸/۷ ثانیه طی می‌کردند. موش‌هایی که ضمن دریافت ۳-نیتروپروپیونیک اسید شرایط هیپرکسی نورموباریک را تحمل کرده بودند به طور معنی‌دار توانایی‌شان در انجام این آزمایش بهبود یافته بود (۵۰/۸±۱۱/۷ ثانیه) (P<۰/۰۵, n=۷).

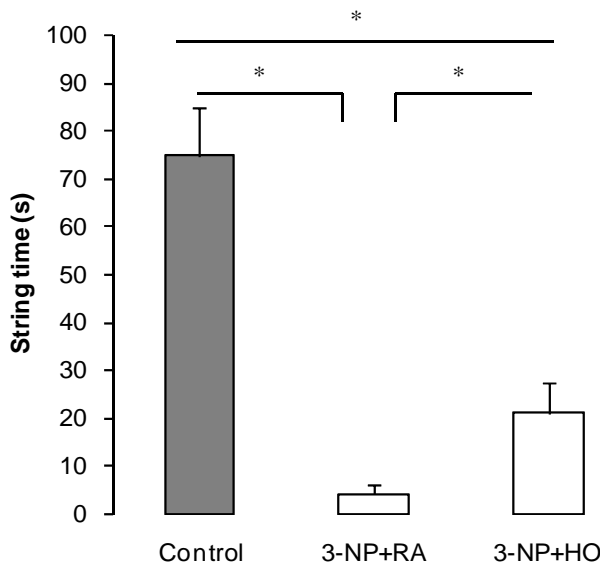
اختلاف زمانی بین جمع شدن اندام‌های حرکتی عقبی در موش‌هایی که ۳-نیتروپروپیونیک اسید به تنهایی دریافت کرده بودند (۹۹/۷±۲۹/۱ ثانیه) به طور قابل ملاحظه‌ای بالا بود (شکل ۲). در حالی که در گروه کنترل زمان بسیار کوتاه بود (۱ ثانیه). در گروه هیپرکسی نورموباریک که ۳-نیتروپروپیونیک اسید نیز دریافت کرده بودند، اختلاف زمانی به طور قابل ملاحظه‌ای کمتر از گروه کنترل بود (۶۰/۵±۱۱/۶ ثانیه) (P<۰/۰۵, n=۷).

تجویز ۳-نیتروپروپیونیک اسید به تنهایی به طور قابل توجهی عملکرد حرکتی موش‌ها را در صفحه شیب‌دار به واسطه کاهش زاویه در این گروه (۵۸/۴±۳/۲ درجه) نسبت به گروه کنترل (۸۰/۵±۳/۴ درجه) نشان می‌داد (شکل ۳). تجویز هیپرکسی نورموباریک باعث افزایش توانایی موش‌ها در سطح شیب‌دار می‌شد (۶۷/۱±۶/۷ درجه) (P<۰/۰۵, n=۷).

فعالیت کل سوپراکسید دیسموتاز (SOD) به واسطه روش جنت و همکارانش در سال ۲۰۰۲ [۱۴] با اندکی تغییر انجام شد. مخلوط سنجش نهایی در حجم کل نهایی ۱ میلی لیتر حاوی ۵۰ میلی مولار بافر فسفات سدیم، ۰/۱ میلی مولار EDTA، ۰/۴۸ میلی مولار پیروگالال، و ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی است. تغییر جذب نوری در ۴۲۰ نانومتر مخلوط سنجش نهایی به مدت یک دقیقه در دمای ۲۵ درجه در مقایسه با محلول بلانک که حاوی همه مواد غیر از بافت هموزن شده است اندازه‌گیری می‌شد (Spectronin 20D MILTON ROY). یک واحد آنزیم طبق تعریف مقداری از آنزیم است که باعث مهار نصف ماگزیمم فعالیت اتواکسیداسیون پیروگالال می‌شود. سطح فعالیت آنزیم، تعادل بر روی میله، وضعیت در سطح شیب‌دار، عقب کشیدن اندام حرکتی، قدرت پنجه‌گیری، و میزان گازهای خون شریانی با استفاده از one-way ANOVA تست داده می‌گرفت. داده‌ها به صورت Mean±SEM نمایش داده می‌شود. تست Post-hock استفاده شده برای موارد داده‌ها Bonferroni است. P<0.05 از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شده اند.

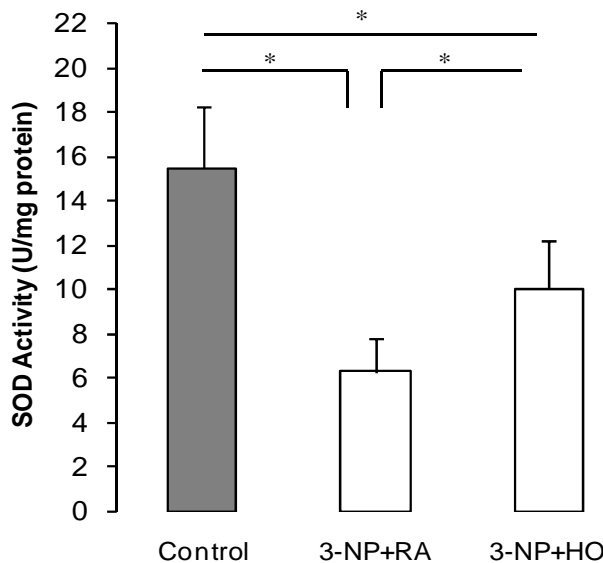


شکل ۱- اثر هیپرکسی نورموباریک با ۳-نیتروپروپیونیک اسید (3-NP+HO) و نورموکسی نورموباریک با ۳-نیتروپروپیونیک اسید (3-NP+RA) بر تعادل بر روی میله در مقایسه با گروه کنترل (P<۰/۰۵, n=۷).

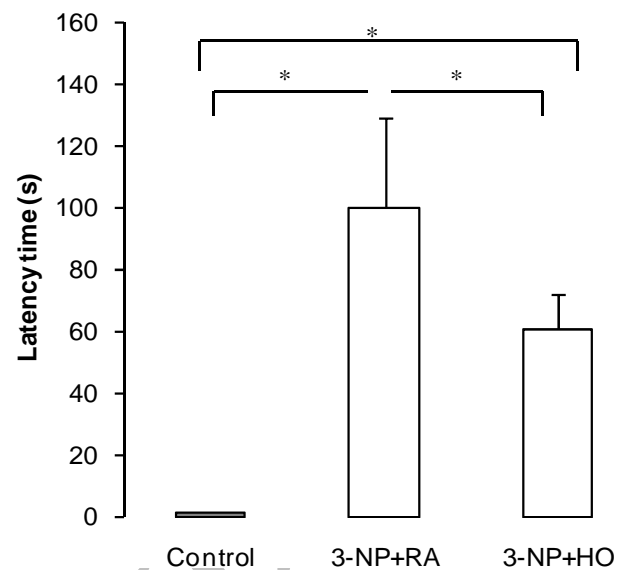


شکل ۴- اثر هیپرکسی نورمواریک با ۳-نیتروپروپیونیک اسید (3-NP+HO) و نورموکسی نورمواریک با ۳-نیتروپروپیونیک اسید (3-NP+RA) بر زمان پنجه‌گیری در مقایسه با گروه کنترل ($n=7$, $P<0.05$).

اسید همراه با نورموکسی نورمواریک (3-NP+RA) دریافت کرده بودند در مقایسه با آنهایی که ۳-نیتروپروپیونیک اسید همراه با هیپرکسی نورمواریک (3-NP+HO) دریافت کرده بودند افزایش سطح فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را نشان می‌دادند. از طرف دیگر سطح فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گروه مدل هانتینگتون در مقایسه با کنترل معنی‌دار بود ($n=7$, $P<0.05$).



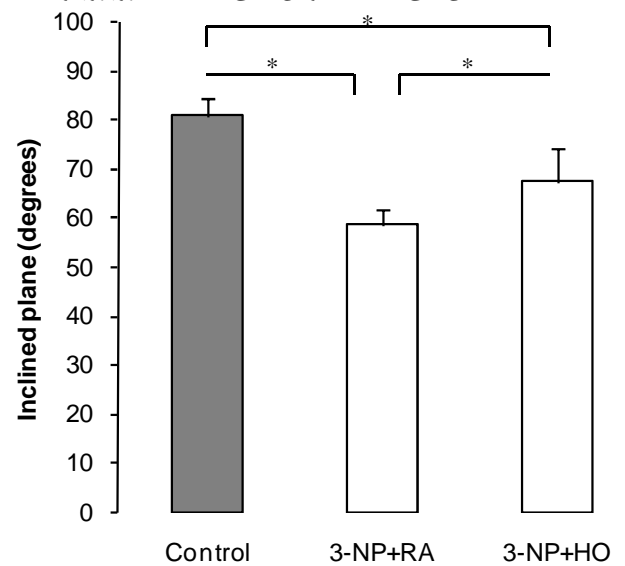
شکل ۵- اثر هیپرکسی نورمواریک با ۳-نیتروپروپیونیک اسید (3-NP+HO) و نورموکسی نورمواریک با ۳-نیتروپروپیونیک اسید (3-NP+RA) بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در مقایسه با گروه کنترل ($n=7$, $P<0.05$).



شکل ۲- اثر هیپرکسی نورمواریک با ۳-نیتروپروپیونیک اسید (3-NP+HO) و نورموکسی نورمواریک با ۳-نیتروپروپیونیک اسید (3-NP+RA) بر زمان عقب کشیدن اندام حرکتی در مقایسه با گروه کنترل ($n=7$, $P<0.05$).

در موش‌هایی که ۳-نیتروپروپیونیک اسید به تنهایی دریافت کرده بودند ($4/1 \pm 1/9$ ثانیه). مدت زمان پنجه‌گیری در مقایسه با گروه کنترل ($74/5 \pm 10/2$ ثانیه) به طور معنی‌داری کاهش می‌یافت (شکل ۴). پیش شرطی سازی با هیپرکسی نورمواریک به طور قابل توجهی زمان پنجه‌گیری را در مقایسه با گروهی که به تنهایی ۳-نیتروپروپیونیک اسید دریافت کرده بودند افزایش می‌داد ($21 \pm 6/4$ ثانیه) ($n=7$, $P<0.05$).

شکل ۵ نشان می‌دهد در موش‌هایی که ۳-نیتروپروپیونیک



شکل ۳- اثر هیپرکسی نورمواریک با ۳-نیتروپروپیونیک اسید (3-NP+HO) و نورموکسی نورمواریک با ۳-نیتروپروپیونیک اسید (3-NP+RA) بر زاویه افتادن از سطح شیب‌دار در مقایسه با گروه کنترل ($n=7$, $P<0.05$).

بحث

افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و سوپراکسید دیسموتاز با کاهش بیان فاکتور القایی هیپوکسی^۲ ارتباط دارد که گفته می‌شود عملکرد سد خونی مغزی را از طریق کاهش فاکتور رشد عروقی بهبود می‌بخشد [۲۱]. علاوه بر این، رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌توانند با افزایش TNF- α از طریق گیرنده TNF- α باعث بروز پدیده تحمل به ایسکمی شوند [۲۳]. از طرف دیگر، افزایش رادیکال‌های آزاد و سوپراکسید دیسموتاز به واسطه کاهش میزان بیان فاکتور القایی هیپوکسی مرتبط است، این روند منجر به بهبود عملکرد سد خونی مغزی می‌شود که احتمالاً این عمل را از طریق کاهش فاکتور رشد عروقی انجام می‌دهد. همان طوری که نتایج این پژوهش نشان می‌دهد، افزایش میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نقش به‌سزایی در کاهش نقص‌های نورولوژیکی دارد. از آنجایی که هانتینگتون یک بیماری استرس اکسیداتیو است، بنابراین هر عاملی که بتواند سطح گونه‌های اکسیژن واکنشی را کم کند می‌تواند در بهبود بیماری هانتینگتون مفید باشد [۸ و ۲۹]. تجویز ۳- نیتروپروپیونیک اسید تخلیه غلظت دوپامین جسم مخطط را در رت‌ها تولید می‌کند [۱]. کاهش غلظت دوپامین [۲] و گیرنده‌های دوپامین [۱] به عنوان عوامل اصلی دخیل در بیماری هانتینگتون پیشنهاد شده است. مطالعات بر روی مدل‌های ترانس ژنیک بیماری هانتینگتون به روشنی اثبات کرده است که کاهش فعالیت دوپامینرژیک به پیشرفت بیماری کمک می‌کند [۱۸]. پیش درمان موش‌ها با هیپرکسی نورموباریک به طور قابل ملاحظه تخلیه دوپامین جسم مخطط القایی ۳-نیتروپروپیونیک اسید را کاهش می‌دهند. بعلاوه، مطالعات اخیر نشان می‌دهد که فاکتور نوتروفیک و پیش درمان با نیکوتین نقش حیاتی در افزایش توان زیستی نرون در مقابل قرارگیری در معرض نروتوکسین‌ها یا نروتوماها ایفا می‌کند [۱۳]. نیکوتین احتمالاً تولید و آزاد سازی فاکتورهای نوتروفیک مانند فاکتور نوتروفیک مشتق عصبی^۳ (BDNF)، فاکتور رشد فیبروبلاست پایه (FGF-2)، و فاکتورهای رشد عصبی^۴ (NGF) تحریک می‌کنند [۲۴]. از طرف دیگر، هیپرکسی تولید و آزاد سازی

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که تجویز هیپرکسی نورموباریک در مقایسه با هوای اتاق باعث افزایش غلظت اکسیژن خون می‌شود (جدول یک). از طرف دیگر، پیش شرطی سازی با هیپرکسی نورموباریک باعث افزایش مقاومت بافت مغز در مقابل استرس اکسیداتیو ناشی از ۳- نیتروپروپیونیک اسید در مدل جانوری هانتینگتون می‌شود. بدین ترتیب میزان نقص‌های نورولوژیک را در ارتباط با رفلکس‌های تعادلی، عقب کشیدن، حفظ وضعیت، و نارسایی پنجه‌گیری بهبود می‌بخشد. همین‌طور، میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در شرایط هیپرکسی نورموباریک افزایش می‌یابد و تا حدی استرس اکسیداتیو ناشی از ۳- نیتروپروپیونیک اسید را خنثی می‌کند. شواهدی وجود دارد که آسیب اکسیداتیو در پاتوژنز چندین نوع بیماری بیماری تحلیل عصبی از جمله هانتینگتون و پارکینسون دخالت دارد [۱۲]. یافته‌های این پژوهش با گزارش‌های پیشین در مورد انواع اختلالات رفتاری و نقص‌های حرکتی در رت‌ها ناشی از تجویز ۳-نیتروپروپیونیک اسید مطابقت دارد [۷۶].

علاوه بر بیماری حاصل از تجویز مزمن ۳-نیتروپروپیونیک اسید به خوبی مراحل هیپوکینتیک بیماری هانتینگتون را نشان می‌دهد [۱۰]. پیش درمان موش‌ها با هیپرکسی نورموباریک حفاظت عصبی در موش‌ها علیه نارسایی حرکتی و رفتاری القایی ۳- نیتروپروپیونیک اسید ایجاد می‌کند. مکانیسم‌های متعددی می‌تواند در حفاظت عصبی ناشی از هیپرکسی علیه مواد تحلیل دهنده‌های عصبی در موش‌ها دخالت داشته باشد. مکانیسم‌های دخیل عبارتند از: (۱) هیپرکسی می‌تواند باعث رگ زایی و افزایش تراکم عروق در واحد حجم شود [۱۸]. (۲) هیپرکسی می‌تواند باعث بلوک شدن مولکول چسبان بین سلولی^۱ و مهار تجمع نوتروفیل‌ها گردد [۳۰، ۸]. بنابراین، هیپرکسی می‌تواند تجمع نوتروفیل‌ها را کاهش دهد و از آسیب مغزی بکاهد. وادا و همکارانش در سال ۲۰۰۰ نشان دادند که رادیکال‌های آزاد اکسیژن و Bcl-2 که به عنوان مهار کننده آپوپتوز عمل می‌کند بعد از قرار گرفتن مکرر در معرض هیپرکسی افزایش می‌یابد و باعث افزایش توان زیستی نورونی می‌شود [۲۸]. از طرف دیگر،

2. hypoxia induce factor-1 α (HIF- α)

3. Brain derived neurotrophic factor

4. Neural growth factor

1. intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)

هانتینگتون باشد [۴]. آنزیم‌های آنتی اکسیدان دستگاه عصبی را علیه گونه‌های واکنشی اکسیژن محافظت می‌کند [۲۰]. آنزیم‌های آنتی اکسیدان می‌توانند به عنوان رفتگر پراکسید هیدروژن عمل کنند.

در مجموع، هیپرکسی نورموباریک به طور قابل ملاحظه آسیب‌های جسم مخطط و نقص‌های نورولوژیک ناشی از ۳-نیتروپروپیونیک اسید را در موش‌ها کاهش می‌دهد. اثر حفاظتی هیپرکسی نورموباریک ممکن است افزایش سطوح دوپامین جسم مخطط ناشی از القای ۳-نیتروپروپیونیک اسید مدل هانتینگتون را کاهش دهد.

TNF- α را تحریک می‌کند. پیش درمان هیپرکسی نورموباریک باعث افزایش بیان ناقلین گلوتامات (EAAT1, EAAT2, EAAT3) و آنزیم تبدیل کننده TNF- α در سلول‌های مختلف نرونی هم می‌شود [۵،۴]. بدین ترتیب آثار حفاظتی ناشی از افزایش آزاد سازی گلوتامات را به نمایش می‌گذارد. لذا هیپرکسی نورموباریک ممکن است قسمتی از اثر حفاظت عصبی خود را به واسطه تحریک بیان گلوتامات و آنزیم تبدیل کننده TNF- α اعمال می‌کند. این روند به روشنی نقش استرس اکسیداتیو را در این فرایند تحلیل عصبی اثبات می‌کند. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که افزایش استرس اکسیداتیو می‌تواند یکی از وقایع اصلی در بیماری‌های بالینی و آزمایشگاهی در بیماری

References

- [1] Alexi T, Hughes PE, Faull RL, Williams CE, 3-Nitropropionic acid's lethal triplet: cooperative pathways of neurodegeneration. *Neuroreport* 9 (1998) R57-R64.
- [2] Beal MF, Brouillet E, Jenkins BG, Ferrante RJ, Kowall NW, Miller JM, Storey E, Srivastava R, Rosen BR, Hyman BT, Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Neurosci* 13 (1993) 4181-4192.
- [3] 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.
- [4] Bigdeli MR, Hajizadeh S, Froozandeh M, Rasulian B, Heidarianpour A, Khoshbaten A, Normobaric hyperoxia induces ischemic tolerance and upregulation of glutamate transporters in the rat brain and serum TNF- α level. *Exp Neurol* (2008) in press.
- [5] Bigdeli MR, Khoshbaten A, In vivo preconditioning with normobaric hyperoxia induces ischemic tolerance partly by triggering TACE/TNF- α /NF- κ B. *Neuroscience* 153 (2008) 671-678.
- [6] Borlongan CV, Koutouzis TK, Sanberg PR, 3-Nitropropionic acid animal model and Huntington's disease. *Neurosci Biobehav Rev* 21 (1997) 289-293.
- [7] Borlongan CV, Nishino H, Sanberg PR, Systemic, but not intraparenchymal, administration of 3-nitropropionic acid mimics the neuropathology of Huntington's disease: a speculative explanation. *Neurosci Res* 28 (1997) 185-189.
- [8] Bowes M, Zivin J, Tothlein R, Monoclonal antibody to ICAM-1 adhesion site reduces neurological damage in a rabbit cerebral embolism stroke model. *Stroke* 25 (1994) 869-876.
- [9] Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72 (1976) 248-54.
- [10] Brouillet E, Conde F, Beal MF, Hantraye P, Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog Neurobiol* 59 (1999) 427-468.
- [11] Brouillet E, Jenkins BG, Hyman BT, Ferrante RJ, Kowall NW, Srivastava R, Roy DS, Rosen BR, Beal MF, Age-dependent vulnerability of the striatum to the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Neurochem* 60 (1993) 356-359.
- [12] Browne SE, Bowling AC, MacGarvey U, Baik MJ, Berger SC, Muqit MM, Bird ED, Beal MF, Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann Neurol* 41 (1997) 646-653.
- [13] French SJ, Humby T, Horner CH, Sofroniew M, Rattray M, Hippocampal neurotrophin and trk receptor mRNA level are altered by local administration of nicotine carbachol and pilocarpine. *Brain Res* 67 (1999) 124-136.
- [14] Genet S, Kale RK, Baquer NZ, Alterations in antioxidant enzymes and oxidative damage in experimental diabetic rat tissues: effect of vanadate and fenugreek (*Trigonella foenum graecum*). *Mol Cell Biochem* 236 (2002):7-12.
- [15] Guyot MC, Hantraye P, Dolan R, Palç S, Maziere M, Brouillet E, Quantifiable bradykinesia, gait abnormalities and Huntington's disease-like striatal lesions in rats chronically treated with 3-nitropropionic acid. *Neuroscience* 79 (1997) 45-56.
- [16] Haik KL, Shear DA, Scheroder U, Sabel BA, Dunbar GL, Quinolinic acid released from polymeric brain implants causes behavioral and neuroanatomical alterations in rodent model of Huntington's disease. *Exp Neurol* 163 (2000) 430-439.
- [17] Heales SJ, Bolanos JP, Stewart VC, Brookes PS, Land JM, Clark JB, Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. *Biochim Biophys Acta* 1410 (1999) 215-228.
- [18] Helms A, Whelan H, Torbey M, Hyperbaric oxygen therapy of cerebral ischemia. *Cerebrovascular dis* 20 (2005) 417-426.
- [19] Hicky MA, Reynolds GP, Morton AJ, The role of dopamine in motor symptoms in the R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neurochem* 81 (2002) 46-59.
- [20] 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.
- [21] Ostrowski R, Colohan A, Zhang J, Mechanisms of hyperbaric oxygen-induces neuroprotection in a rat model

- of subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow & Metab* 25 (2005) 554-571.
- [22] Ouary S, Bizat N, Altairac S, Menetrat H, Mittoux V, Conde F, Hantraye P, Brouillet E, Major strain differences in response to chronic systemic administration of the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid in rats: implications for neuroprotection studies. *Neuroscience* 97 (2000) 521-530.
- [23] Pradillo J, Hurtado O, Romera C, Cardenas A, Fernandez-Tome P, Alonso-Escolano D, Lorenzo P, Moro M, Lizasoain, TNF-R1 mediates increased neuronal membrane EAAT3 expression after in vivo cerebral ischemic preconditioning. *Neuroscience* 138 (2006) 1171-1178
- [24] Ravikumar R, Fugaccia I, Scheff SW, Geddes JW, Srinivasan C, Toborek M, Nicotine attenuates morphological deficits in a contusion model of spinal cord injury. *J Neurotrauma* 22 (2005) 240-251.
- [25] Rivlin AS, Tator CH. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat. *J Neurosurg* 47 (1977) 577-581.
- [26] Shear DA, Dong J, Gundy CD, Haik-Creguer KL, Dunbar GL, Comparison of intrastriatal injections of quinolinic acid and 3-nitropropionic acid for use in animal models of Huntington's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiat* 22 (1998) 1217-1240.
- [27] Vis JC, Verbeek MM, De Waal W, Ten Donkelaar HJ, Kremer HPH, 3-nitropropionic acid induces a spectrum of Huntington's disease like neuropathology in rat striatum. *Neuropathol Appl Neurobiol* 25 (1999) 513-521.
- [28] Wada K, Kiyazawa T, Nomura N, Yano A, Tsuzuki N, Nawashiro H, Shima K, Mn-SOD and Bcl-2 expression after repeated hyperbaric oxygenation. *Acta Neurochir Suppl* 76 (2000) 285-290
- [29] Xia E, Rao G, Van Remmen H, Heydari AR, Richardson A, Activities of antioxidant enzymes in various tissues of male Fischer 344 rats are altered by food restriction. *J Nutr* 125 (1995) 195-201.
- [30] Zhang R, Chopp M, Jiang N, Tang W, Protak J, Manning A, Anderson D, Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient but not permanent middle cerebral artery occlusion in the wistar rat. *Stroke* 26 (1995) 1438-1443.