

بررسی میزان بیان ناقل گلوتامات شماره ۳، سطح TNF- α و فعالیت فاکتور هسته‌ای کاپا B در پدیده تحمل به ایسکمی حاصل از هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب در مدل رت سخته مغزی

محمد رضا بیگدلی^۱، سهراب حاجی زاده^{۲*}، مهدی فروزنده^۳، علی خوش باطن^۴

۱- استادیار، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴- استادیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۶/۱۲/۸

دریافت مقاله: ۸۶/۹/۲۰

چکیده

هدف: مطالعات اخیر بیان می‌کند که هیپرکسی نورموباریک (HO) متناوب و پیوسته باعث ایجاد پدیده تحمل به ایسکمی می‌شود و از این طریق از آسیب‌های ناشی از برقراری مجدد جریان جلوگیری می‌کند. هدف از این مطالعه بررسی تغییرات بیان ناقل اسیدهای آمینه تحریکی شماره ۳ (EAAT3)، سطح فاکتور نکروز نکروز تومور آلفا (TNF- α) سرم و فعالیت فاکتور هسته‌ای کاپا B به دنبال پیش شرطی‌سازی با HO پیوسته و متناوب است.

مواد و روش‌ها: رت‌ها به چهار گروه آزمایشی تقسیم شدند و هر گروه حاوی ۲۱ 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 درصد به نام HO متناوب و پیوسته قرار گرفتند. دو گروه دوم به‌عنوان گروه‌های کنترل همانند دو گروه اول به صورت پیوسته (۲۴ ساعت مداوم) و متناوب (۴ ساعت در روز به مدت ۶ روز) در معرض اکسیژن ۲۱ درصد به نام نورموکسی نورموباریک (RA؛ هوای اتاق) پیوسته و متناوب قرار گرفتند. هر گروه به سه زیرگروه به نام زیرگروه انسداد شریان راست مرکزی مغزی (MCAO)، زیرگروه گروه شم MCAO (جراحی بدون ایسکمی MCAO)، و زیرگروه دست نخورده (بدون هیچ‌گونه جراحی) تقسیم شدند. بعد از ۲۴ ساعت برقراری جریان خون مجدد بعد از ۶۰ دقیقه ایسکمی، میزان نقص نورولوژیک (NDS) در زیر گروه MCAO بررسی شد. بلافاصله و ۴۸ ساعت بعد از پیش درمان، خونگیری به‌منظور اندازه‌گیری سطح TNF- α سرم انجام شد. بعد از ۴۸ ساعت، رت‌ها برای نمونه برداری مغزی قربانی شدند تا اثر پیوسته و متناوب بر تغییرات فعالیت فاکتور هسته‌ای کاپا B بیان و EAAT3 و سطح TNF- α سرم بررسی شود.

نتایج: پیش شرطی‌سازی با HO پیوسته و متناوب باعث کاهش NDS می‌شود. پیش درمان با HO پیوسته و متناوب باعث افزایش بیان EAAT3 و سطح TNF- α سرم می‌شود.

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

کلیدواژه‌ها: هیپرکسی نورموباریک، تحمل به ایسکمی مغزی، ناقل اسیدهای آمینه تحریکی شماره ۳، سطح TNF- α سرم، فاکتور هسته‌ای کاپا B.

۱- مقدمه

استرس‌های دیگر حاصل از هم‌بین تحریکات آسیب‌رسان (تحمل: Tolerance) یا دیگر تحریکات آسیب‌رسان (تحمل

تحریکات آسیب‌رسان در دوزهای پایین و کم، البته زیر آستانه آسیب‌رسان به سلول، پاسخ سازشی القا می‌کند که مغز را در برابر

* نشانی مکاتبه: تهران، تقاطع بزرگراه جلال آل احمد و شهید چمران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه فیزیولوژی، صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵

هیپرکسی در برابر ایسکمی را سرکوب می‌کند [۱]. NF- κ B و TNF- α احتمالاً در یک حلقه فیدبک (Feedback loop) مثبت با همدیگر همکاری دارند [۱۸].

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 [۱، ۲۹]؛ بنابراین، ناقلین گلوتامات هدف اصلی مانورهای پیش شرطی‌سازی به ایسکمی هستند از طرف دیگر، مطالعات نشان می‌دهد که TNF- α نقش مهمی در ایجاد پدیده تحمل به ایسکمی ایفا می‌کند [۳۰]. TNF- α توسط پروتئاز غشایی موسوم به آنزیم تبدیل کننده TNF- α (TNF- α Converting Enzyme: TACE) به حالت محلول در می‌آیند.

نشان داده شده است که پیش شرطی‌سازی با هیپرکسی نورموباریک متناوب (Intermittent HO: InHO) و پیوسته (Prolonged HO: PrHO) باعث ایجاد درجات متفاوت پدیده تحمل به ایسکمی در مغز رت می‌شوند [۱۳]. هدف از این مطالعه بررسی ملکولی اثر HO بر بافت مغز است. از آنجایی که مهم‌ترین آسیب بعد از ایسکمی مغزی آزادسازی گلوتامات است که آن نیز به نوبه خود باعث بروز سمیت حاصل از تحریک در اثر افزایش یون کلسیم است، بنابراین یکی از مسیرهای ملکولی پدیده تحمل به ایسکمی افزایش بیان ناقل گلوتامات است. از طرف دیگر بنا به آثار گزارش شده هیپرکسی و درگیری آن با TNF- α و فعالیت NF- κ B، این مطالعه طوری طراحی شده است تا اثر InHO و PrHO بر تغییرات بیان ناقل اسیدهای آمینه تحریکی شماره ۳ (Excitatory Amino-acid Transporter 3: EAAT3)، فعالیت NF- κ B و سطح TNF- α سرم بررسی شوند.

۲- مواد و روش‌ها

۱-۲- گروه‌بندی حیوانات

رت‌های اسپراگو-دالی (۲۵۰-۳۵۰ گرم) به‌طور تصادفی به چهار گروه حاوی ۲۱ حیوان تقسیم شدند. دو گروه در درون جعبه اکسیژن با غلظت بالای ۹۰ درصد تحت عنوان شرایط هیپرکسی قرار داده شدند. از این دو گروه، یک گروه

متقابل (Cross tolerance) حفاظت می‌کند [۱]. در بین استرس‌های مختلف، هیپوکسی (Hypoxia) [۲]، ایسکمی (Ischemia) [۳]، تشنج [۴]، آنوکسی (Anoxia) [۵]، افسردگی منتشر (Spreading depression) [۶]، گرما [۷]، استرس اکسیداتیو (Oxidative stress) [۸]، تیمار با اسیدهای چرب اشباع نشده [۹] و مهارکننده‌های فسفوریلاسیون اکسیداتیو (Oxidative phosphorylation) [۱۰] فرایند تحمل مغز در برابر ایسکمی (Ischemic tolerance) (کامل یا کانونی) را القا می‌کنند. اکثر این تحریکات به علت آثار سمی، فاقد پتانسیل پیاده‌سازی بالینی هستند. به همین دلیل تحریکات غیر فارماکولوژیکی برای ایجاد پدیده تحمل به ایسکمی بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. یکی از این تحریکات غیر فارماکولوژیکی هیپرکسی (Hyperoxia) است. اخیراً چندین گزارش وجود دارد که هیپرکسی نیز باعث بروز تحمل به ایسکمی می‌شود [۱۱-۱۳].

مکانیسم‌های احتمالی متعددی در القا و حفظ پدیده تحمل به ایسکمی در مغز پیشنهاد شده‌اند. مکانیسم‌های مولکولی احتمالی شامل انواع وسیعی از میانجی‌هایی هستند که القای پروتئین‌های شوک گرمایی [۱۴]، گیرنده‌های ان-متیل-د-آسپاراتات (N-methyl-D-aspartic acid: NMDA) [۱۵-۱۷]، عوامل ضد مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (Antiapoptotic) [۱۸]، ایستر لوکین-۱ (Interleukin-1) [۱۹]، گیرنده‌های آدنوزینی (Adenosine receptors) و کانال‌های پتاسیمی وابسته به ATP [۲۰]، سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase) [۲۱]، گونه‌های اکسیژن واکنشی (Reactive Oxygen Species: ROS) [۲۲]، فعال‌سازی p21ras وابسته به نیتریک اکسید [۲۳]، متالوتیونین‌ها (Metallothioneins) [۲۴]، فعال‌سازی گیرنده فاکتور رشد اندوتلیالی عروق و Akt (پروتئین کیناز B) [۲۵]، اریتروپویتین (Erythropoietin) [۲۶]، کسپاز-۳ (Caspase-3) [۲۷]، و سایتوکین‌های (Cytokines) پیش‌تهایی و فاکتور هسته‌ای کاپا B (NF- κ B: Nuclear Factor-kappa B) [۲۸] از این جمله‌اند.

NF- κ B توسط عوامل مختلف داخل سلولی فعال می‌شود که شامل سیتوکین‌ها، فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF- α : Tumor Necrosis Factor-alpha)، فاکتورهای نوروتروفیک (Neurotrophic Factors) و نوروترانسمیترها (Neurotransmitters) هستند. همچنین نشان داده شده است که NF- κ B در ریه‌ها و قلب ظرف ۲ تا ۵ دقیقه فعال می‌شود [۳۷]. از طرف دیگر، مهار NF- κ B قبل از هیپرکسی حفاظت حاصل از

اکسیژن در خون اندازه‌گیری شد.

۲-۳- ایجاد مدل سگته مغزی (انسداد شریان مرکزی مغز)

رت‌ها بعد از توزین با داروی کلرات هیدرات (Merck، آلمان) (۴۰۰ میلی گرم در کیلوگرم وزن بدن) هوشبری می‌شدند. جراحی مدل‌سازی MCAO مطابق دستورالعمل لونگا و همکارانش انجام شد [۳۱]. به‌طور خلاصه، تحت جراحی میکروسکوپی، یک نخ بخیه نایلون از طریق تنه جراحی (External Carotid Artery) ECA وارد رگ شریانی راست شد و تا رسیدن به (Anterior Cerebral Artery) ACA از میان (Internal Carotid Artery) ICA با پتریگوپالاتین (Pterygopalatine) ادامه داده شد. در اثر تماس نخ بخیه و ACA جریان خون از هر طرف به (Middle Cerebral Artery) MCA بسته می‌شود. این بسته شدن از طریق احساس مقاومت در پیشروی نخ و ورود حدود ۲۰ میلی‌متر طول نخ از تنه ECA مشخص می‌شود. بعد از ۶۰ دقیقه ایسکمی، برقراری مجدد جریان خون صورت گرفت. دمای بدن از طریق رکتوم (Rectum) اندازه‌گیری شد و میزان دما در حوالی ۳۷ درجه سانتی‌گراد حفظ شد.

۲-۴- ارزیابی رفتاری حاصل از سگته

معاینه‌های نورولوژیک بعد از ۲۴ ساعت انجام شد. در طول ۲۴ ساعت بعد از شروع انسداد تا قربانی شدن حیوان مراقبت‌های ویژه انجام شد. یافته‌های نورولوژیک در ۵ مقیاس دسته‌بندی شدند: شماره صفر (۰) هیچ‌گونه عارضه نورولوژیک نشان ندادند؛ شماره یک (نارسایی کامل در انتهای پنجه‌های جلویی)، که یک نقص نورولوژیک کانونی خفیف در نظر گرفته شد؛ شماره دو (به چپ چرخیدن) نقص نورولوژیک کانونی متوسط؛ شماره ۳ (افتادن به سمت چپ) دچار نقص کانونی شدید هستند؛ و رت‌های شماره ۴ به‌طور خودبه‌خودی نمی‌توانند راه بروند و سطح هوشیاری پایین دارند.

۲-۵- ارزیابی حجم سگته مغزی

بعد از قربانی کردن رت‌ها با کلرال هیدرات (۸۰۰ میلی گرم در کیلوگرم وزن بدن)، سر آن‌ها جدا شد و به سرعت مغزها خارج

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 گرفتند (HO). 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 (۴ ساعت در روز به مدت ۶ روز) در معرض اکسیژن ۲۱ درصد قرار می‌گرفتند (RA: هوای اتاق). حیوان‌ها سپس به مدت ۲۴ ساعت در هوای اتاق (اکسیژن ۲۱ درصد) قرار گرفتند. سپس هر کدام از این گروه‌ها به سه زیر گروه تقسیم شدند. زیر گروه‌های اول به مدت ۶۰ دقیقه تحت جراحی انسداد شریان مرکزی (Middle Cerebral Artery Occlusion: MCAO) قرار گرفتند. ۲۴ ساعت بعد از لحاظ نقص‌های حرکتی نورولوژیک مطالعه شدند. زیر گروه‌های دوم به‌عنوان گروه شام (Sham) برنامه آزمایشی گروه اول را دریافت کردند با این تفاوت که جراحی بدون MCAO در این حیوانات صورت گرفت. زیر گروه‌های سوم به‌عنوان گروه دست نخورده (Intact) برنامه آزمایشی گروه اول را دریافت کردند با این تفاوت که هیچ‌گونه جراحی در آن‌ها صورت نگرفت. این دو گروه برای بررسی اثر خالص پیش شرطی‌سازی با InHO و PrHO بر میزان بیان EAAT3 و سطح TNF- α سرم طراحی شده بودند. برای ارزیابی سطح TNF- α و فعالیت NF- κ B در زیر گروه‌های دوم و سوم، بلافاصله و ۴۸ ساعت بعد از پیش درمان با HO نمونه‌گیری انجام شد.

۲-۲- جعبه هیپرکسی

۹ رت در داخل یک جعبه که تمامی درزهای آن به‌طور کامل گرفته شده است در ابعاد (۶۵×۳۵×۳۰) با دو مجرای ورودی و خروجی قرار داده شدند. ماده‌ای به نام سودا لیم (soda lime) (جاذب دی اکسید کربن) در زیر جعبه قرار داد شد تا دی اکسید کربن تولیدی را جذب کند. بدین ترتیب، امکان تغییر غلظت گاز داخل جعبه به حداقل می‌رسید. اکسیژن خالص (F_IO₂= ۰/۹۵) یا هوای اتاق در میزان ۳ لیتر در دقیقه برای تیمار جانوران به جعبه حاوی رت‌ها متصل شد. برای افزایش دقت آزمایش یک الکتروود سنجش اکسیژن نیز در کنار جعبه تعبیه شد تا غلظت اکسیژن داخل جعبه را اندازه‌گیری کند. در پایان تیمار با هیپرکسی و نورموکسی (Normoxia) آزمایش‌های اندازه‌گیری میزان گازهای شریانی (Arterial Blood Gases: ABG) به‌منظور کنترل سطح

سپس، ۱۰ میکرو لیتر محلول یکنواخت را با بافر نمونه ۲x مخلوط کرده و به مدت ۵ دقیقه جوشانده شد. ۴۰ میکرو گرم از آن در روی چاهک های ژل وارد (Load) شد، همچنین نردبان وزن مولکولی پروتئینی (Fermentas, SM0671) به اندازه ۵ میکرو لیتر در یکی از چاهک ها وارد شد. پروتئین ها بر اساس اندازه در SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate polyacrilamid gel electrophoresis) ۱۰ درصد جدا شدند.

قبل از اضافه کردن آنتی بادی های پروتئین های مورد نظر، غشا PVDF (Polyvinylidene fluoride) به واسطه ماده مسدود کننده (Blocking reagent) (GE Health care, Amersham) به مدت یک ساعت مسدود شد. پروتئین ها روی غشای PVDF با آنتی بادی های پلی کلونال (Polyclonal) اختصاصی علیه ناقل گلو تامات نوع ۳ [EAAT3/(Excitatory Amino-Acid Carrier) EAAC1] (Chemicon) با رقت ۱:۲۰۰۰ حاصل از بز یا با آنتی بادی اختصاصی علیه بتا-اکتین (Prosci-incorporated) به مدت یک ساعت انکوبه می شدند. ناقل گلو تامات و بتا-اکتین به واسطه آنتی بادی اختصاصی اولیه شناسایی شدند و به آن ها اتصال یافتند. سپس آنتی بادی های ثانویه اختصاصی بز متصل به HRP (Horseradish Peroxidase) (RAY-بیوتک، ایران) برای شناسایی آنتی بادی های علیه ناقل گلو تامات نوع ۳ با رقت ۱:۱۰۰۰ استفاده شد. انکوباسیون (Incubation) آنتی بادی ثانویه به مدت یک ساعت در دمای اتاق صورت می گرفت. بعد از شستشوی غشای PVDF مخلوطی از سوبسترای A و B (ECL, Amersham Biosciences) در تاریکی روی غشا اضافه شد و در اثر واکنش آن ها با HRP نور تولید شد. آنگاه فیلم حساس رادیولوژی را به مدت یک دقیقه روی بلات (Blot) قرار گرفت تا فیلم رادیولوژی را متأثر سازد؛ بدین ترتیب وجود پروتئین آشکار شد.

۷-۲- آزمایش الایزا

(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA)

غلظت TNF- α سرم

بعد از خونگیری، بلافاصله سرم از لخته خونی جدا شد. تعیین غلظت TNF- α سرم توسط کیت الایزا TNF- α رت بر اساس دستور العمل کیت انجام شد (Bander Medsystem, Austeria). به طور خلاصه، بعد از شستشو با بافر نمونه، نمونه ها به چاهک ها به صورت نمونه و استاندارد اضافه شدند. هریک از چاهک های مزبور پوشیده از آنتی بادی ضد TNF- α بودند. سپس آنتی بادی ضد

شدند و در سالیین (Saline) ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری شدند. هشت برش به ضخامت ۲ میلی متر به صورت کرونال (Coronal) به واسطه دستگاه ماتریکس مغز تهیه شدند که شروع آن ها از پیاز بویایی بود. برش ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در محلول ۲ درصد ۲،۳،۵ تری فنیل تترازولیم کلراید (2, 3, 5-tri phenyl tetrazolum chloride) نگهداری شدند. سپس با دوربین دیجیتال (نوکیا ۶۶۳۰) که قابل اتصال به کامپیوتر بود تصویربرداری شدند. بعد از انتقال تصاویر به کامپیوتر به وسیله نرم افزار Image Tools مساحت نواحی سفید و قرمز به ترتیب به عنوان نواحی آسیب دیده و سالم اندازه گیری شدند. حجم نواحی آسیب دیده و سالم برش ها از طریق محاسبه حاصل ضرب مساحت نواحی مذکور برش ها در ضخامت ۲ میلی متر برش به دست آمد و سپس به واسطه معادله زیر حجم اصلاح شده ناحیه آسیب دیده محاسبه شد [۲۷].

(حجم ناحیه آسیب دیده - حجم نیمکره راست) - حجم

نیمکره چپ = حجم اصلاح شده ناحیه آسیب دیده

۶-۲- آنالیز وسترن بلات ناقل گلو تامات

ابتدا برای یکنواخت کردن بافت مغز بافر یکنواخت به صورت زیر آماده شد. بافر حاوی ۳۲۰ میلی مولار سوکروز (Merck، آلمان)، یک میلی مولار دی-ال دی تیوتریتول (D-L-dithiothreitol)، ۱۰ میکرو گرم در میلی لیتر مهار کننده تریپسین سویبین (soybean trypsin inhibitor) (Merck، آلمان)، ۲ درصد SDS (Merck، آلمان)، ۱۰۰ میکرو مولار، ۱۰-فنانترولین (1,10-phenanthroline) (Merck، آلمان)، یک درصد PMSF (Phenylmethanesulphonyl fluoride) و ۵۰ میلی مولار تریس (Boehringer، آلمان)، بود که در دمای ۲۰ درجه سلسیوس با HCl به pH ۷ رسانده شد [۳].

۴۸ ساعت بعد از تیمار، حدود ۱۵۰ میلی گرم از بافت مغز (۸ ساعت بعد از پایان PrHO و InHO یا نورموکسی) از ناحیه همسو با ناحیه آسیب مغزی جدا شد. بافت جدا شده را در دمای ۴ درجه سلسیوس در ۴ حجم حاوی بافر یکنواخت قرار داده شد [۶۰]. سپس به وسیله دستگاه سونیکاتور (Sonicator) به مدت ۱۰ ثانیه، ۰/۵ دور در ثانیه و دامنه ۶۰ درصد بافت مغزی یکنواخت شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه بافر حاوی محلول یکنواخت با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد.

۹-۲- تحلیل نتایج و روش‌های آنالیز آماری

داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف خطای معیار (Mean \pm SEM) بیان شده است. غلظت TNF- α سرم، فسفو پروتئین مهارکننده، میزان بیان ناقل گلو تامات، و ABG از طریق آزمون آنوای یک طرفه (one-way ANOVA test) محاسبه شده‌اند. امتیاز نقص‌های نورولوژیک (Neurologic Deficit Score :NDS) با استفاده از آزمون U من ویتنی (Mann-Whitney U test) آنالیز شده است. $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شده است.

۳- نتایج

۱-۳- پارامترهای شرایط آزمایش

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

جدول ۱ وضعیت گازهای خون شریانی و تنفسی در پایان تیمار با هیپرکسی نورموباریک ($*=P < 0.001$)

میزان تنفس (هرتز)	PO ₂ (mmHg)	PCO ₂ (mmHg)	pH	گروه‌های آزمایشی
۱/۶۲ \pm ۰/۰۹	۹۲/۸ \pm ۳/۳	۴۱/۱۶ \pm ۱/۴	۷/۴ \pm ۰/۰۳	RA متناوب
۱/۳۷ \pm ۰/۱۲	۳۵۱/۱ \pm ۱۷/۶*	۳۹/۲ \pm ۱/۹	۷/۳ \pm ۰/۰۲	HO متناوب
۱/۶۰ \pm ۰/۱۱	۹۳/۲ \pm ۵/۲	۴۰/۲ \pm ۱/۳	۷/۳۷ \pm ۰/۰۵۲	RA پیوسته
۱/۲۴ \pm ۰/۱۲	۳۶۳ \pm ۱۴/۳*	۳۷/۸ \pm ۲/۳۸	۷/۳۵ \pm ۰/۰۲۷	HO پیوسته

۲-۳- آثار InHO و PrHO بر NDS

میان NDS به واسطه قرارگیری در معرض HO به‌طور قابل ملاحظه کاهش می‌یابد. میان NDS در گروه‌های InHO و PrHO و نورموکسی نورموباریک متناوب (Intermittent RA :InRA) و پیوسته (Prolonged RA :PrRA) در جدول ۲ نشان داده شده است. در رت‌هایی که به‌واسطه قرار گرفتن در معرض هیپرکسی هیچ‌گونه نقص نورولوژیک مشاهده نشده بود، با تزریق آوانسی آبی (Blue Evance)، این رنگ در ناحیه مرکزی سکنه مشاهده شد. این مدرک نشان می‌دهد که در کلیه رت‌های مذکور انسداد شریان مرکزی مغز صورت گرفته است ولی به دلیل بروز پدیده تحمل به ایسکمی القایی هیپرکسی به ویژه در ناحیه پنومبرا (Penumbra)

TNF- α متصل به بیوتین (Biotin) برای اتصال به TNF- α که به آنتی‌بادی ضد TNF- α ته چاهک متصل است اضافه شد. آنگاه به مدت یک ساعت انکوباسیون انجام شد. سپس به‌واسطه بافر شستشو چاهک‌ها شسته می‌شدند. سپس استرپتوئیدین-HRP (Strep-HRP :Streptavidin-HRP) برای اتصال به آنتی‌بادی ضد TNF- α متصل به بیوتین اضافه شد. بعد از انکوباسیون، Strep-HRP غیر متصل شستشو می‌شدند و سپس محلول سوبسترا حاوی تترا متیل بنزودین و ۰/۰۲ درصد پراکسید هیدروژن برای واکنش با HRP به چاهک‌ها اضافه شد. واکنش به‌واسطه اضافه کردن اسید متوقف می‌شد و غلظت TNF- α سرم به‌واسطه جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Start Fax-2100, USA).

۸-۲- آزمایش الیزا غلظت فسفو پروتئین

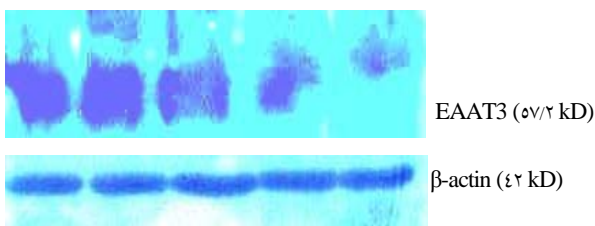
مهارکننده (Phospho-IkBa)

بعد از نمونه‌گیری مغزی، فسفو پروتئین مهارکننده به‌وسیله کیت اندازه‌گیری فسفو پروتئین مهارکننده بر اساس دستورالعمل کیت انجام شد (Alexis, Biochemicals). به‌طور خلاصه، ۵ میلی‌گرم از بافت مغزی ناحیه همسو در نیمکره غیر ایسکمی در محلول بافر فسفات سرد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جدا شد و دو بار به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس حجم معادلی از بافر لیزکننده به حجم بافت اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. آنگاه، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی (Supernatant) برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین جمع‌آوری و محلول سلول‌های لیز شده تا غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در بافر مسدودکننده رقیق شد. سپس آنتی‌بادی آشکارکننده در محلول مسدودکننده با رقت ۱:۲۰۰ اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. بعد از شستشو Strep-HRP با رقت ۱:۱۰۰۰ اضافه و به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. بعد از شستشو، محلول سوبسترا به چاهک‌ها اضافه و در فاصله ۲ تا ۱۰ دقیقه بعد از افزودن سوبسترا میزان نور تولیدی توسط لومیناتور (Chemiluminescence Immunoassay analyzer, China) اندازه‌گیری شد.

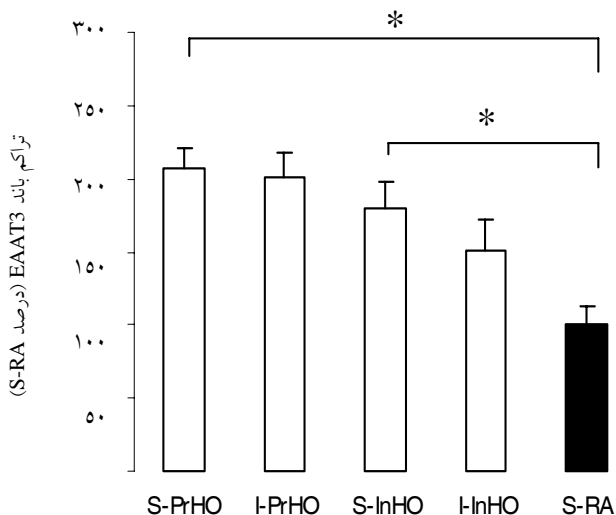
۴-۳- اثر PrHO و InHO بر بیان ژن ناقل

گلوتامات نوع ۳

شکل ۲ نشان می‌دهد که S-PrHO و S-InHO در مقایسه با S-RA باعث افزایش بیان ژن ناقل گلوتامات نوع ۳ می‌شوند. همچنین نشان می‌دهد که اثر PrHO نسبت به InHO بر افزایش بیان ژن ناقل گلوتامات نوع ۳ معنی‌دار نیست. تفاوت آماری گروه‌های مذکور در مقایسه با RA معنی‌دار است (شکل ۲).



S-PrHO**I- PrHO**S-InHO**I- InHO **S-RA



شکل ۲ آنالیز وسترن بلات مقایسه میزان بیان پروتئین ناقل گلوتامات نوع ۳ (EAAT3/EAAC1) در مغز رت‌های گروه شام (S-PrHO) و گروه نخورده (I-PrHO) هیپرسی نورموباریک پیوسته، گروه شام (S-InHO) و گروه دست نخورده (I-InHO) هیپرسی نورموباریک متناوب، و نورموکسی نورموباریک (S-RA) را نشان می‌دهد. مقایسه با گروه کنترل انجام شده است (*= $P<0.001$)

۴-۵- اثر PrHO و InHO بر غلظت TNF-α سرم

شکل ۳ نشان می‌دهد که PrHO و InHO یک ساعت بعد از پیش درمان، در مقایسه با RA باعث افزایش غلظت TNF-α سرم می‌شوند. همچنین نشان می‌دهد که اثر PrHO نسبت به InHO بر افزایش غلظت TNF-α سرم بیشتر است. PrHO و InHO یک ساعت بعد از پیش درمان، در مقایسه با RA بر تغییر غلظت

استحکام سد خونی - مغزی افزایش یافته است.

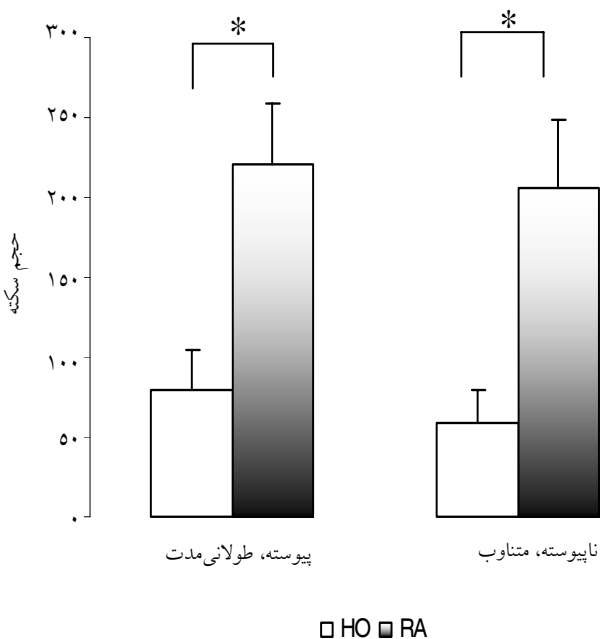
جدول ۲ توزیع امتیازهای نورولوژیک در هر گروه و مقایسه آماری آنها. همان‌طوری که ملاحظه می‌کنید مقایسه گروه‌های ردیف InHO: InRA و PrHO: PrRA معنی‌دار است اما InHO:PrHO معنی‌دار نیست.

نتایج آماری (مقدار P)	۳	۲	تعداد نقص‌های نورولوژیک در هر گروه					گروه‌های آزمایشی	۳
			۴	۳	۲	۱	۰		
InHO* InRA:	۲	۸	۰	۲	۴	۲	۰	InRA	۱
InHO:PrHO	۰	۷	۰	۰	۱	۳	۳	InHO	۲
PrHO* PrRA:	۲	۸	۰	۱	۵	۲	۰	PrRA	۳
-	۱	۷	۰	۰	۱	۴	۲	PrHO	۴

* = $P<0.05$

۳-۳- آثار PrHO و InHO بر حجم آسیب بافتی

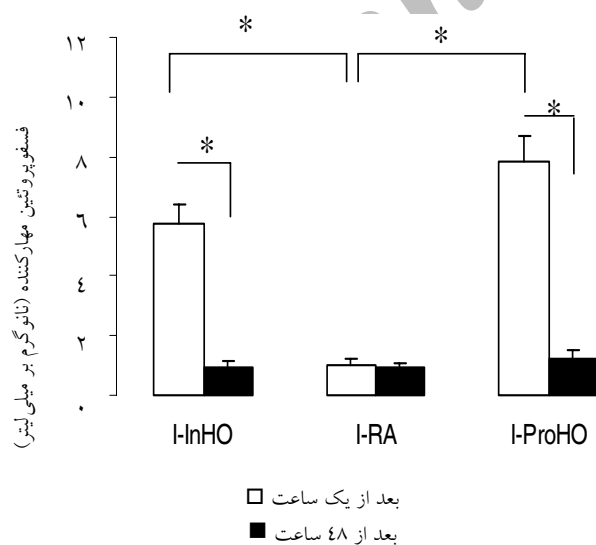
شکل ۱ نشان می‌دهد که PrHO و InHO در مقایسه با RA باعث کاهش حجم آسیب بافتی می‌شود. تفاوت آماری گروه‌های PrHO و InHO معنی‌دار نیست. تفاوت آماری گروه‌های مذکور نسبت به گروه شام نورموکسی نورموباریک (Sham RA :S-RA) معنی‌دار است. کاهش حجم آسیب بافتی و نقص‌های نورولوژیک اثر پدید یافته تحمل به ایسکمی حاصل از هیپرسی را اثبات می‌کند.



شکل ۱ اثر شرایط HO و RA متناوب و پیوسته را بر روی حجم آسیب بافتی نشان می‌دهد (*= $P<0.05$)

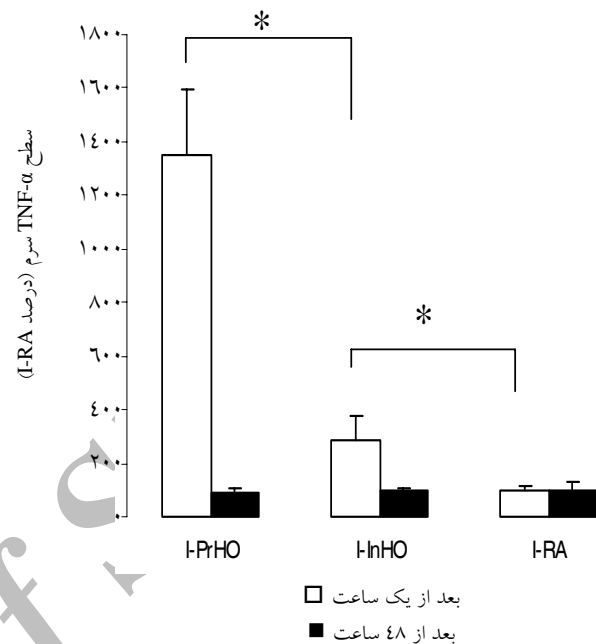
طرف دیگر نشان داده شده است که PrHO و InHO بیان ناقل گلوتامات شماره ۳ را افزایش می‌دهند. بنابراین بررسی رابطه متغیرهای فوق می‌تواند در روشن نمودن مکانیسم مولکولی پدیده تحمل به ایسکمی مفید باشد و دورنمای درمان ایسکمی‌های مغزی با پیش زمینه‌سازی را بهبود بخشد. مدل MCAO به واسطه نخ بخیه ایجاد می‌شود و یک مدل مطمئن و قابل تکرار در مدل‌های حیوانی سکنه مغزی است [۳۲]. شرایط فیزیولوژیک طی آزمایش در محدوده طبیعی نگاه داشته شد. البته، در گروه‌های هیپرکسی به علت غلظت بالای اکسیژن، محتوی اکسیژن افزایش می‌یافت و فرکانس تنفس کاهش یافت.

بر اساس نتایج این مطالعه نشان داده شده است که PrHO به علت کاهش NDS در اثر ۶۰ دقیقه ایسکمی در مقایسه با گروه RA، 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 PrHO را گزارش کرده‌اند [۱۱]. همچنین گزارش کرده‌اند که PrHO کمتر از ۲۴ ساعت پدیده تحمل به ایسکمی را نشان نمی‌دهد و با تزریق رفتگرهای ROS دقیقاً قبل از ۲۴ ساعت PrHO پدیده تحمل به ایسکمی نشان داده نشده است [۱۱]. نتایج این پژوهش با نتایج ژانگ و همکارانش همخوانی دارد. بنابراین، PrHO احتمالاً با افزایش ROS مسیر پیام‌رسانی سلولی پیش شرطی‌سازی ایسکمی را به راه می‌اندازد.



شکل ۴ تغییرات سطح فسفوپروتئین مهارکننده در گروه‌های هیپرکسی نورمواریک (HO) و نورموکسی نورمواریک (RA) متناوب (In) و پیوسته (Pr) یک و ۴۸ ساعت بعد از ازپایان هیپرکسی و نورموکسی نورمواریک. (*= $P<0/01$)

TNF- α سرم معنی‌دار نیست. تفاوت آماری گروه‌های مذکور در مقایسه با RA معنی‌دار است (شکل ۳).



شکل ۳ تغییرات سطح TNF- α سرم در گروه‌های هیپرکسی نورمواریک (HO) و نورموکسی نورمواریک (RA) متناوب (In) و پیوسته (Pr) یک و ۴۸ ساعت بعد از ازپایان هیپرکسی و نورموکسی نورمواریک. (*= $P<0/01$)

۶-۳. اثر PrHO و InHO بر غلظت فسفوپروتئین

مهارکننده

شکل ۴ نشان می‌دهد که PrHO و InHO یک ساعت بعد از پیش درمان، در مقایسه با RA باعث افزایش غلظت فسفوپروتئین مهارکننده می‌شوند. همچنین نشان می‌دهد که اثر PrHO نسبت به InHO بر افزایش غلظت فسفوپروتئین مهارکننده بیشتر است. PrHO و InHO بعد از ۴۸ ساعت ازپیش درمان، در مقایسه با RA بر تغییر غلظت فسفوپروتئین مهارکننده معنی‌دار نیست. تفاوت آماری گروه‌های مذکور در مقایسه با RA معنی‌دار است (شکل ۴).

۴- بحث

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که PrHO و InHO توانایی ایجاد پدیده تحمل به ایسکمی را دارند. همچنین همان‌طوری که قبلاً نشان داده شده بود NF- κ B رابطه تنگاتنگی با TNF- α در قلب دارد که در این تحقیق نیز بر این مهم پافشاری شده است. از

افزایش روند سازگاری سلول با شرایط سخت ایسکمی می‌شود که شامل افزایش زمان انعقاد خون و افزایش ایترلوکین‌ها هستند. ژن‌هایی که روند سازشی برای ایسکمی در بافت را به صورت پدیده تحمل به ایسکمی به نمایش می‌گذارند عبارتند از: افزایشنده‌های میزان اکسیژن تحویلی، تنظیم‌کننده‌های انرژی و متابولیسم و افزایشنده‌های توان بقایی سلول و توانایی تکثیر آن.

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که PrHO و InHO باعث افزایش غلظت فسفوپروتئین مهارکننده می‌شود. از طرف دیگر، PrHO و InHO باعث افزایش بیان ژن TACE می‌شود. تاکنون گزارشی مبنی بر افزایش بیان ژن TACE به واسطه PrHO و InHO در مغز نشان داده نشده است. اما شواهدی وجود دارد که میزان بیان TACE بعد از ایسکمی مغزی افزایش می‌یابد. بدین ترتیب باعث افزایش آزادسازی TNF- α می‌شود و در صورتی که مهارکننده TACE مورد استفاده قرار گیرد، پدیده تحمل به ایسکمی نیز دیده نمی‌شود [۲۳]. همچنین نشان داده شده است که اگر TNF- α به صورت پیش درمان استفاده شود می‌تواند پدیده تحمل به ایسکمی را به وجود آورد [۲۹]. بنابراین نتایج این پژوهش با نتایج سایر محققین همخوانی دارد.

با توجه به نتایج فوق برخی نشان داده‌اند که TNF- α به‌عنوان یک میانجی کلیدی در پدیده تحمل به ایسکمی عمل می‌کند [۲۲]. همچنین نشان داده شده است که در پیش شرطی‌سازی ایسکمی میزان بیان ژن TACE افزایش می‌یابد [۲۳]. بنابراین، مکانیسم احتمالی که می‌تواند در این زمینه پیش‌بینی کرد آن است که هیپرکسی باعث تولید TNF- α می‌شود. سپس TNF- α از طریق گیرنده خود باعث به راه افتادن مسیر پیام‌رسانی NF- κ B در داخل سلول می‌شود [۲۳، ۱]. آنگاه، فاکتور نسخه برداری NF- κ B باعث افزایش بیان گروهی از ژن‌های پیش شرطی‌سازی ایسکمی می‌شود و توان بقای سلول‌های عصبی را افزایش می‌دهد.

نشان داده شده است که NF- κ B توسط عوامل مختلف داخل سلولی فعال می‌شود که مهم‌ترین آن‌ها TNF- α است [۳۷]. همانطوری که نتایج این تحقیق نشان می‌دهد PrHO و InHO هر دو باعث افزایش TNF- α و غلظت فسفوپروتئین مهارکننده می‌شود و این تغییرات با همدیگر رابطه مستقیم دارند. این نتایج تا حدی می‌توانند بیانگر رابطه تنگاتنگ TNF- α و غلظت فسفوپروتئین مهارکننده باشند. از طرف دیگر، مهار NF- κ B قبل از هیپرکسی حفاظت حاصل از هیپرکسی در برابر ایسکمی را سرکوب می‌کند [۱]. NF- κ B و TNF- α احتمالاً در یک حلقه فیدبک مثبت با همدیگر

در پژوهش‌های قبل نشان داده شده است که InHO باعث ایجاد تحمل به ایسکمی در مغز می‌شود [۱۳]. همچنین نشان داده شده است که ۴ ساعت HO منفرده پدیده تحمل به ایسکمی را در مغز نشان نمی‌دهد [۱۱]. دونگ و همکارانش نشان داده‌اند که پیش درمان با هیپرکسی هیپرباریک (۲/۵ اتمسفر) و HO به صورت یک ساعت در روز به مدت ۵ روز باعث ایجاد پدیده تحمل به ایسکمی در نخاع خرگوش شده است [۱۲]. نتایج پژوهش حاضر نتایج دونگ و همکارانش را تأیید 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 روی بدن اهمیت دارد.

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که PrHO و InHO باعث افزایش بیان ژن ناقل گلوتامات نوع ۳ می‌شود. تاکنون گزارشی مبنی بر ایجاد تحمل به ایسکمی به‌واسطه افزایش بیان ژن ناقل گلوتامات نوع ۳ از طریق هیپرکسی در مغز منتشر نشده است. اما نشان داده شده است که در اثر پیش شرطی‌سازی ایسکمی از طریق دوره‌های کوتاه ایسکمی در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) [۱] میزان بیان ژن ناقل گلوتامات نوع ۳ افزایش می‌یابد. همچنین در شرایط این ویوو (in vivo) نشان داده شده است [۲۹] 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 شرطی‌سازی به ایسکمی مغزی وساطت می‌کند [۲۹]. همچنین شواهدی وجود دارد که ناقل گلوتامات نوع ۳ بعد از ایسکمی ناشی از MCAO دچار تنظیم افزایشی می‌شود. 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، ۱]. 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 به‌عنوان منبع تولید و حسگر ROS محسوب می‌شود [۳۷]. 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 به‌واسطه فعال‌سازی NF- κ B میزان بیان ژن ناقلین گلوتامات را در سلول‌های عصبی افزایش می‌دهد [۱، ۲۹]. علاوه بر این ژن‌های دیگری در مجموعه ژن‌های پیش شرطی‌سازی وجود دارد که باعث

مهار کننده را در درجات مختلف افزایش می‌دهند و از این طریق باعث فعال شدن NF- κ B می‌شوند. ۴) استفاده از روش InHO برای القای پدیده تحمل به ایسکمی مناسب‌تر است. بنابراین، استفاده از HO یا طراحی موادی که قادر به تقلید از آثار HO 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 مفید خواهد بود.

۵- تشکر و قدردانی

این طرح با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران ریاست جمهوری انجام شده است که بدینوسیله از همکاری و حمایت صندوق سپاسگزاری می‌شود.

همکاری دارند [۱۸]. بنابراین نتایج این تحقیق با نتایج سایر محققین همخوانی دارد.

در مجموع، TNF- α تولیدی 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 شرطی‌سازی شود. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که ناقل گلوتامات نوع ۳ در شرایط PrHO و InHO افزایش می‌یابد و این افزایش با افزایش غلظت TNF- α سرم رابطه مستقیم دارد.

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که؛ ۱) InHO و PrHO تحمل به ایسکمی را به وجود می‌آورند و باعث کاهش NDS می‌شوند. ۲) InHO و PrHO بیان ناقل گلوتامات و سطح TNF- α سرم را در درجات مختلف افزایش می‌دهند. این اثر تا حدی می‌تواند تحمل به ایسکمی را وساطت کند. ۳) InHO و PrHO غلظت فسفوپروتئین

۶- منابع

- [1] 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* 2004; 24(6): 1350-7.
- [2] Gidday JM, Fitzgibbons JC, Shah AR, Park TS. Neuroprotection from ischemic brain injury by hypoxic preconditioning in the neonatal rat. *Neurosci Lett* 1994; 168: 221-4.
- [3] 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* 1990; 528: 21-4.
- [4] Plamondon H, Blondeau N, Heurteaux C, Lazdunski M. Mutually protective actions of kainic acid epileptic preconditioning and sublethal global ischemia on hippocampal neuronal death: involvement of adenosine A1 receptors and KATP channels. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 1296-308.
- [5] Perez-Pinzon MA, Mumford PL, Rosenthal M, Sick TJ. Anoxic preconditioning in hippocampal slices: role of adenosine. *Neuroscience* 1996; 75: 687-94.
- [6] Matsushima K, Hogan MJ, Hakim AM. Cortical spreading depression protects against subsequent focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; 16: 221-6.
- [7] 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* 1989; 39: 1396-8.
- [8] 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* 1992; 599: 246-52.
- [9] Patel AJ, Honore´ E, Maingret F, Lesage F, Fink M, Duprat F, Lazdunski M. A mammalian two pore domain mechanogated S-type K⁺ channel. *EMBO J* 1998; 17: 4283-90.
- [10] Riepe MW, Esclaire F, Kasischke K, Schreiber S,

- Nakase H, Kempinski O, Ludolph AC, Dirnagl U, Hugon J. Increased hypoxic tolerance by chemical inhibition of oxidative phosphorylation: "chemical preconditioning." *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; 17: 257–64.
- [11] 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* 2004; 51(3): 258–63.
- [12] 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* 2002; 96: 907-12.
- [13] Bigdeli M R, 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* 2007; 1152: 228-33.
- [14] Kirino T, Tsujita Y, Tamura A. Induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 1991; 11: 299–307.
- [15] 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* 1992; 29: 559–65.
- [16] Grabb MC, Choi DW. Ischemic tolerance in murine cortical cell culture: critical role for NMDA receptors. *J Neurosci* 1999; 19: 1657–62.
- [17] Kasischke K, Ludolph AC, Riepe MW. NMDA antagonists reverse increased hypoxic tolerance by preceding chemical hypoxia. *Neurosci Lett* 1996; 214: 175–8.
- [18] 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* 1994; 20: 95–9.
- [19] 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* 1992; 599: 246–52.
- [20] 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* 1995; 92: 4666–70.
- [21] Toyoda T, Kassell NF, Lee KS. Induction of ischemic tolerance and antioxidant activity by brief focal ischemia. *Neuro Report* 1997; 8: 847–51.
- [22] Ravati A, Ahlemeyer B, Becker A, Klumpp S, Kriegstein J. Preconditioning-induced neuroprotection is mediated by reactive oxygen species and activation of the transcription factor nuclear factor- κ B. *J Neurochem* 2001; 78: 909–19.
- [23] 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* 2000; 97: 436–41.
- [24] 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* 2002; 22: 5879–88.
- [25] 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* 2002; 22: 7415–21.
- [26] 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* 2002; 22: 10291–301.
- [27] 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* 2003; 100: 715–20.
- [28] Mattson MP, Culmsee C, Yu Z, Camandola S. Roles of nuclear factor kappa B in neuronal survival and plasticity. *J Neurochem* 2000; 74: 443–56.
- [29] 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. *J Neurosci* 2006; 138: 1171–8.
- [30] 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 Physiol*. 2000; 278: 144–53.
- [31] Longa E, Weinstein P, Carlson S, BS, Cummins R. Reversible Middle Cerebral Artery Occlusion without Craniectomy in Rats. *Stroke*. 1989; 20: 84-91.
- [32] 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* 2003; 34: 2252-7.
- [33] 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* 2006; 55: 264–70.
- [34] Robinson MB. The family of sodium-dependent glutamate transporters: a focus on the GLT-1/EAAT2 subtype. *Neurochem Int* 1998; 33: 479–91.
- [35] 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* 2002; 324: 117–20.
- [36] 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 TNF α after stroke: a novel role for TNF α in LPS-ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007; in press.
- [37] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124–36.