

## بررسی بیان ژنهای درگیر در آپوپتوز (Bax, Survivin) پس از القای شوک سرمایی بر کورتکس حسی - حرکتی مغز موش بالغ و درمان با کلرید منیزیم

مریم نام آوری M.Sc.\*، منصوره موحدین Ph.D.\*، تقی طریحی Ph.D.\*

\* گروه علوم تشریح دانشگاه تربیت مدرس

وصول: خردادماه ۸۵، پذیرش مردادماه ۸۵

### چکیده

**هدف:** بررسی بیان پروتئین Bax و Survivin پس از ایجاد آسیب مغزی با استفاده از شوک سرمایی و توانایی کلرید منیزیم در مهار آپوپتوز بود.

**مواد و روشها:** در تحقیق حاضر برای ایجاد شوک سرمایی، یک پروپ فلزی ۱۰۰ گرمی با ازت مایع سرد شد و بر سطح مجسمه در بالای لوب پاریتال به مدت ۳۰ ثانیه قرار گرفت. ۷۲ ساعت پس از ایجاد ضایعه مغز موشها برداشته شد و برشهایی به منظور مطالعه ایمنونوهیستوشیمیایی تهیه شد. در این مطالعه برای بررسی وقوع آپوپتوز از آنتی بادهای Bax و Survivin استفاده شد. داده‌ها با آزمون t-test تجزیه و تحلیل شد.

**یافته‌ها:** نتایج این مطالعه نشان داد که Bax در گروه مدل به میزان بالایی بیان شد اما بیان آن در گروه درمان بسیار پایین بود. Survivin در گروه درمان به میزان بالایی بیان شد و تفاوت معنی داری با گروه مدل ایجاد کرد ( $p < 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** این مطالعه نشان داد که کلرید منیزیم با دوز مطلوب موجب فعال شدن بیان پروتئین Survivin و مهار آپوپتوز می‌شود.

**کلیدواژه‌ها:** آسیب مغزی، شوک سرمایی، کلرید منیزیم، آپوپتوز، Bax، Survivin

### مقدمه

اتفاق می‌افتد که پیامد اصلی آزارهای ناشی از ایسکمی، عفونت، سموم و واکنشهای ایمنی است که به آن مرگ پاتولوژیک سلولی گفته می‌شود [۱].

متداولترین شکل مرگ سلولی به دنبال تحریکات خارجی، نکروز است که باتورم شدید، پارگی سلول، انعقاد پروتئینهای پلاسما و تجزیه ارگانلهای سلولی تظاهر می‌کند [۱].

آپوپتوز یک شکل مجزا از مرگ سلولی است که به صورت تراکم کروماتین، قطعه قطعه شدن DNA و چروکیده شدن سلول تظاهر می‌کند و عملکرد آن حذف سلولها طی تکامل

مرگ سلولی پدیده‌ای است که به طور مداوم در طول دوران تکوین و زندگی تمام موجودات زنده اتفاق می‌افتد. گاهی این مرگ برنامه ریزی شده است و در راستای عملکرد طبیعی بدن موجودات زنده رخ می‌دهد مثل مرگ برنامه ریزی شده سلولهای زاید در دوران جنینی یا حذف سلولی در جمعیتهای سلولی در حال تکوین مثل اپیتلیوم کریپتهای روده‌ای. در مواردی هم مرگ سلولی در پی آزار غیر قابل برگشت سلولی

✉ آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح، صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵

E-mail: mansoure@modares.ac.ir

[۱۴]. شوک سرمایی یک مدل مفید به منظور ایجاد ادم مغزی و بررسی آپوپتوز در اختلالات مغزی، مخصوصاً آسیب مغزی تروماتیک است. موراکامی (Murakami) و همکارانش در سال ۱۹۹۹ برای ایجاد ادم مغزی از شوک سرمایی استفاده کردند و به بررسی تغییرات میزان آب مغز و نفوذپذیری سد خونی-مغزی پرداختند [۱۵]. محققین دیگری نیز با ایجاد همین مدل تأثیرات ملاتونین [۱۶] و دگزامتازون سدیم فسفات [۱۷] را در درمان ادم مغزی بررسی کردند. گرز چیک (Grzeschik) و همکارانش در سال ۲۰۰۳ از شوک سرمایی جهت ایجاد ادم مغزی استفاده کردند و نقش استرس اکسیداتیو را در ایجاد آسیب مغزی ثانویه بررسی نمودند [۱۸].

مطالعات بسیاری نشان داده اند که میزان یون منیزیم در داخل و خارج سلول به‌دنبال آسیب مغزی کاهش می‌یابد. شدت آسیب بستگی به کاهش میزان منیزیم به‌دنبال آسیب مغزی دارد [۱۹]. کاهش منیزیم بعد از ضربه، با مرگ سلولی و اختلال در عملکرد مغز مربوط است [۲۰]. هیس (Heath) و همکارانش سولفات منیزیم و کلرید منیزیم را مقایسه کردند و نشان دادند که هر دو نمک غلظت منیزیم آزاد داخل سلولی را به‌دنبال آسیب مغزی تروماتیک افزایش می‌دهد [۲۱ و ۲۲]. از آنجا که در بین مطالعات انجام شده به بررسی بیان ژنهای Bax و Survivin پس از ایجاد شوک سرمایی در کورتکس حسی- حرکتی مغز موش بالغ و درمان با کلرید منیزیم پرداخته نشده بود، بنابراین هدف این مطالعه بررسی بیان پروتئین Bax و Survivin پس از ایجاد آسیب مغزی با استفاده از شوک سرمایی و توانایی کلرید منیزیم در مهار آپوپتوز بود.

## مواد و روشها

### حیوان آزمایشگاهی

در این تحقیق از موشهای نر بالغ ۸-۶ هفته ای با وزن ۳۵-۳۰ گرم از نژاد NMRI که از بخش پرورش حیوانات آزمایشگاهی موسسه رازی واقع در کرج تهیه شده بودند، استفاده شد. حیوانات به مرکز نگهداری حیوانات دانشکده

طبیعی و رشد بافتها است، اما می‌تواند توسط محرکهای پاتولوژیک نیز القاء گردد [۱]. گروه‌های ژنی متعددی آپوپتوز را کنترل می‌کنند که عبارتند از: خانواده‌های Bcl-2 [۲] کاسپازها [۳]، IAP<sup>۱</sup> [۴] و ژن P53 [۵]. پروتئین Bax<sup>۱</sup> مهمترین عضو خانواده Bcl-2 است که به طور وسیعی در سیستم عصبی بیان می‌شود و به دنبال حذف فاکتورهای تروفیک و یا آسیب‌های دیگر، فعال شدن آن برای مرگ نورون‌ها ضروری است [۶ و ۷]. Bax به عنوان یک فاکتور آزاد کننده سیتوکروم C از میتوکندری شناخته شده است [۸ و ۹].

برای جلوگیری از آپوپتوز ناخواسته در سلولهای طبیعی، باید فعالیت پروتئینهای آپوپتوتیک خنثی شود. سلولها با استفاده از خانواده IAP به طور فعال با مرگ مقابله می‌کنند [۴ و ۱۰]. این خانواده شامل اعضای زیر می‌باشد:

Survival<sup>۲</sup> و NAIP, IAP2, IAP1, X chromosome-linked IAP motor protein

Survivin عضو جدیدی از خانواده مهار کننده آپوپتوزی (IAP) است که نقشی دوگانه در تنظیم تقسیم سلولی و نیز مهار آپوپتوز دارد [۱۱]. این پروتئین در بافتهای جنینی و همچنین در بافتهای سرطانی به وفور دیده می‌شود. تحقیقات نشان داده پروتئین Survivin با اتصال به پروتئینهای کاسپاز ۳ و کاسپاز ۹ و مهار این پروتئینها در روند آپوپتوز اختلال ایجاد می‌کند [۱۲]. مطالعات زیادی کاهش یا خاموشی بیان این ژن را در بافتهای بالغ گزارش کرده است [۱۱]. بیان بالای Survivin در دوران قبل از تولد (و هنگام تولد) نیز یک همزمانی را با اوج انجام نورون زایی در این دوران نشان می‌دهد [۱۳].

آسیبهای مغزی ممکن است در نتیجه آزارهای گوناگونی از جمله هیپوکسی، آنوکسی، سکنه و ضربه ایجاد شود. عارضه مشترک ایجاد شده توسط تمامی این آزارها مرگ سلولی است

1. Inhibitor of Apoptosis Protein  
2. Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein

استفاده از تثبیت‌کننده پارافرمالدئید تثبیت شده و خارج شد. مغز خارج شده به مدت ۱۲ ساعت در تثبیت‌کننده پارافرمالدئید قرار داده شد. سپس ضمن پردازش بافتی و قالب گیری از هر نمونه ۱۲۰ سکنشن (ضخامت هر سکنشن ۱۰ میکرون) که تمامی قشر حسی- حرکتی را شامل می‌شد انتخاب شد. تعیین ناحیه حسی حرکتی به کمک اطلس مغز موش انجام شد بدین ترتیب که اطلس مغز موش مطالعه شد و با توجه به ضخامت سکنشها ناحیه حسی- حرکتی مشخص شد [۲۳].

### مراحل ایمونوهیستوشیمی

پس از پارافین زدایی از نمونه‌های انتخاب شده و انجام مراحل آب دهی و شتشو با PBS<sup>۳</sup> برای مهار پراکسیدازاندوزنوس، H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> سه درصد در بافر PBS به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد در محلول بافرسیترات ۹ میلی مولار برای آنتی بادی Survivin و محلول بافرسیترات ۵۰ میلی مولار برای آنتی بادی Bax قرار گرفتند. برای مهار واکنش زمینه، ترکیب سرم بز ۱۰ درصد و تریتون X-100 سه درصد به مدت ۳۰ دقیقه بر روی نمونه‌ها قرار داده شد. سپس آنتی بادی اولیه Mouse Anti Bax با غلظت ۴۰ μg/ml از شرکت سیگما و آنتی بادی Mouse Anti Survivin با غلظت ۱/۱۰۰ از شرکت سیگما روی نمونه‌ها قرار گرفت و به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. سپس نمونه‌ها در طی ۳ مرحله و در مجموع به مدت ۱۵ دقیقه در PBS شسته شدند. آنتی بادی ثانویه فلورسنس با غلظت ۱/۱۰۰۰ و از شرکت سیگما برای آنتی بادی Bax و آنتی بادی ثانویه HRP<sup>۴</sup> با غلظت ۱/۱۰۰۰ و از شرکت SIGMA برای آنتی بادی Survivin به مدت ۲ ساعت بر روی نمونه‌ها قرار گرفت.

علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس منتقل شدند تا با محیط سازگاری پیدا کنند. حیوانات تحت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار گرفته و با غذای مخصوص جوندگان و آب کافی تغذیه شدند.

### روش جراحی

ابتدا برای ایجاد آسیب سرمایی<sup>۱</sup>، موشها با ترکیبی از کتامین و زایلوکائین (به نسبت حجمی ۲ به ۱) که به ازای هر ۱ گرم وزن موش، یک لاندرا به طریق داخل صفاقی تزریق شد، بیهوش شدند سپس توسط قیچی پوست سر در خط وسط شکاف داده شد تا مجسمه نمایان شود. یک پروب فلزی ۱۰۰ گرمی با قطر ۴ mm با فرو بردن در ازت سرد شده و بر سطح مجسمه در بالای لوب پاریتال سمت راست به مدت ۳۰ ثانیه (با فشار ثابت) قرار گرفت. سپس محل جراحی توسط پودر پنی سیلین ضد عفونی شد و پوست سر با بخیه یا گیره بسته شد [۱۵].

### گروه بندی حیوانات مورد آزمایش

مطالعه روی موش نر بالغ نژاد NMRI در گروههای زیرانجام شد (هر گروه: ۳ موش)

۱- گروه شاهد: شامل موشهایی بودند که شوک سرمایی به آنها وارد نشد و دارو دریافت نکردند.

۳- گروه مدل: شامل موشهایی بودند که شوک سرمایی به آنها وارد شده و دارو برایشان تجویز نشده بود.

۴- گروه درمان: شامل موشهایی بودند که شوک سرمایی به آنها وارد شده و کلرید منیزیم با دوز مطلوب (۲ میلی مولار) را ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از جراحی و ایجاد ضایعه به طریق داخل صفاقی دریافت کردند.

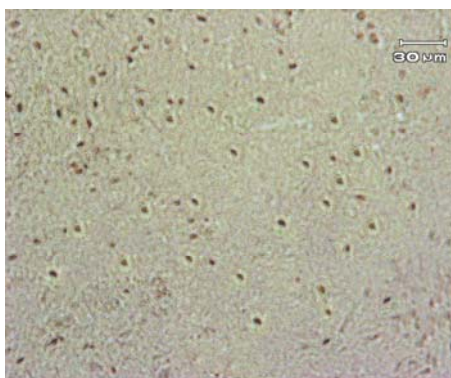
مطالعات آزمایشگاهی

۷۲ ساعت پس از جراحی، مغز موش با روش پرفیوژن<sup>۲</sup> و با

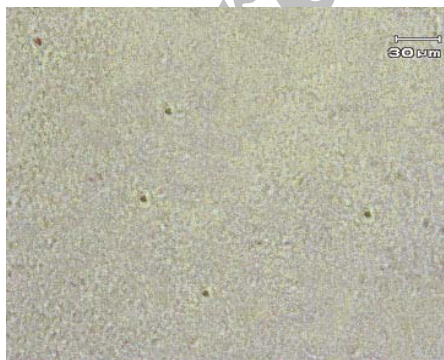
3. Phosphate Buffer Saline  
4. Horse Radish Peroxidase

1. Cold injury  
2. Perfusion

ای رنگ دیده شد که در واقع محل قرار گرفتن پروتئینهای آن را نشان می‌دهد (شکل ۱-الف). در گروه مدل، بیان این پروتئین بسیار کم بود یا اینکه اصلاً بیان نشده بود (شکل ۱-ب). شمارش تعداد سلولهای عصبی که این پروتئین را بیان کرده‌اند، نشان داد که میانگین تعداد این سلولها در واحد سطح در گروه مدل  $7/3 \pm 254$  بود. این تعداد برای گروه درمان  $27/4 \pm 3/5$  بود که تفاوت معنی داری با یکدیگر داشتند ( $P < 0.0001$ )، (نمودار ۱). این مطلب نشان دهنده تأثیر کلرید منیزیم در بقای سلولهای عصبی در گروه درمان است.



شکل ۱ الف. تظاهر پروتئین survivin در سلولهای عصبی محل ضایعه، گروه درمان (۲ mM)، بیان Survivin در سلولها به شکل رسوب ذرات قهوه ای رنگ دیده می‌شود.



شکل ۱ ب. تظاهر پروتئین survivin در سلولهای عصبی محل ضایعه، گروه مدل، بیان Survivin در سلولها به شکل رسوب ذرات قهوه ای رنگ دیده می‌شود.

سپس نمونه‌ها طی ۳ مرحله و در مجموع به مدت ۱۵ دقیقه در PBS شسته شدند. نمونه‌های Bax با چسب گلیسرول مانت شدند و به کمک میکروسکوپ فلورسنت Zeiss و با طول موج ۵۴۰ آنگستروم بررسی شدند. به نمونه‌های Survivin، DAB با غلظت ۱ mg/ml حاوی ۱ لاند H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> به مدت ۱۵ دقیقه اضافه شد و پس از شستشو با PBS و انجام مراحل آب گیری و شفاف سازی، نمونه‌ها با چسب انتالان تثبیت شدند.

### مطالعه مورفومتریک و تجزیه و تحلیل آماری

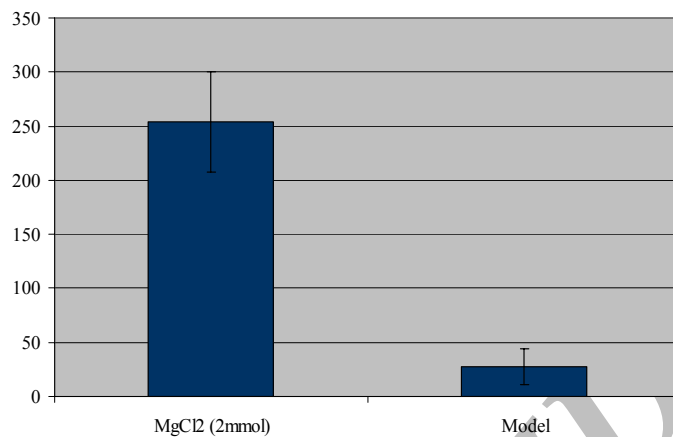
از لامهای تهیه شده از مغز هر موش، ۴ لام به طور تصادفی انتخاب گردید و از آنجایی که روی هر لام ۵ بخشی قرار داشت یک نمونه انتخاب شد و به کمک میکروسکوپ Olympus مجهز به دوربین ساخت شرکت Olympus، در هر سکشن از ۵ ناحیه با عدسی ۴۰ میکرون عکس گرفته شد. سپس با انتقال عکسها به کامپیوتر شمارش سلولی به کمک کادری به مساحت  $160 \times 240$  میکرون که در نرم افزار Microsoft Office PowerPoint 2003 طراحی شده بود انجام شد. بدین ترتیب که سلولهای عصبی که پروتئین survivin را بیان کردند در مساحت کادر ذکر شده شمارش شد و عدد به دست آمده در واحد سطح (۱ میلیمترمربع) محاسبه شد. سپس با استفاده از نرم افزار تجزیه تحلیل آماری SPSS (ver. 13) آزمون t-test روی اطلاعات خام به دست آمده انجام شد.

### یافته‌ها

#### بیان پروتئین Survivin پس از ایجاد شوک

#### سرمایی در موشهای گروه مدل و گروه آزمون

در این مرحله از تحقیق بیان پروتئین Survivin در گروه مدل و درمان مورد بررسی شد. در برشهای تهیه شده از گروه درمان، بیان Survivin در سلولهای عصبی به شکل رسوب ذرات قهوه

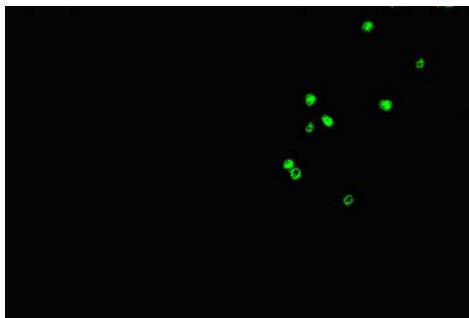


نمودار ۱ مقایسه میانگین سلولهای Survivin مثبت پس از ایجاد شوک سرمایی در موشهای گروه مدل و گروه درمان. اختلاف بین دو گروه در سطح  $p < 0.05$  معنی دار است.

### بیان پروتئین Bax پس از ایجاد شوک سرمایی

#### در موشهای گروه مدل و گروه درمان

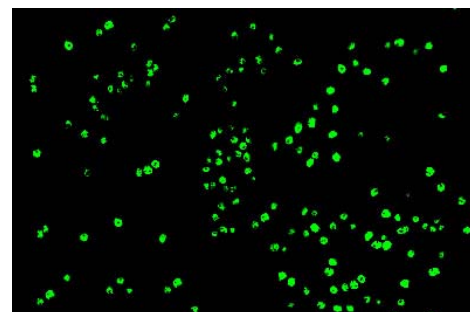
در این مرحله از تحقیق بیان پروتئین Bax در گروه مدل و گروه درمان بررسی شد. در پایان این مرحله، سیتوپلاسم سلولهای آپتوزی که Bax-Positive بودند، به رنگ سبز فلورسانس در اطراف هسته دیده شد. در برشهای تهیه شده از گروه مدل، Bax به میزان بالایی بیان شد (شکل ۲-الف). در برشهای تهیه شده از گروه درمان، میزان بیان Bax بسیار کم بود یا اینکه اصلاً بیان نشده بود و این نشان دهنده تأثیر کلرید منیزیم در کاهش مرگ و میر سلولهای عصبی کورتکس بود (شکل ۲-ب).



شکل ۲ ب. تظاهر پروتئین Bax در سلولهای عصبی گروه درمان (بزرگنمایی:  $\times 100$ ). تعداد سلولهای Bax مثبت مشاهده شده کمتر از گروه مدل است.

### بحث

در تحقیق حاضر از مدل شوک سرمایی برای ایجاد ادم مغزی و بررسی مرگ سلولی در مغز موش سوری استفاده شد. شوک سرمایی مدل مفید و تثبیت شده‌ای برای مطالعه ادم مغزی وازوژنیک و آسیبهای مغزی ثانویه است که منجر به طیف وسیعی از حوادث ثانویه می‌شود [۱۵]. گرزچیک (Grzeschik) و همکارانش از شوک سرمایی برای ایجاد ادم مغزی وازوژنیک استفاده کردند و به بررسی تورم



شکل ۲ الف. تظاهر پروتئین Bax در سلولهای عصبی گروه مدل، (بزرگنمایی:  $\times 100$ ). تعداد سلولهای Bax مثبت مشاهده شده بیش از گروه درمان است.

مغز، ساینز ضایعه و آپوپتوز پرداختند [۱۸]. کاوایی (Kawai) و همکارانش در سال ۲۰۰۳ [۲۴] نیز از شوک سرمایی برای ایجاد ادم مغزی و بررسی آسیب ثانویه در مغز موش استفاده کردند.

در تحقیق حاضر نشان داده شد که شوک سرمایی موجب کاهش سلولهای عصبی زنده در مغز موش سوری شد. احتمال داده می‌شود که کاهش سلولهای عصبی زنده به علت مرگ سلولی نکروزی و آپوپتوزی باشد. مطالعه حاضر حل این مسئله را به عهده گرفته که آیا مرگ نورونی القا شده به واسطه شوک سرمایی در نورونهای حسی و حرکتی قشر مغز از مسیر آپوپتوز می‌گذرد یا خیر؟

مرگ سلولی آپوپتوتیک در انواعی از آسیبهای مغزی از جمله ایسکمی و ضربه درگیر می‌شود. از مدل شوک سرمایی و ایسکمی مغزی فوکال برای ایجاد ادم مغزی وازوژنیک و مرگ سلولی آپوپتوتیک استفاده می‌شود [۲۵]. آپوپتوز با بیان و فعال شدن چند ژن و پروتئین تنظیم می‌شود [۲۶]. یکی از پروتئینهای دخیل در آپوپتوز Bax است. پروتئین Bax که از اعضای خانواده Bcl2 محسوب می‌شود در حالت عادی به صورت محلول در سیتوزول وجود دارد و در پروسه آپوپتوز به حالت فعال در می‌آید، بنابر این وجود آن به حالت فعال در یک سلول نشانگر وقوع آپوپتوز در سلول است [۲۷].

Ng و همکارانش [۲۸] گزارش کردند که در آسیب مغزی تروماتیک، مکانیزمهای آپوپتوز درگیر می‌شوند و برای اولین بار بیان بالای ژن پرو آپوپتوز (bax) و میزان پایین ژن آنتی آپوپتوز (bcl-2) را در آسیب مغزی تروماتیک گزارش کردند. چن (Chen) به منظور بررسی بیان bax و bcl-2، مدل کبود شدگی فوکال مغزی را ایجاد کرد و گزارش کرد که بیان این دو ژن بعد از آسیب افزایش می‌یابد [۲۹]. همان‌گونه که ذکر شد در این تحقیق پس از ایجاد شوک سرمایی به بررسی آپوپتوز در سلولهای عصبی پرداخته شد

و برای بررسی سلولهای آپوپتوزی از آنتی بادی Bax استفاده شد و نتایج نشان داد که Bax در موشهای مدل (موشهایی که شوک سرمایی به آنها وارد شد اما دارو دریافت نکردند) به میزان زیادی بیان شد و در گروه درمان (موشهایی که شوک سرمایی به آنها وارد شد و دارو دریافت کردند) بیان آن کمتر بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که شوک سرمایی باعث القای آپوپتوز شده است یعنی استرس اکسیداتیو ناشی از ادم مغزی سبب فعال شدن Bax سلولهای بافت مغزی شده است. موراکامی (Murakami) و همکارانش [۳۰] نیز معتقدند ادم مغزی در مدل شوک سرمایی باعث ایجاد آپوپتوز می‌شود.

سرناک (Cernak) و همکارانش [۳۱] به منظور بررسی بیان اعضاء فعال و پیش فعال خانواده Bcl-2 از جمله bax, caspase-3, bcl-x, bcl-2 از مدل آسیب مغزی تروماتیک در رت‌ها استفاده کردند. نتایج این تحقیق نشان داد که بیان bax در کورتکس رت، بین ۲۴ ساعت و ۳ روز بعد از آسیب منتشر آکسونی افزایش می‌یابد [۳۱]. مکانیزمی که bax مرگ سلولی آپوپتوتیک را ایجاد می‌کند ناشناخته است. داده‌های مطالعات قبلی این محققین نشان داد که بعد از آنکه مغز در معرض محرک آپوپتوتیک خاص قرار می‌گیرد، bax از سیتوپلاسم به غشاء میتوکندری منتقل می‌شود و این روند یکی از پروسه‌های اساسی است که در مرگ سلولی مشارکت می‌کند [۳۲]. فرضیه دیگر این است که بیان بالای bax می‌تواند کاسپاز ۳ را فعال کند [۲۷] و [۳۳]. نتایج آنها نشان دهنده آنست که آپوپتوز در آبشار آسیب ثانویه که بدنبال آسیب مغزی تروماتیک رخ می‌دهد، مشارکت می‌کند [۳۰].

در این تحقیق از کلرید منیزیم در درمان ادم مغزی ایجاد شده به دنبال شوک سرمایی استفاده شد و آثار درمانی کلرید منیزیم روی بقای سلولهای عصبی بعد از ایجاد آسیب در موش سوری مطالعه شد. همچنین فرض شد که

مغزی رخ می‌دهد، موثر است و همچنین موثر بودن کلرید منیزیم در درمان ادم مغزی وابسته به دوز است و دوز مطلوب برای درمان ادم مغزی ایجاد شده به دنبال شوک سرمایی، دوز ۲ میلی مولار بود (اطلاعات نشان داده نشده است).

پروتئین Survivin عضو خانواده پروتئینهای مهار کننده آپوپتوز است که از طریق مهار کاسپازها آپوپتوز را کنترل کرده و سلول را از روندی که سبب مرگ سلولی می‌شود باز گردانده و نجات می‌دهد [۳۹]. این پروتئین به عنوان هدف دارویی بالقوه، توجه ویژه‌ای را به خود جلب نموده است [۴۰]. این تحقیق بر این فرض استوار است که سلولهایی که از مرگ نجات یافته‌اند یا در حال تکثیر هستند پروتئین Survivin را بیان می‌کنند. در مطالعه‌ای که توسط جانسون (Johnson) و همکارانش [۴۱] انجام شد، به بررسی بیان Survivin در مدل آسیب مغزی تروماتیک پرداخته شد و داده‌های این تحقیق نشان داد که بعد از آسیب مغزی تروماتیک، بیان Survivin در آستروسیتها و نورونها افزایش می‌یابد و بیان Survivin ممکن است مرگ سلولی را کاهش دهد.

در تحقیق حاضر Survivin در گروه درمان به میزان بالایی بیان شد اما بیان آن در گروه مدل بسیار پایین بود و بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که کلرید منیزیم باعث فعال شدن پروتئین Survivin و در نهایت نجات سلول از آپوپتوز شده است.

نتایج این تحقیق نشان داد شوک سرمایی یک مدل مفید به منظور ایجاد ادم مغزی و بررسی آپوپتوز در اختلالات مغزی، مخصوصاً آسیب مغزی تروماتیک است. همچنین استفاده از کلرید منیزیم با دوز ۲ میلی مولار پس از ایجاد شوک سرمایی، درمان مناسبی جهت این آسیب و کاهش میزان مرگ و میر سلولهای عصبی است.

کلرید منیزیم از مرگ بیش از حد نورونهای حسی - حرکتی قشر مغز جلوگیری می‌کند و سیر آپوپتوز را عوض می‌نماید.

مطالعات متعددی نشان داده‌اند که میزان یون منیزیم سلولی به دنبال آسیب به مغز کاهش می‌یابد [۳۴]. کاهش میزان یون منیزیم موجب گسیختگی در گیرنده NMDA<sup>۱</sup> و فرآیندهای سلولی که در مغز رخ می‌دهند، می‌شود. به دنبال آسیب، تحریک بیش از حد گیرنده NMDA با گلوتامیت منجر به مرگ سلولی می‌شود [۳۵]. یون منیزیم با بلوکه کردن کانال یونی NMDA وابسته به ولتاژ، هجوم یون کلسیم را محدود می‌کند، بنابراین میزان مرگ سلولی را کاهش می‌دهد [۳۶]. در این بررسی نشان داده شده که تجویز کلرید منیزیم با دوز دو میلی مولار بعد از ایجاد آسیب، بقای سلولهای عصبی را به میزان قابل ملاحظه‌ای افزایش داده و تعداد سلولهای عصبی زنده به گروه کنترل نزدیک شد.

Bareyre و همکارانش [۳۷] نشان دادند که عارضه کاهش در سلولهای کورتکس، که به علت ضربه ایجاد شده بود می‌تواند با تجویز منیزیم ۲۴ ساعت بعد از آسیب، تخفیف یابد. راویشانکار (Ravishankar) و همکارانش [۳۸] گزارش کردند منیزیم که دارای نقش حمایت عصبی است، می‌تواند در هیپوکسی، نسبت bax /bcl-2 را تغییر دهد و آن را از آپوپتوز محافظت کند.

تحقیق حاضر اهمیت منیزیم درمانی را در بهبود مرگ و میر سلولهای عصبی قشر حسی - حرکتی در مدل شوک سرمایی ایجاد کننده ادم مغزی در موش سوری بررسی کرد. نتایج این مطالعه نشان داد که درمان با کلرید منیزیم در محدود کردن آسیب ثانویه مغزی که به دنبال آسیب

1. N- methyl- D- aspartate

## References

1. کاترن، کومار، کالینز. رایینز پایه آسیب‌شناختی بیماریها، بهادری مسلم، چهر، ۱۳۷۸، جلد اول.
2. **Merry DE, Korsmeyer SJ.** Bcl-2 gene family in the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 1997; 20: 245-67.
3. **Wolf BB, Green DR.** Suicidal tendencies : apoptotic cell death by caspase family proteinases 3. *Biol Chem* 1999; 274: 20049-20052.
4. **Liston P.** Suppression of apoptosis in mammalian Cells by NM<sup>2</sup> and a related family of IAP genes. *Nature* 1996; 379: 349-53.
5. **Polyak K.** A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 1997; 389: 300-5.
6. **Deckwerth TL.** Bax is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. *Neuron* 1996; 17: 401-11.
7. **Adams JM, Cory S.** Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci* 2001; 26: 61-6.
8. **Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J.** Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997; 275: 1129-32.
9. **Kuan C, Roth KA, Flavell RA., Rakic P.** Mechanisms of programmed cell death in the developing brain. *Trends Neurosci* 2000; 23: 291-7.
10. **Deveraux QL, Reed JC.** IA family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13: 239-52.
11. **Martin LJ.** Neuronal cell death in nervous system development, disease, and injury. *Int J Mol Med* 2001; 7: 455-78.
12. **Sasaki T, Lopes MB, Hankins GR, Helm GA.** Expression of survivin, an inhibitor of apoptosis protein, in tumors of the nervous system. *Acta Neuropathol* 2002; 104(1): 105-9.
13. **Reed JC.** The Survivin saga goes in vivo. *J Clin Invest* 2001; 108(7): 965-969.
14. **Rao AV, Balachandran B.** Role of oxidative stress and neurodegenerative diseases. *Nutr Neurosci* 2002; 5(5): 291-309.
15. **Murakami K, Kondo T, Yang G, Chen SF, Morita-Fujimura Chan PH.** Cold injury in mice : A model to study mechanisms of brain edema and neuronal apoptosis. *Progress Neurobiol* 1999; 57: 289-90.
16. **Gorgulu A, Palaoglu S, Ismailoglu O, Tuncel M, Surucu MT, Erbil M, et al.** Effect of melatonin on cerebral edema in rats *Neurosurgery* 2001; 49(6): 1434-41.
17. **Turkoglu OF, Eroglu H, Okutan O, Burul E.** The efficiency of dexamethasone sodium phosphate-encapsulated chitosan microspheres after cold injury. *Surg Neurol* 2005; 64: 11-16.
18. **Grzeschik SM, Maier CM, Chan PH.** Effects of cold injury-induced trauma in manganese superoxide dismutase-deficient mice. *Neurotrauma* 2003; 20(6): 571-81.
19. **Hoane MR, Knotts AA, Akstulewicz SL, Aquilano M, Meanas LW.** The behavioral



- effects of magnesium therapy on recovery of function following bilateral anterior medial cortex lesions in the rat. *Brain Res Bull* 2003; 3(1): 56-63.
20. **Vink R, Ibolja C.** Regulation of intra cellular free magnesium in central nervous system injury. *Front Biosci* 2000; 5: 656-65.
21. **Heath DL, Vink R.** Neuroprotective effects of MgSo<sub>4</sub> and MgCl<sub>2</sub> in closed head injury: a comparative phosphorous NMR study. *J Neurotrauma* 1998; 15: 183-9.
22. **Heath DL, Vink R.** Optimisation of magnesium therapy following severe diffuse axonal brain injury in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 288: 1311-6.
23. [www.mbl.org/mblmain/atlas.html](http://www.mbl.org/mblmain/atlas.html).
24. **Kawai N; Kawanishi M; Okada M; Matsumoto Y; Nagao S.** Treatment of cold injury-induced brain edema with a nonspecific matrix metalloproteinase inhibitor MMI270 in rats. *Neurotrauma* 2003; 20(7): 649-57.
25. **Murakami K, Kawase M, Kondo T, Chan PH.** Cellular accumulation of extravasated serum protein and DNA fragmentation following vasogenic edema. *J Neurotrauma* 1998; 15(10): 825-35.
26. **Steller H.** Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995; 267: 1445-1449.
27. **Cregan SP, MacLaurin JG, Craig CG, Robertson GS, Nicholson DW, Park DS.** Bax-Dependent Caspase-3 Activation Is a Key Determinant in p53-Induced Apoptosis in Neurons. *Neurosci* 1999; 19(18): 7860-9.
28. **Ng I, Yeo TT, Soong R, Tang WT, Ong PL, Lew T.** Young investigator's award: induction of apoptosis following traumatic head injury in humans. *Ann Acad Med Singapore* 1999; 28(3): 363-5.
29. **Chen L.** Study on histology and the expression of Bax and Bcl-2 after cerebral contusion in rats. *Fa Yi Xue Za Zhi* 2000; 16(4): 211-3.
30. **Murakami K, Kondo T, Sato S, Li Y, Chan PH.** Occurrence of apoptosis following cold injury-induced brain edema in mice. *Neurosci* 1997; 81 (1): 231-7.
31. **Cernak I, Champan SM, Hamlin GP, Vink R.** Temporal characterisation of pro- and anti-apoptotic mechanisms following diffuse traumatic brain injury in rats. *Neurosci* 2002; 9(5): 565-72.
32. **Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Youle RJ.** Movement of bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* 1997; 139:1281-92.
33. **Kitanaka C, Amiki T N, Noguchi K.** Caspase-dependent apoptosis of COS-7 cells induced by bax overexpression: differential effects of Bcl-2 and Bcl-xL on bax-induced caspase activation and apoptosis. *Oncogene* 1997; 15:1763-1772.
34. **Vink R.** Nuclear magnetic resonance characterization of secondary mechanisms following traumatic brain injury. *Mol Chem Neuropathol* 1993; 18: 279-97.

35. **McDonald JW, Roeser NF, Silverstein FS, Johnston MV.** Quantitative assessment of neuroprotection against NMDA-induced brain injury. *Exp Neurol* 1989; 106: 289-96.
36. **Cox JA, Lysko PG, Henneberry RC.** Excitatory amino acid neurotoxicity at the NMDA receptor in cultured neurons: role of the voltage-dependent magnesium block. *Brain Res* 1989; 499: 267-72.
37. **Bareyre FM, Saatman KE, K, McIntosh R, McIntosh TK.** Magnesium deficiency exacerbates and treatment attenuates histological cell loss and cytoskeletal changes following brain injury in rats. *J Neurotrauma* 1998; 15: 857-60.
38. **Ravishankar S, Ashraf QM, Fritz K, Mishra OP, Delivoria- Papadopoulos M.** Expression of bax and Bcl-2 proteins during hypoxia in cerebral cortical neuronal nuclei of newborn piglets effect of administration of magnesium sulfate. *Brain Res* 2001;18:. 23-9.
39. **Altieri DC, Marchisio C.** Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer. *Lab. Invest* 1999; 79: 1327-33.
40. **Velculescu VE, Madden SL, Zhang L, Lash AE, Yu J, Rago C.** Analysis of human transcriptomes. *Nat Genet* 1999; 23: 387-8.
41. **Johnson EA, Svetlov SI, Tolentino PJ, Shaw G, Wang KK, Hayes RL.** Cell-specific upregulation of survivin after experimental traumatic brain injury in rats. *Exp Brain Res* 2005; 167(1): 17-26.