

بررسی اثر پیش‌شرطی‌سازی با هیپرکسی نورموباریک بر فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون

پراکسیداز در مدل سکتة مغزی رت

چکیده

زمینه و هدف: پیش‌شرطی‌سازی با ایسکمی یکی از پدیده‌های درون زاد است که می‌تواند توسط عوامل مختلف و از مسیرهای مولکولی متفاوت، در بافت‌های مختلف مانند مغز ایجاد شود. در این مطالعه اثر پیش‌شرطی‌سازی به واسطه هیپرکسی نورموباریک (HO) پیوسته و متناوب، بر میزان نقص نورولوژیک، حجم سکتة مغزی و میزان فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی: این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۶ در دانشگاه شهید بهشتی انجام شد. رت‌ها در ۴ گروه به صورت گروه‌های پیوسته (۲۴ ساعت پیوسته) و متناوب (۴ ساعت در روز به مدت ۶ روز) در معرض HO و نورموکسی نورموباریک (Room Air = RA) یا هوای اتاق قرار گرفتند. هر گروه، به ۳ زیرگروه تقسیم شدند. زیرگروه اول، بعد از ۲۴ ساعت، تحت جراحی انسداد شریان میانی مغز (Middle Cerebral Artery Occlusion = MCAO) به مدت ۶۰ دقیقه قرار گرفتند و سپس ۲۴ ساعت به آن‌ها اجازه برقراری مجدد جریان خون داده شد. زیرگروه دوم و سوم بنام زیر گروه شم (بدون MCAO) و گروه دست نخورده (بدون جراحی) برای بررسی اثر هیپرکسی نورموباریک بر میزان فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز در نظر گرفته شده بودند. داده‌های حجم آسیب بافتی، گازهای خون و فعالیت آنزیم با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه و نقص نورولوژیک با استفاده از آزمون من-ویتنی یو مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: یافته‌ها نشان می‌دهد که HO متناوب و پیوسته در القای IT (Ischemic Tolerance) درگیر هستند. پیش درمان با HO پیوسته و متناوب، نقص‌های نورولوژیک را بهبود می‌بخشد، حجم سکتة مغزی را کاهش می‌دهد و میزان فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز را به طور معنی‌دار افزایش می‌دهد. اثر هیپرکسی نورموباریک پیوسته نسبت به گروه هیپرکسی نورموباریک متناوب بر میزان فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز بیشتر است. نتیجه‌گیری: اگرچه برای شناخت مکانیسم حفاظت عصبی حاصل از هیپرکسی نورموباریک مطالعات زیادی لازم است، اما نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که هیپرکسی نورموباریک آثار حفاظت عصبی خود را احتمالاً تا حدی از طریق افزایش میزان فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز نشان می‌دهد.

کلیدواژه‌ها: ۱- پیش‌شرطی‌سازی ۲- ایسکمی ۳- گلوکوتاتیون پراکسیداز ۴- سکتة مغزی ۵- هیپرکسی نورموباریک

* دکتر محمدرضا بیگدلی I

علی اکبر مراتان II

تاریخ دریافت: ۸۷/۲/۲۹، تاریخ پذیرش: ۸۷/۷/۲۲

مقدمه

مغز در برابر آسیب‌های مغزی بعد از سکتة مغزی است.^(۲) در بین استرس‌های مختلف، هیپوکسی،^(۳) ایسکمی،^(۴) تشنج،^(۱) آنوکسی،^(۵) افسردگی منتشر (Spreading depression)،^(۶) گرما،^(۷) استرس اکسیداتیو،^(۸) تیمار با اسیدهای چرب اشباع نشده^(۹) و مهارکننده‌های فسفوریلاسیون اکسیداتیو،^(۱۰) فرایند تحمل مغز در برابر ایسکمی (Ischemic tolerance) (کامل یا کانونی) را القا می‌کنند. چندین گزارش وجود دارد که

تحریکات آسیب‌رسان در دوزهای پایین و کم، البته زیر آستانه آسیب‌رسان به سلول، پاسخ سازشی القا می‌کنند که مغز را در برابر استرس‌های دیگر حاصل از همین تحریکات آسیب‌رسان (تحمل = Tolerance) یا دیگر تحریکات آسیب‌رسان (تحمل متقابل = Cross tolerance) حفاظت می‌کند.^(۱) تحمل به ایسکمی (IT Ischemic tolerance) یکی از مهمترین مکانیسم‌های درون‌زاد مسؤول افزایش تحمل بافت

این مطالعه با استفاده از حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شده است. (I) استادیار فیزیولوژی، دانشکده علوم زیستی، اوین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران (* مؤلف مسؤول). (II) دانشجوی دکتری بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

هیپرکسی نیز باعث بروز تحمل به ایسکمی می‌شود.^(۱) مطالعات انجام شده در زمینه پیش‌شرطی‌سازی ایسکمی عصبی بسیار گسترده است. پیش‌شرطی‌سازی ایسکمی عصبی به مقدار زیادی از طریق گیرنده‌های NMDA (N - methyl - D - aspartic acid) و ساطت می‌شود، بدین ترتیب کلسیم داخل سلولی افزایش می‌یابد. مطالعات اخیر نشان می‌دهند که تحمل به ایسکمی در مغز به واسطه افزایش سنتز پروتئین‌های خاص، توان بقای نورون را افزایش می‌دهد که از میان آن‌ها می‌توان به پروتئین شوک گرمایی ۷۰،^(۷) پروتئین ضد آپوپتوزی (Anti - apoptotic Bcl2)،^(۸) ناقلین گلوتامات،^(۹) سوپراکسید دیسموتاز (Superoxidedismutase = SOD)،^(۱۰) فاکتورهای آنتی‌آپوپتوز،^(۹) گونه‌های واکنشی اکسیژن،^(۱۱) NF-kB (Nuclear Factor - kappa B)، و سایتوکین‌های پیش‌التهابی^(۱۲) اشاره کرد. علی‌رغم تلاش‌های انجام شده برای ایجاد IT حاصل از محرک‌های زیر کشنده مختلف، مصارف بالینی روش‌های مزبور به علت آثار سمی و جانبی آن‌ها قابل پذیرش نیست اما هیپرکسی بنا به حالت سلامت درمانی، روشی قابل پذیرش است.^(۱۳) روش‌های مولد تحمل به ایسکمی سبب ایجاد تحمل بافت مغز به ایسکمی و سایر عوامل آسیب‌رسان شده که به آن پیش‌شرطی‌سازی به ایسکمی (IPC= Ischemic preconditioning) یا عوامل آسیب‌رسان می‌گویند.^(۱) IPC یک پدیده دومرحله‌ای است، که دارای مرحله اولیه و ثانویه است: مرحله اول کوتاه مدت و مستقل از سنتز پروتئین است در حالی که مرحله ثانویه بلند مدت و با تغییر بیان ژن بروز می‌کند.^(۱۳)

یکی از تظاهرات بالینی آسیب دستگاه عصبی مرکزی (CNS=Central nervous system) بعد از ایسکمی مغزی، تشکیل ادم مغزی ناشی از شکستن سد خونی مغزی (BBB=Blood brain barrier) است که به واسطه پیش‌شرطی‌سازی با هیپرکسی نورموباریک، قابل بهبودی است.^(۱۴) آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ادم مغزی

واژونیک بعد از انواع آسیب‌ها را کاهش می‌دهد،^(۱۵) این امر بیان می‌کند که اکسیژن رادیکالی نقش مهمی در شکستن سد خونی مغزی ایفا می‌کند. آسیب مستقیم ایسکمی به سلول عصبی، باعث بروز دپولاریزاسیون و آزادسازی گلوتامات می‌شود. این آسیب نیز به واسطه پیش‌شرطی‌سازی با هیپرکسی نورموباریک، از طریق افزایش میزان بیان ناقلین گلوتامات، کاهش می‌یابد.^(۹) گلوتامات غلظت کلسیم آزاد^(۱۴) را افزایش می‌دهد که آن نیز آنزیم‌های وابسته به کلسیم را افزایش می‌دهد و منجر به تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود.^(۱۳) مطالعات اخیر نشان می‌دهند که سمیت حاصل از تحریک (Excitotoxicity) باعث مرگ سلولی نورون می‌شود. اخیراً نشان داده شده است که آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان باعث مهار مرگ سلولی می‌شوند. مرگ سلولی نورون ممکن است نقش مهمی در آسیب عصبی حاصل از مدل ایسکمی کانونی مغزی داشته باشد.^(۲) بنابراین، تلاش‌های زیادی برای تقویت دستگاه آنتی‌اکسیدان برای جلوگیری از آسیب مغزی انجام شده است. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را می‌توان با روش‌های مختلف استرس سلولی مانند ایسکمی و برقراری مجدد جریان خون خفیف،^(۱۶) استرس گرمایی،^(۱) میانجی‌های التهابی^(۹) و اکسیژناسیون هیپرباریک^(۱۷) افزایش داد. از میان پژوهش‌های انجام شده فوق، نشان داده شده است که استرس خفیف ایسکمی بیان چندین ژن را افزایش می‌دهد. و از آن بین می‌توان به ژن کاتالاز اشاره کرد که نیم ساعت بعد از استرس ایسکمی به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد.^(۱۸) از طرف دیگر در برخی از آزمایش‌ها نشان داده شده است که فعال‌سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در سرکوب آسیب‌های ایسکمی و برقراری مجدد جریان خون دخالت دارند؛ این امر نشان می‌دهد که در حقیقت افزایش ظرفیت آنزیم آنتی‌اکسیدان آثار تحمل به آسیب‌های ایسکمی را القا می‌کند.^(۱۹)

آنزیم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدان شامل سوپراکسید

ایسکمی حاصل از هیپرکسی نورموباریک بر میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز و کاهش آسیب حاصل از سکتة مغزی در رت است.

روش بررسی

مطالعه تجربی حاضر یک مطالعه کارآزمایی بالینی است که در سال ۱۳۸۶ در دانشگاه شهید بهشتی انجام شد. رت‌های اسپیراگو-دالی (۲۵۰-۳۸۰ گرم) به طور تصادفی به ۴ گروه اصلی حاوی ۲۰ حیوان تقسیم شدند. ۲ گروه در درون جعبه اکسیژن با غلظت بالای ۹۰٪ تحت عنوان شرایط هیپرکسی قرار داده شدند. از این ۲ و گروه، یک گروه به صورت پیوسته (۲۴ ساعت، PrHO) و دیگری به صورت متناوب (۴ ساعت در روز به مدت ۶ روز، InHO) در معرض اکسیژن بالای ۹۰٪ (هیپرکسی نورموباریک، HO) قرار گرفتند. ۲ گروه دیگر وضعیت مشابه با ۲ گروه اول داشتند با این تفاوت که یک گروه به صورت پیوسته (۲۴ ساعت، PrRA) و دیگری به صورت متناوب (۴ ساعت در روز به مدت ۶ روز، InRA) در معرض اکسیژن ۲۱٪ (RA، هوای اتاق) قرار گرفتند. آنگاه، تمام حیوان‌ها به مدت ۲۴ ساعت در هوای اتاق (۲۱٪) قرار گرفتند. بعد از ۲۴ ساعت، هر کدام از این گروه‌ها به ۳ زیر گروه تقسیم شدند. زیر گروه‌های اول حاوی ۹ رت، به مدت ۶۰ دقیقه تحت جراحی انسداد شریان مرکزی (MCAO) قرار گرفتند و بعد از ۲۴ ساعت، از لحاظ نقص‌های حرکتی نورولوژیک و حجم سکتة مغزی مورد مطالعه قرار گرفتند. زیر گروه‌های دوم به عنوان گروه شم (S-InHO, S-InRA) و گروه‌های سوم (S-PrHO, S-PrRA) حاوی ۶ رت، پروتوکل آزمایشی گروه اول را دریافت کردند با این تفاوت که جراحی بدون MCAO در این حیوانات صورت گرفت. زیر گروه‌های سوم به عنوان گروه دست نخورده (I-InRA, I-PrHO, I-PrRA) حاوی ۵ رت، پروتوکل آزمایشی گروه اول را دریافت کردند با این تفاوت که

دیسموتاز کاتالاز (Catalase=CAT)، گلوتاتیون پراکسیداز (Glutathion Peroxidase=GPOX) و گلوتاتیون ردوکتاز (Glutathion Reductase=GR) است. سوپراکسید دیسموتاز یک متالوآنزیم است که دیسموتاسیون آنیون سوپراکسید (O_2^-) به اکسیژن (O_2) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) را در سیتوزول، میتوکندری و هسته انجام می‌دهد.^(۲۰) به دنبال آن پراکسید هیدروژن به واسطه آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در سیتوزول به آب احیا می‌شود. گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز، توام با گلوتاتیون اس-ترانسفراز و گلوتاتیون ردوکتاز به سهولت توسط عوامل اکسیداتیو القا می‌شوند و سطوح فعالیت آنزیم‌های مذکور برای اندازه‌گیری استرس اکسیداتیو در سلول استفاده می‌شود.^(۱۸)

گروه‌های سولفویدریل سیستئین در دو مولکول گلوتاتیون از طریق اکسیداسیون با تشکیل دی‌سولفید گلوتاتیون به همدیگر متصل می‌شوند. گلوتاتیون ردوکتاز بازگشت گلوتاتیون به حالت اولیه یعنی از دی‌سولفید گلوتاتیون به گلوتاتیون از طریق احیای آن را کاتالیز می‌کند.^(۱۸) دی‌سولفید گلوتاتیون و گلوتاتیون از لحاظ زیست‌شناسی به عنوان تیول‌های داخل سلولی اهمیت زیادی دارند و غالباً تغییرات نسبت بین دی‌سولفید گلوتاتیون و گلوتاتیون، به عنوان شاخص استرس اکسیداتیو مورد استفاده قرار می‌گیرند.

طی پژوهش‌های قبل نشان داده شد که قرارگیری متناوب و پیوسته در معرض هیپرکسی نورموباریک پدیده تحمل به ایسکمی را القا می‌کند و باعث افزایش بیان ناقلین گلوتامات، سطوح Tumor Necrosis Factor-a (TNF-a) سرم و آنزیم تبدیل‌کننده TNF-a (Tumor Necrosis Factor-a Converting Enzyme=TACE) در مغز رت می‌شود.^(۱۲،۱) هیپرکسی نورموباریک متناوب موجب کاهش ادم مغزی و افزایش استحکام سد خونی مغزی نیز می‌شود.^(۹)

هدف از این مطالعه بررسی ارتباط بین پدیده تحمل به

بسته شدن از طریق احساس مقاومت و در پیشروی نخ و ورود حدود ۲۰ میلی‌متر 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.

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) هیچ‌گونه عارضه نورولوژیک نشان نمی‌دادند؛ شماره یک (نارسایی کامل در انتهای پنجه‌های جلویی)، یک نقص نورولوژیک کانونی خفیف، شماره دو (به چپ چرخیدن)، نقص نورولوژیک کانونی متوسط و شماره ۳ (افتادن به سمت چپ) نقص کانونی شدید در نظر گرفته می‌شوند و رت‌های شماره ۴ به‌طور خود بخودی نمی‌توانند راه بروند و سطح هوشیاری پایین دارند.^(۲۲)

بعد از قربانی کردن رت‌ها با کلرال هیدرات (۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن)، سر آن‌ها جدا می‌شد و به سرعت مغزها خارج می‌شدند و در سالین ۴ درجه به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری می‌شدند. ۸ برش به ضخامت ۲ میلی‌متر به صورت کرونال به واسطه دستگاه ماتریکس از مغز تهیه می‌شد که شروع آن‌ها از پیاز بویایی بود. برش‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه در محلول ۲٪، ۳٪، ۵٪ تتری فنیل تترازولیم کلراید نگهداری می‌شدند، سپس با دوربین دیجیتال (نوکیا ۶۶۳۰) که قابل اتصال به کامپیوتر بود تصویربرداری انجام می‌شد. بعد از انتقال تصاویر به کامپیوتر به واسطه نرم‌افزار Image Tools مساحت نواحی سفید و قرمز به ترتیب به عنوان نواحی آسیب دیده و سالم اندازه‌گیری می‌شدند. حجم نواحی آسیب دیده و سالم برش‌ها از طریق محاسبه حاصلضرب مساحت نواحی مذکور برش‌ها در ضخامت ۲ میلی‌متر برش بدست می‌آمد و

هیچ‌گونه جراحی در آن‌ها صورت نگرفت. این دو زیرگروه برای بررسی اثر خالص پیش‌شرطی‌سازی با هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب بر میزان فعالیت آنزیم گلوکوتایون پراکسیداز طراحی شده بودند. ۹ رت در داخل یک جعبه که تمامی درزهای آن به‌طور کامل گرفته شده بود، در ابعاد ۳۰×۳۵×۶۵ سانتیمتر با دو مجرای ورودی و خروجی قرار داده شدند. ماده‌ای بنام سودا لیم (soda lime) (جاذب دی‌اکسید کربن) در زیر جعبه قرار داده می‌شد تا دی‌اکسید کربن تولیدی را جذب کند. بدین ترتیب، امکان تغییر غلظت گاز داخل جعبه به حداقل می‌رسید. اکسیژن خالص (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 الکتروود سنجش اکسیژن نیز در کنار جعبه تعبیه شد تا غلظت اکسیژن داخل جعبه را اندازه‌گیری کند. آزمایش ABG (Arterial blood gas) در هر دو آزمایش صورت گرفت. وضعیت گازهای خون شریانی در پایان تیمار با هیپرکسی و نورموکسی نورموباریک بررسی می‌شد. کمیت‌های خون توسط دستگاه سنجش گازهای شریانی اندازه‌گیری شد (Blood Gas Analyzer, AVL-993). تعداد تنفس به واسطه باند نشانه حرکات عضله دیافراگم در ناحیه شکم اندازه‌گیری شد.

رت‌ها بعد از توزین، با داروی کلرات هیدرات (مرک، آلمان) (۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن) هوشبری می‌شدند. جراحی مدل سازی MCAO مطابق دستورالعمل لونگا و همکارانش انجام شد.^(۲۳) به‌طور خلاصه، تحت جراحی میکروسکوپی، یک نخ بخیه نایلون از طریق تنه ECA (External carotid artery) وارد رگ می‌شد و تا رسیدن به ACA (Anterior cerebral artery) از میان ICA (Internal carotid artery) با پتریگوپالاتین بسته ادامه داده می‌شد. در اثر تماس نخ بخیه و ACA جریان خون از هر طرف به MCA (Middle cerebral artery) بسته می‌شد. این

الکتروفورزی گلوکاتینون پراکسیداز، از ژل پلی اکریل آمید ۱۰٪ استفاده شد. رنگ آمیزی از طریق روش بوکامپ و فریدوچ سال ۱۹۷۱ انجام شد.^(۲۸)

سطح فعالیت آنزیم، حجم سکتی مغزی و میزان گازهای خون شریانی با استفاده از one-way ANOVA مورد آنالیز قرار گرفت. امتیازهای نقص نورولوژیک با استفاده از آزمون Mann-Whitney U مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. داده‌ها به صورت Mean±SEM نمایش داده شده است. $P < 0.05$ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

یافته‌ها

جدول شماره ۱ محتوی اکسیژن داخل جعبه اکسیژن را در شرایط هیپرکسی و نورموکسی نورموباریک نشان می‌دهد. بر اساس ارزیابی‌های آزمایش گازهای خون شریانی (ABG) فشار اکسیژن شریانی در شرایط هیپرکسی بسیار بالاتر از فشار اکسیژن شریانی در شرایط نورموکسی است.

میانگین امتیازهای نقص نورولوژیک (Neurologic Deficit Score=NDS) بواسطه قرارگیری در معرض هیپرکسی نورموباریک، به‌طور قابل ملاحظه کاهش می‌یابد. میانه امتیازهای نقص نورولوژیک در گروه‌های هیپرکسی نورموباریک متناوب و پیوسته و نورموکسی نورموباریک متناوب و پیوسته در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. در رت‌هایی که بواسطه قرار گرفتن در معرض هیپرکسی هیچ‌گونه نقص نورولوژیک مشاهده نشده بود، با تزریق اوانس آبی، این رنگ در ناحیه مرکزی سکتی 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 بویژه در ناحیه پنومبرا (قشر مغز)، استحکام سد خونی-مغزی افزایش یافته است.

سپس به واسطه معادله زیر، حجم اصلاح شده ناحیه آسیب‌دیده محاسبه می‌شد.^(۲۳)

(حجم ناحیه آسیب‌دیده - حجم نیمکره راست) - حجم نیمکره چپ = حجم اصلاح شده ناحیه آسیب‌دیده
نمونه‌ها (۱۵۰ تا ۲۰۰ میلی‌گرم از بافت نیمکره راست) در یک میلی‌لیتر بافر (۰/۳۲) مول در لیتر ساکاروز، یک میلی‌مول در لیتر EDTA، و ۱۰ نانومول در لیتر تریس هیدروکلرید با $pH = 7.4$ با هموژنیزر شیشه تفلون، هموژن شدند. هموژن با سرعت ۱۳۶۰۰ شتاب جاذبه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد و سوپر ناتانت جمع‌آوری شد و برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز مورد استفاده قرار گرفت.^(۲۴) غلظت پروتئین بر اساس روش برادفورد^(۲۵) با استفاده از استاندارد آلومین سرم گاوی اندازه‌گیری شد.

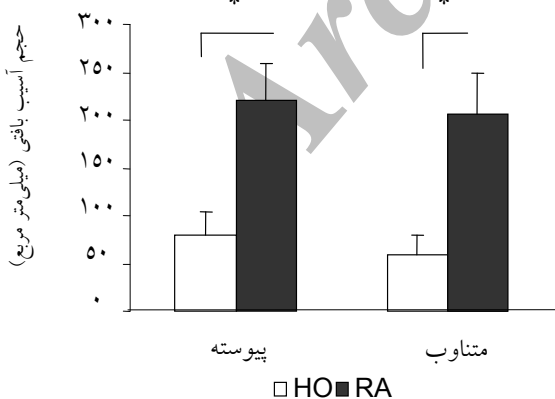
فعالیت آنزیم گلوکاتینون پراکسیداز به واسطه روش جنت و همکارانش در سال ۲۰۰۲^(۲۶) با اندکی تغییر انجام شد. مخلوط سنجش نهایی در حجم کل نهایی یک میلی‌لیتر حاوی ۱۰۰ میلی‌مولار بافر فسفات پتاسیم، $pH = 7.0$ EDTA، ۲۵ میلی‌مولار، ۰/۵ میلی‌مولار گلوکاتینون احیا شده، ۲ میلی‌مولار سدیم آزید، گلوکاتینون ردکتاز (۱/۵ واحد بین‌المللی)، ۰/۱ میلی‌مولار NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate) و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی است. واکنش با افزودن پراکسید هیدروژن شروع می‌شود و کاهش جذب نوری در ۳۴۰ نانومتر مخلوط سنجش نهایی به مدت یک دقیقه در دمای ۲۵ درجه در مقایسه با محلول بلانک که حاوی همه مواد غیر از بافت هموژن شده است اندازه‌گیری شد. یک واحد آنزیم، طبق تعریف، مقداری از آنزیم است که باعث اکسید شدن ۱ میکرومول NADPH در یک دقیقه در یک میلی‌گرم پروتئین شود. ژل الکتروفورزی پلی اکریل آمید (Sodium Dodecyl sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis = PAGE) در دمای ۴ درجه با ولتاژ ۱۴۰ ولت مطابق روش لاملی در سال ۱۹۷۰ انجام شد.^(۲۷) برای جداسازی

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

| گروه‌های آزمایشی | pH | PCO ₂ (mmHg) | PO ₂ (mmHg) | میزان تنفس (هرتز) |
|------------------|-----------|-------------------------|------------------------|-------------------|
| RA متناوب | ۷/۴±۰/۰۲ | ۴۱/۶±۰/۷۵ | ۹۲/۳±۱/۲۵ | ۱/۶۱±۰/۰۴ |
| HO متناوب | ۷/۳±۰/۰۱ | ۳۹/۰±۱/۳ | ۳۶۰±۷/۴۵* | ۱/۳±۰/۰۹ |
| RA پیوسته | ۷/۳۷±۰/۰۲ | ۴۰/۳±۰/۷۵ | ۹۳/۱±۰/۸۳ | ۱/۵۹±۰/۰۸ |
| HO پیوسته | ۷/۳۵±۰/۰۲ | ۳۹/۳±۱/۳ | ۳۵۵±۵/۲* | ۱/۲۹±۰/۰۴ |

جدول شماره ۲- توزیع امتیازهای نورولوژیک در هر گروه و مقایسه آماری آن‌ها. همانطوری که ملاحظه می‌کنید مقایسه گروه‌های ردیف InHO: PrHO و InRA: PrRA معنی‌دار است اما InHO: PrHO معنی‌دار نیست (*= $P < 0.05$).

| گروه‌های آزمایشی | تعداد نقص‌های نورولوژیک در هر گروه | تعداد | | | | | | |
|-----------------------------------|------------------------------------|---------|----|---|---|---|----------|---|
| | | میانگین | کل | | | | | |
| | | | | ۴ | ۳ | ۲ | ۱ | ۰ |
| نورموکسی نورموباریک متناوب (InRA) | ۰ | ۳ | ۴ | ۲ | ۰ | ۹ | ۱/۸۸ | |
| هیپرکسی نورموباریک متناوب (InHO) | ۵ | ۳ | ۱ | ۰ | ۰ | ۹ | ۰/۵۵ (*) | |
| نورموکسی نورموباریک پیوسته (PrRA) | ۰ | ۴ | ۴ | ۱ | ۰ | ۹ | ۱/۶۶ | |
| هیپرکسی نورموباریک پیوسته (PrHO) | ۳ | ۵ | ۱ | ۰ | ۰ | ۹ | ۰/۷۷ (*) | |



نمودار شماره ۱- اثر شرایط هیپرکسی نورموباریک (HO) و نورموکسی نورموباریک (RA) متناوب و پیوسته بر روی حجم آسیب بافتی ۴۸ ساعت بعد از پیش درمان (*= $P < 0.05$).

نمودار شماره ۱ نشان می‌دهد که هیپرکسی

نورموباریک پیوسته (PrHO) و متناوب (InHO) در مقایسه با نورموکسی نورموباریک (RA)، باعث کاهش حجم آسیب بافتی می‌شود. تفاوت آماری گروه‌های هیپرکسی نورموباریک پیوسته (PrHO) و متناوب (InHO) معنی‌دار نیست. تفاوت آماری گروه‌های مذکور نسبت به گروه شام نورموکسی نورموباریک معنی‌دار است. کاهش حجم آسیب بافتی و نقص‌های نورولوژیک، اثر پدیده تحمل به ایسکمی حاصل از هیپرکسی را اثبات می‌کند.

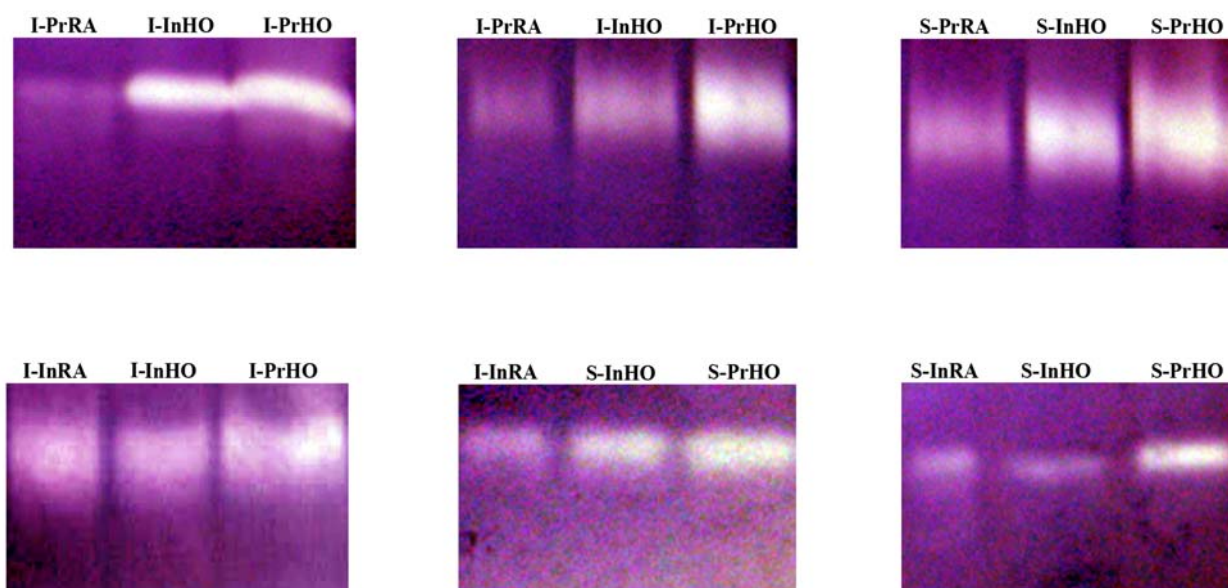
جدول شماره ۳- فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (GPOX) در گروه‌های مختلف آزمایش و کنترل (*P<0/05).

| مقدار P | گروه‌های مقایسه‌ای | فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز | گروه‌های آزمایشی (شماره گروه) |
|---------|--------------------|----------------------------------|---|
| 0/001 | ۳-۱* | 10/96±2/1 | هیپرکسی نورموباریک متناوب- دست نخورده ^(۱) |
| 0/006 | ۴-۲* | 11/92±1/8 | هیپرکسی نورموباریک متناوب- شم ^(۲) |
| 0/000 | ۵-۳* | 5/77±1/0 | نورموکسی نورموباریک متناوب- دست نخورده ^(۳) |
| 0/991 | ۴-۳ | 5/49±0/7 | نورموکسی نورموباریک متناوب- شم ^(۴) |
| 0/000 | ۵-۷* | 15/59±1/2 | هیپرکسی نورموباریک پیوسته- دست نخورده ^(۵) |
| 0/012 | ۶-۲* | 15/51±0/9 | هیپرکسی نورموباریک پیوسته- شم ^(۶) |
| 1/0 | ۸-۷ | 5/76±0/7 | نورموکسی نورموباریک پیوسته- دست نخورده ^(۷) |
| 0/008 | ۸-۶* | 6/17±1/3 | نورموکسی نورموباریک متناوب- شم ^(۸) |

آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز به طور معنی داری بیشتر از اثر هیپرکسی نورموباریک پیوسته است.

شکل شماره ۱ نشان می‌دهد که هیپرکسی نورموباریک پیوسته (PrHO) و متناوب (InHO) در مقایسه با نورموکسی نورموباریک (RA)، باعث افزایش سطح فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز بعد از پایان پیش درمان هیپرکسی می‌شود. این شکل یافته‌های جدول شماره ۳ را تأیید می‌کند.

جدول شماره ۳ نشان می‌دهد که هیپرکسی نورموباریک پیوسته (PrHO) و متناوب (InHO) در مقایسه با نورموکسی نورموباریک (RA)، باعث افزایش سطح فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز بعد از پایان پیش درمان هیپرکسی می‌شود. اثر هیپرکسی نورموباریک پیوسته (PrHO) و متناوب (InHO) در افزایش میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز، یکسان نیست؛ به طوری که اثر هیپرکسی نورموباریک پیوسته بر میزان فعالیت



شکل شماره ۱- رنگ آمیزی ژل الکتروفورز پلی اکریل آمید فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (GPOX) در گروه‌های مختلف آزمایش و کنترل.

بحث

بر اساس نتایج این مطالعه، به نظر می‌رسد که هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب، می‌تواند امتیاز نقص نورولوژیکی و حجم آسیب مغزی حاصل از سکته مغزی را به‌طور مؤثر در مدل MCAO (انسداد شریان مرکزی مغز) کاهش دهد؛ در حالیکه اثر هیپرکسی نورموباریک پیوسته، خفیف‌تر است. مدل MCAO بواسطه نخ بخیه ایجاد می‌شود که یک مدل مطمئن و قابل تکرار در مدل‌های حیوانی سکته مغزی است.^(۲۲) دمای بدن، گازهای خون، ضربان قلب و فرکانس تنفس همگی طی آزمایش در محدوده طبیعی قرار داشتند؛ البته، در گروه‌های هیپرکسی به علت غلظت بالای اکسیژن، محتوی اکسیژن، افزایش و فرکانس تنفس، کاهش می‌یافت.

نتایج این مطالعه با سایر پژوهش‌ها در زمینه تحمل به ایسکمی که در مقدمه اشاره شد، مطابقت دارد.^(۱۸،۴) تحمل به ایسکمی در بافت‌های مغزی مورد آزمایش بر اساس مدت زمان و مقدار غلظت اکسیژن متفاوت بوده است. بنابراین، کمیت و کیفیت تجویز اکسیژن در القای عوارض جانبی و مسمومیت‌های حاصل از آن اهمیت دارد. این نتایج نشان می‌دهد که هیپرکسی پیوسته، در برخی موارد، نارسایی‌های ریوی ایجاد می‌کند.

هیپرکسی نورموباریک پیوسته دارای آثار جانبی و خواص سمی است.^(۱۳) نتایج سایر محققین نشان می‌دهد که هیپرکسی نورموباریک پیوسته کمتر از ۲۴ ساعت آثار تحمل به ایسکمی را نشان نمی‌دهد.^(۱) گزارش‌های دیگر نشان می‌دهد که قرار گرفتن در معرض اکسیژن ۹۵٪ به مدت ۲۴ ساعت، باعث احتقان شدید ریوی می‌شود. احتقان ریوی شامل خروج گلبول‌های قرمز خون، ادم و تغییر در ساختمان آلوئولی می‌باشد. حتی بعد از ۲ هفته نیز بهبودی ساختمان آلوئولی کامل نمی‌شود؛ بنابراین، تجویز اکسیژن بصورت پیوسته به اختلال عملکردی ریه‌ها منجر می‌شود.^(۱۳) مدارک دیگر

نشان می‌دهد که پدیده حفاظت قلبی در حیوان‌هایی که در معرض هیپوکسی منقطع (اکسیژن‌رسانی مجدد و مکرر) قرار می‌گیرند در مقایسه با حیوان‌هایی که هیپوکسی پیوسته را تجربه می‌کنند قوی‌تر بروز می‌کند.^(۱۲) بنابراین، با در نظر گرفتن نتایج فوق، هیپرکسی متناوب، سمیت کمتر و آثار تحمل به ایسکمی بیشتری القا می‌کند.

اگرچه نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که هیپرکسی در مغز رت، بواسطه کاهش حجم آسیب بافتی و امتیاز نقص نورولوژیکی، حفاظت عصبی (Neuroprotection) را القا می‌کند، اما هیپرکسی آثار دیگری نیز دارد که می‌تواند بواسطه آن‌ها، تحمل به ایسکمی را در مغز رت تقویت نماید؛ این آثار عبارتند از:

- ۱- رگ‌زایی و افزایش تراکم عروق در واحد حجم
 - ۲- بلوک شدن مولکول چسبان بین سلولی (Intercellular adhesion molecule-1 = ICAM-1) و مهار تجمع نوتروفیل‌ها.^(۲۸)
- بنابراین، هیپرکسی می‌تواند تجمع نوتروفیل‌ها را کاهش دهد و از آسیب مغزی بکاهد. وادا و همکاران نشان دادند که رادیکال‌های آزاد اکسیژن و Bcl-2 که به عنوان مهارکننده آپوپتوز عمل می‌کنند، بعد از قرار گرفتن مکرر در معرض هیپرکسی افزایش می‌یابند و باعث افزایش توان زیستی نرونی می‌شوند.^(۹) از طرف دیگر، افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و سوپراکسید دیسموتاز، با کاهش بیان عامل القایی هیپوکسی (Hypoxia induce factor-1 α (HIF- α)) ارتباط دارد که گفته می‌شود عملکرد سد خونی مغزی را از طریق کاهش عامل رشد عروقی بهبود می‌بخشد.^(۲۹) علاوه بر این، رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌توانند با افزایش TNF- α ، از طریق گیرنده TNF- α ، باعث بروز پدیده تحمل به ایسکمی شوند.^(۳۰) از طرف دیگر، افزایش رادیکال‌های آزاد و سوپراکسید دیسموتاز بواسطه کاهش میزان بیان عامل القایی هیپوکسی مرتبط است،

همدیگر متصل می‌شوند. گلوکاتایون ردکتاز بازیافت گلوکاتایون را کاتالیز می‌کند و آن را مجدداً به مولکول منفرد گلوکاتایون احیا می‌کند. به‌طور طبیعی، مغز نسبت بالای GSH/GSSG را حفظ می‌کند و کاهش این نسبت نشانگر شاخص تنش اکسیداتیو است.^(۱۹)

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن و اکسیژن تبدیل می‌کند. پراکسید هیدروژن می‌تواند به رادیکال هیدروکسیل تبدیل شود.^(۱۵) بنابراین حذف پراکسید هیدروژن برای تکمیل کار سوپراکسید دیسموتاز برای کاهش آثار مضر استرس اکسیداتیو، حیاتی است. حذف پراکسید هیدروژن را آنزیم کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز انجام می‌دهد. این آنزیم‌ها در بافت مغز وجود دارند. فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز هفت برابر بیشتر از آنزیم کاتالاز است. بنابراین، وجود این آنزیم برای حذف رادیکال هیدروکسیل بسیار اساسی است.^(۱۵) بر خلاف آنزیم کاتالاز که در داخل پراکسیزوم‌ها انجام وظیفه می‌کند، آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز در سیتوزول در برابر استرس اکسیداتیو مقابله می‌کند. فقدان ژن‌های گلوکاتایون پراکسیداز و کاتالاز باعث افزایش آسیب‌های نوروئی حاصل از مدل سگته مغزی در رت می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که افزایش فعالیت کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز باعث کاهش مرگ برنامه‌ریزی شده سلول،^(۲۰-۲۱) فعال‌سازی آستروسیت‌ها و میکروگلیاها و خروج عناصر ضد التهابی^(۱۹،۲۰) می‌شود. از طرف دیگر مطالعات نشان می‌دهند که فقدان ژنتیکی آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز موجب افزایش آسیب‌های حاصل از ایسکمی و برقراری مجدد جریان خون نمی‌شود، زیرا آثار آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز توسط آنزیم کاتالاز پشتیبانی می‌شود و تا حد زیادی اجازه بروز آثار فقدان آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز را نمی‌دهد.^(۲۳) نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز بواسطه هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب افزایش می‌یابد. البته اثر هیپرکسی نورموباریک پیوسته، بیشتر از

این روند به بهبود عملکرد سد خونی مغزی منجر می‌شود که احتمالاً این عمل را از طریق کاهش عامل رشد عروقی انجام می‌دهد.

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن و اکسیژن تبدیل می‌کند. پراکسید هیدروژن می‌تواند به رادیکال هیدروکسیل تبدیل شود.^(۲۱) بنابراین حذف پراکسید هیدروژن برای تکمیل کار سوپراکسید دیسموتاز برای کاهش آثار مضر تنش اکسیداتیو، حیاتی است. حذف پراکسید هیدروژن را آنزیم کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز انجام می‌دهد. این آنزیم‌ها در بافت مغز وجود دارند. فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز هفت برابر بیشتر از آنزیم کاتالاز است؛ لذا، وجود این آنزیم برای حذف رادیکال هیدروکسیل بسیار اساسی است.^(۲۲) بر خلاف آنزیم کاتالاز که در داخل پراکسیزوم‌ها انجام وظیفه می‌کند، آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز در سیتوزول در برابر تنش اکسیداتیو مقابله می‌کند. فقدان ژن‌های گلوکاتایون پراکسیداز و کاتالاز باعث افزایش آسیب‌های نوروئی حاصل از مدل سگته مغزی در رت می‌شود. مطالعه‌ها نشان داده‌اند که افزایش فعالیت کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز، باعث کاهش مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، فعال‌سازی آستروسیت‌ها و میکروگلیاها و خروج عناصر ضد التهابی می‌شود.^(۲۲) از طرف دیگر مطالعه‌ها نشان می‌دهند که فقدان ژنتیکی آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز موجب افزایش آسیب‌های حاصل از ایسکمی و برقراری مجدد جریان خون نمی‌شود، زیرا آثار آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز توسط آنزیم کاتالاز پشتیبانی می‌شود و تا حد زیادی اجازه بروز آثار فقدان آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز را نمی‌دهد.^(۲۳) گلوکاتایون یک تری پپتید (گاما-آل-گلوتامیل-آل-سیستئینیل-گلیسین) است که برای گلوکاتایون پراکسیداز احیا می‌شود. گروه‌های سولفو هیدریل سیستئین در دو مولکول گلوکاتایون از طریق اکسیداسیون با تشکیل دی‌سولفید گلوکاتایون به

وجود می‌آورند و باعث کاهش میزان نقص نورولوژیک و حجم آسیب بافتی می‌شوند و هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب میزان فعالیت آنزیم گلوکوتایون پراکسیداز را افزایش می‌دهند، همچنین اثر هیپرکسی نورموباریک پیوسته در افزایش فعالیت آنزیم گلوکوتایون پراکسیداز، بیشتر از هیپرکسی نورموباریک متناوب است. این اثر تا حدی می‌تواند تحمل به ایسکمی را وساطت کند، از طرف دیگر استفاده از روش هیپرکسی نورموباریک متناوب به علت آثار سمی پایین 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 فعالیت آنزیم گلوکوتایون پراکسیداز باشند، روش و استراتژی جدیدی در پیدایش داروها وجود خواهد آورد که در به حداقل رساندن آسیب‌های نورونی طی ایسکمی مغزی یا به جلوگیری از پیشروی بیماری‌های مزمن تحلیل عصبی کمک خواهد کرد.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با استفاده از حمایت مالی دانشگاه شهید بهشتی (معاونت پژوهشی) انجام گردیده است که بدین وسیله نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسئولین آن مرکز ابراز می‌دارند.

هیپرکسی نورموباریک متناوب است (شکل شماره ۱ و جدول شماره ۳).

محدودیت‌های مطالعه حاضر از دو نظر قابل بحث

است:

۱- متغییر مستقل (آماده‌سازی محیط هیپرکسی نورموباریک). به دلیل استفاده از کپسول‌های تحت فشار اکسیژن، حفظ شرایط نورموباریک در جعبه اکسیژن ضروری بود، به همین دلیل، فشارسنجی به منظور کنترل پیوسته فشار داخل جعبه تعبیه شده بود. از طرف دیگر اکسیژن متری به منظور کنترل پیوسته غلظت اکسیژن داخل جعبه تعبیه شده بود.

۲- جراحی مدل جانوری سخته مغزی. اول این که، یکی از عوارض اصلی این جراحی خونریزی زیرعنکبوتیه است که باعث تلف شدن حیوان‌ها در هر گروه می‌شد. میزان مرگ‌ومیر، ۱۶/۷٪ بود به همین دلیل در هر گروه ۹ رت در نظر گرفته می‌شد. دوم اینکه گرد کردن متوازن سرنخ بواسطه شعله شمع نیاز به آزمون‌های صحیح خطا دارد تا نخ مناسب ساخته شود، آنگاه کلیه جراحی‌ها بوسیله همان نخ انجام می‌شود.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب تحمل به ایسکمی را

فهرست 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*. 2007;1152:228-33.

2- Pradillo J, Hurtado O, Romera C, Cardenas A, Fernandez-Tome P, Alonso-Escolano D, et al. TNF-R1 mediates increased neuronal membrane EAAT3 expression after in vivo cerebral ischemic preconditioning. *Neuroscience* 2006; 138: 1171-78.

3- 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.

4- Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Hata R, Ueda H, Niinobe M, et al. Ischemic tolerance phenomenon found in the brain. *Brain Res* 1990; 528:21-4.

5- Perez-Pinzon MA, Mumford PL, Rosenthal M, Sick

- TJ. Anoxic preconditioning in hippocampal slices: role of adenosine. *Neuroscience* 1996; 75:687-94.
- 6- Currie RW, Tanguay RM. Analysis of RNA for transcripts for catalase and HSP71 in rat hearts after in vivo hyperthermia. *Biochem Cell Biol* 1991; 69: 375-82.
- 7- Ohtsuki T, Matsumoto M, Kuwabara K, Kitagawa K, Suzuki K, Taniguchi N, et al. Influence of oxidative stress on induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. *Brain Res* 1992; 599:246-52.
- 8- 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; 20:95-99.
- 9- Bigdeli MR, Hajizadeh S, Froozandeh M, Heidarianpour A, Rasouljan B, Asgari AR, et al. Normobaric Hyperoxia Induces Ischemic Tolerance and Upregulation of Glutamate Transporters in the Rat brain and Serum TNF- α Level. *Exp Neurol* 2008; 212: 298-306.
- 10- Wada K, Kiyazawa T, Nomura N, Yano A, Tsuzuki N, Nawashiro H, et al. Mn-SOD and Bcl-2 expression after repeated hyperbaric oxygenation. *Acta Neurochir Suppl* 2000; 76: 285-90.
- 11- 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.
- 12- Bigdeli MR, Khoshbaten A. In vivo preconditioning with normobaric hyperoxia induces ischemic tolerance partly by triggering tumor necrosis factor- α converting enzyme/tumor necrosis factor- α /nuclear factor- κ B. *Neuroscience* 2008; 153: 671-78.
- 13- Al-Motabagani MA. Histological changes in the alveolar structure of the rat lung after exposure to hyperoxia. *Ital J Anat Embryol* 2005; 110(4):209-23.
- 14- Orrenius S, McCabe MJ J, Nicotera P. Ca²⁺-dependent mechanisms of cytotoxicity and programmed cell death. *Toxicol Lett* 1992; 64-65:357-64.
- 15- Warner D, Sheng H, Batinic-Haberle I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol* 2004; 207: 3221-31.
- 16- Ohtsuki T, Matsumoto M, Kuwabara K, Kitagawa K, Suzuki K, Taniguchi N, et al. Influence of oxidative stress on induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. *Brain Res* 1992; 599:246-52.
- 17- Oh DJ, Kim YH, Kim CH, Park JW, Kim MS. Pretreatment of hyperbaric oxygenation increases the activation of myocardial antioxidant enzymes and protect the ischemiareperfusion injury of the heart. *Korean J Physiol Pharmacol* 1997; 1: 749-58.
- 18- Kim Y, Chun Y, Park J, Kim C, Kim M. Involvement of adrenergic pathways in activation of catalase by myocardial ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 2002; 282: R1450-R1458.
- 19- Namba K, Takeda Y, Sunami K, Hirakawa M. Temporal profiles of the levels of endogenous antioxidants after four-vessel occlusion in rats. *J. Neurosurg. Anesthesiol* 2001; 13:131-7.
- 20- Sugawara T, Noshita N, Lewén A, Gasche Y, Ferrand-Drake M, Fujimura M, et al. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage by blocking the mitochondrial pathway of caspase activation. *J Neurosci* 2002; 22(1):209-17.
- 21- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989; 20(1):84-91.
- 22- Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu G, Savalos RA, Davidson C, Sharp FR. A semiautomated method for measuring brain infarct volume. *J Cereb Blood Flow Metab* 1990; 10(2):290-3.
- 23- 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* 1995; 125(2):195-201.
- 24- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-54.
- 25- 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* 2002; 236(1-2):7-12.
- 26- Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-85.
- 27- Lin CL, Chen HJ, Hou WC. Activity staining of glutathione peroxidase after electrophoresis on native and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 2002; 23(4):513-6.

28- Helms A, Whelan H, Torbey M. Hyperbaric oxygen therapy of cerebral ischemia. *Cerebrovascular dis* 2005; 20: 417-26.

29- Ostrowski R, Colohan A, Zhang J. Mechanisms of hyperbaric oxygen-induced neuroprotection in a rat model of subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow & Metab* 2005; 25: 554-71.

30- Leong KG, Karsan A. Signaling pathways mediated by tumor necrosis factor α . *Histol Histopathol* 2000; 15:1303-25.

31- Okado-Matsumoto A, Fridovich I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat

liver. *J. Biol. Chem* 2001; 276: 38388-93.

32- Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Narasimhan P, Copin JC, Kawase M, Chan PH. Copper-zinc superoxide dismutase prevents the early decrease of apurinic/aprimidinic endonuclease and subsequent DNA fragmentation after transient focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* 1999; 30(11):2408-15.

33- Noshita N, Sugawara T, Hayashi T, Lewen A, Omar G, Chan P. H. Copper/zinc superoxide dismutase attenuates neuronal cell death by preventing extracellular signal-regulated kinase activation after transient focal cerebral ischemia in mice. *J. Neurosci* 2002; 22:7923-30.

Archive of SID

Study of Prolonged and Intermittent Effects of Normobaric Hyperoxia Preconditioning on Glutathione Peroxidase Activity in Rat Stroke Model

*M. R. Bigdeli, PhD^IA. A. Meratan, MSc^{II}

Abstract

Background & Aim: Ischemic preconditioning (IPC) is an endogenous phenomenon that can induce ischemic tolerance (IT) in a variety of organs such as brain. In this study, we examined the intermittent and prolonged effects of normobaric hyperoxia (HO) on neurologic deficit scores, infarct volume, and glutathione peroxidase activity.

Material and Method: This experimental study was done in Shahid Beheshti University. The rats were divided into four main groups. The first two main groups were exposed to HO in prolonged (24hrs; PrHO) and intermittent (4hrs×6days; InHO) ways and the second two groups acted as controls and were exposed to 21% oxygen in the same chamber (room air, RA) continuously (24hrs; PrRA) and discontinuously (4hrs×6days; InRA). Each group was divided into three subgroups. After 24 hours, the first subgroup was subjected to a 60-minute MCAO followed by 24hrs of reperfusion. Then, the IT induced by InHO and PrHO was measured through neurologic deficit scores and infarct volume. The second and third subgroups were called sham — operated and intact subgroups — and used for the assessment of the effect of HO on glutathione peroxidase activity. Enzyme activities, arterial blood gases, and infarct volume were compared using one-way ANOVA test. The neurologic deficit scores were analyzed using the Mann-Whitney U test.

Results: Our findings indicate that InHO and PrHO are involved in the induction of IT. Pretreatment with InHO and PrHO can reduce neurologic deficit scores and infarct volume and increase glutathione peroxidase activity significantly. The catalase activity of prolonged HO groups was significantly more than that of intermittent HO groups.

Conclusion: Although further studies are needed to clarify the mechanisms of ischemic tolerance, InHO and PrHO seem to partly exert their effects via increasing glutathione peroxidase activity.

Key Words: 1) Preconditioning 2) Ischemia 3) Glutathione Peroxidase
4) Stroke 5) Normobaric Hyperoxia

This study was financed by the Research Department of Shahid Beheshti University.

I) Assistant Professor of Physiology. Faculty of Biosciences. Shahid Beheshti University. Tehran, Iran. (*Corresponding Author)

II) PhD Student of Biochemistry. Research Center of Biochemistry and Biophysics. Tehran University. Tehran, Iran.