بررسی اثر پیش شرطی سازی با هیپرکسی نورموباریک بر فعالیت آنزیم کاتالاز در مدل سکته مغزی رت

محمد رضا بیگدلی[1]، علی اکبر مراتان[2]

1- استادیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی

2- دانشجوی دکتری بیوشیمی، گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران

یافته / دوره دهم / شماره 4 / زمستان 87 / مسلسل 38

چکیده

دریافت مقاله: 87/7/4، ***پذیرش مقاله***: 87/10/11

Ø چکیده

مقدمه: پیش شرطی سازی به ایسکمی یکی از پدیده های درون زاد است که می تواند توسط عوامل مختلف و از مسیرهای مولکولی متفاوت در بافت های مختلف مانند مغز ایجاد شود. در این مطالعه اثر پیش شرطی سازی به واسطه هیپرکسی نورموباریک (**HO**) پیوسته و متناوب بر میزان، نقص نورولوژیک، حجم سکته مغزی و میزان فعالیت آنزیم کاتالاز مورد بررسی قرار گرفته است.

Ø مواد و روش کار: رت ها در چهار گروه به صورت گروه های پیوسته (24 ساعت پیوسته) و متناوب (4 ساعت در روز به مدت 6 روز) در معرض **HO** و نورموکسی نورموباریک (**RA** یا هوای اتاق) قرار می گرفتند. هر گروه به سه زیرگروه تقسیم می شدند. زیرگروه اول، بعد از 24 ساعت، تحت جراحی انسداد شریان میانی مغز (**MCAO**) به مدت 60 دقیقه قرار می گرفتند و سپس 24 ساعت به آنها اجازه برقراری مجدد جریان خون داده می 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 کاتالاز در نظر گرفته شده بود.

Ø نتایج: یافته های ما نشان می دهد که **HO** متناوب و پیوسته در القای **IT** درگیر هستند. پیش درمان با **HO** پیوسته و متناوب نقص های نورولوژیک را بهبود می بخشد، حجم سکته مغزی را کاهش می دهد و میزان فعالیت آنزیم کاتالاز را به طور معنی دار افزایش می دهد. اثر هیپرکسی نورموباریک پیوسته نسبت به گروه هیپرکسی نورموباریک متناوب بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز بیشتر است.

Ø نتیجه گیری: اگرچه برای شناخت مکانیسم حفاظت عصبی حاصل از هیپرکسی نورموباریک مطالعات زیادی لازم است، اما نتایج این تحقیق نشان می دهد که هیپرکسی نورموباریک آثار حفاظت عصبی خود را احتمالاً تاحدی از طریق افزایش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نشان می دهد.

Ø واژه های کلیدی: پیش شرطی سازی به ایسکمی، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز، سکته مغزی، هیپرکسی نورموباریک

آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم زیستی

پست الکترونیک: bigdelimohammadreza@yahoo.com

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2026-10-08]

مقدمه

تحریکات آسیب رسان در دوزهای پایین و کم، البته زیر آستانه ی آسیب رسان به سلول، پاسخ سازشی القا می کند که مغز را در برابر استرس های دیگر حاصل از همین تحریکات آسیب رسان (تحمل[1]) یا دیگر تحریکات آسیب رسان (تحمل متقابل[2]) حفاظت می کند(1). در بین استرس های مختلف، هیپوکسی(2)، ایسکمی(3)، تشنج(4)، آنوکسی(5)، افسردگی منتشر[3] (6) ، گرما (7)، استرس اکسیداتیو(8)، تیمار با اسیدهای چرب اشباع نشده(9)، و مهار کننده های فسفوریلاسیون اکسیداتیو(10) فرایند تحمل مغز در برابر ایسکمی[4] (کامل یا کانونی) را القا می کنند. چندین گزارش وجود دارد که هیپرکسی نیز باعث بروز تحمل به ایسکمی می شود(11و12).

مطالعات اخیر نشان می دهد که تحمل به ایسکمی در مغز به واسطه افزایش سنتز پروتئین های خاص توان بقای نورون را افزایش می دهد. از میان آنها می توان به پروتئین شوک گرمایی 70 (13)، Bcl2 (14)، ناقلین گلوتامات(15)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) (16)، فاکتورهای آنتی آپوپتوز(17)، گونه های واکنشی اکسیژن(18)، NF-kB، و سایتوکین های پیش التهابی(18) اشاره کرد.

یکی از تظاهرات بالینی آسیب دستگاه عصبی مرکزی (CNS) بعد از ایسکمی مغزی تشکیل ادم مغزی ناشی از شکستن سد خونی مغزی (BBB) است که به واسطه پیش شرطی سازی با هیپرکسی نورموباریک قابل بهبودی است(19). آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) ادم مغزی وازوژنیک بعد از انوع آسیب ها را کاهش می دهد(17)، این امر بیان می کند که اکسیژن رادیکالی نقش مهمی در شکستن سد خونی مغزی ایفا می کند. تظاهرات دیگر آسیب CNS آسیب مستقیم به سلول عصبی است که به واسطه وقایع تحریکی آزاد سازی گلوتامات بعد از ایسکمی مغزی را القا می کنند. این آسیب نیز به واسطه پیش شرطی سازی با هیپرکسی نورموباریک از طریق افزایش میزان بیان ناقلین گلوتامات کاهش می یابد(20). گلوتامات غلظت کلسیم آزاد(2) را افزایش می دهد که آن نیز آنزیم های وابسته به کلسیم را افزایش می دهد و منجر به تولید رادیکالهای آزاد می شود(21). مطالعات اخیر نشان می دهد که آسیب حاصل از تحریک[5] باعث مرگ سلولی در برخی از نورونها می شود(22). اخیراً نشان داده شده است که آنزیم های آنتی اکسیدان باعث مهار مرگ سلولی می شوند. بنابراین، مرگ سلولی نورون ممکن است نقش مهمی در آسیب عصبی حاصل از مدل ایسکمی کانونی مغزی داشته باشد(23). بنابراین، تلاش های زیادی برای تقویت دستگاه آنتی اکسیدان برای جلوگیری از آسیب مغزی انجام شده است. فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان را می توان با روشهای مختلف استرس سلولی مانند ایسکمی و برقراری مجدد جریان خون خفیف(24)، استرس گرمایی(12)، میانجی های التهابی(25)، و اکسیژناسیون هیپرباریک(3) افزایش داد. از میان پژوهش های انجام شده فوق، نشان داده شده است که استرس خفیف ایسکمی بیان mRNA چندین ژن را افزایش می دهد. از میان آنها می توان به ژن کاتالاز اشاره کرد که نیم ساعت بعد از استرس ایسکمی به طور قابل ملاحظه ای افزایش می یابد(5). از طرف دیگر در برخی از آزمایش ها نشان داده شده است که فعال سازی آنزیم های آنتی اکسیدان در سرکوب آسیب های ایسکمی و برقراری مجدد جریان خون دخالت دارند. این امر نشان می دهد که در حقیقت افزایش ظرفیت آنزیم آنتی اکسیدان آثار تحمل به آسیب های ایسکمی را القا می کند(26).

آنزیم های دفاعی آنتی اکسیدان شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPOX)، و گلوتاتیون ردوکتاز (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 می دهد(27). به دنبال آن پراکسید هیدروژن به واسطه آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در سیتوزول به آب احیا می شود.

[1]- Tolerance
[2]- Cross tolerance
[3]- Spreading depression
[4]- Ischemic tolerance
[5]- Excitotoxicity

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2026-10-08]

گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، و کاتالاز توام با گلوتاتیون اس-ترانسفراز و گلوتاتیون ردوکتاز به سهولت توسط عوامل اکسیداتیو القا می شوند و سطوح فعالیت آنزیم های مذکور برای اندازه گیری استرس اکسیداتیو در سلول استفاده می شود(28).

اکسیداسیون گروه های سولفوهیدریل سیستئین در دو مولکول گلوتاتیون (GSH) با تشکیل پیوند دی سولفید برای ایجاد دی سولفید گلوتاتیون (GSSG) به همدیگر متصل می شوند. گلوتاتیون ردکتاز بازگشت گلوتاتیون به حالت اولیه یعنی از دی سولفید گلوتاتیون (GSSG) به گلوتاتیون (GSH) از طریق احیای آن را کاتالیز می کند[32].دی سولفید گلوتاتیون (GSSG) و گلوتاتیون (GSH) از لحاظ زیست شناسی به عنوان تیول های داخل سلولی اهمیت زیادی دارند و تغییرات نسبت بین دی سولفید گلوتاتیون (GSSG) و گلوتاتیون (GSH) غالباً به عنوان شاخص استرس اکسیداتیو مورد استفاده قرار می گیرند.

ما در آزمایشگاه خود، طی پژوهش های قبل نشان داده ایم که قرارگیری متناوب و پیوسته در معرض هیپرکسی نورموباریک پدیده تحمل به ایسکمی را القا می کند و باعث افزایش بیان ناقلین گلوتامات، سطوح TNF-a سرم، و آنزیم تبدیل کننده TNF-a (TACE) در مغز رت می شود(20،21). هیپرکسی نورموباریک متناوب موجب کاهش ادم مغزی و افزایش استحکام سد خونی مغزی نیز می شود(5).

هدف از این مطالعه بررسی ارتباط بین پدیده تحمل به ایسکمی حاصل از هیپرکسی نورموباریک بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و کاهش آسیب حاصل از سکته مغزی در رت است.

مواد و روشها

1- گروه بندی حیوان آزمایشگاهی

رت های اسپیراگو-دالی (380-250گرم) به طور تصادفی به چهار گروه حاوی 20 حیوان تقسیم شدند. دو گروه در درون جعبه اکسیژن با غلظت 90< تحت عنوان شرایط هیپرکسی قرار داده می شدند. از این دو گروه، یک گروه به صورت پیوسته (24 ساعت، PrHO) و دیگری به صورت متناوب (4ساعت در روز به مدت 6 روز، InHO) در معرض اکسیژن بالای 90 درصد (هیپرکسی نورموباریک، HO) قرار می گرفتند. دو گروه دیگر وضعیت مشابه با دو گروه اول داشتند با این تفاوت که یک گروه به صورت پیوسته (24 ساعت، PrRA) و دیگری به صورت متناوب (4ساعت در روز به مدت 6 روز، InRA) در معرض اکسیژن 21 درصد (RA، هوای اتاق) قرار می گرفتند. حیوان ها سپس به مدت 24 ساعت در هوای اتاق (21 درصد) قرار می گرفتند. سپس هر کدام از این گروه ها به سه زیر گروه تقسیم می شدند. زیر گروه های اول به مدت 60 دقیقه تحت جراحی انسداد شریان مرکزی (MCAO) قرار می گرفتند. 24 ساعت بعد از لحاظ نقص های حرکتی نورولوژیک و حجم سکته مغزی مورد مطالعه قرار می گرفتند. زیر گروه های دوم به عنوان گروه شم (S-InHO, S-InRA, S-PrHO, S-PrRA) پروتوکل آزمایشی گروه اول را دریافت می کردند با این تفاوت که جراحی بدون MCAO در این حیوانات صورت می گرفت. زیر گروه های سوم به عنوان گروه دست نخورده (I-InRA, I-PrHO, I-PrRA, I-InHO) پروتوکل آزمایشی گروه اول را دریافت می کردند با این تفاوت که هیچ گونه جراحی در آنها صورت نمی گرفت. این دو گروه برای بررسی اثر خالص پیش شرطی سازی با هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز طراحی شده بودند.

2- جعبه هیپرکسی

9 رت در داخل یک جعبه که تمامی درزهای آن به طور کامل گرفته شده است در ابعاد cm(30×35×65) با دو مجرای ورودی و خروجی قرار داده می شدند. ماده ای بنام سودا لیم[1] (جاذب دی اکسید کربن) در زیر جعبه قرار داده می شد تا دی اکسید کربن تولیدی را جذب کند. بدین ترتیب، امکان تغییر غلظت گاز داخل جعبه به حداقل می رسید. اکسیژن خالص (F_IO_2= 0/95) یا هوای اتاق در میزان 3 لیتر در دقیقه برای تیمار جانوران به جعبه حاوی رت ها متصل می شد. برای افزایش دقت آزمایش یک الکترود سنجش اکسیژن نیز در کنار جعبه تعبیه می شد تا غلظت اکسیژن داخل جعبه

[1]- soda lime

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2026-10-08]

را اندازه گیری کند. آزمایشABG در هر دو آزمایش صورت می گرفت.

3- ایجاد مدل سکته مغزی (انسداد شریان مرکزی مغز)

رت ها بعد از توزین با داروی کلرات هیدرات (مرک، آلمان) (400 میلی گرم در کیلوگرم وزن بدن) هوشبری می شدند. جراحی مدل سازی MCAO مطابق دستورالعمل لونگا و همکارانش انجام می شد(29). به طور خلاصه، تحت جراحی میکروسکوپی، یک نخ بخیه نایلون از طریق تنه ECA[1] وارد رگ می شد و تا رسیدن به ACA[2] از میان ICA[3] با پتریگوپالاتین بسته ادامه داده می شد. در اثر تماس نخ بخیه و ACA جریان خون از هر طرف به MCA[4] بسته می شد. این بسته شدن از طریق احساس مقاومت و در پیشروی نخ و ورود حدود 20 میلی متر طول نخ از تنه ECA مشخص می شد. بعد از 60 دقیقه ایسکمی، برقراری مجدد جریان خون صورت می گرفت. دمای بدن از طریق رکتوم اندازه گیری می شد و میزان دمای در حوالی 37 درجه حفظ می شد.

4- ارزیابی رفتاری حاصل از سکته

معاینه های نورولوژیک بعد از 24 ساعت انجام می شد. در طول 24 ساعت بعد از شروع انسداد تا قربانی شدن حیوان مراقبت های ویژه انجام می شد. یافته های نورولوژیکی در 5 مقیاس دسته بندی می شوند: شماره صفر هیچ گونه عارضه نورولوژیک نشان نمی دادند؛ شماره یک (نارسایی کامل در انتهای پنجه های جلویی)، که یک نقص نورولوژیک کانونی خفیف در نظر گرفته می شود. شماره دو (به چپ چرخیدن) نقص نورولوژیک کانونی متوسط؛ شماره سه (افتادن به سمت چپ) نقص کانونی شدید هستند؛ و رت های شماره چهار به طور خود بخودی نمی توانند راه بروند و سطح هوشیاری پایین دارند(4و29).

5- ارزیابی حجم سکته مغزی

بعد از قربانی کردن رت ها با کلرات هیدرات (800 میلی گرم در کیلوگرم وزن بدن)، سر آنها جدا می شد و به سرعت مغز ها خارج می شدند و در سالین 4^0 C به مدت 15 دقیقه نگهداری می شدند. هشت برش به ضخامت 2 میلی متر به صورت کرونال به واسطه دستگاه ماتریکس مغز تهیه می شدند که شروع آنها از پیاز بویایی بود. برش ها به مدت 15 دقیقه در دمای 37^0 C در محلول 2 درصد 2،3،5 تری فنیل تترازولیوم کلراید نگهداری می شدند. سپس با دوربین دیجیتال (نوکیا 6630) که قابل اتصال به کامپیوتر بود تصویربرداری می شدند. بعد از انتقال تصاویر به کامپیوتر به واسطه نرم افزار " Image Tools " مساحت نواحی سفید و قرمز به ترتیب به عنوان نواحی آسیب دیده و سالم اندازه گیری می شدند. حجم نواحی آسیب دیده و سالم برش ها از طریق محاسبه حاصلضرب مساحت نواحی مذکور برش ها در ضخامت 2 میلی متر برش به دست می آمد و سپس به واسطه معادله زیر حجم اصلاح شده ناحیه آسیب دیده محاسبه می شد(30).

(حجم ناحیه آسیب دیده - حجم نیمکره راست)- حجم نیمکره چپ = حجم اصلاح شده ناحیه آسیب دیده

6- نمونه گیری مغزی و استخراج پروتئین

نمونه ها (150 تا 200 میلی گرم از بافت نیمکره راست) در یک میلی لیتر بافر (0/32 مول در لیتر ساکاروز، 1 میلی مول در لیتر EDTA، و 10 نانومول در لیتر تریس هیدروکلرید با pH 7/4) با هموژنیزر شیشه تفلون هموژن می شدند. هموژن با سرعت g13600 به مدت 30 دقیقه سانتریوفوژ می شدند و سوپر ناتانت جمع آوری می شد و برای اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز مورد استفاده قرار می گرفت(31). غلظت پروتئین بر اساس روش برادفورد(8) با استفاده از استاندارد آلبومین سرم گاوی اندازه گیری می شد.

7- سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) به واسطه روش جنت و همکارانش در سال 2002 (7) با اندکی تغییر انجام شد. مخلوط سنجش نهایی در حجم کل نهایی 1 میلی لیتر حاوی 50 میلی مولار بافر فسفات سدیم،pH 7/0، 10 میلی مولار پراکسید هیدروژن، و 20 میکرولیتر عصاره آنزیمی است. تغییر جذب نوری در 240 نانومتر مخلوط سنجش نهایی به مدت یک دقیقه

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

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2026-10-08]

در دمای 25^0 C در مقایسه با محلول بلانک که حاوی همه مواد غیر از بافت هموژن شده است اندازه گیری می شد. یک واحد آنزیم طبق تعریف مقداری از آنزیم است که باعث تبدیل 1 میکرومول پراکسید هیدروژن در یک دقیقه در یک میلی گرم پروتئین شود.

8- رنگ آمیزی فعالیت آنزیم کاتالاز بر روی ژل الکتروفورز پلی اکریل آمید

ژل الکتروفورز پلی اکریل آمید (PAGE) در دمای 4^0 C با ولتاژ 140 ولت مطابق روش لاملی در سال 1970 انجام می شد(32). برای جدا سازی الکتروفورزی کاتالاز از ژل پلی اکریل آمید 10 درصد استفاده شد. رنگ آمیزی از طریق روش بوکامپ و فریدووچ سال 1971 انجام می شد(1،6).

9- آنالیز آماری

سطح فعالیت آنزیم، حجم سکته 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. داده ها به صورت Mean±SEM نمایش داده می شود. $P<0.05$ از لحاظ آماری معنی دار در نظر گرفته شده است.

یافته ها

1- پارامترهای شرایط آزمایش

جدول 1 محتوی اکسیژن داخل جعبه اکسیژن را در شرایط هیپرکسی و نورموکسی نورموباریک نشان می دهد. بر اساس ارزیابی های آزمایش گازهای خون شریانی[1] (ABG) فشار اکسیژن شریانی در شرایط هیپرکسی بسیار بالاتر از فشار اکسیژن شریانی در شرایط نورموکسی است.

2- آثار هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب بر امتیازهای نقص نورولوژیک

میانه امتیازهای نقص نورولوژیک (NDS) به واسطه قرار گیری در معرض هیپرکسی نورموباریک به طور قابل ملاحظه کاهش می یابد. میانه امتیازهای نقص نورولوژیک در گروه های هیپرکسی نوموباریک متناوب و پیوسته و نورموکسی نورموباریک متناوب و پیوسته در جدول 2 نشان داده شده است. در رت هایی که به واسطه قرار گرفتن در معرض هیپرکسی هیچ گونه نقص نورولوژیک مشاهده نشده بود، با تزریق اوانس آبی، این رنگ در ناحیه مرکزی سکته مشاهده می شد. این مدرک نشان می دهد که در کلیه رت های مذکور انسداد شریان مرکزی مغز صورت گرفته است ولی به دلیل بروز پدیده تحمل به ایسکمی القایی هیپرکسی به ویژه در ناحیه پنومبرا استحکام سد خونی-مغزی افزایش یافته است.

3- آثار هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب بر حجم آسیب بافتی

نمودار 1 نشان می دهد که هیپرکسی نورموباریک پیوسته (PrHO) و متناوب (InHO) در مقایسه با نورموکسی نورموباریک (RA) باعث کاهش حجم آسیب بافتی می شود. تفاوت آماری گروه های هیپرکسی نورموباریک پیوسته (PrHO) و متناوب (InHO) معنی دار نیست. تفاوت آماری گروه های مذکور نسبت به گروه شم نورموکسی نورموباریک معنی دار است. کاهش حجم آسیب بافتی و نقص های نورولوژیک اثر پدیده تحمل به ایسکمی حاصل از هیپرکسی را اثبات می کند.

4- آثار هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب بر سطح فعالیت آنزیم کاتالاز

نمودار 2 نشان می دهد که هیپرکسی نورموباریک پیوسته (PrHO) و متناوب (InHO) در مقایسه با نورموکسی نورموباریک (RA) باعث افزایش سطح فعالیت آنزیم کاتالاز بعد از پایان پیش درمان هیپرکسی می شدند. اثر هیپرکسی نورموباریک پیوسته (PrHO) و متناوب (InHO) در افزایش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز یکسان نیست به طوری که اثر هیپرکسی نورموباریک پیوسته بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز به طور معنی دار بیشتر از اثر هیپرکسی نورموباریک پیوسته است.

5- آثار هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب بر سطح فعالیت آنزیم کاتالاز بر روی ژل اکریل آمید

[1]- Arterial blood gases

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2026-10-08]

نمودار 3 نشان می دهد که هیپرکسی نورموباریک پیوسته (PrHO) و متناوب (InHO) در مقایسه با نورموکسی نورموباریک (RA) باعث افزایش سطح فعالیت آنزیم کاتالاز بعد از پایان پیش درمان هیپرکسی می شدند. این شکل یافته های نمودار 2 را تایید می کند.

بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این مطالعه، به نظر می رسد که HO پیوسته و متناوب می تواند امتیاز نقص نورولوژیکی و حجم آسیب مغزی حاصل از سکته مغزی را به طور موثردر مدل MCAO(انسداد شریان مرکزی مغز) کاهش دهد. در حالی که اثرHO پیوسته خفیف تر است. مدل MCAO به واسطه نخ بخیه ایجاد می شود که یک مدل مطمئن و قابل تکرار در مدل های حیوانی سکته مغزی است(33). دمای بدن، گازهای خون، ضربان قلب، و فرکانس تنفس همگی در طی آزمایش در محدوده طبیعی قرار داشتند. البته، در گروه های هیپرکسی به علت غلظت بالای اکسیژن، محتوی اکسیژن افزایش می یافت و فرکانس تنفس کاهش می یافت.

نتایج این پژوهش با سایر مطالعات در زمینه تحمل به ایسکمی که در مقدمه اشاره شد مطابقت دارد(7،21). تحمل به ایسکمی در بافت های مغزی مورد آزمایش بر اساس مدت زمان و مقدار غلظت اکسیژن متفاوت بوده است. بنابراین، کمیت و کیفیت تجویز اکسیژن در القای تحمل به ایسکمی، عوارض جانبی، و مسمومیت های آن بر روی بدن اهمیت دارد. این نتایج نشان می دهد که هیپرکسی پیوسته در برخی موارد نارسایی های ریوی ایجاد می کند.

هیپرکسی نورموباریک (HO) پیوسته دارای آثار جانبی و خواص سمی است(34). نتایج سایر محققین نشان می دهد که هیپرکسی نورموباریک (HO) پیوسته کمتر از 24 ساعت آثار تحمل به ایسکمی را نشان نمی دهد(21). گزارش های دیگر نشان می دهد که قرار گرفتن در معرض اکسیژن 95% به مدت 24ساعت منجر به احتقان شدید ریوی می شود که در آن گلبول های قرمز خون، ادم و تغییر در ساختمان آلوئولی اتفاق می افتد. حتی بعد از 2 هفته نیز بهبودی ساختمان آلوئولی کامل نمی شود. بنابراین، تجویز اکسیژن به صورت پیوسته منجر به اختلال عملکردی ریه ها می شود(34). مدارک دیگر نشان می دهد که پدیده حفاظت[1] قلبی در حیواناتی که در معرض هیپوکسی منقطع (اکسیژن رسانی مجدد و مکرر) قرار می گیرند در مقایسه[1] با حیواناتی که هیپوکسی پیوسته را تجربه می کنند قوی تر بروز می کند(14). بنابراین، با در نظر گرفتن نتایج فوق هیپرکسی متناوب سمیت کم و آثار تحمل به ایسکمی بیشتری القا می کند.

اگرچه نتایج این تحقیق نشان می دهد که هیپرکسی در مغز رت به واسطه کاهش حجم آسیب بافتی و امتیاز نقص نورولوژیک حفاظت عصبی القا می کند، اما هیپرکسی آثار دیگری نیز دارد که می تواند به واسطه آنها تحمل به ایسکمی را در مغز رت تقویت نماید. این آثار عبارتنداز: (1) هیپرکسی می تواند باعث رگ زایی و افزایش تراکم عروق در واحد حجم شود(14). (2) هیپرکسی می تواند باعث بلوک شدن مولکول چسبان بین سلولی[3] و مهار تجمع نوتروفیل ها گردد(34،32). بنابراین، هیپرکسی می تواند تجمع نوتروفیل ها را کاهش دهد و از آسیب مغزی بکاهد. وادا و همکارانش در سال 2000 نشان دادند که رادیکال های آزاد اکسیژن و Bcl-2 که به عنوان مهار کننده آپوپتوز عمل می کند بعد از قرار گرفتن مکرر در معرض هیپرکسی افزایش می یابد و باعث افزایش توان زیستی نورونی می شود(1). از طرف دیگر، افزایش رادیکال های آزاد اکسیژن و سوپراکسید دیسموتاز با کاهش بیان فاکتور القایی هیپوکسی[4] ارتباط دارد که گفته می شود عملکرد سد خونی مغزی را از طریق کاهش فاکتور رشد عروقی بهبود می بخشد(8). علاوه بر این، رادیکال های آزاد اکسیژن می توانند با افزایش TNF-α از طریق گیرنده TNF-α باعث بروز پدیده تحمل به ایسکمی شوند(6). از طرف دیگر، افزایش رادیکال های آزاد و سوپراکسید دیسموتاز به واسطه کاهش میزان بیان فاکتور القایی هیپوکسی مرتبط است، این روند منجر به بهبود عملکرد سد خونی مغزی می شود که احتمالاً این عمل را از طریق کاهش فاکتور رشد عروقی انجام می دهد.

[1]- Protection
[2]- Neuroprotection
[3]- Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)
[4]- Hypoxia induce factor-1α (HIF-α)

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2026-10-08]

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن و اکسیژن تبدیل می کنند. پراکسید هیدروژن می تواند به رادیکال هیدروکسیل تبدیل شود(28). بنابراین حذف پراکسید هیدروژن برای تکمیل کار سوپراکسید دیسموتاز برای کاهش آثار مضر استرس اکسیداتیو حیاتی است حذف پراکسید هیدروژن را آنزیم کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز انجام می دهد. این آنزیم ها در بافت مغز وجود دارد. اگر چه اثر و فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز هفت برابر بیشتر از آنزیم کاتالاز است اما وجود این آنزیم نیز به ویژه در داخل پروکسیزوم ها بسیار ضروری است(28،19). مطالعات نشان داده اند که افزایش فعالیت کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز باعث کاهش مرگ برنامه ریزی شده سلول(28،19)، فعال سازی آستروسیت ها و میکروگلیا ها و خروج عناصر ضد التهابی(36،28) می شود. از طرف دیگر مطالعات نشان می دهند که فقدان ژنتیکی آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز موجب افزایش آسیب های حاصل از ایسکمی و برقراری مجدد جریان خون نمی شود زیرا آثار آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز توسط آنزیم کاتالاز پشتیبانی می شود و اجازه بروز آثار نبود آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز را تا حد زیادی نمی دهد(14،28). نتایج این مطالعه نشان می دهد که فعالیت آنزیم کاتالاز به واسطه هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب افزایش می یابد. البته اثر هیپرکسی نورموباریک پیوسته بیشتر از هیپرکسی نورموباریک متناوب است(شکل های 3 و 2).

نتیجه گیری، نتایج این تحقیق نشان می دهد: (1) هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب تحمل به ایسکمی را به وجود می آورند و باعث کاهش میزان نقص نورولوژیک می شوند. (2) هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب میزان فعالیت آنزیم کاتالاز را افزایش می دهند. (3) اثر هیپرکسی نورموباریک پیوسته در افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز بیشتر از هیپرکسی نورموباریک متناوب است. این اثر تا حدی می تواند 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 مناسب تر است. لذا، استفاده از هیپرکسی نورموباریک یا طراحی موادی که قادر به تقلید از آثار هیپرکسی نورموباریک در افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز باشند، روش و استراتژی جدیدی در پیدایش دارو ها به وجود خواهد آورد که در به حداقل رساندن آسیب های نورونی طی ایسکمی مغزی یا حین پیشروی بیماری های مزمن تحلیل عصبی درگیر با اثر سمی ناشی از تحریک کمک خواهد کرد.

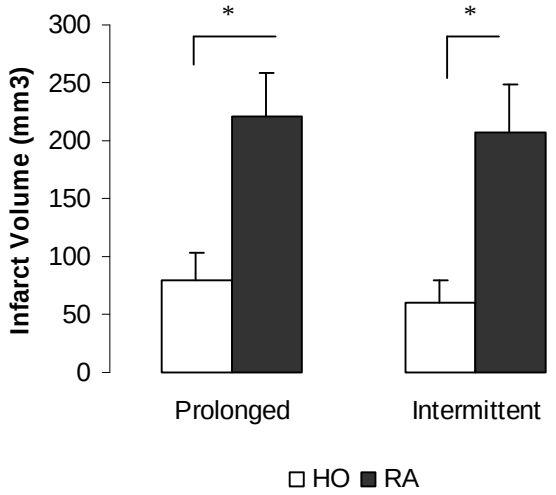
جدول 1- وضعیت گازهای خون شریانی و تنفسی در پایان تیمار با هیپرکسی نورموباریک *:P<0/001.

گروه های آزمایشی	pH	PCO_2 (mmHg)	PO_2 (mmHg)	میزان تنفس (هرتز)
RA متناوب	7/4±0/02	41/6±0/75	92/3±1/25	1/61±0/04
HO متناوب	7/3±0/01	39/0±1/3	360±7/45*	1/3±0/09
RA پیوسته	7/37±0/02	40/3±0/75	93/1±0/83	1/59±0/08
HO پیوسته	7/35±0/02	39/3±1/3	355±5/2*	1/29±0/04

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2026-10-08]

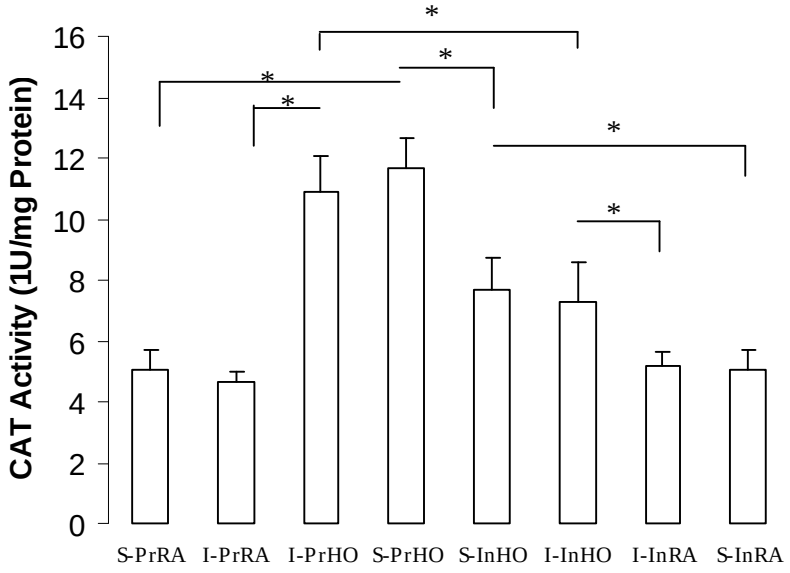
جدول 2- توزیع امتیاز های نورولوژیک در هر گروه و مقایسه آماری آنها. همانطوری که ملاحظه می کنید مقایسه گروه های ردیف InRA: InHO و PrRA: PrHOمعنی دار است اما InHO:PrHO معنی دار نیست.

گروه های آزمایشی	تعداد نقص های نورولوژیک در هر گروه					تعداد کل	میانه
	0	1	2	3	4		
نورموکسی نورموباریک متناوب (InRA)	0	3	4	2	0	9	2
هیپرکسی نورموباریک متناوب (InHO)	5	3	1	0	0	9	0
نورموکسی نورموباریک پیوسته (PrRA)	0	4	4	1	0	9	2
هیپرکسی نورموباریک پیوسته (PrHO)	3	5	1	0	0	9	1

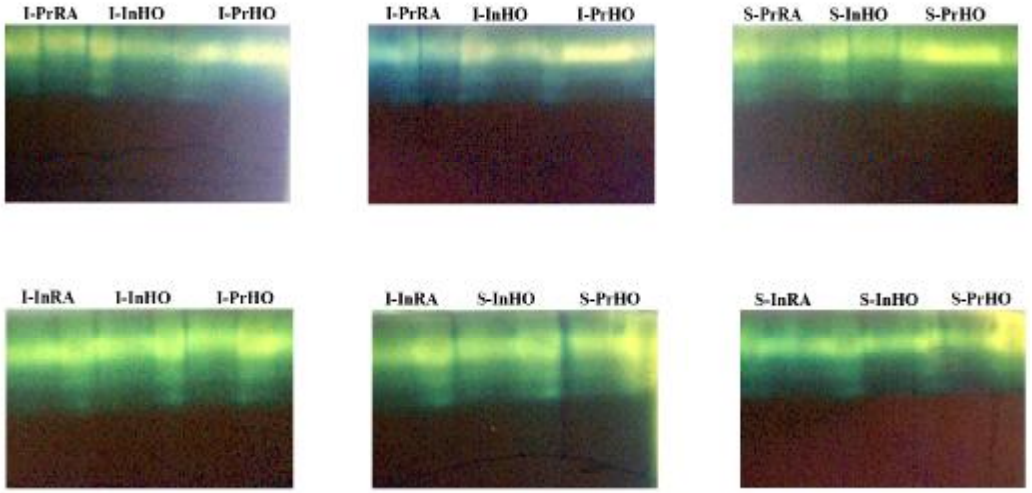


نمودار 1: اثر شرایط هیپرکسی نورموباریک (HO) و نورموکسی نورموباریک (RA) متناوب و پیوسته را بر روی حجم آسیب بافتی 48 ساعت بعد از پیش درمان نشان می دهد(*:P<0.05).

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2026-10-08]



نمودار 2: فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در گروه های مختلف آزمایش و کنترل.(*:P<0.01)



نمودار 3: رنگ آمیزی ژل الکتروفورز پلی اکریل آمید فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در گروه های مختلف آزمایش و کنترل.

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2026-10-08]

References

1. Dewir YH, Chakrabarty D, Ali MB, Hahn EJ Paek KY. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of Euphorbia millii hyperhydric shoots. Environmental and Experimental Botany 58; 2006. 93–99.
2. Kinouchi H, Epstein CJ, Mizui T, Carlson E, Chen SF, Chan PH. Attenuation of focal cerebral ischemic injury in transgenic mice overexpressing CuZn superoxide dismutase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991. 88(24):11158-62.
3. Das DK, Moraru II, Maulik N, and Engelman RM. Gene expression during myocardial adaptation to ischemia and reperfusion. Ann NY Acad Sci 1994.723: 292–307.
4. Bederson JB, Pitter LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. Stroke. 1986. 17(6):1304-8.
5. 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.
6. Lin CL, Chen HJ, Hou WC. 2002. Activity staining of glutathione peroxidase after electrophoresis on native and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. Electrophoresis. 23(4):513-6.
7. Genet S, Kale RK, Baquer NZ. 2002. Alterations in antioxidant enzymes and oxidative damage in experimental diabetic rat tissues: effect of vanadate and fenugreek (Trigonellafoenum graecum). Mol Cell Biochem. 236(1-2):7-12.
8. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem;72:248-54.
9. Helms A, Whelan H, Torbey M. 2005. Hyperbaric oxygen therapy of cerebral ischemia. Cerebrovascular dis. 20: 417-426.
10. Chen SH, Cheung RT. 2002. Peripheral and central administration of neuropeptide Y in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model reduces cerebral blood flow and increases infarct volume. Brain Res; 927(2):138-43.
11. Valen G. 2003. Cellular signalling mechanisms in adaptation to ischemia-induced myocardial damage. Ann Med. 35:300-307
12. Currie RW and Tanguay RM. 1991. Analysis of RNA for transcripts for catalase and HSP71 in rat hearts after in vivo hyperthermia. Biochem Cell Biol 69: 375–382.
13. Gidday JM, Fitzgibbons JC, Shah AR, Park TS. 1994. Neuroprotection from ischemic brain injury by hypoxic preconditioning in the neonatal rat. Neurosci Lett. 168(1-2):221-4.
14. Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Hata R, Ueda H, Niinobe M, Handa N, Fukunaga R, Kimura K, Mikoshiba K.

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2026-10-08]

1990. Ischemic tolerance phenomenon found in the brain. Brain Res 528:21–24.

15. Riepe MW, Esclaire F, Kasischke K, Schreiber S, Nakase H, Kempski O, Ludolph AC, Dirnagl U, Hugon J. 1997. Increased hypoxic tolerance by chemical inhibition of oxidative phosphorylation: "chemical preconditioning. J Cereb Blood Flow Metab 17:257–264.
16. Ohtsuki T, Matsumoto M, Kuwabara K, Kitagawa K, Suzuki K, Taniguchi N, Kamada T.1992. Influence of oxidative stress on induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. Brain Res 599:246–252.
17. Ravati A, Ahlemeyer B, Becker A, Klumpp S, Krieglstein J. 2001. Preconditioning-induced neuroprotection is mediated by reactive oxygen species and activation of the transcription factor nuclear factor-κB. J Neurochem 78:909–919.
18. Toyoda T, Kassell NF, Lee KS. 1997. Induction of ischemic tolerance and antioxidant activity by brief focal ischemia. Neuro Report 8:847– 851.
19. Shimazaki K, Ishida A, Kawai N. 1994. Increase in bcl-2 oncoprotein and the tolerance to ischemia-induced neuronal death in the gerbil hippocampus. Neurosci Res 20:95–99.
20. Bigdeli MR, Hajizadeh S, Froozandeh M, Heidarianpour A, Rasoulian B, Asgari AR, Pourkhalili K, Khoshbaten K. 2008. Normobaric Hyperoxia Induces Ischemic Tolerance and Upregulation of Glutamate Transporters in the Rat brain and Serum TNF-α Level. Exp Neurol. In press.
21. Bigdeli MR, Khoshbaten A. 2008. In vivo preconditioning with normobaric hyperoxia induces ischemic tolerance partly by triggering tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/tumor necrosis factor-alpha/nuclear factor-kappaB. Neuroscience. in press
22. Orrenius S, McCabe MJ J, Nicotera P. 1992. Ca(2+)-dependent mechanisms of cytotoxicity and programmed cell death. Toxicol Lett. 64-65:357-64.
23. Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P. 1995. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. Neuron. 15(4):961-73.
24. Linnik MD, Zobrist RH, Hatfield MD. 1993. Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. Stroke. 24(12):2002-9.
25. Oh DJ, Kim YH, Kim CH, Park JW, and Kim MS. 1997. Pretreatment of hyperbaric oxygenation increases the activation of myocardial antioxidant enzymes and protect the ischemiareperfusion injury of the heart. Korean J Physiol Pharmacol 1: 749–758.
26. Kim Y, Chun Y, Park J, Kim C, Kim M. 2002 Involvement of adrenergic pathways in activation of catalase by myocardial ischemia-reperfusionAm J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol 282: R1450–R1458.

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2026-10-08]

27. Fridovich I. 1986. Biological effects of the superoxide radical. Arch Biochem Biophys. 247(1):1-11. Review.
28. Warner D, Sheng H, and Batinic-Haberle I. 2004. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. J Exp Biol 207, 3221-3231
29. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. 1989. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke; 20(1):84-91.
30. Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu G, Savalos RA, Davidson C, Sharp FR. 1990. A semiautomated method for measuring brain infarct volume. J Cereb Blood Flow Metab. 10(2):290-3.
31. Xia E, Rao G, Van Remmen H, Heydari AR, Richardson A. 1995. Activities of antioxidant enzymes in various tissues of male Fischer 344 rats are altered by food restriction. J Nutr;125(2):195-201.
32. Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature 227. 680-685.
33. Hendricks PL, Hall DA, Hunter WL Jr, Haley PJ. 1977. Extension of pulmonary O2 tolerance in man at 2 ATA by intermittent O2 exposure. J Appl Physiol. 42(4):593-9.
34. Al-Motabagani MA. 2005. Histological changes in the alveolar structure of the rat lung after exposure to hyperoxia. Ital J Anat Embryol. 110(4):209-23.
35. Leong KG,Karsan A 2000. Signaling pathways mediated by tumor necrosis factor a. Histol Histopathol 15:1303 .1325.
36. Namba, K., Takeda, Y., Sunami, K. and Hirakawa, M. 2001. Temporal profiles of the levels of endogenous antioxidants after four-vessel occlusion in rats. J. Neurosurg. Anesthesiol. 13, 131-137.

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2026-10-08]