The effect of prolonged and intermittent normobaric hyperoxia preconditioning on glutathione reductase activity in the rat stroke model

MR Bigdeli* AA Meratan**

* Assistant professor of physiology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
** PhD student, Institute of Biochemistry and Biophysics, Tehran University, Tehran, Iran

Abstract

Background: Ischemic preconditioning (IPC) is an endogenous phenomenon that can induce ischemic tolerance (IT) in a variety of organs such as brain.

Objective: To investigate the intermittent and prolonged dose of normobaric hyperoxia (HO) on neurologic deficit scores, infarct volume, and glutathione reductase activity.

Methods: this was an experimental study carried out in Shahid Beheshti University of Medical Sciences in Tehran, Iran. A total of 80 rats were initially divided into four main groups. The first two groups were exposed to HO in prolonged (24h; PrHO; 95% O_2) and intermittent (4h×6days; InHO; 95% O_2) groups and the second two groups served as controls and exposed to 21% oxygen in the same chamber (room air, RA) continuously (24h; PrRA) and discontinuously (4h×6days; InRA). Each group was further subdivided into three subgroups. After 24 h, the first subgroup was subjected to 60 minutes middle cerebral artery occlusion (MCAO) followed by 24h of reperfusion. Later, the IT induced by InHO and PrHO, were measured by neurologic deficit scores and infarct volume. The second and third subgroups were marked as sham-operated and intact subgroups for assessing the effect of HO on glutathione reductase activity.

Findings: Our findings indicated that the InHO and PrHO are involved in induction of IT. Pre-treatment with InHO and PrHO reduced the neurologic deficit scores and infarct volume, significantly. The InHO and PrHO caused a significant increase in glutathione reductase activity. The catalase activity of prolonged HO groups was significantly higher than that of intermittent HO groups.

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

Keywords: Cerebrovascular Disorders, Normobaric Hyperoxia, Glutathione Reductase, Ischemic, Preconditioning

Corresponding Address: Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University, Evin, Tehran, Iran.
Email: bigdelimohammadreza@yahoo.com
Tell: +98 21 29902731
Received: 2008/05/06
Accepted: 2008/10/12

اثر پیش‌شرطی‌سازی با هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب بر فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردکتاز در مدل سکته مغزی رت

دکتر محمدرضا بیگدلی* علی اکبر مراتان**

* استادیار فیزیولوژی دانشکده علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی
** دانشجوی دکترای بیوشیمی مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران

آدرس مکاتبه: تهران، اوین، دانشکده علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی، تلفن ۲۹۹۰۲۷۳۱ -۰۲۱ Email: bigdelimohammadreza@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۷/۲/۱۷ تاریخ پذیرش: ۸۷/۷/۲۱

***چکیده**

زمینه: پیش‌شرطی‌سازی به ایسکمی یکی از پدیده‌های درون زاد است که می‌تواند توسط عوامل مختلف و از مسیرهای مولکولی متفاوت در بافت‌های مختلف مانند مغز ایجاد شود.

هدف: مطالعه به منظور تعیین اثر پیش شرطی سازی به واسطه هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب بر فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردکتاز در مدل سکته مغزی رت انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی در سال ۱۳۸۶ در دانشگاه شهید بهشتی انجام شد. ۸۰ رت در چهار گروه به صورت گروه‌های پیوسته (۲۴ ساعت پیوسته) و متناوب (۴ ساعت در روز به مدت ۶ روز) در معرض هیپرکسی نورموباریک (۹۵٪ اکسیژن) و نورموکسی نورموباریک (هوای اتاق، ۲۱٪ اکسیژن) قرار گرفتند. هر گروه به سه زیرگروه تقسیم شدند. زیرگروه اول، بعد از ۲۴ ساعت تحت جراحی انسداد شریان میانی مغز (MCAO) به مدت ۶۰ دقیقه قرار گرفتند و سپس ۲۴ ساعت به آنها اجازه برقراری مجدد جریان خون داده شد. زیرگروه دوم و سوم به نام زیر گروه شم (بدون MCAO) و گروه دست نخورده (بدون جراحی) برای بررسی اثر هیپرکسی نورموباریک بر میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردکتاز در نظر گرفته شدند. داده‌ها با آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و من-ویتنی یو تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: هیپرکسی نورموباریک متناوب و پیوسته در القای تحمل به ایسکمی درگیر بودند. پیش درمان با هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب نقص‌های عصب شناسی بهبود بخشیدند، حجم سکته مغزی را کاهش دادند و میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردکتاز را به طور معنی‌دار افزایش دادند اثر هیپرکسی نورموباریک پیوسته نسبت به گروه هیپرکسی نورموباریک متناوب بر میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردکتاز بیش‌تر بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌ها هیپرکسی نورموباریک ممکن است آثار حفاظت عصبی خود را تا حدی از طریق افزایش میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردکتاز نشان دهد.

کلیدواژه‌ها: اختلالات عروقی مغز، نوروموباریک هیپرکسی، گلوتاتیون ردکتاز، ایسکمی، پیش‌شرطی‌سازی

***مقدمه:**

تحریک‌های آسیب‌رسان در دوزهای پایین‌تر از آستانه آسیب‌رسان به سلول، پاسخ سازشی القا می‌کنند که مغز را در برابر تنش‌های دیگر حفاظت می‌کنند.[۱] تنش‌های مختلف از قبیل هیپوکسی، ایسکمی، تشنج، آنوکسی، افسردگی منتشر، گرما، تنش اکسیداتیو، تیمار با اسیدهای چرب اشباع نشده و مهارکننده‌های فسفوریلاسیون اکسیداتیو فرایند تحمل مغز در برابر ایسکمی کامل یا کانونی را القا می‌کنند.[۲] چندین گزارش وجود دارد که هیپرکسی نیز باعث بروز تحمل به ایسکمی می‌شود.[۳]

مطالعه‌های اخیر نشان می‌دهند که افزایش ساخت پروتئین‌های خاص در مغز مانند پروتئین شوک گرمایی ۷۰، Bcl2، ناقلین گلوتامات، سوپراکسید دیسموتاز، عوامل آنتی آپوپتوز، گونه‌های واکنشی اکسیژن،

NF-kB و سایتوکین‌های پیش التهابی تحمل نورون را در برابر ایسکمی افزایش می‌دهد.[۴و۵]

یکی از تظاهرهای بالینی آسیب ناشی از ایسکمی در دستگاه عصبی مرکزی (CNS) ادم مغزی ناشی از شکستن سد خونی مغزی است که به واسطه پیش شرطی‌سازی با هیپرکسی نورموباریک قابل بهبود است.[۲] آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ادم مغزی را بعد از انوع آسیب ها کاهش می‌دهد.[۶] این امر بیان می‌کند که اکسیژن رادیکالی نقش مهمی در شکستن سد خونی مغزی ایفا می‌کند. تظاهرهای دیگر آسیب CNS، آسیب مستقیم به سلول‌های عصبی است که آزادسازی گلوتامات بعد از ایسکمی مغزی را القا می‌کنند. این آسیب نیز به واسطه پیش‌شرطی سازی با هیپرکسی نورموباریک از طریق افزایش بیان ناقلین گلوتامات کاهش می‌یابد.[۴] پژوهش‌ها نشان می‌دهند که تنش خفیف ایسکمی بیان mRNA چندین ژن از قبیل ژن کاتالاز را افزایش می‌دهد که نیم ساعت بعد از تنش ایسکمی به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد.[۷و۸] 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 تحمل به آسیب‌های ایسکمی در اثر افزایش ظرفیت آنزیم آنتی‌اکسیدان القا می‌شود.[۹]

آنزیم‌های دفاعی آنتی اکسیدان شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD) کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPOX)، و گلوتاتیون ردوکتاز (GR) هستند. سطوح فعالیت آنها برای اندازه‌گیری تنش اکسیداتیو در سلول استفاده می‌شود.[۱۰]

گلوتاتیون ردکتاز بازگشت گلوتاتیون به حالت اولیه یعنی از دی‌سولفیدگلوتاتیون به گلوتاتیون (GSSG) از طریق احیای آن را کاتالیز می‌کند.[۱۱] دی سولفید گلوتاتیون و گلوتاتیون از لحاظ زیست شناسی به عنوان تیول‌های داخل سلولی اهمیت زیادی دارند و تغییرات نسبت بین دی‌سولفیدگلوتاتیون و گلوتاتیون اغلب به عنوان شاخص تنش اکسیداتیو مورد استفاده قرار می‌گیرند.

لذا، مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر مطالعه به منظور تعیین اثر پیش شرطی سازی به واسطه هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب بر فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردکتاز در مدل سکته مغزی رت انجام شد.

* مواد و روش‌ها:

در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۸۶ در دانشگاه شهید بهشتی انجام شد، رت‌های اسپیراگو- دالی با وزن ۲۵۰ تا ۳۸۰ گرم به طور تصادفی به چهار گروه شامل ۲۰ حیوان تقسیم شدند. شرایط نگه‌داری از حیوان‌ها از نظر روشنایی و محیط زندگی استاندارد بود و مطابق مصوبه کمیته اخلاق زیستی دانشگاه شهید بهشتی آزمایش شدند. دو گروه در درون جعبه اکسیژن با غلظت بالای ۹۰ درصد تحت عنوان شرایط هیپرکسی نورموباریک (HO) قرار داده شدند. از این دو گروه، یک گروه به صورت پیوسته (۲۴ ساعت، PrHO) و دیگری به صورت متناوب (۴ساعت در روز به مدت ۶ روز، InHO) در معرضHo قرار گرفتند. دو گروه دیگر نیز پیوسته (۲۴ ساعت، PrRA) و متناوب (۴ ساعت در روز به مدت ۶ روز، InRA) در معرض اکسیژن ۲۱ درصد (RA، هوای اتاق) قرار گرفتند. سپس، حیوان‌ها به مدت ۲۴ ساعت در هوای اتاق قرار گرفتند و هر کدام از این گروه ها به سه زیر گروه تقسیم شدند. زیر گروه‌های اول به مدت ۶۰ دقیقه تحت جراحی انسداد شریان مرکزی (MCAO) قرار گرفته و ۲۴ ساعت بعد از لحاظ نقص‌های حرکتی و حجم سکته مغزی بررسی شدند. زیر گروه‌های دوم به عنوان گروه شم (S-InHO, S-InRA, S-PrHO, S-PrRA) همان آزمایش‌های گروه اول را بدون جراحی MCAO دریافت کردند زیر گروه‌های سوم به عنوان گروه دست نخورده (I-InRA, I-PrHO, I-PrRA, I-InHO) همان

آزمایش‌های گروه اول را بدون هیچ گونه جراحی دریافت کردند. این دو گروه برای بررسی اثر خالص پیش شرطی‌سازی با هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب بر میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردکتاز طراحی شده بودند.

تعداد ۹ رت در داخل یک جعبه در ابعاد ۳۰×۳۵×۶۵ سانتی‌متر با دو مجرای ورودی و خروجی قرار داده شدند. ماده‌ای به نام سودا لیم (جاذب دی اکسید کربن) در زیر جعبه قرار داده شد تا دی اکسید کربن تولیدی را جذب کند. بدین ترتیب، امکان تغییر غلظت گاز داخل جعبه به حداقل رسید. اکسیژن خالص (F_IO_2= ۰/۹۵) یا هوای اتاق به میزان ۳ لیتر در دقیقه برای تیمار جانوران به جعبه حاوی رت‌ها متصل شد. برای افزایش دقت آزمایش یک الکترود سنجش اکسیژن نیز در کنار جعبه در نظر گرفته شد تا غلظت اکسیژن داخل جعبه را اندازه‌گیری کند. کمیت خون با دستگاه گازهای شریانی (AVL-993) اندازه‌گیری شدند. تعداد تنفس به واسطه باند نشانه حرکت‌های عضله دیافراگم در ناحیه شکم اندازه‌گیری شد.

رت‌ها بعد از توزین، با ۴۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن داروی کلرات هیدرات (مرک، آلمان) بی‌هوش شدند. جراحی مدل سازی MCAO مطابق دستورالعمل لونگا و همکاران انجام شد.[۱۲] به طور خلاصه، تحت جراحی میکروسکوپی، یک نخ بخیه نایلون از طریق تنه شریان کاروتید خارجی(ECA) وارد رگ می‌شد و تا رسیدن به شریان مغذی قدامی(ACA) از میان شریان کاروتید داخلی ICA با پتریگوپالاتین بسته ادامه داده می‌شد. در اثر تماس نخ بخیه و ACA جریان خون از هر طرف به شریان مغزی میانی (MCA) بسته می‌شد. این 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 و در حوالی ۳۷ درجه حفظ می‌شد.

معاینه‌های عصبی بعد از ۲۴ ساعت انجام شد. در طول ۲۴ ساعت بعد از شروع انسداد تا قربانی شدن حیوان، مراقبت‌های ویژه انجام شد. یافته‌های عصبی در ۵ مقیاس دسته بندی شدند: شماره صفر یعنی هیچ گونه عارضه عصبی مشاهده نشود، شماره ۱ (نارسایی کامل در انتهای پنجه‌های جلویی) یک نقص عصبی کانونی خفیف، شماره ۲ (به چپ چرخیدن) نقص عصبی کانونی متوسط، شماره ۳ (افتادن به سمت چپ) نقص کانونی شدید و شماره ۴ عدم توانایی در راه رفتن به طور خود به خودی و کاهش سطح هوشیاری.[۱۲و۱۳]

بعد از قربانی کردن رت‌ها با کلرال هیدرات (۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن)، سر آنها جدا و مغز به سرعت خارج شدند و در سالین ۴ درجه به مدت ۱۵ دقیقه نگه‌داری شدند. هشت برش به ضخامت ۲ میلی‌متر به صورت کرونال به واسطه دستگاه ماتریکس مغز تهیه شدند که شروع آنها از پیاز بویایی بود. برش‌های بافتی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محلول ۲ درصد ۵، ۳ و ۲ و تری فنیل تترازولیوم کلراید نگه‌داری و سپس با دوربین دیجیتال تصویربرداری 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 اندازه‌گیری شدند. حجم نواحی آسیب دیده و سالم برش‌ها از طریق محاسبه حاصل ضرب مساحت نواحی مذکور در ضخامت ۲ میلی‌متر برش به دست آمد و سپس به واسطه معادله زیر حجم اصلاح شده ناحیه آسیب دیده محاسبه شد.[۱۴]

(حجم ناحیه آسیب‌دیده- حجم نیم کره راست)- حجم نیم کره چپ= حجم اصلاح شده ناحیه آسیب دیده

در رت‌هایی که به واسطه قرار گرفتن در معرض هیپرکسی هیچ گونه نقص عصبی مشاهده نشده بود، با

تزریق اوانس آبی، این رنگ در ناحیه مرکزی سکته مشاهده می شد.

نمونه‌ها (۱۵۰ تا ۲۰۰ میلی‌گرم از بافت نیم کره راست) در یک میلی‌لیتر بافر (۰/۳۲ مول در لیتر ساکاروز، ۱ میلی مول در لیتر EDTA، و ۱۰ نانومول در لیتر تریس هیدروکلرید با PH= ۷/۴) با هموژنیزر شیشه تفلون هموژن شدند. هموژن با سرعت g۱۳۶۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریوفوژ شد. سپس سوپر ناتانت برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز جمع‌آوری شد.[۱۵] غلظت پروتئین بر اساس روش برادفورد با استفاده از استاندارد آلبومین سرم گاوی اندازه‌گیری شد.[۱۶]

فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردکتاز به واسطه روش رومرو و همکاران با اندکی تغییر انجام شد.[۱۷] مخلوط سنجش نهایی حاوی ۰/۱ مولار بافر فسفات پتاسیم، pH ۷/۰، ۲/۵ میلی مولار GSSG و ۱۲۵ میلی مولار NADPH در دمای ۲۵ درجه در جذب نوری ۳۴۰ نانومتر مخلوط سنجش نهایی 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 ۱ میکرومول NADPH در یک دقیقه در یک میلی‌گرم پروتئین شود.

سطح فعالیت آنزیم، حجم سکته مغزی و میزان گازهای خون شریانی با استفاده از آزمون ANOVA و امتیازهای نقص عصبی با استفاده از آزمون من ویتنی تجزیه و تحلیل شدند. مقادیر p کم‌تر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

***یافته‌ها:**

براساس آزمایش گازهای خون شریانی، فشار اکسیژن شریانی در شرایط هیپرکسی بسیار بالاتر از شرایط نورموکسی بود (جدول شماره ۱).

میانه امتیازهای نقص عصبی (NDS) به واسطه قرارگیری در معرض هیپرکسی نورموباریک به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت (جدول شماره ۲). تزریق اوانس آبی نشان داد که در تمام رت‌ها انسداد شریان مرکزی مغز انجام شده، ولی به دلیل بروز پدیده تحمل به ایسکمی القایی هیپرکسی به ویژه در ناحیه پنومبرا (قشر مغز) استحکام سد خونی-مغزی افزایش یافته است.

جدول ۱- وضعیت گازهای خون شریانی و تنفسی در پایان تیمار با هیپرکسی نورموباریک

گروه های آزمایشی	pH	PCO_2 (mmHg)	PO_2 (mmHg)	میزان تنفس (هرتز)
نورموکسی نورموباریک متناوب (InRA)	۷/۴±۰/۰۲	۴۱/۶±۰/۷۵	۹۲/۳±۱/۲۵	۱/۶۱±۰/۰۴
هیپرکسی نورموباریک متناوب (InHO)	۷/۳±۰/۰۱	۳۹/۰±۱/۳	۳۶۰±۷/۴۵*	۱/۳±۰/۰۹
نورموکسی نورموباریک پیوسته (PrRA)	۷/۳۷±۰/۰۲	۴۰/۳±۰/۷۵	۹۳/۱±۰/۸۳	۱/۵۹±۰/۰۸
هیپرکسی نورموباریک پیوسته (PrHO)	۷/۳۵±۰/۰۲	۳۹/۳±۱/۳	۳۵۵±۵/۲*	۱/۲۹±۰/۰۴

*p<۰/۰۰۱

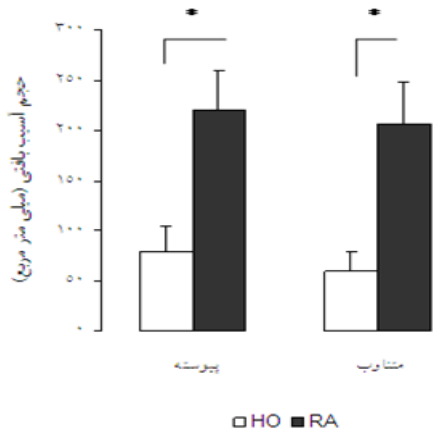
جدول ۲- مقایسه امتیازهای نقص عصبی در گروه‌های آزمایشی

گروه‌های آزمایشی	تعداد نقص‌های عصبی در هر گروه					تعداد کل	میانه
	۰	۱	۲	۳	۴		
نورموکسی نورموباریک متناوب (InRA)	۰	۳	۴	۲	۰	۹	۲
هیپرکسی نورموباریک متناوب (InHO)	۵	۳	۱	۰	۰	۹	۰
نورموکسی نورموباریک پیوسته (PrRA)	۰	۴	۴	۱	۰	۹	۲
هیپرکسی نورموباریک پیوسته (PrHO)	۳	۵	۱	۰	۰	۹	۱

(مقایسه گروه های ردیف InRA: InHO و PrRA: PrHO معنی دار بود، اما InHO:PrHO معنی دار نبود)

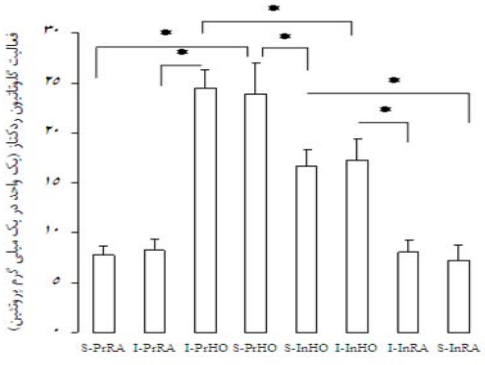
هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب در مقایسه با نورموکسی نورموباریک باعث کاهش حجم آسیب بافتی شد. تفاوت آماری گروه های هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب معنی دار نبود، ولی تفاوت گروه های مذکور نسبت به گروه شم نورموکسی نورموباریک از نظر آماری معنی‌دار بود (p<۰/۰۵) (نمودار شماره۱).

نمودار ۱- اثر شرایط هیپرکسی نورموباریک (HO) و نورموکسی نورموباریک (RA) متناوب و پیوسته بر روی حجم آسیب بافتی ۴۸ ساعت بعد از پیش درمان



هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب در مقایسه با نورموکسی نورموباریک باعث افزایش سطح فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردکتاز بعد از پایان پیش درمان هیپرکسی شد. اثر هیپرکسی نورموباریک پیوسته بر میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردکتاز به طور معنی‌دار بیش‌تر از اثر هیپرکسی نورموباریک پیوسته بود(p<۰/۰۱)(نمودار شماره۲).

نمودار ۲- فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردکتاز (GR) در گروه‌های مختلف آزمایش و کنترل



*بحث و نتیجه گیری:

بر اساس نتایج این مطالعه، به نظر می‌رسد هیپرکسی نورموباریک پیوسته و متناوب می‌توانند نقص عصبی و حجم آسیب مغزی حاصل از سکته مغزی در مدل MCAO را به طور مؤثر کاهش دهند. در حالی که اثر هیپرکسی نورموباریک پیوسته خفیف‌تر است. دمای بدن، گازهای خون، ضربان قلب و فرکانس تنفس طی آزمایش در محدوده طبیعی قرار داشتند. البته در گروه‌های هیپرکسی به علت غلظت بالای اکسیژن، اکسیژن خون افزایش و فرکانس تنفس کاهش یافت.

نتایج پژوهش حاضر با سایر مطالعه ها در زمینه تحمل به ایسکمی مطابقت دارد.[۱۰و۱۱] تحمل به ایسکمی در بافت‌های مغزی بر اساس مدت زمان و مقدار غلظت اکسیژن متفاوت بود. بنابراین، کمیت و کیفیت تجویز اکسیژن در القای تحمل به ایسکمی، عوارض جانبی و مسمومیت‌های آن اهمیت دارد.

هیپرکسی نورموباریک پیوسته آثار جانبی و خواص سمی دارد.[۱۸] نتایج سایر محققین نشان می‌دهد که هیپرکسی نورموباریک پیوسته کم‌تر از ۲۴ ساعت آثار تحمل به ایسکمی را نشان نمی‌دهد.[۲] گزارش‌های دیگر نشان می دهد که قرار گرفتن در معرض اکسیژن ۹۵ درصد به مدت ۲۴ساعت به احتقان شدید ریوی منجر می‌شود که در آنجا خروج گلبول‌های قرمز خون، ادم و تغییر در ساختمان آلوئولی اتفاق می‌افتد. حتی بعد از ۲ هفته نیز بهبودی ساختمان آلوئولی کامل نمی‌شود. بنابراین، تجویز اکسیژن به صورت پیوسته به اختلال عملکردی ریه‌ها منجر می‌شود.[۱۸] مدارک دیگر نشان می‌دهد که پدیده حفاظت قلبی در حیوان‌هایی که در معرض هیپوکسی منقطع (اکسیژن رسانی مجدد و مکرر) قرار می‌گیرند، در مقایسه با حیوان‌هایی که هیپوکسی پیوسته را تجربه می‌کنند قوی‌تر بروز می‌کند.[۵] بنابراین، با در نظر گرفتن نتایج فوق هیپرکسی متناوب سمیت کم‌تر و آثار تحمل به ایسکمی بیش‌تری القا می‌کند.

نتایج تحقیق حاضر نشان می دهد کـه هیپرکـسی در مغز رت به واسطه کاهش حجـم آسـیب بـافتی و امتیـاز نقص عصبی، حفاظـت عـصبی (Neuroprotection) را القا می‌کند. اما هیپرکسی بـه واسـطه آثـار دیگـری نیـز تحمل به ایسکمی را در مغز رت تقویـت مـی‌نمایـد کـه عبارتند از: ۱- رگ زایی و افزایش تراکم عروق در واحـد حجـم ۲- بلـوک شـدن مولکـول چـسبان بـین سـلولی (ICAM-1) و مهـار تجمـع نوتروفیـل‌هـا.[۱۹] بنـابراین، هیپرکسی می‌تواند تجمع نوتروفیل ها را کاهش دهد و از آسیب مغزی بکاهـد. وادا و همکـاران نـشان دادنـد کـه رادیکـال‌هـای آزاد اکـسیژن و Bcl-2 کـه بـه عنـوان مهارکننده آپوپتوز عمل می‌کنند بعد از قرار گرفتن مکـرر در معرض هیپرکسی افزایش می‌یابنـد و باعـث افـزایش تـوان زیـستی نـورونی مـی‌شـوند.[۴] عـلاوه بـر ایـن، رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌توانند بـا افـزایش TNF-α باعث بروز پدیده تحمل به ایـسکمی شـوند.[۲۰] از طـرف دیگـر، افـزایش رادیکـال‌هـای آزاد بـا افـزایش فعالیـت سوپراکسید دیسموتاز خنثی می شود و ایـن رونـد باعـث کاهش آسیب القایی هیپوکسی می گردد و این فرایند به بهبود عملکرد سـد خـونی مغـزی کمـک مـی کنـد کـه احتمالاً این عمل را از طریق کاهش عامل رشد عروقـی انجام می‌دهد.

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن و اکسیژن تبدیل می‌کنند. پراکـسید هیـدروژن می‌تواند به رادیکال هیدروکسیل تبدیل شود.[۲۱] بنـابراین حذف پراکسید هیدروژن برای تکمیـل کـار سوپراکـسید دیسموتاز، کاهش آثار مضر تنش اکسیداتیو حیاتی اسـت. حذف پراکسید هیـدروژن را آنـزیم کاتـالاز و گلوتـاتیون پراکسیداز انجام می‌دهند. این آنزیم‌ها در بافت مغز وجود دارند. فعالیت آنـزیم گلوتـاتیون پراکـسیداز هفـت برابـر بیش‌تر از آنزیم کاتالاز است. لذا، وجود این آنـزیم بـرای حذف رادیکال هیدروکسیل بسیار اساسـی اسـت.[۲۲] بـر خلاف آنزیم کاتالاز که در داخـل پراکـسیزوم هـا انجـام وظیفه می‌کند، آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در سیتوزول در برابر تنش اکـسیداتیو مقابلـه مـی‌کنـد. فقـدان ژن‌هـای گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز باعث افزایش آسـیب‌هـای نورونی حاصل از مـدل سـکته مغـزی در رت مـی‌شـود. مطالعه‌ها نشان داده‌انـد کـه افـزایش فعالیـت کاتـالاز و گلوتاتیون پراکسیداز باعث کاهش مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، فعال‌سازی آستروسیت‌ها و میکروگلیاهـا و خـروج عناصر ضدالتهابی می‌شود.[۲۲] از طرف دیگـر مطالعـه‌هـا نشان مـی‌دهنـد کـه فقـدان ژنتیکـی آنـزیم گلوتـاتیون پراکسیداز موجب افزایش آسیب‌های حاصل از ایسکمی و برقراری مجدد جریان خون نمـی‌شـود، زیـرا آثـار آنـزیم گلوتـاتیون پراکـسیداز توسـط آنـزیم کاتـالاز پـشتیبانی می‌شود و تا حد زیـادی اجـازه بـروز آثـار فقـدان آنـزیم گلوتاتیون پراکسیداز را نمی‌دهد.[۷]

نتـایج مطالعـه حاضـر نـشان داد کـه فعالیـت آنـزیم گلوتـاتیون ردکتـاز بـه واسـطه هیپرکـسی نورموباریـک پیوسته و متناوب افزایش می‌یابـد. البتـه اثـر هیپرکـسی نورموباریک پیوسته بـیش‌تـر از هیپرکـسی نورموباریـک متناوب بود. از طرف دیگـر، اسـتفاده از روش هیپرکـسی نورموباریک متناوب به علت آثار سمی پایین برای القـای پدیده تحمل به ایسکمی مناسب‌تر است. لـذا، اسـتفاده از هیپرکسی نورموباریک یا طراحی موادی که قادر به تقلید از آثار هیپرکسی نورموباریک در افـزایش فعالیـت آنـزیم گلوتـاتیون ردکتـاز باشـند، روش و راهبـرد جدیـدی در پیدایش دارو ها به وجود خواهد آورد کـه در بـه حـداقل رساندن آسیب‌های نورونی طی ایسکمی مغزی یـا حـین پیشروی بیماری‌های مزمن تحلیل عصبی درگیـر بـا اثـر سمی ناشی از تحریک کمک خواهد کرد.

***مراجع:**

1. Romera C, Hurtado O, Botella SH, et al. In Vitro ischemic tolerance involves upregulation of glutamate transport partly mediated by the TACE/ ADAM17-tumor necrosis factor-alpha pathway. J Neurosci 2004 Feb 11; 24 (6): 1350-7

2. Bigdeli MR, Hajizadeh S, Froozandeh M, et al. Prolonged and intermittent with normobaric hyperoxia induce different degrees of ischemic tolerance in rat brain tissue. Brain Res 2008; 1152: 228-33

3. Zhang X, Xiong L, Hu W, et al. Preconditioning with prolonged oxygen exposure induces ischemic tolerance in the brain via oxygen free radical formation. Can J Anaesth. 2004 Mar; 51(3): 258-63

4. Bigdeli MR, Hajizadeh S, Froozandeh M, et al. Normobaric hyperoxia induces ischemic tolerance and upregulation of glutamate transporters in the rat brain and serum TNF- alpha level. Exp Neurol 2008 Aug; 212(2): 298-306

5. Bigdeli MR, Khoshbaten A. In vivo preconditioning with normobaric hyperoxia induces ischemic tolerance partly by triggering tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/tumor necrosis factor-alpha/nuclear factor-kappa B. Neuroscience 2008 May 15; 153(3): 671-8

6. Genet S, Kale RK, Baquer NZ. Alterations in antioxidant enzymes and oxidative damage in experimental diabetic rat tissues: effect of vanadate and fenugreek (Trigonellafoenum graecum). Mol Cell Biochem. 2002 Jul; 236(1-2): 7-12

7. Noshita N, Sugawara T, Hayashi T, et al. 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 Sep 15: 22(18): 7923-30

8. Oh DJ, Kim YH, Kim CH, et al. Pretreatment of hyperbaric oxygenation increase the activation of myocardial antioxidant enzymes and protect the ischemiareperfusion injury of the heart. Korean J Physiol Pharmacol 1997; 1: 49-58

9. Das DK, Moraru II, Maulik N, Engelman RM. Gene expression during myocardial adaptation to ischemia and reperfusion. Ann N Y Acad Sci 1994 Jun 17; 723: 292-307

10. Kim Y, Chun YS, Park JW, et al. Involvement of adrenergic pathways in activation of catalase by myocardial ischemia-reperfusion. Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol 2002 May; 282(5): R1450-8

11. Warner D, Sheng H, and Batinic-Haberle I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. J Exp Biol 2004 Aug; 207 (pt 18): 3221-31

12. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke 1989 Jan; 20(1): 84-91

13. Bederson JB, Pitter LH, Germano SM, et al. Evaluation of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. Stroke 1986 Nov-Dec; 17(6):1304-8

14. Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu G, et al. A semiautomated method for measuring brain infarct volume. J Cereb Blood Flow Metab 1990 Mar; 10(2): 290-3

15. Xia E, Rao G, Van Remmen H, et al. Activities of antioxidant enzymes in various tissues of male Fischer 344 rats are altered by food restriction. J Nutr 1995 Feb; 125(2):195-201

16. 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 May 7; 72: 248-54

17. Romero FJ, Romá J, Bosch-Morell F, et al. Reduction of brain antioxidant defense upon treatment with butylated hydroxyanisole (BHA) and Sudan III in Syrian golden hamster. Neurochem Res 2000 Mar; 25(3): 389-93
18. Al-Motabagani MA. Histological changes in the alveolar structure of the rat Lung after exposure to hyperoxia. Ital J Anat Embryol 2005 Oct-Dec; 110(4): 209-23
19. Helms A, Whelan H, Torbey MT. Hyperbaric oxygen therapy of cerebral ischemia. Cerebrovasc Dis 2005; 20(6): 417-26
20. Leong KG, Karsan A. Signaling pathways mediated by tumor necrosis factor alpha. Histol Histopathol 2000 Oct; 15(4):1303-25
21. Okado-Matsumoto A, Fridovich I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu, Zn-SOD in mitochondria. J Biol Chem 2001 Oct 19; 276(42): 38388-93
22. Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Narasimhan P, et al. Copper-zinc superoxide dismutase prevents the early decrease of apurinic/apyrimidinic endonuclease and subsequent DNA fragmentation after transient focal cerebral ischemia in mice. Stroke 1999 Nov; 30(11):2408-15