Physiology and Pharmacology, 13 (1), 18 - 27
Spring 2009 [Article in Persian]

Physiology
and
Pharmacology

The Effect of Normobaric Hyperoxia on Superoxide Dismutase Activity and Neurological Deficits in an Animal Model of Huntington disease

Mohammad Reza Bigdeli *, Mehdi Rahnema

Dept. Biology, Islamic Azad University- Zanjan Branch, Zanjan, Iran

Received: 4 Dec 2008 **Revised: 3 Fab 2009** **Accepted: 19 Fab 2009**

Abstract

Introduction: recent studies have shown that normobaric hyperoxia (HO) can induce excitotoxicity and oxidative stress tolerance (ETT) in a variety of organs such as brain. In this study, we examined the effect of intermittent doses of normobaric hyperoxia (HO) on the neurological deficit and superoxide dismutase activity in the brain tissue of an animal model of Huntington's disease.

Methods: Rats were divided into 3 groups. The first group was exposed to HO intermittently (4h × 6 days; HO) and the second 2 main groups acted as controls, and were exposed to 21% oxygen in the same chamber (room air, RA) or discontinuously (4h × 6 days; InRA). HO and RA groups were immediately given 20 mg/kg of 3-nitropropionic acid for 6 days, Administration of 3-nitropropionic acid generates an animal model of Huntington disease, because Huntington disease is a neurodegenerative disorder. Then, ETT induced by HO was measured by the evaluation of neurological deficits such as string, limb withdrawal, inclined plane, beam balance test, and assessment of superoxide dismutase activity.

Results: Our findings indicated that HO is involved in the induction of ETT. Pretreatment with HO significantly improved neurological deficits including string, limb withdrawal, inclined plane, beam balance test. Preconditioning with HO significantly increased superoxide dismutase activity.

Conclusion: Although further studies are needed to clarify the mechanisms of excitotoxicity tolerance, pretreatment with HO seems to partly exert its effects through the enhancement of cell viability and superoxide dismutase activity.

Keywords: brain preconditioning, normobaric hyperoxia, Huntington, excitotoxicity, tolerance, neurological deficits.

* Corresponding author e- mail: bigdelimohammadreza@yahoo.com
Available online @: www.phypha.ir/ppj

[Downloaded from ppj.phypha.ir on 2023-12-03]

فیزیولوژی و فارماکولوژی

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۳ (۱)، ۱۸ – ۲۷
بهار ۱۳۸۸

بررسی اثر پیش شرطی سازی هیپرکسی نورموباریک بر فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و نارسایی‌های نورولوژیک در مدل بیماری هانتینگتون

محمد رضا بیگدلی*، مهدی رهنما
گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، زنجان

دریافت: ۱۳آذر ۸۷ بازبینی: ۱۴بهمن ۸۷ پذیرش: ۳۰ بهمن ۸۷

چکیده

مقدمه: مطالعات اخیر بیان می‌کند که هیپرکسی نورموباریک (HO) باعث ایجاد پدیده تحمل به اکسیتوتوکسیسیتی و استرس اکسیداتیو در انواع اندام‌ها به خصوص مغز می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی اثر پیش شرطی سازی هیپرکسی نورموباریک بر نارسایی‌های نورولوژیک و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بافت مغزدر مدل جانوری بیماری هانتینگتون است.

روش‌ها: در این آزمایش رت‌ها در سه گروه دسته‌بندی می‌شوند. جانوران در گروه اول اکسیژن بالای ۹۰ درصد به مدت ۴ ساعت در روز به مدت ۶ روز استنشاق می‌کردند. جانوران گروه دوم و سوم هوای اتاق (RA) استنشاق می‌کردند. بلافاصله بعد از پایان پیش شرطی سازی، مدل سازی بیماری هانتینگتون با تزریق داخل صفاقی روزانه ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن اسید نیتروپروپیونیک (3-NP) در شش روز انجام می‌شد.

یافته‌ها: پیش شرطی سازی با HO باعث ایجاد پدیده تحمل به اکسیتوتوکسیسیتی می‌شود. پیش شرطی سازی با HO در مقایسه با هوای اتاق باعث کاهش معنی‌دار نقص نورولوژیک مانند تعادل بر روی میله، زمان عقب کشیدن اندام حرکتی، زمان پنجه گیری، افتادن از سطح شیب‌دار می‌شد. همچنین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در شرایط هیپرکسی افزایش می‌یافت.

نتیجه‌گیری: اگرچه مطالعات بیشتری برای وضوح مکانیسم‌های بهبود دهنده پیش شرطی سازی لازم است، اما HO ظاهراً تا حدی آثارشان را از طریق مقاوم سازی سلولها با پیش شرطی سازی و افزایش میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید انجام می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: هیپرکسی نورموباریک، هانتینگتون، پیش شرطی سازی، نارسایی‌های نورولوژیک.

مقدمه

بیماری‌های تحلیل بر عصبی مانند بیماری‌های آلزایمر، پارکینسون، و هانتینگتون بیماری‌های چند عاملی هستند که در آنها مکانیسم‌هایی از قبیل اکسیتوتوکسیسیتی (سمیت حاصل از تحریک[1])، نقص عملکردی میتوکندری، و استرس اکسیداتیو با همدیگر میان کنش می‌دهند و منجر به اختلالات رفتاری و نوروشیمیایی می‌شوند [۱۲،۱۷]. در مدل رت هانتینگتون با اسید ۳- نیتروپروپیونیک (3-NP) احتمالاً هر سه مکانیسم در گیرند [۱]. اسید ۳- نیتروپروپیونیک به صورت غیرقابل برگشت سوکسینات دهیدروژناز را مهار می‌کند. سوکسینات دهیدروژناز آنزیمی سراسری در غشای در مجموعه دوم زنجیره انتقال الکترون و چرخه کربس است. این مهار، عملکرد میتوکندری را به خطر می‌اندازد و منجر به تخلیه ATP، استرس اکسیداتیو و فعال سازی گیرنده‌های NMDA از طریق افزایش غلظت

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: bigdelimohammadreza@yahoo.com
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

1. Excitotoxicity

[Downloaded from ppj.phypha.ir on 2023-12-03]

گلوتامات می‌شوند [۷،۶].

پاتولوژی مدل 3-NP به واسطه تحلیل انتخابی جسم مخطط[1] شناخته می‌شود که با آلودگی استروگلیایی که با افزایش بیان پروتئین اسیدی فیبریلی گلیال (GFAP) مرتبط است اتفاق می‌افتد [۲،۲۲]. نرون‌های گابارژیک به طور خاص مستعد مسمومیت القایی3-NP هستند که هنوز علت آن ناشناخته است [۱۷]. علائم رفتاری در رت هایی که در معرض دوزهای پایین و مزمن 3-NP از طریق اختلال فعالیت حرکتی شناخته می‌شود [۷،۶].

در بین رت‌های تیمار شده با 3-NP، واکنش‌های پاتولوژیکی و رفتاری بسیار متغییری وجود دارد [۱۵،۷]. اثر نژاد و سن رت بر میزان واکنش‌های پاتولوژیکی دخالت دارد. مثلاً، رت‌های ۴ و ۱۲ ماه نسبت به رت‌های ۱ ماهه مستعد تر هستند [۱۱]. اختلاف علائم رفتاری ممکن است به دوز و روش تجویز سم بستگی داشته باشد. به طوری که دوز پایین و مزمن از طریق تزریق داخل صفاقی پاسخ دو مرحله‌ای القا می‌کند، ابتدا هیپواکتیویتی[2] و سپس هیپراکتیویتی[3]، در حالی که دوزهای حاد تنها هیپراکتیویتی القا می‌کند [۲،۷]. تصور می‌شود که نقص‌های رفتاری در نتیجه تحلیل جسم مخطط و مهار سوکسینات دهیدروژناز باشند [۳]. از طرف دیگر، نشان داده شده است که حفاظت عصبی ناشی از پیش زمینه سازی به ایسکمی[4] (IPC) پدیده‌ای درون زاد است که تحمل به ایسکمی را در اندام‌های مختلف مانند قلب، کلیه و مغز القا می‌کند. اولین بار کیتاگاوا [۲۰] در سال ۱۹۹۰ دریافت که رت‌هایی که تحت ۵ دقیقه ایسکمی کلی مغزی زیر کشنده قرار می‌گیرند کاهش مرگ سلولیCA1 در هیپوکامپ را به نمایش می‌گذارند. پدیده IPC بعدها توسط عوامل دیگر از جمله هیپرکسی نورموباریک نیز به اثبات رسیده است [۴،۵]. هیپرکسی نورموباریک بر خلاف سایر روش‌های پیش شرطی سازی که فاقد پتانسیل پیاده سازی بالینی هستند می‌تواند به صورت بالینی مورد استفاده قرار گیرد. به همین دلیل استفاده از عوامل غیر فارماکولوژیکی مفید به نظر می‌رسد.

1. Striatal
2. Hypoactivity
3. Hyperactivity
4. Ischemic Preconditioning

همان طوری که گفته شد، بیماری هانتیگتون یک بیماری تحلیل عصبی است که مبنای آن سمیت حاصل از تحریک و استرس اکسیداتیو است که منجر به تخریب سلولی و آسیب بافتی می‌شود. همچنین همان طوری که ذکر شد هیپرکسی با ایجاد گونه‌های واکنشی اکسیژن (reactive oxygen species: ROS) نوعی شرایط زیر کشنده استرس اکسیداتیو را مهیا می‌سازد. بنابراین یکی از روش‌های مقابله با گونه‌های واکنشی اکسیژن افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز است. به همین جهت در این مطالعه فرض بر این است که با شرایط زیر کشنده استرس اکسیداتیو حاصل از هیپرکسی نورموباریک می‌توان سلول‌های عصبی را برای مقابله با سمیت حاصل از تحریک و استرس اکسیداتیو آماده کرد. بر این اساس، هدف از این مطالعه بررسی پیش شرطی سازی با هیپرکسی نورموبایک بر بهبود نقص‌های نورولوژیک و میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در بیماری هانتینگتون است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق ۲۱ رت نر بالغ Sprague-Dawley با وزن ۲۰۰-۲۵۰ گرم که در شرایط استاندارد (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی؛ دسترسی آسان به آب و غذا؛ دمای اتاق ۲۵-۲۰ درجه سانتی گراد) نگهداری می‌شدند. در این آزمایش رت‌ها به طور تصادفی در سه (به تعداد هر کدام ۷ سر) با استفاده از روش تصادفی به صورت زیر گروه‌بندی می‌شدند. جانوران گروه اول (کنترل) و دوم (اسید ۳-نیتروپروپیونیک؛3-NP+RA) هوای اتاق استنشاق (RA) می‌کردند؛ جانوران در گروه سوم اکسیژن بالای ۹۰ درصد به مدت ۴ ساعت در روز به مدت ۶ روز استنشاق می‌کردند (3NP+HO). بعد از پایان پیش شرطی سازی برای ایجاد مدل هانتینگتون تحت تزریق شش روز اسید نیتروپروپیونیک قرار می‌گرفتند. بعد از ۲۴ ساعت، برای ارزیابی فعایت‌های رفلکسی، حرکتی و تعادلی از آزمایش‌های روتین رفتاری استفاده می‌شد که عبارتند از: برای سنجش توان حرکتی تعادلی از روش ارزیابی میزان تعادل بر روی میله، برای سنجش توان رفلکس‌های حرکتی از روش ارزیابی عقب کشیدن اندام حرکتی، برای سنجش توان تعادل حرکتی زاویه‌ای از روش صفحه سطح شیب‌دار، و برای سنجش قدرت اجرای حرکت

[Downloaded from ppj.phypha.ir on 2023-12-03]

پنجه دست از روش ارزیابی قدرت پنجه‌گیری.

تحریکات آسیب رسان در دوزهای پایین و کم، البته زیر آستانه ی آسیب رسان به سلول (هیپرکسی نورموباریک)، پاسخ سازشی القا می‌کند که مغز را در برابر استرس‌های دیگر حاصل از همین تحریکات آسیب رسان (تحمل(Tolerance)) یا دیگر تحریکات آسیب رسان (تحمل متقابل مانند بیماری هانتیگتون (Cross tolerance)) حفاظت می‌کند. جانوران در داخل یک جعبه که تمامی درزهای آن به طور کامل گرفته شده بود در ابعاد (۶۵*۳۵*۳۰) با دو مجرای ورودی و خروجی قرار می‌دادیم. ماده‌ای بنام سودا لیم[1] (جاذب دی اکسید کربن) در زیر جعبه قرار می‌دادیم تا دی اکسید کربن تولیدی را جذب کند تا احتباس دی اکسید کربن تولیدی در جعبه اکسیژن رخ ندهد. بدین ترتیب، امکان تغییر غلظت گاز داخل جعبه به حداقل می‌رسید. اکسیژن خالص (F_IO_2>0.9) یا هوای اتاق در میزان ۳ لیتر در دقیقه برای تیمار جانوران به جعبه حاوی رت‌ها متصل می‌شد. برای افزایش دقت آزمایش یک الکترود سنجش اکسیژن نیز در کنار جعبه تعبیه می‌شد تا غلظت اکسیزن داخل جعبه را اندازه‌گیری کند. آزمایشABG در هر دو آزمایش صورت می‌گرفت. در این آزمایش خون‌گیری شریانی از کاروتید انجام می‌شد.

برای ایجاد مدل بیماری هانتینگتون، رت‌های نر بالغ در گروه‌های دوم و سوم برای ایجاد مدل جانوری هانتینگتون به مدت شش روز تحت تزریق روزانه داخل صفاقی اسید نیتروپروپیونیک (سیگما) (3-NP؛۲۰ میلی گرم در کیلوگرم محلول در سالین با تطابق pH حدود ۷) قرار می‌گرفتند [۷،۶]. گروه اول به عنوان گروه کنترل همانند گروه اول و دوم تحت تزریق سالین قرار می‌گرفتند.

آزمایش ارزیابی تعادل بر روی میله به منظور سنجش میزان توانایی رت‌ها در عبور از یک میله باریک افقی (۱۰۰×۱ سانتی متر) صورت می‌گرفت. موش‌ها به صورت عمودی از بالا بر روی این میله که فاصله آن از زمین یک متر بود گذاشته می‌شدند [۱۶].

در آزمایش ارزیابی عقب کشیدن اندام حرکتی موش‌ها در یک صفحه با اندازه‌های ۳۰×۳۰ و ارتفاع ۲۰ سانتی متر که دارای چهار سوراخ بود قرار داده می‌شدند. به طوری که دو سوراخ عقبی به قطر ۵ سانتی متر برای اندام‌های حرکتی عقبی و دو سوراخ به قطر ۴ سانتی متر برای اندام‌های حرکتی جلویی وجود داشت. موش‌ها در این صفحه قرار داده می‌شدند به طوری که ابتدا اندام‌های حرکتی عقبی آنها در سوراخ‌های عقبی قرار داده می‌شدند. آنگاه اندام‌های جلویی نیز به همان صورت در سوراخ‌های جلویی قرار داده می‌شدند. مدت زمانی که طول می‌کشید تا اولین و دومین (مقابل) اندام حرکتی عقبی جمع شود ثبت می‌شد. بدین ترتیب اختلاف زمان بین جمع شدن اولین و دومین اندام حرکتی عقبی محاسبه می‌شد. این آزمایش به عنوان روشی برای اندازه‌گیری اختلالات عملکردی اندام حرکتی عقبی انجام می‌شد که شاخصی از میزان وسعت تحلیل جسم مخطط در مغز موش هاست [۲۷]. این آزمایش سه بار به فاصله‌های زمانی ۴۵ دقیقه انجام می‌شدند و میانگین آن گزارش می‌شد.

در آزمایش صفحه سطح شیب‌دار مطابق روش ریولین و تاتور [۲۵] میزان عملکرد حرکتی در موش‌ها اندازه‌گیری می‌شد. صفحه شیب‌دار دارای دو صفحه است که به وسیله لولایی به همدیگر وصل شده‌اند و با همدیگر می‌توانند زاویه‌های متغییری ایجاد کنند. این زاویه می‌تواند تا ۹۰ درجه ادامه داشته باشد. حداکثر زمانی که موش می‌توانست با حداکثر شیب به مدت ۵ ثانیه خود را روی شیب نگاه دارد به عنوان شاخص ثبت می‌شد.

برای ارزیابی قدرت پنجه‌گیری به موش‌ها اجازه داده می‌شد که با پنجه دست سیم استیل به قطر ۲ میلی متر و طول ۳۵ سانتی متر را بگیرند. در این حالت موش با ارتفاع ۵۰ سانتی متری بالای سیم نگاه داشته می‌شد، مدت زمانی که موش می‌توانست این میله را نگاه دارد ثبت می‌شود. مدت زمان لازم برای جدا شدن دست موش به عنوان قدرت پنجه‌گیری در نظر گرفته می‌شد [۲۶].

نمونه‌ها (۱۵۰ میلی گرم از بافت نیمکره 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 می‌شدند. هموژن با سرعت g ۱۳۶۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریوفوژ می‌شدند و سوپر ناتانت جمع آوری می‌شد و برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز مورد استفاده قرار می‌گرفت [۲۹]. غلظت پروتئین بر اساس روش برادفورد [۹] با استفاده از استاندارد آلبومین سرم گاوی اندازه‌گیری می‌شد.

1. soda lime

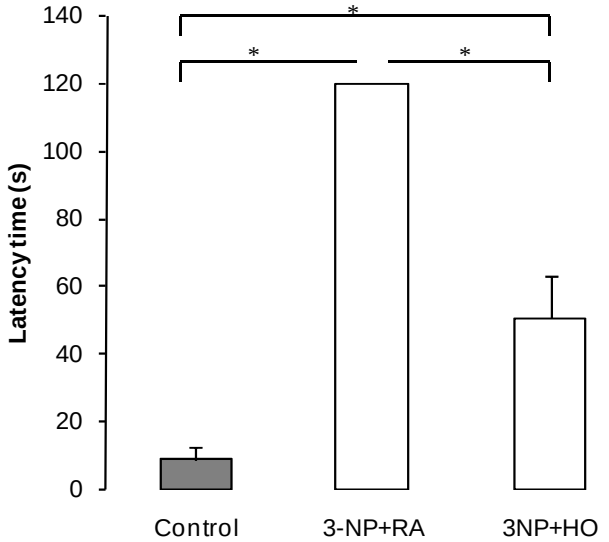
[Downloaded from ppj.phypha.ir on 2023-12-03]

جدول ۱- وضعیت گازهای خون شریانی و تنفسی در پایان تیمار با هیپرکسی و نورموکسی نورموباریک (*=P<0.001, n=6).

گروه‌های آزمایشی	pH	PCO_2 (mmHg)	PO_2 (mmHg)	میزان تنفس (هرتز)
RA کنترل	۷/۴±۰/۰۹	۴۱/۶±۱/۹۵	۹۲/۳±۴/۵۱	۱/۶۱±۰/۱۲
3-NP+RA	۷/۳۷±۰/۰۸	۴۰/۳±۱/۸۹	۹۳/۱±۲/۵۳	۱/۵۹±۰/۲۳
3-NP+HO	۷/۳۵±۰/۰۸	۳۹/۳±۲/۱	۳۵۵±۱۹/۳۹*	۱/۲۹±۰/۲۲

فعالیت کل سوپراکسید دیسموتاز (SOD) بـه واسـطه روش جنت و همکارانش در سال ۲۰۰۲ [۱۴] با اندکی تغییر انجام شد. مخلوط سنجش نهایی در حجم کل نهایی ۱ میلـی لیتـر حـاوی ۵۰ میلی مولار بافر فسفات سـدیم، ۰/۱ میلـی مـولار EDTA، ۰/۴۸ میلی مـولار پیروگالـل، و ۲۰ میکرولیتـر عصـاره آنزیمـی است. تغییر جذب نوری در ۴۲۰ نانومتر مخلوط سـنجش نهـایی به مدت یک دقیقه در دمـای ۲۵ درجـه در مقایسـه بـا محلـول بلانک که حاوی همه مـواد غیـر از بافـت همـوژن شـده اسـت اندازه‌گیری مـی‌شـد (Spectronin 20D MILTON ROY). یک واحد آنزیم طبق تعریف مقداری از آنـزیم اسـت کـه باعـث مهار نصف ماگزیمم فعالیت اتواکسیداسیون پیروگالل می‌شود.

سطح فعالیت آنزیم، تعادل بر روی میلـه، وضـعیت در سـطح شیب‌دار، عقب کشیدن اندام حرکتی، قدرت پنجه گیری، و میزان گازهای خون شریانی با استفاده از one-way ANOVA مـورد آنالیز قرار می‌گرفت. داده‌ها بـه صـورت Mean±SEM نمـایش داده می‌شـود. تسـت Post –hock اسـتفاده شـده بـرای مـوارد داده‌ها Bonferroni است. P<0.05 از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شده اند.



شکل ۱- اثر هیپرکسی نورموباریک با ۳-نیتروپروپیونیک اسید (3-NP+HO) و نورموکسی نورموباریک با ۳-نیتروپروپیونیک اسید (3-NP+RA) بر تعادل بـر روی میله در مقایسه با گروه کنترل (*=P<۰/۰۵ , n=۷).

یافته‌ها

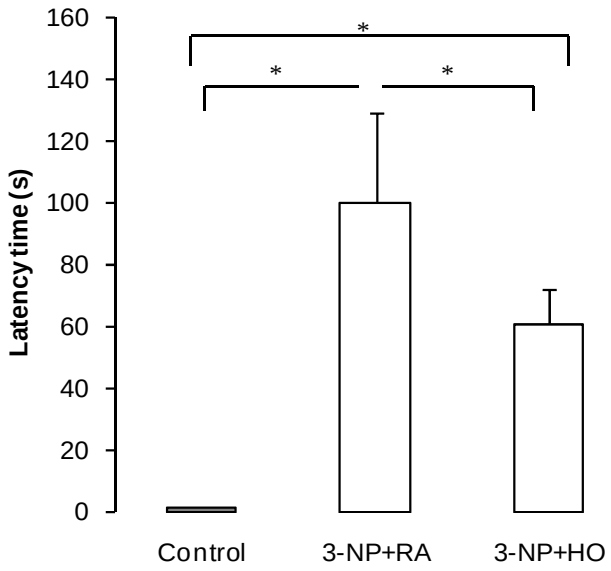
بر اساس ارزیابی‌های گازهای خون شـریانی (ABG) فشـار اکسـیژن شـریانی در شـرایط هیپرکسـی بسـیار بـالاتر (P<0.001,n=6) از فشار اکسیژن شریانی در شرایط نورموکسی است (جدول ۱).

همه موش‌هایی که ۳- نیتروپروپیونیک اسـید را بـه تنهـایی دریافت کرده بودند و در شـرایط نورموکسـی نورموباریـک قـرار گرفته بودند (گـروه اول)، در عبـور از میـان میلـه باریـک افقـی ۱۰۰×۱ سانتی‌متر ناتوان بودند و برای آنها زمـان ۱۲۰ ثانیـه در نظر گرفته شده‌است (شکل ۱). در حالی که موش‌هـایی کـه بـه عنوان کنترل سالین در یافت کرده بودند این میله را با میـانگین زمانی۳/۷ ±۸/۷ ثانیه طی مـی‌کردنـد. مـوش‌هـایی کـه ضـمن دریافت ۳- نیتروپروپیونیک اسید شرایط هیپرکسی نورموباریـک را تحمل کرده بودند به طور معنی‌دار توانایی‌شان در انجـام ایـن آزمایش بهبود یافته بود (۱۱/۷±۵۰/۸ ثانیه) (P<۰/۰۵ , n=۷).

اختلاف زمانی بین جمع شدن اندام‌هـای حرکتـی عقبـی در موش‌هایی که ۳-نیتروپروپیونیک اسید به تنهایی دریافت کـرده بودند (۲۹/۱±۹۹/۷ ثانیه) بـه طـور قابـل ملاحظـه‌ای بـالا بـود (شکل ۲). در حالی که در گروه کنترل زمان بسیار کوتاه بـود (۱ ثانیه). در گروه هیپرکسـی نورموباریـک کـه ۳-نیتروپروپیونیـک اسید نیز دریافت کـرده بودنـد، اخـتلاف زمـانی بـه طـور قابـل ملاحظـه‌ای کمتـر از گـروه کنتـرل بـود (۱۱/۶±۶۰/۵ ثانیـه) (P<۰/۰۵ , n=۷).

تجویز ۳-نیتروپروپیونیک اسـید بـه تنهـایی بـه طـور قابـل توجهی عملکرد حرکتی موش‌ها را در صفحه شیب‌دار به واسـطه کاهش زاویه در این گروه (۳/۲±۵۸/۴ درجـه) نسـبت بـه گـروه کنتـرل (۳/۴±۸۰/۵ درجـه) نشـان مـی‌داد (شـکل ۳). تجـویز هیپرکسی نورموباریک باعث افزایش توانایی موش‌هـا در سـطح شیب‌دار می‌شد (۶/۷±۶۷/۱ درجه) (P<۰/۰۵ , n=۷).

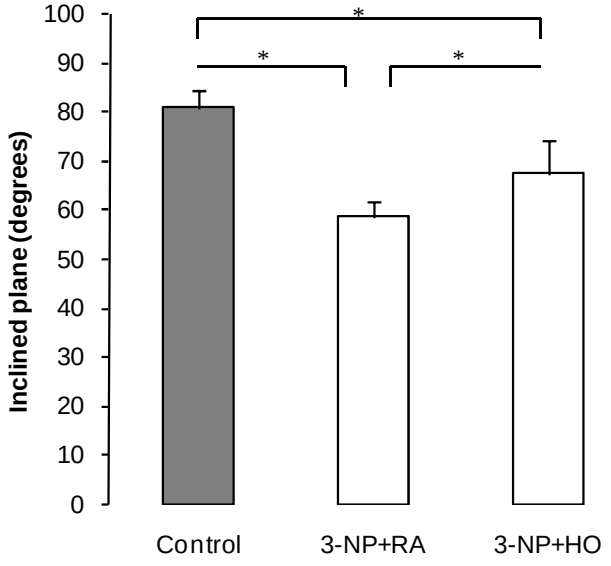
[Downloaded from ppj.phypha.ir on 2023-12-03]



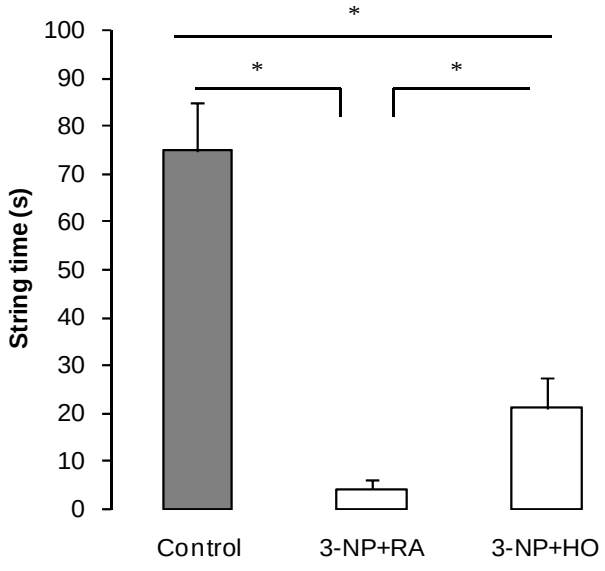
شکل۲- اثر هیپرکسی نورموباریک با ۳-نیتروپروپیونیک اسید (3-NP+HO) و نورموکسی نورموباریک با ۳-نیتروپروپیونیک اسید (3-NP+RA) بر زمان عقب کشیدن اندام حرکتی در مقایسه با گروه کنترل (*=P<0.05, n=۷).

در موش‌هایی که ۳-نیتروپروپیونیک اسید به تنهایی دریافت کرده بودند (۱/۹±۴/۱ ثانیه). مدت زمان پنجه‌گیری در مقایسه با گروه کنترل (۱۰/۲±۷۴/۵ ثانیه) به طور معنی‌داری کاهش می‌یافت (شکل۴). پیش شرطی سازی با هیپرکسی نورموباریک به طور قابل توجهی زمان پنجه‌گیری را در مقایسه با گروهی که به تنهایی ۳-نیتروپروپیونیک اسید دریافت کرده بودند افزایش می‌داد (۶/۴±۲۱ ثانیه) (P<۰/۰۵ , n=۷).

شکل ۵ نشان می‌دهد در موش‌هایی که ۳-نیتروپروپیونیک

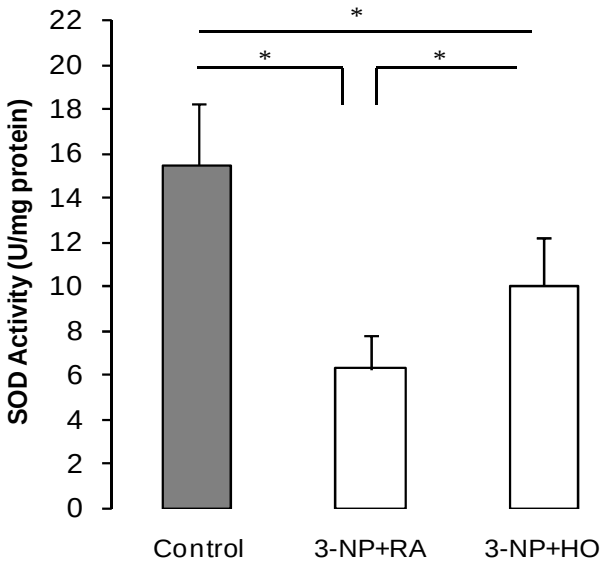


شکل۳- اثر هیپرکسی نورموباریک با ۳-نیتروپروپیونیک اسید (3-NP+HO) و نورموکسی نورموباریک با ۳-نیتروپروپیونیک اسید (3-NP+RA) بر زاویه افتادن از سطح شیبدار در مقایسه با گروه کنترل (*=P<۰/۰۵ , n=۷).



شکل۴- اثر هیپرکسی نورموباریک با ۳-نیتروپروپیونیک اسید (3-NP+HO) و نورموکسی نورموباریک با ۳-نیتروپروپیونیک اسید (3-NP+RA) بر زمان پنجه‌گیری در مقایسه با گروه کنترل (*=P<۰/۰۵ , n=۷).

اسید همراه با نورموکسی نورموباریک (3-NP+RA) دریافت کرده بودند در مقایسه با آنهایی که ۳-نیتروپروپیونیک اسید همراه با هیپرکسی نورموباریک (3-NP+HO) دریافت کرده بودند افزایش سطح فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را نشان می‌دادند. ازطرف دیگر سطح فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گروه مدل هانتینگتون در مقایسه با کنترل معنی‌دار بود (P<۰/۰۵ , n=۷).



شکل۵- اثر هیپرکسی نورموباریک با ۳-نیتروپروپیونیک اسید (3-NP+HO) و نورموکسی نورموباریک با ۳-نیتروپروپیونیک اسید (3-NP+RA) بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در مقایسه با گروه کنترل (*=P<۰/۰۵ , n=۷).

[Downloaded from ppj.phypha.ir on 2023-12-03]

بحث

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که تجویز هیپرکسی نورموباریک در مقایسه با هوای اتاق باعث افزایش غلظت اکسیژن خون می‌شود (جدول یک). از طرف دیگر، پیش شرطی سازی با هیپرکسی نورموباریک باعث افزایش مقاومت بافت مغز در مقابل استرس اکسیداتیو ناشی از ۳- نیتروپروپیونیک اسید در مدل جانوری هانتینگتون می‌شود. بدین ترتیب میزان نقص‌های نورولوژیک را در ارتباط با رفلکس‌های تعادلی، عقب کشیدن، حفظ وضعیت، و نارسایی پنجه‌گیری بهبود می‌بخشد. همین طور، میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در شرایط هیپرکسی نورموباریک افزایش می‌یابد و تا حدی استرس اکسیداتیو ناشی از ۳- نیتروپروپیونیک اسید را خنثی می‌کند. شواهدی وجود دارد که آسیب اکسیداتیو در پاتوژنز چندین نوع بیماری بیماری تحلیل عصبی از جمله هانتینگتون و پارکینسون دخالت دارد [۱۲]. یافته‌های این پژوهش با گزارش‌های پیشین در مورد انواع اختلالات رفتاری و نقص‌های حرکتی در رت‌ها ناشی از تجویز ۳-نیتروپروپیونیک اسید مطابقت دارد [۷،۶]. علایم بیماری حاصل از تجویز مزمن ۳-نیتروپروپیونیک اسید به خوبی مراحل هیپوکینتیک بیماری هانتینگتون را نشان می‌دهد [۱۰]. پیش درمان موش‌ها با هیپرکسی نورموباریک حفاظت عصبی در موش‌ها علیه نارسایی حرکتی و رفتاری القایی ۳- نیتروپروپیونیک اسید ایجاد می‌کند. مکانیسم‌های متعددی می‌تواند در حفاظت عصبی ناشی از هیپرکسی علیه مواد تحلیل دهنده‌های عصبی در موش‌ها دخالت داشته باشد. مکانیسم‌های دخیل عبارتنداز: (۱) هیپرکسی می‌تواند باعث رگ زایی و افزایش تراکم عروق در واحد حجم شود [۱۸]. (۲) هیپرکسی می‌تواند باعث بلوک شدن مولکول چسبان بین سلولی[1] و مهار تجمع نوتروفیل‌ها گردد [۳۰،۸]. بنابراین، هیپرکسی می‌تواند تجمع نوتروفیل‌ها را کاهش دهد و از آسیب مغزی بکاهد. وادا و همکارانش در سال ۲۰۰۰ نشان دادند که رادیکال‌های آزاد اکسیژن و Bcl-2 که به عنوان مهار کننده آپوپتوز عمل می‌کند بعد از قرار گرفتن مکرر در معرض هیپرکسی افزایش می‌یابد و باعث افزایش توان زیستی نورونی می‌شود [۲۸]. از طرف دیگر، افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و سوپراکسید دیسموتاز با کاهش بیان فاکتور القایی هیپوکسی[2] ارتباط دارد که گفته می‌شود عملکرد سد خونی مغزی را از طریق کاهش فاکتور رشد عروقی بهبود می‌بخشد [۲۱]. علاوه بر این، رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌توانند با افزایش TNF-α از طریق گیرنده TNF-α باعث بروز پدیده تحمل به ایسکمی شوند [۲۳]. از طرف دیگر، افزایش رادیکال‌های آزاد و سوپراکسید دیسموتاز به واسطه کاهش میزان بیان فاکتور القایی هیپوکسی مرتبط است، این روند منجر به بهبود عملکرد سد خونی مغزی می‌شود که احتمالاً این عمل را از طریق کاهش فاکتور رشد عروقی انجام می‌دهد. همان طوری که نتایج این پژوهش نشان می‌دهد، افزایش میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نقش به سزایی در کاهش نقص‌های نورولوژیکی دارد. از آن جایی که هانتینگتون یک بیماری استرس اکسیداتیو است. بنابراین هر عاملی که بتواند سطح گونه‌های اکسیژن واکنشی را کم کند می‌تواند در بهبود بیماری‌هانتینگتون مفید باشد [۸ و ۲۹]. تجویز ۳- نیتروپروپیونیک اسید تخلیه غلظت دوپامین جسم مخطط را در رت‌ها تولید می‌کند [۱]. کاهش غلظت دوپامین [۲] و گیرنده‌های دوپامین [۱] به عنوان عوامل اصلی دخیل در بیماری هانتینگتون پیشنهاد شده است. مطالعات بر روی مدل‌های ترانس ژنیک بیماری هانتینگتون به روشنی اثبات کرده است که کاهش فعالیت دوپامینرژیک به پیشرفت بیماری کمک می‌کند [۱۸]. پیش درمان موش‌ها با هیپرکسی نورموباریک به طور قابل ملاحظه تخلیه دوپامین جسم مخطط القایی ۳-نیتروپروپیونیک اسید را کاهش می‌دهند. بعلاوه، مطالعات اخیر نشان می‌دهد که فاکتور نروتروفیک و پیش درمان با نیکوتین نقش حیاتی در افزایش توان زیستی نرون در مقابل قرارگیری در معرض نروتوکسین‌ها یا نروتروماها ایفا می‌کند [۱۳]. نیکوتین احتمالاً تولید و آزاد سازی فاکتورهای نروتروفیک مانند فاکتور نروتروفیک مشتق عصبی[3] (BDNF)، فاکتور رشد فیبروبلاست پایه (FGF-2)، و فاکتورهای رشد عصبی[4] (NGF) تحریک می‌کنند [۲۴]. از طرف دیگر، هیپرکسی تولید و آزاد سازی

1. intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)

2. hypoxia induce factor-1α (HIF-α)
3. Brain derived neurotrophic factor
4. Neural growth factor

[Downloaded from ppj.phypha.ir on 2023-12-03]

TNF-a را تحریک می‌کند. پیش درمان هیپرکسی نورموباریک باعث افزایش بیان ناقلین گلوتامات (EAAT1, EAAT2, EAAT3)[1] و آنزیم تبدیل کننده TNF-a در سلولهای مختلف نرونی هم می‌شود [۵،۴]. بدین ترتیب آثار حفاظتی ناشی از افزایش آزاد سازی گلوتامات را به نمایش می‌گذارد. لذا هیپرکسی نورموباریک ممکن است قسمتی از اثر حفاظت عصبی خود را به واسطه تحریک بیان گلوتامات و آنزیم تبدیل کننده TNF-a اعمال می‌کند. این روند به روشنی نقش استرس اکسیداتیو را در این فرایند تحلیل عصبی اثبات می‌کند. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که افزایش استرس اکسیداتیو می‌تواند یکی از وقایع اصلی در بیماری‌های بالینی و آزمایشگاهی در بیماری هانتیگتون باشد [۴]. آنزیم‌های آنتی اکسیدان دستگاه عصبی را علیه گونه‌های واکنشی اکسیژن محافظت می‌کند [۲۰]. آنزیم‌های آنتی اکسیدان می‌توانند به عنوان رفتگر پراکسید هیدروژن عمل کنند.

در مجموع، هیپرکسی نورموباریک به طور قابل ملاحظه آسیب‌های جسم مخطط و نقص‌های نورولوژیک ناشی از ۳-نیتروپروپیونیک اسید را در موش‌ها کاهش می‌دهد. اثر حفاظتی هیپرکسی نورموباریک ممکن است افزایش سطوح دوپامین جسم مخطط ناشی از القای ۳-نیتروپروپیونیک اسید مدل هانتینگتون را کاهش دهد.

1. Excitatory amino acid transporters

[Downloaded from ppj.phypha.ir on 2023-12-03]

References

[1] Alexi T, Hughes PE, Faull RL, Williams CE, 3-Nitropropionic acid's lethal triplet: cooperative pathways of neurodegeneration. ***Neuroreport*** 9 (1998) R57-R64.

[2] Beal MF, Brouillet E, Jenkins BG, Ferrante RJ, Kowall NW, Miller JM, Storey E, Srivastava R, Rosen BR, Hyman BT, Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. ***J Neurosci*** 13 (1993) 4181-4192.

[3] 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*** 1152 (2007) 228–233.

[4] Bigdeli MR, Hajizadeh S, Froozandeh M, Rasulian B, Heidarianpour A, Khoshbaten A, Normobaric hyperoxia induces ischemic tolerance and upregulation of glutamate transporters in the rat brain and serum TNF-a level. ***Exp Neurol*** (2008) in press.

[5] Bigdeli MR, Khoshbaten A, In vivo preconditioning with normobaric hyperoxia induces ischemic tolerance partly by triggering TACE/TNF-α/NF-κB. ***Neuroscience*** 153 (2008) 671–678.

[6] Borlongan CV, Koutouzis TK, Sanberg PR, 3-Nitropropionic acid animal model and Huntington's disease. ***Neurosci Biobehav Rev*** 21 (1997) 289^293.

[7] Borlongan CV, Nishino H, Sanberg PR, Systemic, but not intraparenchymal, administration of 3-nitropropionic acid mimics the neuropathology of Huntington's disease: a speculative explanation. ***Neurosci Res*** 28 (1997) 185-189.

[8] Bowes M, Zivin J, Tothlein R, Monoclonal antibody to ICAM-1 adhesion site reduces neurological damage in a rabbit cerebral embolism stroke model. ***Stroke*** 25 (1994) 869-876.

[9] Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. ***Anal Biochem*** 72 (1976) 248-54.

[10] Brouillet E, Conde F, Beal MF, Hantraye P, Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. ***Prog Neurobiol*** 59 (1999) 427-468.

[11] Brouillet E, Jenkins BG, Hyman BT, Ferrante RJ, Kowall NW, Srivastava R, Roy DS, Rosen BR, Beal MF, Age-dependent vulnerability of the striatum to the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. ***J Neurochem*** 60 (1993) 356-359.

[12] Browne SE, Bowling AC, MacGarvey U, Baik MJ, Berger SC, Muqit MM, Bird ED, Beal MF, Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. ***Ann Neurol*** 41 (1997) 646^653.

[13] French SJ, Humby T, Horner CH, Sofroniew M, Rattry M, Hippocampal neurotrofin and trk receptor mRNA level are altered by local administration of nicotine carbachol and pilocarpine. ***Brain Res*** 67 (1999) 124-136.

[14] 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*** 236 (2002):7-12.

[15] Guyot MC, Hantraye P, Dolan R, Pal¢ S, Maziere M, Brouillet E, Quanti¢able bradykinesia, gait abnormalities and Huntington's disease-like striatal lesions in rats chronically treated with 3-nitropropionic acid. ***Neuroscience*** 79 (1997) 45-56.

[16] Haik KL, Shear DA, Scheroder U, Sabel BA, Dunbar GL, Quinolinic acid released from polymeric brain implants causes behavioral and neuroanatomical alterations in rodent model of Huntington's disease. ***Exp Neurol*** 163 (2000) 430-439.

[17] Heales SJ, Bolanos JP, Stewart VC, Brookes PS, Land JM, Clark JB, Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. ***Biochim Biophys Acta*** 1410 (1999) 215-228.

[18] Helms A, Whelan H, Torbey M, Hyperbaric oxygen therapy of cerebral ischemia. ***Cerebrovascular dis*** 20 (2005) 417-426.

[19] Hicky MA, Reynolds GP, Morton AJ, The role of dopamine in motor symptoms in the R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease. ***Neurochem*** 81 (2002) 46-59.

[20] Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Hata R, Ueda H, Niinobe M, Handa N, Fukunaga R, Kimura K, Mikoshiba K, Ischemic tolerance phenomenon found in the brain. ***Brain Res*** 528 (1990) 21–24.

[21] Ostrowski R, Colohan A, Zhang J, Mechanisms of hyperbaric oxygen-induces neuroprotection in a rat model

[Downloaded from ppj.phypha.ir on 2023-12-03]

of subarachnoid hemorrhage. ***J Cereb Blood Flow & Metab*** 25 (2005) 554-571.

[22] Ouary S, Bizat N, Altairac S, Menetrat H, Mittoux V, Conde F, Hantraye P, Brouillet E, Major strain di¡erences in response to chronic systemic administration of the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid in rats: implications for neuroprotection studies. ***Neuroscience*** 97 (2000) 521-530.

[23] Pradillo J, Hurtado O, Romera C, Cardenas A, Fernandez-Tome P, Alonso-Escolano D, Lorenzo P, Moro M, Lizasoain, TNF-R1 mediayes increased neuronal membrane EAAT3 experession after in vivo cerebral ischemic preconditioning. ***Neuroscience*** 138 (2006) 1171–1178

[24] Ravikumar R, Fugaccia I, Scheff SW, Geddes JW, Srinvasan C, Toborek M, Nicotine attenuates morphological deficits in a contusion model of spinal cord injury. ***J Neurotruma*** 22 (2005) 240-251.

[25] Rivlin AS, Tator CH. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat. ***J Neurosurg*** 47 (1977) 577-581.

[26] Shear DA, Dong J, Gundy CD, Haik-Creguer KL, Dunbar GL, Comparison of intrastriatal injections of quinolinic acid and 3-nitropropionic acid for use in animal models of Huntington's disease. **Prog Neuropsychopharmacol *Biol Psychiat*** 22 (1998) 1217-1240.

[27] Vis JC, Verbeek MM, De Waal W, Ten Donkelear HJ, Kremer HPH, 3-nitropropionic acid induces a spectrum of Huntington's disease like neuropathology in rat striatum. ***Neuropathol Appl Neurobiol*** 25 (1999) 513-521.

[28] Wada K, Kiyazawa T, Nomura N, Yano A, Tsuzuki N, Nawashiro H, Shima K, Mn-SOD and Bcl-2 expression after repeated hyperbaric oxygenation. ***Acta Neurochir Suppl*** 76 (2000) 285-290

[29] 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*** 125 (1995) 195-201.

[30] Zhang R, Chopp M, Jiang N, Tang W, Protak J, Manning A, Anderson D, Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient but not permanent middle cerebral artery occlusion in the wistar rat. ***Stroke*** 26 (1995) 1438-1443.

[Downloaded from ppj.phypha.ir on 2023-12-03]