



Evaluation of UCP2 expression in the phenomenon of ischemic resistance induced by alternating normobaric hyperoxia in a rat model of stroke

Firoozeh Alavian¹, Sohrab Hajizadeh^{1,2*}, Mohammad Reza Bigdeli³, Gholam Reza Bayat¹, Mohammad Javan¹

1. Dept. Physiology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2. Institute for Cognitive Science Studies (ICSS), Tehran, Iran

3. Dept. Biology, Faculty of Biological Science, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Received: 27 Oct 2011

Accepted: 23 Apr 2012

Abstract

Introduction: ischemic preconditioning is one of the most important mechanisms, responsible for the increased brain resistance after stroke. One of the most important candidates to ischemia preconditioning is intermittent normobaric hyperoxia. In this study, the effect of intermittent normobaric hyperoxia on the expression of UCP2 was investigated in a stroke model.

Methods: Rats were divided into 4 groups (normoxia – sham, hyperoxia – sham, normoxia – stroke and hyperoxia – stroke). Hyperoxia groups were exposed to 95% inspired O₂, for 4 h/day and 6 consecutive days. Oxygen level in the control groups was %21 (normoxia). After 24 h, stroke groups were subjected to 60 min of right middle cerebral artery occlusion. After 24 h reperfusion neurological deficit scores were assessed. The brain UCP2 levels were analyzed by western blot.

Results: The results of this study showed that following brain ischemia-reperfusion, UCP2 levels significantly increased in the stroke groups compared with the sham group; while there was no significant difference in hyperoxia groups compared with normoxia. Also hyperoxia decreased neurological deficit scores.

Conclusion: Following ischemia, oxidative stress caused by increase of ROS, leads to increased UCP2 levels in stroke groups. In this study, the neuroprotective effect of hyperoxia is independent of UCP2 expression.

Key words: Hyperoxia, Stroke, Preconditioning, UCP2

* Corresponding author e-mail: hajizadeh@iricss.or
Available online at: www.phypha.ir/ppj

بررسی میزان بیان UCP2 در پدیده مقاومت به ایسکمی القاء شده به واسطه هیپراکسی نورموباریک متناوب در مدل سکتة مغزی رت

فیروزه علویان^۱، سهراب حاجی زاده^{۱*}، محمدرضا بیگدلی^۲، غلامرضا بیات^۱، محمد جوان^۱

۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲. پژوهشکده علوم شناختی، تهران

۳. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

پذیرش: ۴ اردیبهشت ۹۱

دریافت: ۵ آبان ۹۰

چکیده

مقدمه: پیش شرطی سازی ایسکمیک یکی از مهمترین مکانیسم های مسئول افزایش مقاومت مغز به ایسکمی پس از سکتة است. یکی از مهم ترین کاندیداهای پیش-شرطی سازی به ایسکمی، هیپراکسی نورموباریک متناوب است. در مطالعه حاضر اثر هیپراکسی بر بیان UCP2 در مدل سکتة مغزی مورد مطالعه قرار گرفت.

روش ها: حیوانات شامل ۴ گروه (نورموکسی - شم، هیپراکسی - شم، نورموکسی - سکتة و هیپراکسی - سکتة)، هر گروه شامل ۶ رت بودند. غلظت اکسیژن استنشاقی در گروه هیپراکسی ۹۵٪، روزانه ۴ ساعت و به مدت ۶ روز متوالی و در گروه نورموکسی با همان شرایط و غلظت اکسیژن ۲۱٪. ۲۴ ساعت بعد رت های گروه های سکتة به مدت ۶۰ دقیقه تحت انسداد شریان کاروتید راست قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت از جریان خون مجدد، نمره نقایص نورولوژیک مورد مقایسه قرار گرفت و سطوح مغزی UCP2 به روش وسترن بلات آنالیز شد.

یافته ها: نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که به دنبال ایسکمی - رپرفیوژن، سطح پروتئین UCP2 در گروه های سکتة نسبت به گروه های شم افزایش معنی داری داشت. اما بین گروه هیپراکسی و نورموکسی تفاوت معنی داری وجود نداشت. همچنین هیپراکسی باعث کاهش نمره نقایص نورولوژیک شد.

نتیجه گیری: به دنبال ایسکمی، استرس اکسیداتیو ناشی از افزایش ROS منجر به افزایش سطوح UCP2 در گروه های سکتة شده است. در این مطالعه اثر حفاظت مغزی هیپراکسی مستقل از بیان UCP2 است.

واژه های کلیدی: هیپراکسی، ایسکمی، پیش شرطی سازی، UCP2

مقدمه

سازای ایسکمیک^۱ است که با اعمال دوره های کوتاه و گذرای ایسکمی برگشت پذیر می توان مغز را به آسیب های ایسکمی - جریان مجدد که بعداً با آن مواجه خواهد شد مقاوم ساخت [۱۴]. پیش شرطی سازی به ایسکمی، احتمالاً با به کارگیری بخش های مختلف عصبی، میوکاردی، عروقی، فرایندهای متعدد سلولی را جامعیت داده تا در نهایت منجر به کاهش مصرف انرژی و آسیب ناشی از خون رسانی مجدد شود [۱۰]. عوامل متعددی در پیش شرطی سازی موثرند، مانند:

موضوع مقاوم سازی و محافظت مغز در برابر آسیب های ایسکمی - جریان مجدد از مباحث اساسی در حوزه پیشگیری و درمان می باشد، یکی از روش های مقاوم سازی پیش شرطی نویسنده مسئول مکاتبات: hajizadeh@iricss.or
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj
1. Ischemic preconditioning

انرژی، نورواندوکراین و فعالیت اتونومیک، تولید ROS و انتقال اسید چرب، مرگ سلولی و التهاب ایفاء کند [۱۸]. در مغز UCP2 به طور غالب در نورون های سریع، میکروگلیاها، نوتروفیل ها، منوسیت ها، سلول های شبکه کروئید و سلول های اندوتلیال چندین بخش از مغز جلویی، میانی و عقبی بیان می شود [۲۱].

سکته مغزی تحت عنوان نقص در انرژی در علم پزشکی شناخته شده است؛ زیرا آسیب ناگهانی در مکانیسم های تولید انرژی رخ می دهد. پیشرفت آسیب ممکن است از طریق نکرور یا آپوپتوز رخ دهد. میتوکندری اندامکی حیاتی در تنظیم سکته مغزی است. در کنار نقش مهم این اندامک در تنظیم متابولیسم، در تولید انواع ROS؛ O_2^- و H_2O_2 نقش دارد. علاوه بر این میتوکندری اندامکی حیاتی در تنظیم کلسیم داخل سلولی است؛ وقتی غشاء داخلی آن دپلاریزه می شود، از خروج کلسیم از میتوکندری ممانعت شده و سلول از اثرات مضر افزایش بیش از حد کلسیم مصون می ماند [۱۲، ۱۹، ۲۳]. ولی در هر صورت پس از ورود کلسیم از طریق رسپتورهای NMDA و ایسکمی مغزی، کلسیم داخل سلولی افزایش می یابد. ورود کلسیم از طریق رسپتورهای NMDA به داخل سلول برای نورونها سمی است. که در این وضعیت ساختار میتوکندری تغییر کرده و منافذ غشاء داخلی میتوکندری به کلسیم نفوذپذیر می شوند. به دنبال آن پروتئین های محلول مانند سیتوکروم C آزاد می شوند؛ آزاد شدن این پروتئین ها، مسیر مرگ سلولی آپوپتوز وابسته به کاسپاز ۳ را دنبال می کند. با توجه به دپلاریزه شدن غشاء داخلی میتوکندری به واسطه UCP2، به نظر می رسد این مولکول در کاهش کلسیم و به دنبال آن کاهش وقایع آپوپتوز موثر باشد [۲۱].

با توجه به موارد ذکر شده UCP2 را می توان یکی از مهم ترین مکانیسم های آنتی اکسیدان سلول دانست. با تغییر در میزان تولید و یا فعالیت UCP2 می توان اثرات فیزیولوژیک مهمی را در جهت کاهش آسیب های ناشی از ROS اعمال کرد. در حال حاضر از این دسته پروتئین ها به عنوان داروهای کاهنده استرس اکسیداتیو استفاده می شود [۲۰].

موضوع مقاوم سازی و محافظت مغز در برابر آسیب های ایسکمی -خونسازی مجدد از مباحث اساسی در حوزه پیشگیری و درمان بیماری های مغزی می باشد. تاکنون تأثیر هیپراکسی

رسپتورهای NMDA [۷]، آنوکسی [۱۷]، القاء پروتئین های شوک حرارتی [۹]، مهار فسفوریلاسیون اکسیداتیو [۴] و استرس اکسیداتیو [۱۵].

یکی از روش های جدید افزایش مقاومت بافت ها در برابر ایسکمی، هیپرکسی نورموباریک متناوب می باشد؛ زیرا آثار سمی و جانبی نداشته و می توان در کلینیک از این روش استفاده کرد [۱۶، ۱]. روشن شدن پاسخ این سوال که هیپراکسی نورموباریک از طریق چه واسطه هایی قادر به ایجاد تحمل به ایسکمی است، می تواند منشأ اطلاعات فیزیولوژیکی و کاربردی مفیدی باشد.

Mcleod و همکارانش در تحقیقی نشان دادند که پس از اعمال دوره های کوتاه ایسکمی و ایجاد پیش شرط سازی در قلب موش صحرایی میتوکندری های جدا شده از قلب، نشت هیدروژنی بیشتر، پتانسیل غشایی کمتر، محتوای ATP کمتر، مصرف اکسیژن بیشتری داشته و تولید ROS^۲ از آنها نسبت به میتوکندری های قلب پیش شرط شده به طور قابل توجهی کاهش می یابد [۱۳].

UCP ها پروتئین های غشا داخلی میتوکندری هستند. نقش اولیه UCP ها در میتوکندری هدایت یون هیدروژن به داخل ماتریکس است. در این حالت با کاهش اختلاف غلظت یون هیدروژن، الکترون ها بر روی عوامل زنجیره تجمع یافته و بنابراین به اکسیژن نمی پیوندند؛ مصرف اکسیژن و ساخت ATP کامل نبوده و این انرژی به شکل گرما پراکنده می شود [۳، ۲۱]. این حقیقت که فسفوریلاسیون اکسیداتیو به طور کامل در میتوکندری جفت نمی شود، اهمیت این دسته از پروتئین ها را برجسته تر می کند [۱۹]. این خانواده شامل UCP1, UCP2, UCP3, UCP4, UCP5 می باشند. مطالعات اخیر نشان داده که توزیع بافتی انواع UCP ها، بیانگر اهمیت فعالیت بیولوژیکی آنهاست [۲، ۲۱]. UCP2 به طور گسترده ای در انواع بافتها بیان می شود. و در شرایط پاتولوژیک گوناگون مانند چاقی، دیابت، بیماری های آسیب نورونی، آترواسکلروزیس و MS درگیر می شود [۲۱]. شواهد حاضر پیشنهاد می کند که ممکن است UCP2 نقش مهمی در طول ایسکمی مغزی از طریق تنظیم پتانسیل میتوکندری و بالانس

2. Radical oxygen species

۳-۰ را با دقت حدود ۲۲-۲۰ میلی متر از آن عبور داده تا حدی که سر نخ نایلونی ابتدای سرخرگ سری جلویی را لمس کند؛ زمانی که مقاومت ملایم حس شود [۱۱]. در طول جراحی درجه حرارت رکتال کنترل می‌شد (Citizen-513w) و حدود ۳۷ درجه سانتی‌گراد به وسیله گرم کردن و یا خنک کردن سطحی ثابت می‌ماند. سرعت تنفس، سرعت ضربان قلب و غلظت گازها در محدوده فیزیولوژیک کنترل می‌شد. جریان خون مغز نیز پیوسته از سطح جمجمه، با دستگاه لیزر داپلر (LDF; Moor Instrument, UK) برای اطمینان از ایجاد مدل سکت (در ایجاد ایسکمی موفق حدود ۲۵٪ کاهش جریان خون از خط پایه لازم است [۱]) کنترل می‌شد. جریان خون مجدد یک ساعت پس از ایسکمی با خارج کردن نخ نایلونی برقرار می‌شد. گروههای شم در همان شرایط گروه سکت به جز عدم عبور نخ نایلونی تیمار شدند.

ارزیابی رفتاری نقایص نورولوژیک: معاینه های نورولوژیک ۲۴ ساعت پس از ایسکمی-جریان مجدد انجام می‌شد. در طول ۲۴ ساعت بعد از شروع انسداد تا خارج کردن مغز حیوان مراقبت‌های ویژه انجام می‌گرفت. یافته های نورولوژیک در ۵ مقیاس دسته بندی می‌شوند [۱۱]: شماره صفر (۰) هیچ گونه عارضه نورولوژیک نشان نمی‌دهد؛ شماره یک (۱) نارسایی کامل در انتهای پنجه های جلویی، که یک نقص نورولوژیک کانونی خفیف در نظر گرفته می‌شود. شماره دو (۲) (به چپ چرخیدن) نقص نورولوژیک کانونی متوسط؛ شماره ۳ (افتادن به سمت چپ) نقص کانونی شدید؛ رت های شماره ۴ به طور خود بخودی نمی‌توانند راه بروند و سطح هوشیاری پایین دارند و رت هایی که طی ۲۴ ساعت بعد از جراحی می‌میرند در صورتی که بعد از رنگ آمیزی بخش وسیعی از مغزشان آسیب دیده باشد و مرگ منحصر به سکت مغزی باشد، به آنها شماره ۵ داده می‌شود.

بررسی سطح پروتئین توسط تکنیک وسترن بلات: در این مطالعه میزان بیان پروتئین UCP2 با تکنیک وسترن بلات مورد سنجش قرار گرفت. ابتدا نمونه بافت مغز از فریزر خارج و توسط بافر لیز کننده حاوی آنتی پروتئاز هموژنیزه گردید. بافت هموژن شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۶۰۰g برای مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. محلول بالایی را جدا کرده و مجدد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با

نورموباریک بر بیان UCP2 در مدل ایسکمی مغزی بررسی نشده و با توجه به این نکته که طی هیپراکسی، سکت و تولید ROS، UCP2 نقش مهمی ایفا می‌کند دانستن ارتباط بین این سه فرایند اثرات درمانی مفیدی در سکت مغزی می‌تواند داشته باشد.

مواد و روش ها

حیوانات و شرایط آزمایشگاهی: این مطالعه از نوع

تجربی بوده و از موش‌های نر نژاد ویستار (۲۵۰ تا ۳۵۰ گرم) استفاده شد. حیوانات با سیکل روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعته، دمای حدود ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. کلیه اصول اخلاقی مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفت.

نورموباریک نورموکسی و نورموباریک هیپراکسی:

حیوانات شامل ۴ گروه: نورموکسی (Room air; RA) - شم، هیپراکسی (Hyperoxia, HO)-شم، نورموکسی-سکت و هیپراکسی-سکت. هر گروه شامل ۶ رت نژاد ویستار بودند. مدل هیپراکسی در جعبه ای به ابعاد ۲۵۰×۳۵۰×۶۵۰mm با غلظت ۹۵٪ اکسیژن (به مدت ۶ روز پیوسته، هر روز ۴ ساعت) ایجاد شد، غلظت اکسیژن به وسیله حسگر حساس به اکسیژن (Lutron-Do5510 oxygen sensor, Taiwan) مداوم کنترل می‌شد. سودالیم (BDH Limited, Poole, England) که نوعی جاذب CO₂ است در گوشه های جعبه قرار می‌گرفت. گروههای نورموکسی به همین شکل در جعبه قرار می‌گرفتند با این تفاوت که در معرض اکسیژن ۲۱٪ قرار داشتند [۱].

ایجاد مدل سکت مغزی: رت ها وزن شده و با کلرات

هیدرات (400mg/kg) (Merck, Germany) و داخل صفاقی بیهوش می‌شدند. سپس به کمک میکروسکوپ جراحی شاخه راست کاروتید و شاخه اکسترنال آن نمایان شده و با دقت از عصب واگ و بافت‌های مجاور جدا شده، پایه کاروتید راست و شاخه اکسترنال را با نخ بخیه محکم بسته، شاخه اینترنال و سرخرگ پتریگو پالاتین با کلیپ بسیار ظریف موقت مسدود شده. سوراخ کوچکی در کاروتید راست ایجاد نموده و نخ نایلون

Table 1. Arterial blood gases tests at the end of pretreatment

Experimental groups	pH	PCO ₂ (mmHg)	PO ₂ (mmHg)	Heart rate	Blood pressure (mmHg)	Respiratory rate(Hz)
RA	7.4±0.01	41.16±0.7	92.8	359.97	84.44	1.65
HO	7.3±0.01	39.2±0.95	352.1***	363	83.13	1.37

داده‌ها به صورت $SEM \pm Mean$ نمایش داده می شود. $P < 0.05$ از لحاظ آماری معنی دار در نظر گرفته شده‌اند.

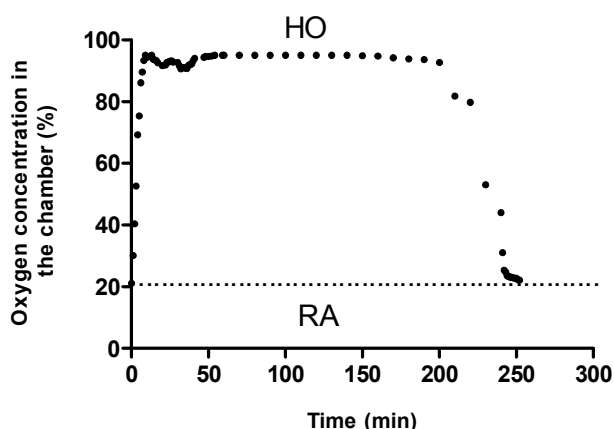
یافته ها

پارامترهای شرایط تجربی: شکل ۱ محتوای اکسیژن (%) داخل جعبه اکسیژن را در شرایط نورموکسی و هیپراکسی نشان می‌دهد. بر اساس ارزیابی‌های آزمایش گازهای خونی شریانی، فشار اکسیژن شریانی بسیار بالاتر از فشار اکسیژن شریانی در شرایط نورموکسی است (جدول ۱).

بررسی تغییرات جریان خون شریان مرکزی: همانطوریکه در شکل ۲ نشان داده شده، MCAO قادر به کاهش جریان خون ناحیه ای به کمتر از ۲۵٪ از خط پایه بود.

اثر هیپراکسی نورموباریک بر نقایص نورولوژیک: هیپراکسی باعث کاهش نمره نقص نورولوژیک و بهبود رفتاری حیوانات شد، به طوریکه در گروه‌های تیمار شده با هیپراکسی، تعداد حیواناتی که نقص شماره بالاتری داشتند کاهش یافت (جدول ۲).

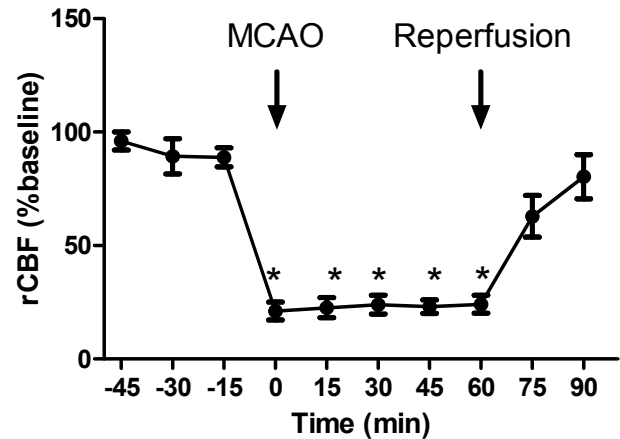
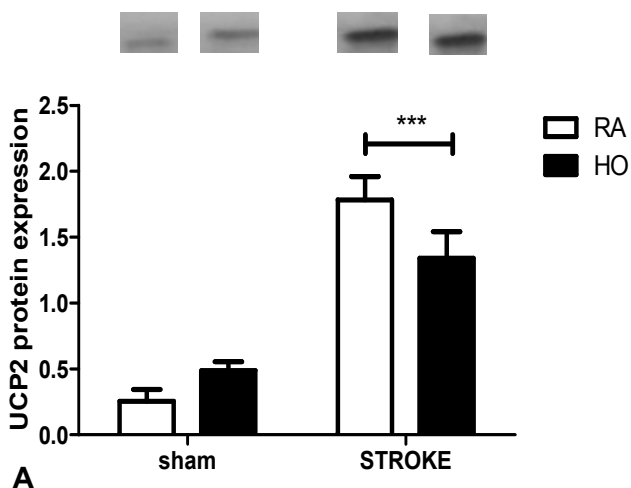
اثر هیپراکسی نورموباریک بر بیان پروتئین UCP2: همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌کنید، مقایسه



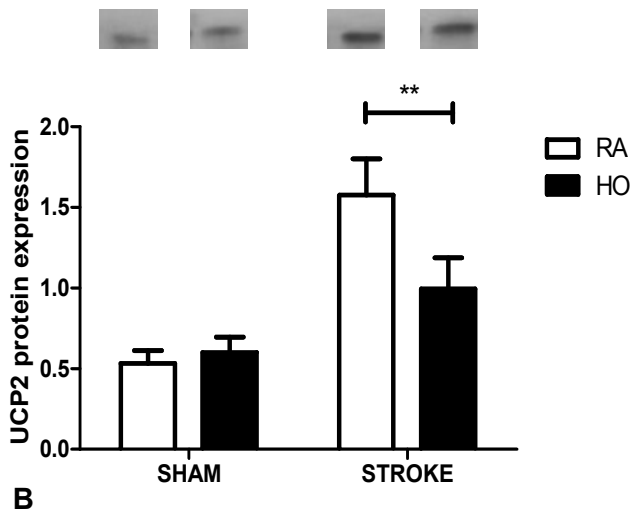
شکل ۱- تغییرات غلظت اکسیژن در واحد زمان در شرایط نورموکسی (Room air; RA) و هیپراکسی (Hyperoxia, HO) را نشان می‌دهد.

سرعت ۱۰۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتیفریوژ گردید. رسوب حاصل که حاوی میتوکندری می‌باشد با یک سی سی از بافر B (EDTA ۱ میلی مول، Tris ۱۰ میلی مول، $PH=7.4$) شستشو داده می‌شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از بافر B و ۶۶ میکرولیتر از SDS ۱۶٪ بر روی رسوب ریخته و خوب مخلوط کرده تا غشاهای میتوکندری به کمک دترژن SDS لیز گردد. در مرحله بعد، این مخلوط در دمای اتاق با سرعت ۱۱۰۰g برای مدت ۲۰ دقیقه جهت حذف مواد غیر محلول سانتیفریوژ گردید. در انتها محلول رویی در داخل لوله اپندورف در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد منجمد گردید [۶]. جهت انجام وسترن بلات ابتدا غلظت پروتئین به روش برادفورد سنجیده می شود. پس از آماده سازی ژل، غلظت مناسبی از پروتئین هر نمونه بر روی ژل الکتروفورز می شود. سپس باندهای موجود بر ژل بر روی کاغذ PVDF منتقل می شود. غشاءها در محلول ۵ درصد شیر خشک بدون چربی و BSA ۱٪ برای مدت یک ساعت بلاک شدند. UCP2 با آنتی بادی اولیه polyclonal UCP2 (N- antibody (Santa Cruz Biotechnology) (19 با رقت ۱ به ۵۰۰ و آنتی بادی ثانویه Horseradish peroxidase-conjugated Donkey anti-Goat (Santa Cruz Biotechnology) با رقت ۱ به ۱۰۰۰۰ مورد شناسایی قرار گرفتند. در مرحله آخر، بلات با ماده ظهور کمولومینسانس آغشته می شود و در تاریک خانه در مجاورت فیلم عکاسی قرار می گیرد تا محل ظهور کمپلکس پروتئین - آنتی بادی بر روی فیلم ظاهر شود.

آنالیز آماری: پارامترهای فیزیولوژیکی با استفاده از آزمون آنوای دو طرفه (Two-way ANOVA) و بن فرونی تست مورد آنالیز قرار گرفت. امتیازهای نقص نورولوژیک با استفاده از آزمون Fisher exact مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تمام آنالیزها با کمک نرم افزار Graph Pad Prism انجام شد.



شکل ۲- تغییرات جریان خون مغزی قبل، حین و بعد از ایسکمی. زمان (Time)، جریان خون مغزی (rCBF)، جریان مجدد (Reperfusion)، مدل سکته مغزی (MCAO)، خط پایه (baseline).



شکل ۳- اثر هیپراکسی بر بیان UCP2 در کرتکس (A) و ساب کرتکس (B) را نشان می‌دهد. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار، به کمک آزمون واریانس دو طرفه و پس آزمون Bonferroni نمایش داده شده‌اند. $P < 0.001$ *** و $P < 0.01$ **، مقایسه درصد معنی داری گروههای سکته در برابر گروههای شم می باشد. نورموکسی (RA)، هیپراکسی (Hyperoxia, HO) و استروک (Stroke).

میانگین میزان بیان UCP2 در سطح پروتئین با آزمون واریانس دو طرفه نشان می‌دهد که در ناحیه کرتکس (شکل ۳ A)، گروههای سکته نسبت به شم تفاوت معنی داری در بیان UCP2 دارند؛ به طوریکه بیان آن در گروههای سکته بیشتر از شم است ($F_{Stroke vs Sham} = 66.4$, $P < 0.0001$).

در این ناحیه هیپراکسی اثر معنی داری بر روی بیان این پروتئین در مقایسه با گروه نورموکسی نداشت ($F_{HO vs RA} = 0.5179$, $P = 0.4922$). تداخل بین گروهها نیز معنی دار می‌باشد ($F_{interaction} = 5.394$, $P < 0.05$). در ناحیه ساب کرتکس مغز (شکل ۳ B) بیان UCP2 در گروه سکته به طور معنی دار بیش از گروه شم می‌باشد ($F_{Stroke vs FHO} = 19.97$, $P < 0.001$). هیپراکسی تأثیری معنی دار بر بیان UCP2 نسبت به گروه نورموکسی در این ناحیه نداشت ($F_{HO vs RA} = 2.556$, $P = 0.148$). همچنین تداخل بین گروهها در ناحیه ساب کرتکس، بدون اثر معنی دار می‌باشد ($F_{interaction} = 4.027$, $P = 0.0783$).

Table 2. The distribution of neurologic deficit score in each groups

No. Experimental groups		NDS in each groups (N)					Total (N)		Median Statistical results (P value)	
		0	1	2	3	4				
1	RA	0	4	14	5	1	24	2.12	P<0.05	
2	HO	10	8	6	0	0	24	0.83		
3	Total	10	12	20	5	1	96	-		

NDS: neurologic deficit score; N: the number of cases in each groups; RA: Room Air; HO: Hyperoxia

بحث

در این مطالعه اثر هیپراکسی بر بیان UCP2 و نقایص نورولوژیک مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس نتایج این مطالعه به نظر می‌رسد که هیپراکسی می‌تواند امتیاز نقص نورولوژیکی حاصل از سکتة مغزی را به طور موثری در مدل MCAO کاهش دهد. مدل MCAO مدل مطمئن و قابل تکرار در مدل‌های حیوانی سکتة مغزی است [۲۲]. نتایج این پژوهش با سایر مطالعه‌ها در زمینه تحمل به ایسکمی که در مقدمه اشاره شد، مطابقت دارد [۸]. همچنین میزان سطوح UCP2 در گروه سکتة در مقایسه با گروه شم، هم در گروه نورموکسی و هم در گروه هیپراکسی در هر دو ناحیه کرتکس و ساب کرتکس، افزایش معنی داری را نشان داد، اما میزان بیان این پروتئین در گروه هیپراکسی در مقایسه با گروه نورموکسی، در هر دو ناحیه، تفاوت معنی داری نداشت، بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده از این آزمایش به نظر می‌آید که بیان UCP2 مستقل از هیپراکسی باشد.

در ناحیه ساب کرتکس نیز همانند کرتکس، گروه‌های سکتة در مقایسه با شم افزایش معنی داری در سطح UCP2 داشتند. اما در هر دو ناحیه تفاوت معنی داری بین گروه‌های نورموکسی و هیپراکسی وجود نداشت. به طور کلی میزان افزایش سطح UCP2 در نواحی کرتکس و مرکزی در یک راستا بود و تفاوتی معنی دار در میزان UCP2 در این دو ناحیه مشاهده نشد. افزایش سطح UCP2 در گروه‌های سکتة موافق با کارهای انجام شده قبلی می‌باشد؛ به طوریکه در مطالعه Mattiasson و همکارانش بر روی ایسکمی-جریان مجدد مغز، افزایش بیش از حد بیان UCP2 موجب شد تا سلول‌های ناحیه هیپوکمپ نسبت به آسیب ایسکمی-جریان مجدد مقاوم شوند و در نهایت اندازه ناحیه سکتة کوچکتر شود [۱۲].

در مطالعه ریچارد و همکارانش القای ایسکمی باعث افزایش سطح mRNA مربوط به UCP2 در نورون‌های هیپوکمپ گردید [۱۸]. همچنین در مطالعه Deierborg و

همکاران، القای ایسکمی باعث افزایش سطح mRNA مربوط به UCP2 در نورون‌های تالاموسی گردید. در همین مطالعه زمانیکه از موش‌های ترانس ژن UCP2، که مقادیر بیشتری UCP2 بیان می‌کردند استفاده شد، سلول‌های تالاموس مقاومت بیشتری نسبت به آسیب ایسکمی-جریان مجدد نشان دادند، میتوکندری‌های جدا شده از این سلول‌ها ROS کمتری تولید کرده، نقایص رفتاری نورولوژی و فعالیت حرکتی این حیوانات بهبود یافته و اندازه ناحیه سکتة کوچکتر می‌شود. بنابراین افزایش سطح UCP2 می‌تواند به مقاومت سلول‌ها در برابر سکتة کمک کند [۵].

مغز با محتوای بالای لیپید و احتمالاً آنتی اکسیدان کمتر، به شدت مستعد آسیب القاء شده به وسیله ROS ضمن ایسکمی مغزی است [۱۹، ۲۱]. در موش‌های فاقد ژن UCP2 که دچار سکتة مغزی شده بودند، ۸۰٪ نسبت به گروه کنترل افزایش بیشتری در تولید ROS مشاهده شد [۲۱]. مهار تولید ROS به واسطه UCP2 می‌تواند سبب مهار آپوپتوز شود [۲۴]. و مهار بیان UCP2 سبب افزایش TNF α و آپوپتوز است. طور کلی افزایش بیان UCP2 سبب تنظیم منفی سطوح پراکسیداسیون لیپید و رادیکال‌های آزاد و تنظیم مثبت تعداد میتوکندری نورونها است [۲۱].

با توجه به اینکه در مطالعه حاضر افزایش پروتئین UCP2 ناشی از اثر هیپراکسی نمی‌باشد، با ادامه این تحقیق می‌توان به یافته‌های دقیق‌تری در خصوص مکانیسم دقیق در تغییر سطح UCP2 ضمن ایسکمی-جریان مجدد خون مغز به دست آورد.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. از مشاوره علمی و موثر دکتر مانی و همکاری خانم‌ها فاطمه محقق و اعظم عسگری نیز تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از آقای دکتر حسن برای تهیه داروی PMSF تقدیر می‌گردد.

References

- [1] Bigdeli MR, Hajizadeha S, Froozandeh M, Rasulianc B, Heidarianpour M, Khoshbaten Z, Prolonged and intermittent normobaric hyperoxia induce different degrees of ischemic tolerance in rat brain tissue. *Brain Res* 1152 (2007) 228-233.
- [2] Bouillaud F, Weissenbach J, Ricquier D, Complete cDNA-derived amino acid sequence of rat brown fat uncoupling protein. *J Biol Chem* 261 (1986) 1487-1490.
- [3] Brand M, Echtay K, Roussel D, Jakabsons M, Cadenas S, Morrison A, Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* 425 (2002) 96-99.
- [4] Chen J, Simon R, Ischemic tolerance in the brain. *Neurology* 48 (1997) 306-311.
- [5] Deierborg T, Wieloch T, Diano S, Warden C, Horvath T, Mattiasson G, Overexpression of UCP2 protects thalamic neurons following global ischemia in the mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* 6 (2008) 1186-1195.
- [6] Heid C, Stevens J, Livak, Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6 (1996) 986-994.
- [7] Kato H, Liu Y, Araki T, Kogure K, but not anisomycin, inhibits the induction of tolerance to ischemia in the gerbil hippocampus. *Neurosci Lett* 139 (1992) 118-121.
- [8] 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* 5 (2002) 1450-145.
- [9] Kirino T, Ischemic tolerance. *Cereb Blood Flow Metab* 22 (2002) 1283-1296.
- [10] Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Hata R, Ueda H, Niinobe M, Handa Fukunaga NR, Kimura K, Mikoshiba K, Ischemic tolerance phenomenon found in the brain. *Stroke* 21 (1990) 21-24.
- [11] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R, Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20 (1989) 84-91.
- [12] Mattiasson G, Shamloo M, Gido G, Mathi K, Tomasevic G, Yi S (2003) Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma. *Nat Med* 9:1062-1068.
- [13] McLeod C, Aziz A, Hoyt J, Sack M, Uncoupling proteins 2 and 3 function in concert to augment tolerance to cardiac ischemia. *J Biol Chem* 39 (2005) 33470-33476.
- [14] Murray C, Lopez A, Mortality by cause for eight regions of the world. *Global Burden of Disease Study Lancet* 349 (1997) 1269-1276.
- [15] Ohtsuki T, Matsumoto M, Kuwabara K, Kitagawa K, Suzuki K, Taniguchi N, Kamada T, Influence of oxidative stress on induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. *Brain Res* 599 (1992) 246-252.
- [16] Pardillo J, Huertado O, Romera C, Cardenas A, Fernandez P, Alonso-Escolano D, Lorenzo P, Moro M, TNF-R1 mediates increased neuronal membrane EAAT3 expression after in vivo cerebral ischemic preconditioning. *Neurosci Lett* 138 (2006) 1171-1178.
- [17] Perez-Pinzon MA, Mumford PL, Rosenthal M, Sick TJ, Anoxic preconditioning in hippocampal slices: role of adenosine. *Neuroscience* 75 (1996) 687-694.
- [18] Richard D, Clavel S, Huang Q, Sanchis D, Ricquier D, Uncoupling protein 2 in the brain: distribution and function. *Biochem Soc Trans* 6 (2001) 812-817.
- [19] Sack M, Mitochondrial depolarization and the role of uncoupling proteins in ischemia tolerance. *Cardiovas Res* 2 (2006) 210-219.
- [20] Senese R, Cioffi F, de Lange P, Goglia F, Lanni A, Lombardi A. Uncoupling proteins a complex journey to function discovery. *Biofactors* 5(2009) 417-28.
- [21] Suresh L, Andy Li. Neuroprotective role of mitochondrial uncoupling protein 2 in cerebral stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 29 (2009) 1069-1078.
- [22] Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu J, Savalos RA, Davidson C, Sharp F, semiautomated method for measuring brain infarct volume. *J Cereb Blood Flow Metab* 10 (1990) 290-293.
- [23] Teshima Y, Akao M, Jones S, Marban E, Uncoupling protein-2 overexpression inhibits mitochondrial death pathway in cardiomyocytes. *Circ Res* 93 (2003) 192-200.
- [24] Tompkin A, Burwell L, Digerness S, Mitochondrial dysfunction in cardiac ischemia-reperfusion injury. ROS from complex I, without inhibition. *Biochimica Biophysica Acta* 2 (2006) 223-231.