بسم الله الرحمن الرحیم

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

خانم فیروزه علویان رشته **فیزیولوژی** رساله **دکتری** خود را با عنوان « **بررسی نقش برخی مسیرهای سیگنالینگ در اثر حفاظتی پیش شرطی سازی با هایپراکسی نورموباریک متناوب در مدل سکته مغزی موش صحرایی** » در تاریخ **۱۳۹۱/۸/۸** ارائه کردند.

بدینوسیله اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	امضاء
استاد راهنما	دکتر سهراب حاجی زاده	
استاد مشاور	دکترمحمد جوان	
استاد مشاور	دکترمحمد رضا بیگدلی	
استاد ناظر	دکترسعید سمنانیان	
استاد ناظر	دکترعلی رضا ایمانی	
استاد ناظر	دکترعلی خوش باطن	
استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی	دکترسید جواد میر نجفی زاده	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسان‌ها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آن‌ها متعلق به دانشگاه می‌باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می‌باشد.

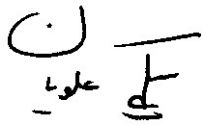
تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی به صورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده‌ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده‌ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته‌ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **فیروزه علویان** دانشجوی رشته **فیزیولوژی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۷** مقطع **دکتری** دانشکده **علوم پزشکی** متعهد می‌شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش‌های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می‌دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم».



آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله) ای دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی پژوهشی دانشگاه است. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱ : در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله) ی خود، مراتب را قبلاً به‌طور کتبی به دفتر "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

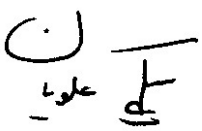
" کتاب حاضر، حاصل **رساله دکتری** نگارنده در رشته **فیزیولوژی** است که در سال **۱۳۹۱** در دانشکده **علوم پزشکی** دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **دکتر سهراب حاجی‌زاده**، مشاوره **دکتر محمد جوان و دکتر محمدرضا بیگدلی** از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶ : اینجانب **فیروزه علویان** دانشجوی رشته **فیزیولوژی** مقطع **دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.



دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله

دوره دکتری تخصصی (Ph.D.) در رشته فیزیولوژی

عنوان

بررسی نقش برخی مسیرهای سیگنالینگ در اثر حفاظتی پیش شرطی سازی با هایپراکسی نورموباریک متناوب در مدل سکته مغزی موش صحرایی

نگارش

فیروزه علویان

استاد راهنما

دکتر سهراب حاجی‌زاده

اساتید مشاور

دکتر محمدرضا بیگدلی

دکتر محمد جوان

پاییز ۹۱

تقدیم به

مادر مهربانم

و

برادران و خواهران عزیزم

تشکر و قدردانی

اکنون که به لطف پروردگار دوره دیگری از تحصیلات خود را به پایان رسانده‌ام، از همه عزیزانی که به من کمک و راهنمائی نمودند تشکر و قدردانی می نمایم:

استاد محترم راهنما جناب آقای دکتر سهراب حاجی‌زاده که از راهنمایی‌های بی دریغ ایشان بهره‌مند شده و شخصیت اخلاقی برجسته ایشان را همواره سرلوحه زندگی کاری خود قرار می دهم.

استاد محترم مشاور، جناب آقای دکتر محمد جوان که در طول تحصیل همواره از دانش، تجربه و مشاوره‌های دلسوزانه و ارزشمند ایشان بهره برده‌ام و جناب آقای دکتر محمدرضا بیگدلی که از راهنمایی های مفید ایشان قبل و پس از تصویب پروپزال بهره مند بودم.

از تلاش‌ها و زحمات اساتید محترم؛ جناب آقای دکتر سعید سمنانیان، جناب آقای دکتر یعقوب فتح الهی و جناب آقای دکتر سید جواد میرنجفی‌زاده که مرا در آموختن یاری نمودند.

سپاس ویژه دارم از استاد بزرگوار، جناب آقای دکتر علیرضا مانی که در طول انجام تحقیق همواره یاری کننده و همراه اینجانب بودند و از اینکه دانش خود را بی‌دریغ در اختیار دانشجویان قرار می‌دهند سپاس‌گزارم.

از اساتید محترم و بزرگوار، جناب آقای دکتر خوش باطن و جناب آقای دکتر علیرضا ایمانی که نظارت این رساله را بر عهده داشتند و از راهنمایی‌های ارزشمند آن‌ها بهره برده‌ام.

از دوستان و دانشجویان عزیز گروه فیزیولوژی و سایر دوستانم در دانشگاه تربیت مدرس که بهره مند کمک‌ها و راهنمایی‌های آنها بوده ام.

همچنین بر خود لازم می‌دارم که از زحمات کارشناسان محترم گروه فیزیولوژی؛ جناب آقای عباس نعیمی، جناب آقای مهدی سلیمی و کارمندان محترم واحدهای آموزش و پژوهش دانشکده علوم پزشکی به‌ویژه جناب آقای موسویان، سرکار خانم دباغی، سرکار خانم سراج ، جناب آقای سرمدی و سرکار خانم پهلوان تشکر نمایم.

در نهایت از مادر، خواهران و بردران مهربانم که در تمامی مرحل انجام پایان نامه با من همکاری نمودند، سپاسگزاری می‌نمایم.

چکیده

مقدمه: سکته مغزی از شایع‌ترین بیماری‌هاست و تحمل به ایسکمی یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مسئول افزایش تحمل مغز پس از سکته مغزی است که به آن پیش شرطی سازی به ایسکمی گویند. هایپراکسی از مهم‌ترین کاندیداهای پیش‌شرطی سازی به ایسکمی است. آسیب‌های ناشی از ایسکمی اغلب به دلیل تجمع رادیکالهای آزاد مشتق از اکسیژن (ROS) است و هایپراکسی در تولید متعادل ROS نقش مهمی دارد. با تولید ROS تحت این شرایط مسیرهای داخل سلولی متعددی از جمله مسیرهای TNFα/TNFRS، ERK/MAPK، PKC و فاکتورهای HIF1α و UCP2 فعال می‌شوند.

در مطالعه اخیر اثر هایپراکسی نورموباریک بر بیان TNF-R2، TNF-R1، HIF1α، UCP2 و فعالیت ERK مورد مطالعه قرار گرفت و با استفاده از مهار کننده اختصاصی PKC نقش این فاکتور در اثر هایپراکسی بر مدل سکته مغزی بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر حیوانات شامل ۱۲ گروه، هر گروه شامل ۶ رت نژاد ویستار بودند. غلظت اکسیژن تنفسی اعمال شده در گروه هایپراکسی ۹۵٪، به مدت ۴ ساعت و ۶ روز پیوسته، و در گروه کنترل با همان شرایط ولی غلظت اکسیژن ۲۱٪ بود. به منظور تحقیق اثر پروتیئن کیناز C از Chelerythrin chloride (CHEL)؛ مهارگر سیستمیک پروتیئن کیناز C استفاده شد. ۲۴ ساعت بعد رت های گروه سکته به مدت ۶۰ دقیقه تحت انسداد شریان کاروتید اصلی راست قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت از جریان خون مجدد، نفوذپذیری سد خونی - مغزی و نقایص رفتاری مورد بررسی قرار گرفت. بیان پروتئین‌های TNFR1,2، HIF1α و UCP2 با روش وسترن بلات و میزان فعالیت ERK با استفاده از کیت مخصوص مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: مهار PKC در مسیری مستقل از هایپراکسی سبب کاهش حجم سکته، کاهش اسکور نقایص نورولوژیک و کاهش نفوذپذیری سد خونی-مغزی شد. هایپراکسی سبب کاهش معنی دار بیان TNFR1 در کورتکس و افزایش معنی دار بیان HIF1α در هر دو ناحیه مغز شد. همچنین هایپراکسی تداخل معنی دار در افزایش بیان UCP2، TNFR1 و TNFR2 دارد. افزایش معنی دار فعالیت ERK تحت اثر هایپراکسی، ۵ و ۲۴ ساعت پس از جریان مجدد در گروههای سکته مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج این تحقیق به نظر می‌رسد هایپراکسی با کاهش حجم آسیب، ادم مغزی، نفوذپذیری سد خونی–مغزی و بهبود نقایص نورولوژیک سبب ایجاد مقاومت در برابر ایسکمی شده است. هایپراکسی با تداخل در افزایش بیان TNFR2، کاهش بیان TNFR1، افزایش بیان HIF1α در هر دو ناحیه کورتکس و مرکز مغز و با تداخل در افزایش بیان UCP2 در ناحیه کورتکس، همچنین با تداخل در افزایش فسوریلاسون ERK، می‌تواند تحمل به ایسکمی را وساطت کند. تفاوت اثر هایپراکسی در کورتکس و مرکز مغز ممکن است مربوط به مکانیسم‌های متفاوت بیوشیمیایی و سلولی باشد.

واژه‌های کلیدی: هایپراکسی، سکته، پیش شرطی سازی، پروتئین کینازC، ERK، TNFR1,2، HIF1α، UCP2

فهرست مطالب

فصل اول : مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته ۱

۱-۱- مقدمه ۲

۱-۲- سکته مغزی ۶

۱-۲-۱- سکته مغزی ایسکمیک ۶

۱-۲-۱-۱- ترومبوز ۷

۱-۲-۱-۲- آمبولی ۷

۱-۲-۲- سکته مغزی هموراژیک ۷

۱-۲-۲-۱- خونریزی تحت عنکبوتیه ۷

۱-۲-۲-۲- خونریزی داخل مغزی ۸

۱-۳- پاتوفیزیولوژی سکته مغزی ۸

۱-۳-۱- سمیت سلولی ناشی از تحریک ۹

۱-۳-۲- اسیدوز بافتی ۱۰

۱-۳-۳- التهاب به دنبال سکته مغزی ۱۱

۱-۳-۴- تولید رادیکالهای واکنشی اکسیژن (ROS) و تحمل به ایسکمی ۱۳

۱-۳-۵- تولید نیتریک اکسید (NO) ۱۵

۱-۳-۶- ادم مغزی ۱۵

۱-۳-۷- آسیب به سد خونی– مغزی ۱۶

۱-۴- تحمل به ایسکمی و پیش شرطی سازی ۱۶

۱-۴-۱- هایپراکسی و حفاظت عصبی ۱۸

۱-۴-۲- نقش TNF-α و رسپتورهای آن (TNFR1, TNFR2) در تحمل به ایسکمی ۱۹

۱-۴-۳- فیزیولوژی و پاتوفیزیولوژی PKC و ERK در تحمل به ایسکمی ۲۲

۱-۴-۴- HIF1α و تحمل به ایسکمی ۲۵

۱-۴-۵- پروتئینهای جدا کننده و تحمل به ایسکمی ۲۸
فصل دوم : مواد و روشها ۳۱
۲-۱- روش انجام تحقیق ۳۲
۲-۱-۱- حیوانات و شرایط نگهداری ۳۲
۲-۱-۲- گروههای آزمایشی ۳۲
۲-۱-۳- پروتکل مراحل انجام کار ۳۴
۲-۱-۴- نورموباریک نورموکسی و نورموباریک هایپراکسی ۳۴
۲-۱-۵- روش ایجاد مدل سکته مغزی MCAO ۳۴
۲-۱-۶- ارزیابی رفتاری نقایص نورولوژیک ۳۵
۲-۱-۷- مهار PKC ۳۶
۲-۱-۸- ارزیابی حجم آسیب بافتی ناشی از سکته مغزی ۳۶
۲-۱-۹- روش سنجش محتوی آب مغزی ۳۷
۲-۱-۱۰- اندازه گیری نفوذپذیری سد خونی- مغزی ۳۷
۲-۲- بررسی میزان بیان رسپتورهای TNFR1,TNFR2 و پروتئین های UCP2 و HIF1α ۳۸
۲-۲-۱- تکنیک وسترن بلات ۳۸
۲-۲-۱-۱- تجهیزات و مواد ۳۸
۲-۲-۱-۲- روش کار ۳۹
۲-۲-۱-۳- نالیز داده ها ۴۲
۲-۳- اندازه گیری میزان فعالیت ERK ۴۳
۲-۳-۱- آماده کردن نمونه‌ها ۴۳
۲-۳-۲- آماده کردن محلول‌ها ۴۳
۲-۳-۲-۱- آماده کردن بافر شستشو ۴۴
۲-۳-۲-۲- آماده کردن Assay Buffer ۴۴
۲-۳-۲-۳- آماده کردن استاندارد ۴۴

۲-۳-۲-۴- آماده کردن بافر لیز RIPA ۴۴
۲-۳-۳- مرحل اندازه گیری غلظت پروتئین نمونه‌ها ۴۵
فصل سوم : نتایج و یافته ها ۴۶
۳-۱- تغییرات فیزیولوژیک ۴۷
۳-۱-۱- تغییرات غلظت اکسیژن در جعبه ۴۷
۳-۱-۲- آنالیز گازهای خونی - شریانی ۴۸
۳-۱-۳- جریان خون مغز ۴۸
۳-۲- تاثیر هایپراکسی و مهار PKC بر درجه نقایص نورولوژیک در گروههای سکته ۴۹
۳-۳- آثار هایپراکسی و مهارPKC بر حجم آسیب بافتی (حجم سکته) ۵۰
۳-۴- آثار هایپراکسی و مهار PKC بر محتوی آب مغزی ۵۲
۳-۵- آثار هایپراکسی و CHEL بر نفوذپذیری سد خونی – مغزی ۵۳
۳-۶- اثر هایپراکسی بر بیان TNFR1 در سطح پروتئین در گروههای آزمایشی ۵۵
۳-۷- اثر هایپراکسی بر بیان TNFR2 در سطح پروتئین در گروههای آزمایشی ۵۷
۳-۸- اثر هایپراکسی بر بیان HIF1α در سطح پروتئین در گروههای آزمایشی ۵۹
۳-۹- اثر هایپراکسی بر بیان UCP2 در سطح پروتئین در گروههای آزمایشی ۶۱
۳-۱۰- اثر هایپراکسی بر ERK فعال ۶۲
۳-۱۰-۱- بررسی اثر هایپراکسی بر ERK فعال، ۵ ساعت پس از ایجاد مدل MCAO ۶۲
۳-۱۰-۲- بررسی اثر هایپراکسی بر ERK فعال،۲۴ ساعت پس از ایجاد مدل MCAO ۶۳
فصل چهارم : بحث ، نتیجه گیری و پیشنهادها ۶۶
۴-۱. هایپراکسی و مقاومت به ایسکمی ۶۷
۴-۲- نقش PKC در تحمل به ایسکمی القا شده با هایپراکسی در سکته مغزی ۶۹
۴-۳- اثر هایپراکسی بر بیان پروتئین ۷۲
۴-۳-۱- اثر هایپراکسی بربیان TNFR1, TNFR2 ۷۳
۴-۳-۲- اثر هایپراکسی بربیان HIF1α ۷۶

۴-۳-۳- اثر هایپراکسی بربیان UCP2 ..... ۷۸
۴-۴- اثر هایپراکسی بر ERk فعال ۸۰
۴-۵- نتیجه گیری کلی ۸۴
۴-۶- پیشنهادها ۸۵
فهرست منابع ۸۶
چکیده انگلیسی ۱۰۴

فهرست نمودارها

نمودار ۳-۱- تغییرات غلظت اکسیژن در واحد زمان. ۴۷
نمودار ۳-۲- جریان خون ناحیه ای سری (rCBF) قبل، در زمان MCAO و پس از جریان خون مجدد. ۴۹
نمودار ۳-۳- توزیع نقایص نورولوژیک در گروههای آزمایشی. CHEL در مقایسه با Vehicle..... ۵۰
نمودار ۳-۴- اثر هایپراکسی بر حجم سکته در گروههای مختلف آزمایشی *P<0.05، CHEL در مقایسه با Vehicle..... ۵۱
نمودار ۳-۵- تفاوت بین محتوی آب نیمکره راست و چپ ($X_R - X_L$)..... ۵۲
نمودار ۳-۶- نفوذپذیری سد خونی – مغزی در گروههای آزمایش..... ۵۳
نمودار ۳-۷- منحنی استانداردی که میزان خروج اوانس بلو از سد خونی-مغزی و ورود آن به بافت توسط آن اندازه گیری شده است..... ۵۴
نمودار ۳-۸- اثر هایپراکسی بربیان TNFR1 در کورتکس (الف)، مرکز (ب) و باندهای مورد نظر (ج) را نشان می‌دهد..... ۵۶
نمودار ۳-۹- اثر هایپراکسی بربیان TNFR2 در کورتکس (الف)، مرکز (ب) و باندهای مورد نظر (ج) را نشان می‌دهد..... ۵۸
نمودار ۳-۱۰- اثر هایپراکسی بربیان HIF1α در کورتکس (الف)، مرکز (ب) و باندهای مورد نظر (ج) را نشان می‌دهد..... ۶۰
نمودار۳ -۱۱- اثر هایپراکسی بربیان UCP2 در کورتکس (الف) و مرکز (ب) را نشان می‌دهد..... ۶۱
نمودار ۳-۱۲- اثر هایپراکسی بر ERK فعال در کورتکس (الف) و مرکز (ب) را نشان می‌دهد..... ۶۳
نمودار ۳-۱۳- اثر هایپراکسی بر ERK فعال در کورتکس (الف) و مرکز (ب) را نشان می‌دهد..... ۶۴
نمودار ۳-۱۴- منحنی استانداردی که میزان غلظت ERK فعال توسط آن اندازه گیری شده است. ... ۶۵

فهرست شکل ها

شکل ۱-۱- خلاصه ای از مسیر ارتباطی مولکول های سیگنال دهنده. علامات سوال مولکول هایی است که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت.....۶
شکل ۱-۲- آبشار ایسکمیک که منجر به آسیب مغزی می‌شود ۸
شکل ۱-۳- نقش گلوتامات در مرگ سلولی ۱۱
شکل ۱-۴- روند آبشاری التهاب، به دنبال استروک..... ۱۲
شکل ۱-۵- همکاری PLA2 در شکل گیریROS در مدل سکته مغزی..... ۱۴
شکل ۱-۶- خلاصه ای از مسیر سیگنال هایپراکسی در سلول ۱۹
شکل ۱-۷- مسیر سیگنال TNFR1 . ..... ۲۱
شکل ۱-۸- مسیرسیگنالینگ MAPK. ۲۵
شکل ۱-۹- وابستگی هیدروکسیلاسیون HIF به اکسیژن.....۲۶
شکل ۱-۱۰- مکانیسم‌های پیشنهادی UCP2..... ۲۹
شکل ۲-۱- پروتکل مراحل انجام کار..... ۳۴
شکل ۳-۱- تصاویر اثر حفاظتی هایپراکسی در مدل MCAO را نشان می‌دهد. ۵۱

فصل اول

مقدمه و

مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱- مقدمه

ایسکمی مغزی یکی از شایع‌ترین علل مرگ و میر و ناتوانی در دنیاست و در صورت زنده ماندن، عوارضی چون فلج ناحیه ای از بدن و مشکلاتی در حافظه، فکر کردن، حرف زدن و حرکت کردن به وجود می‌آورد. ۱۵ درصد سکته‌ها به علت هموراژی و ۸۵ درصد توسط ایسکمی به وقوع می‌پیوندد. ایسکمی در اثر عواملی چون ترومبوز، آمبولی و کاهش خونرسانی سیستمیک به وجود می‌آید [۱]. ایسکمی کانونی[1] (ناشی از آمبولی و ترومبوز) و گلوبال[2] (ناشی از ایست قلبی) از بیماری‌های شایع جوامع بشری هستند. بافت مغزی به دلیل متابولیسم بالا و ذخایر اکسیژن کم، حساسیت بسیار زیادی به آسیب ایسکمی دارد [۲]. تحمل به ایسکمی[3] (IT) از مهم‌ترین مکانیسم‌های درون زاد مسئول افزایش مقاومت بافت مغز در برابر آسیب‌های مغزی پس از سکته مغزی است [۳]. با وجود تلاشهای انجام شده در القاء IT حاصل از محرک‌های زیر کشنده کاربرد بالینی روشهای مزبور به دلیل آثار سمی و جانبی آن‌ها قابل پذیرش نیست [۴]. یکی از روش‌های موثر در افزایش تحمل بافت مغز در برابر آسیب‌های پس از سکته مغزی، پیش شرطی سازی ایسکمی[4] (IPC) می‌باشد، بدین‌معنی که اعمال دوره‌های کوتاه ایسکمی و جریان مجدد قبل از القاء یک دوره ایسکمی طولانی‌مدت، سبب کاهش عوارض ناشی از ایسکمی و جریان مجدد بعدی می‌شود. طی IPC دو پاسخ حفاظتی از نظر زمانی و مکانیسمی در بافت مغزی اتفاق می‌افتد [۵]: مرحله اولیه یا حاد که این مرحله مستقل از سنتز پروتئین است و با تغییرات پس از ترجمه پروتئین‌ها ارتباط دارد و ظرف چند دقیقه مشاهده

[1] Focal ischemia
[2] Global ischemia
[3] Ischemic tolerance
[4] Ischemic preconditioning

می‌شود و پس از دو تا سه ساعت از بین می‌رود. مرحله ثانویه یا تاخیری با تغییر بیان ژن بروز می‌کند و برای ایجاد این مرحله نیاز به سنتز پروتئین جدید است. این مرحله چند ساعت پس از وقـوع پـیش شرطی سازی شروع می شود و به مدت چند روز یا چند هفته می‌تواند ادامه داشته باشد [۶]. این موج دوم مرگ سلولی در پاسخ به ایسکمی توسط واسطه های التهاب نورونی اتفاق می‌افتد. طـی ایـسکمی میکروگلیاهـای فعـال شـده مـی‌تواننـد سـیتوکینهای التهـابی مثـل TNFα، IL-1β و ملکولهـای سیتوتوکسیک دیگری مثل NO و ROS تولید کنند [۷]. آستروسیتها نیز مانند میکروگلیاها، قـادر بـه تولید فاکتورهای التهابی مثل سیتوکینها، کموکینها و NO هستند. سیتوکینها بیان ملکولهای اتـصالی سلول‌ها را افزایش داده، به طوریکه ۴ تا ۶ ساعت پس از شروع ایسکمی، لوکوسیتها به دیـواره رگ‌هـا چسبیده و به بافت مغزی مهاجرت کرده و شروع به ترشح واسطه های پـیش برنـده التهـاب و آسـیب ثانویه مغزی می‌کنند [۸]. تغییرات التهابی نورونها در نهایت می‌تواند سبب تخریب سد خونی- مغـزی و تشکیل ادم و در نتیجه مرگ سلولی شود. بنابراین مسیرهای التهاب نورونی می‌توانند اهـدافی بـرای پیشبرد داروها در درمان ایسکمی باشند.

در پدیده تحمل به ایسکمی نقش کینازهای داخل سلولی از جملـهPKC و MAP کینازهـا مـورد بحث است. PKC ایزوآنزیم های متفاوتی دارد. این احتمـال وجـود دارد کـه در مغـز ایزوآنـزیم هـای متفاوت PKC آثار مختلفی داشته باشند [۹]. نامزد بعدی IPC در مسیر تبدیل سیگنال شـامل مـسیر ERK از انواع MAP کینازها می‌باشد. تغییر سطوح فعالیت ERK منجر به نـسخه بـرداری تغییریافتـه ژنهایی است که در سیکل سلولی مهم هستند [۱۰].

اخیرا تومور نکروز فاکتور آلفا (TNF-α) در مکانیسم‌های حفاظت مغزی در برابر آسیب‌های حاصل از ایسکمی به میزان زیادی مورد تاکید قرار گرفته است [۱۱-۱۲]. سیگنال TNF-α از طریق دو دسته رسپتور TNF-R1 و TNFR-2 اعمال می‌شود، TNF-R1 بیشترین نقش را در فعالیت بیولوژیـک TNF-α دارد و اتصال TNF-α با TNFR-1 باعث تریگر شدن یکسری وقایع داخل سـلولی اسـت کـه در نهایـت منجر به فعال شدن دو فاکتور مهم نسخه برداری یعنی NF-κB وC-jun اسـت. فـاکتور نـسخه‌بـرداری NF-κB باعث افزایش بیان گروهی از ژنهای پیش‌شرطی‌سازی ایسکمی می‌شود. در غیاب فعالیت NF-

κB حساسیت سلول به TNF-α و آپوپتوز افزایش می‌یابد و فعال شدن قوی NF-κB باعث حفاظت در برابر آپوپتوز است و توان بقای سلول عصبی را افزایش می‌دهد. حضور پایدار TNF منجر به بکارگیری کاسپاز ۸ است و به دنبال آن آبشار پروتئاز شروع شده که منجر به آپوپتوز می‌شود. بنابراین در سیگنال TNF تقابل بین مسیرهای آپوپتوز و سیگنال NF-κB و C-jun وجود دارد [۱۳-۱۴].

HIFs فاکتورهای رونویسی هستند که در پاسخ به تغییرات اکسیژن، خصوصا در پاسخ به کاهش اکسیژن تولید می‌شوند، وقتی HIF-1α به واسطه هیپوکسی پایدار می‌شود، به HIF1α-responsive elements ژنهای هدف خود وصل شده و باعث رونویسی چندین ژن می‌شود که تضمین کننده حیات سلول ضمن هیپوکسی هستند [۱۵].

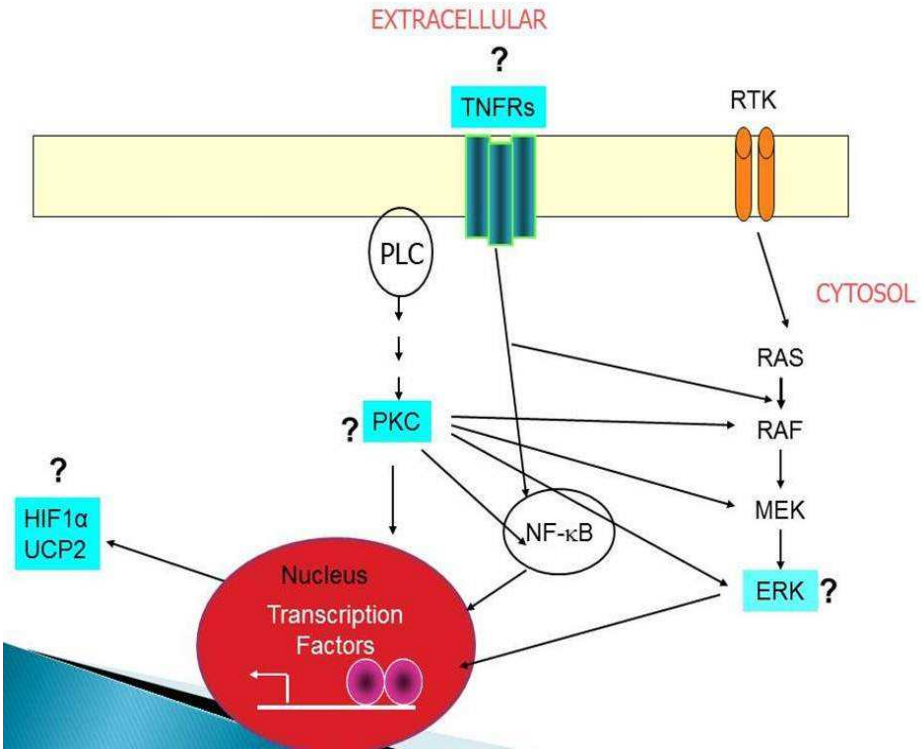
رایکالهای آزاد و اکسیدانهایی که از سلولهای دچار التهاب تولید می‌شوند زندگی بافتهای اطراف کانون ایسکمی را تهدید می‌کنند [۱]. منبع اصلی رادیکالهای آزاد، میتوکندریها و آسیب آن‌ها و پاسخ التهابی در برابر آسیب ایسکمی است [۱۶]. مغز در مقابل این رادیکال‌ها توسط جمع کننده های رادیکالهای آزاد برونزاد مثل آسکوربات و آلفا تکوفرول و یا توسط آنزیمهای آنتی اکسیدانی درونزاد مثل گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز حفاظت می‌شود [۲]. هرچند بیان این آنزیم‌ها طی ایسکمی افزایش می‌یابد، ولی ظرفیت آن‌ها محدود است و در نتیجه غلظت رادیکالهای آزاد رو به افزایش می‌گذارد [۱۷]. در طول ایسکمی افزایش غلظت کلسیم، موجب فعال شدن NOS های وابسته به کالمودولین می‌شود. غلظتهای غیر فیزیولوژیکی NO سبب آسیب می‌شود [۱۸]. همچنین از ترکیب NO وسوپراکسید ترکیبی بسیار اکسیدان به نام پراکسی نیتریت به وجود می‌آید که در نهایت تمام این اکسیدانها سبب آسیب به لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA می‌شوند [۱۹].

Uncoupling Protein (UCP) ها ناقلان پروتون غشاء داخلی میتوکندری هستند که شامل UCP1 تا UCP5 می‌باشند. UCP2 در حالت پایه نشت هیدروژن نداشته و فقط در حضور عوامل خاص باعث نشت هیدروژن و دپلاریزاسیون غشاء است؛ در این شرایط شیب الکتروشیمیایی هیدروژن در دو سوی غشاء داخلی میتوکندری کاهش یافته و بدین ترتیب فسفریلاسیون-اکسیداتیو را جدا کرده و الکترون-ها به جای انتقال به اکسیژن بر روی عوامل زنجیره تجمع می‌یابند و تولید سوپراکساید به طور

فیدبکی کم می‌شود. این موضوع بیانگر نقش ضد استرس اکسیداتیو UCPها است. این یافته کلیدی نقش ضد استرس اکسیداتیو UCPها دیدگاه جدید و با ارزشی را برای مطالعه بیماری‌های رژنراتیو بافت‌های متخلف بدن فراهم کرد، زیرا تولید ROS عامل کلیدی در پاتولوژی بسیاری از بیماری‌هاست [۲۰-۲۱]. ارتباط میان فاکتورهای مورد نظر در این مطالعه در شکل ۱-۱ نمایش داده شده است.

پیش شرطی سازی توسط تحریکات مختلف مانند: هیپوکسی، آنوکسی، آدنوزین، مهارشیمیایی فسفوریلاسیون اکسیداتیو و سیتوکین ها [۲۲-۲۴] صورت می‌گیرد. همه روش‌های ذکر شده قابلیت پیاده سازی بالینی را ندارند اما هایپراکسی نورموباریک آثار سمی و جانبی روش‌های مذکور را ندارد و قابلیت پیاده سازی بالینی را دارد [۴]. هایپراکسی به واسطه تولید ROS در پیش شرطی سازی عصبی نقش دارد، به طوریکه انسداد تجمع آغازینROS توسط آنتی اکسیدان ها پیش شرطی سازی عصبی اعمال شده به واسطه هایپراکسی را تخفیف می‌دهد [۲۵].

روشن شدن پاسخ این سوال که هایپراکسی نورموباریک چگونه و با چه مکانیسم‌هایی قادر به ایجاد تحمل به ایسکمی است، می‌تواند منشاء اطلاعات فیزیولوژیکی و کاربردی مفیدی باشد. یافته های این پژوهش ضمن روشن‌تر کردن برخی آثار مهم و فیزیولوژیکی هایپراکسی نورموباریک بر مغز می‌تواند اطلاعات کاربردی بالینی جالب توجهی را به همراه داشته باشد. اطلاعات حاصل از این پژوهش می‌تواند بستری فراهم کند تا برای جلوگیری از بروز سکته مغزی به آثار پیش شرطی سازی گرایش به وجود آید و در ادامه با به کار بردن موادی که می‌توانند فرایند پیش شرطی سازی را تقلید کنند روش‌های مفیدی در استراتژی درمان سکته مغزی به تکوین برسد. همچنین این روش می‌تواند با افزایش تحمل بافت مغز به ایسکمی، موفقیت پیوند بافتی را بهبود بخشد. نتایجی که بالقوه می‌توانند از یافته های این پژوهش حاصل شوند با توجه به وفور بیمارانی که از سکته مغزی رنج می‌برند، هم در سطح ایران و هم سایر کشورها، می‌تواند کمک موثری در تحمل به ایسکمی فراهم آورد.



شکل ۱-۱- خلاصه ای از مسیر ارتباطی مولکول های سیگنال دهنده. علامات سوال مولکول هایی است که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت.

۱-۲- سکته مغزی

سکته مغزی مرگ ناگهانی سلول‌ها در ناحیه خاصی از مغز، به موجب جریان خون ناکافی می‌باشد که بسته به اینکه کدام ناحیه از مغز دچار آسیب شده باشد، یک استروک می‌تواند موجب فلج، اختلال در بینایی، اختلال در تکلم، از دست دادن حافظه و توانایی استدلال، کما و یا مرگ شود. به طور کلی سکته مغزی را می‌توان به دو نوع ایسکمیک و هموراژیک تقسیم کرد [۲۶-۲۷]:

۱-۲-۱- سکته مغزی ایسکمیک

۸۰-۹۰ درصد موارد سکته مغزی را شامل می‌شود که به واسطه لخته خون تشکیل شده در مغز و یا در نقطه –ای دیگر از بدن ایجاد می‌شود و به موجب آن شریان مشروب کننده مغزی مسدود می‌گردد که خود دو نوع است: