

Expression of the apoptotic genes Bax and Bcl-2 in rat hippocampus following transient ischemia

Majidy-Zolbin M^{1,2}, Rezaei L³, Azami-Tameh A¹, Rezvani Z⁴, Atlasi MA¹, Nikzad H¹, Naji T³, Naderian H^{1*}

1- Anatomical Sciences Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran.

2- Student Research Committee, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran.

3- Department of Biology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, Islamic Azad University of Pharmaceutical Sciences, Tehran, I. R. Iran.

4- Department of Biotechnology, Faculty of Chemistry, University of Kashan, Kashan, I. R. Iran.

Received February 23, 2012; Accepted July, 2012

Abstract:

Background: Cerebral ischemia is considered as one of the leading causes of death and involved in neuronal apoptosis. This study aimed to evaluate the Bax and Bcl-2 expression in the rat hippocampus after reperfusion following transient ischemia.

Materials and Methods: In this experimental study, transient global cerebral ischemia (15 and 30 minutes) was induced in adult male Wistar rats (n=5 in each group) by the occlusion of bilateral common carotid artery followed by reperfusion for 24 and 72 hours. Five Sham-operated animals, without any intervention, considered as a control group. The expression of Bcl-2 and Bax genes were detected by reverse transcription (RT)-PCR in all groups.

Results: Transcription and expression of both Bcl-2 and Bax genes were increased after global cerebral ischemia in all experimental groups; the two gene expression increment in the experimental groups (2, 3 and 4) was more detectable than the first group.

Conclusion: According to the results, transient cerebral ischemia activates Bcl-2 and Bax apoptotic genes that play an important role in the protection and induction of cell death in the hippocampal neurons, respectively.

Keywords: Transient cerebral ischemia, Gene expression, Apoptosis, Bcl-2 and Bax genes

* Corresponding Author.

Email: h_naderian@kaums.ac.ir

Tel: 0098 913 361 0661

Fax: 0098 361 555 1112

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences November, 2012; Vol. 16, No 5, Pages 454-460

Please cite this article as: Majidy-Zolbin M, Rezaei L, Azami-Tameh A, Rezvani Z, Atlasi MA, Nikzad H, et al. Expression of the apoptotic genes Bax and Bcl-2 in rat hippocampus following transient ischemia. *Feyz* 2012; 16(5): 454-60.

بررسی بیان ژن‌های آپوپتوتیک Bcl-2 و Bax در هیپوکامپ مغز موش صحرایی به‌دنبال ایجاد ایسکمی موقت

معصومه مجیدی ذوالبین^۱، لیلا رضایی^۳، ابوالفضل اعظمی طامه^۴، زهرا رضوانی^۵، محمد علی اطلسی^۶، حسین نیکزاد^۶، طاهره ناجی^۷، همایون نادریان^{۴*}

خلاصه:

سابقه و هدف: ایسکمی مغزی یکی از علل مهم مرگ و میر می‌باشد و در ایجاد آپوپتوز در نورون‌ها نقش دارد. هدف از این مطالعه بررسی بیان ژن‌های آپوپتوتیک Bcl2 و Bax به‌دنبال ایجاد ایسکمی موقت در هیپوکامپ مغز موش صحرایی و رپرفیوژن متعاقب آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی موش‌های صحرایی بالغ نژاد ویستار تحت القاء ایسکمی موقت به‌مدت ۱۵ و ۳۰ دقیقه با ایجاد انسداد دو طرفه شریان کاروتید مشترک قرار گرفتند (۵ سر در هر گروه). بعد از رفع انسداد و ایجاد خون‌رسانی مجدد به‌مدت ۲۴ و ۷۲ ساعت، حیوانات مورد بررسی واقع شدند. ۵ سر موش صحرایی بدون هیچ تداخلی به‌عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شدند. در تمام گروه‌ها بیان ژن‌های Bcl-2 و Bax به‌وسیله رونویسی معکوس واکنش زنجیره ای پلیمرز (RT-PCR) بررسی گردید.

نتایج: رونویسی و بیان ژن‌های Bcl-2 و Bax بعد از القاء ایسکمی در گروه‌های مورد افزایش یافت که البته در گروه اول در هر دو ژن بسیار ضعیف گزارش گردید و در گروه‌های تجربی ۲ و ۳ و ۴ بسیار آشکار بیان گردیدند. **نتیجه‌گیری:** یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهند که ایسکمی موقت بیان ژن‌های آپوپتوزی را فعال می‌کند که در حفاظت (Bcl-2) و القاء مرگ سلولی (Bax) در نورون‌های هیپوکامپ نقش دارند.

واژگان کلیدی: ایسکمی موقت مغزی، بیان ژن، آپوپتوز، ژن‌های Bcl-2, Bax

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره شانزدهم، شماره ۵، آذر و دی ۱۳۹۱، صفحات ۴۶۰-۴۵۴

مقدمه

وقایعی که بعد از گردش مجدد خون به‌صورت تأخیری بروز می‌کنند عامل آسیب‌های بافتی برگشت ناپذیری می‌باشند که متعاقب آن نیز نقص‌های آشکار با درجات متفاوت شایع می‌باشند [۵]. در گروه‌های تجربی ایسکمی موقت طول زمان رپرفیوژن بعد از القاء ایسکمی دارای نقش حائز اهمیتی است که به دو مرحله تقسیم می‌گردد: مرحله اولیه و مرحله تأخیری. هر مرحله فرایند مشخصی را فعال می‌کند، مرحله اولیه خون‌رسانی مجدد می‌تواند از پیشرفت و توسعه ناحیه آسیب دیده، با مهار بیان ژن‌های آپوپتوزی جلوگیری کند و در مرحله تأخیری برقراری مجدد جریان خون، ژن‌های آپوپتوزی زمان کافی را برای بیان شدن دارند که مهمترین پیامد آن در معرض آسیب قرار گرفتن حجم وسیعی از نورون‌های هیپو-کامپ در اثر مرگ نورونی تأخیری است [۶]. الگوی گردش خون پس از وقفه ایجاد شده توسط ایسکمی به شکل افزایش اولیه در جریان خون مغزی است و به‌دنبال آن کاهش جریان خون را داریم که اصطلاحاً به آن هایپوپرفیوژن اطلاق می‌گردد [۴]. آپوپتوزی که بعد از ایسکمی/رپرفیوژن فعال می‌شود، یکی از راه‌های مهم ایجاد مرگ سلولی در نورون‌هاست [۷] در پاسخ به واکنش اکسیداتیو در میتوکندری، غشاء خارجی میتوکندری نفوذپذیر گردیده و منجر به انتقال Bax از سیتوزول به میتوکندری می‌گردد که در حالت

سکته مغزی یکی از عوامل اصلی مرگ و میر و همچنین علت عمده ناتوانی در جوامع سالخورده است [۲، ۱]. سکته مغزی کاهش طولانی مدت جریان خون یا نقص در انتقال خون را نشان می‌دهد که منجر به تحویل ناقص اکسیژن و گلوکز می‌شود [۳]. رپرفیوژن پس از ایسکمی مغزی یک واقعه معمول بالینی است [۴].

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی کاشان
^۲ دانشجوی کارشناسی ارشد، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان
^۳ دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی
^۴ استادیار، مرکز تحقیقات علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی کاشان
^۵ گروه بیوتکنولوژی، دانشکده شیمی، دانشگاه کاشان
^۶ دانشیار، مرکز تحقیقات علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی کاشان
^۷ استادیار، گروه بیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی

* نشانی نویسنده مسئول:

کاشان، کیلومتر ۵ بلوار قطب راوندی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات علوم تشریح

تلفن: ۰۹۱۳۳۶۱۰۶۶۱ | دورنویس: ۰۳۶۱ ۵۵۵۱۱۱۲

پست الکترونیک: naderian_h@kaums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۲/۴ | تاریخ پذیرش نهایی: ۹۱/۴/۲۲

کلی این ژن محدود به فضای بین غشایی میتوکندری می باشد [۹۸]. انتقال این پروتئین پیش آپوپتوزی به وسیله خانواده پروتئین-های Bcl-2 کنترل می گردد [۷]. بنابراین، عنصر کلیدی آپوپتوز که قویا در مغز بیان و تنظیم می گردد، ژنهای Bax و Bcl-2 هستند [۱۰]. ایسکمی مغزی یکی از قوی ترین محرک های بیان ژن در مغز بوده و شمار وسیعی از این ژن ها که تحت القاء ایسکمی مغزی بیان می شوند، مورد شناسایی قرار گرفته اند. بسیاری از این ژن ها در فرآیندهای تخریب کننده نورون ها مثل پاسخ التهابی و تهییج نورون ها دخالت دارند. در همین راستا، به منظور پاسخ به این پرسش که آیا ژن های خانواده Bcl-2 نقش حفاظتی و حمایتی دارند، بیان و رونویسی این ژن ها، با رونویسی معکوس واکنش زنجیره ای پلیمرز (RT-PCR) مورد بررسی قرار گرفته است [۱۱، ۱۲]. برای شناسایی پاتوفیزیولوژی قسمتی از مکانیسم آپوپتوزی دخیل در ایسکمی و ریپرفیوژن در مدل ایسکمی موقت حیوانی بسیاری از نورون های از بین رفته در هیپوکامپ مورد ارزیابی قرار گرفته و چون مرگ نورونی تأخیری در هیپوکامپ بروز می کند، مکانیسم آن به طور کامل شناسایی نگردیده است [۲]. آنالیزهای جامعی در مورد تنظیم بیان ژن های آپوپتوزی انجام گرفته است که تایید می کنند، ژن های خانواده Bcl-2 در فرآیند مرگ سلولی نقش دارند [۱۰]. با توجه به یافته های موجود در مورد بیان ژن های موثر در فرآیند آپوپتوز، در این مطالعه به بررسی تاثیر زمان های مختلف ایسکمی ریپرفیوژن بر روی بیان ژن های آپو-پتوزی Bax و Bcl-2 پرداخته می شود.

مواد و روش ها

موش های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با وزن حدود ۲۵۰ گرم از حیوان خانه دانشگاه علوم پزشکی کاشان تهیه گردیدند. تمامی حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی با دمای ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. آب و غذا به مقدار لازم در دسترس آنها بود. جزئیات گروه های (هر گروه ۵ سر) مورد آزمایش به شرح زیر می باشد: گروه ۱- زمان ایسکمی مغزی ۱۵ دقیقه و زمان ریپرفیوژن ۲۴ ساعت؛ گروه ۲- زمان ایسکمی مغزی ۱۵ دقیقه و زمان ریپرفیوژن ۷۲ ساعت؛ گروه ۳- زمان ایسکمی مغزی ۳۰ دقیقه و زمان ریپرفیوژن ۲۴ ساعت؛ گروه ۴- زمان ایسکمی مغزی ۳۰ دقیقه و زمان ریپرفیوژن ۷۲ ساعت؛ و گروه ۵- گروه کنترل بدون بستن شریان ها

روش جراحی

حیوانات توسط تزریق درون صفاقی کلرال هیدرات

(۳۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند [۷، ۵، ۳]. پس از بیهوشی کامل، یک برش عمودی در ناحیه جلوی گردن حیوان (کمی پایین تر از آرواره تحتانی تا بالای جناغ) ایجاد شد. با کنار زدن پوست و عضلات جلوی نای، شریان های کاروتید مشترک در هر دو سمت در معرض دید قرار گرفت و پس از جدا کردن عصب واگ از آن، هر دو شریان توسط کلامپ میکروسرجری یاشارگیل به مدت ۱۵ و یا ۳۰ دقیقه بسته شدند [۱۲]. پس از زمان های فوق کلامپ ها برداشته شده و گردش خون مجدداً برای هر گروه به مدت ۲۴ و یا ۷۲ ساعت برقرار گردید. در طول مدت جراحی درجه حرارت مقعدی حیوان مرتباً توسط ترمومتر اندازه گیری شده و با استفاده از لامپ گرمایی درجه حرارت در 37°C تثبیت شد. برش ایجاد شده توسط نخ بخیه دوخته شد و حیوانات تا موقع به هوش آمدن و تثبیت وضعیت، تحت نظر قرار گرفته شده و بعد از جراحی در قفس های جداگانه نگهداری شدند. پس از زمان ریپرفیوژن، حیوانات با گیوتین مخصوص حیوانات کوچک کشته شده و سپس استخوان جمجمه کنار زده شده تا ناحیه هیپوکامپ دو طرف مشخص گردد [۱۳]. هیپوکامپ یک طرف برای استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج RNA و cDNA

تمام RNA ناحیه هیپوکامپ با استفاده از پروتکل استخراج RNA بر اساس دستور عمل کارخانه تولید کننده RNX استخراج شد. RNA با استفاده از اتانول رسوب داده شد و در دمای -80°C نگهداری گردید. غلظت RNA با استفاده از اسپکترو-فتومتر اندازه گیری گردید. با استفاده از کیت، از RNA نمونه های مورد نظر cDNA سنتز گردید.

واکنش PCR

از واکنش زنجیره ای پلی مرز برای بیان ژن های Bcl-2 و Bax به عنوان ژن های هدف و GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) به عنوان ژن ساختمانی (House keeper) جهت کنترل داخلی استفاده شد و صحت بررسی های PCR با استفاده از ژن GAPDH تایید گردید. با استفاده از پرایمرها (جدول شماره ۱)، از cDNA سنتز شده بر اساس پروتکل، واکنش PCR به شرح زیر انجام گرفت. دناتو-راسیون اولیه در دمای 96°C ، ۳ دقیقه، در هر سیکل دناتوراسیون 94°C ، ۳۰ ثانیه. دمای اتصال برای پرایمر Bcl-2 61°C ، ۳۰ ثانیه، پرایمر Bax 61°C ، ۳۰ ثانیه و پرایمر GAPDH 61°C ، ۳۰ ثانیه با استفاده از دمای گرادیان تعیین گردید. دمای تکثیر برای هر

آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

بررسی یافته‌های این مطالعه مشخص نمود، تنوع زمان ایسکمی-ریپرفیوژن روی بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 موثر است. در مطالعه ما ژن‌های Bax و Bcl-2 در همه گروه‌ها بیان شده بودند. شکل ۱ مشخص می‌نماید ژن Bax با ۱۷۳ نوکلئوتید و ژن Bcl-2 با ۲۲۶ نوکلئوتید در همه گروه دیده شده‌اند. همچنین، سطح بیان Bcl-2/GAPDH و Bax/GAPDH به‌عنوان کنترل mRNA در هیپوکامپ در سطح پایینی قرار داشت، در حالی‌که در گروه‌های ایسکمی افزایشی را نشان داده است. در این مطالعه مقایسه سطح بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 مشخص می‌کند بیان Bcl-2 به‌جز در گروه سوم در همه گروه‌ها به‌طور معنی‌داری بیشتر است (جدول شماره ۲). همچنین، مقایسه ژن Bax در گروه ایسکمی-ریپرفیوژن با گروه کنترل آن به‌جز گروه اول در بقیه گروه‌ها اختلاف معنی‌داری را مشخص می‌کند. چنین نتیجه‌ای در مورد مقایسه ژن Bcl-2 در گروه ایسکمی ریپرفیوژن با گروه کنترل نیز دیده شد. تجزیه و تحلیل دقیق‌تر یافته‌های این مطالعه نشان داد زمان ریپرفیوژن بیشتر (۷۲ ساعت) سبب افزایش سطح بیان ژن Bcl-2 شده است (شکل شماره ۲).

سیکل 72°C ، ۴۵ ثانیه بود. برای پرایمرهای Bcl-2، Bax ۳۷ سیکل و برای GAPDH ۳۳ سیکل انجام گردید. به‌منظور تکمیل نهایی ساختار DNA های تکثیر شده، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه تکثیر نهایی را انجام دادند. محصول PCR در ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد. نمونه‌های DNA در کنار مارکر ژنی به مدت ۳۰ دقیقه در ولتاژ ثابت ۱۲۰ ولت به حرکت درآمدند و عکس‌برداری از ژل انجام شد. بهبود کیفیت واکنش PCR برای هر نمونه و پرایمر با استفاده از رقیق سازی سریالی انجام گرفت تا تعداد سیکل مناسب برای انجام این واکنش تعیین گردد. پس از تهیه عکس از ژل، میزان تراکم باندها توسط نرم افزار (UVI geltec) دندستومتری با تراکم سنجی و با استفاده از روش semi quantity PCR (نیمه کمی) مقایسه بین گروه‌ها انجام گردید. نسبت میزان تراکم باند ژن هدف از هر گروه بر میزان تراکم باند ژن ساختمانی (یعنی GAPDH) از همان گروه محاسبه شد و میانگین این نسبت در سه بار تکرار آزمایشات به‌صورت درصد بیان نسبت به گروه کنترل نمایش داده شد.

آنالیز آماری

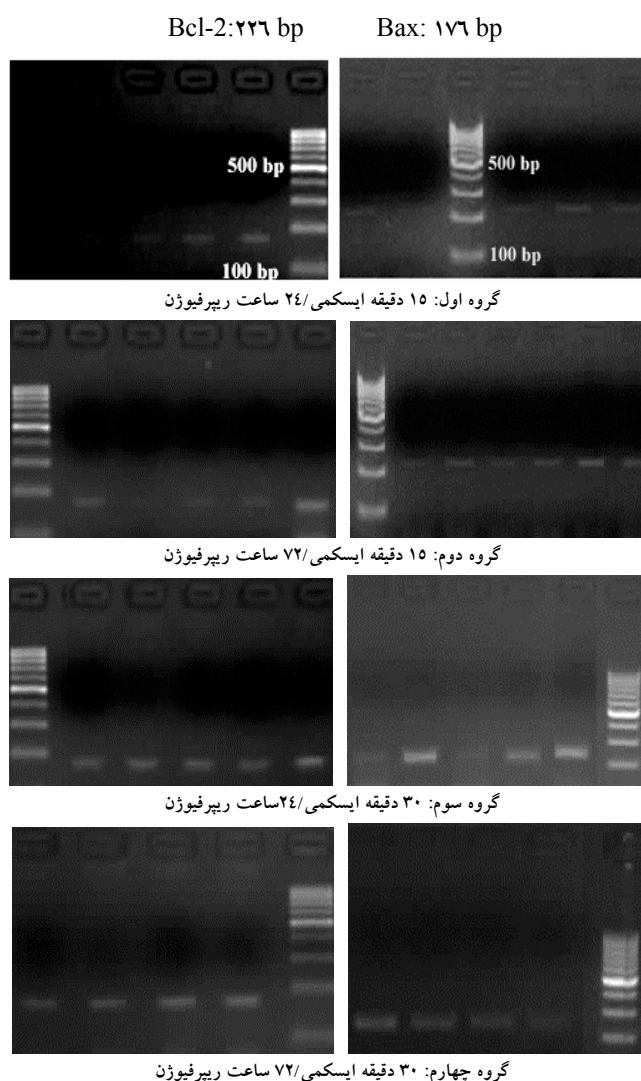
به‌منظور تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۶ و آزمون آماری t استفاده شد. $P < 0.05$ از لحاظ

جدول شماره ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده

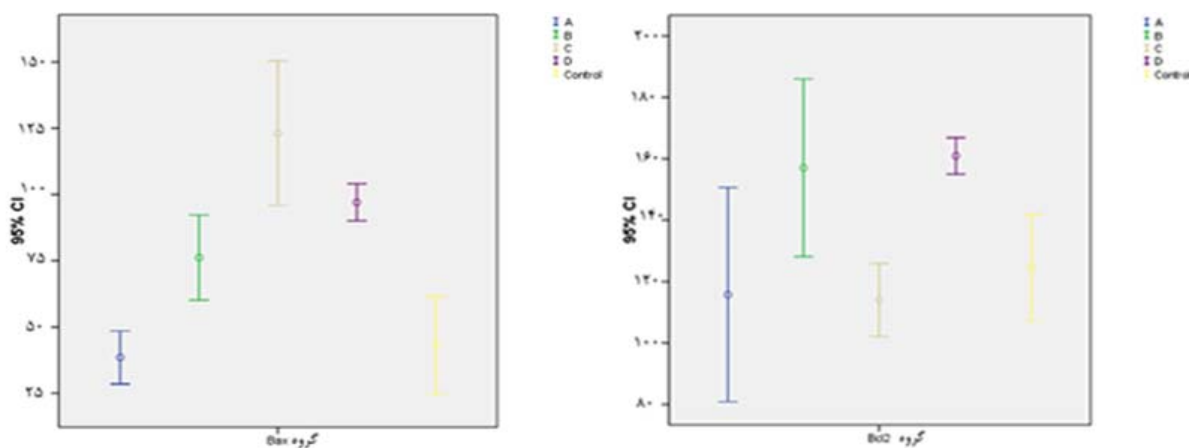
ژن	ترادف (5'-3')	اندازه (bp)	دمای اتصال ($^{\circ}\text{C}$)	منبع
Bcl-2	F:CTGGTGGACAACATCGCTCTG R:GGTCTGCTGACCTCACTTGTG	۲۲۶	۶۸	[۱۴]
Bax	F:TGCAGAGGATGATTGCTGAC R:GATCAGCTCGGGCACTTTAG	۱۷۶	۶۱	[۱۵]
GAPDH	F:GAACATCATCCCTGCATCCA R:CCAGTGAGCTTCCCGTTCA	۶۸	۶۱	[۱۶]

جدول شماره ۲- مقایسه میزان بیان ژن‌های Bcl-2 و Bax در گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌ها	$\bar{X} \pm SD$ of bax	P value of bax	$\bar{X} \pm SD$ of bcl-2	P value of bcl-2	Bcl-2/ Bax نسبت
۱۵ دقیقه ایسکمی/ساعت ریپرفیوژن	38.0 ± 0.8	$P=0.056$	110.7 ± 28.1	$P=0.055$	۳
۱۵ دقیقه ایسکمی/ساعت ریپرفیوژن	76.1 ± 12.9	$P<0.001^*$	157.0 ± 23.2	$P=0.02^*$	۲/۰۶
۳۰ دقیقه ایسکمی/ساعت ریپرفیوژن	123.1 ± 21.9	$P<0.001^*$	114.0 ± 9.5	$P=0.02$	۰/۹۳
۳۰ دقیقه ایسکمی/ساعت ریپرفیوژن	97.1 ± 56	$P<0.001^*$	160.9 ± 4.7	$P<0.001^*$	۱/۶۶
کنترل	43.1 ± 14.8		124.5 ± 13.8		



شکل شماره ۱- بیان ژن‌های Bax, Bcl-2 در گروه‌های مختلف بعد از انسداد دو طرفه شریان کاروتید مشترک به مدت ۱۵ و ۳۰ دقیقه زمان ایسکمی و برقراری جریان خون مجدد ۲۴ و ۷۲ ساعت زمان ریپرفیوژن



شکل شماره ۲- مقایسه گروه‌های تجربی گروه کنترل برای بیان ژن‌های Bcl-2 و Bax به ترتیب در هر شکل از سمت چپ به راست برای گروه‌های اول تا چهارم

بحث

بر اساس نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، مقایسه بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 نشان داد سطح بیان ژن Bcl-2 در ایسکمی موقت و به‌دنبال آن ریپرفیوژن بیشتر است. هم‌چنین، سطح بیان ژن Bax به‌جز در گروه اول در بقیه گروه‌ها افزایش یافته بود. در فرآیند آپوپتوز Bax به‌عنوان یک ژن پیش‌برنده و Bcl-2 به‌عنوان ژن متوقف‌کننده آپوپتوز شناخته می‌شوند [۱۰]. بیان بیشتر ژن Bcl-2 در گروه‌های ایسکمی ریپرفیوژن که در این مطالعه به‌دست آمده است با نتایج حاصل از مطالعات مشابه که بر روی بیان ژن‌های مذکور صورت گرفته است منطبق می‌باشد [۱۷]. در مطالعه حاضر ۴ گروه ایسکمی ریپرفیوژن مطالعه شد که زمان ایسکمی ۱۵ و ۳۰ دقیقه و زمان ریپرفیوژن ۷۲ ساعت بالاترین سطح بیان ژن Bcl-2 را نشان داد. این یافته‌ها با شواهد ارائه شده در دیگر مطالعات منطبق می‌باشند [۱۸، ۱۲]. چنین یافته‌هایی با زمان‌های متفاوت ایسکمی ریپرفیوژن بعد از ۱۲ و ۲۴ ساعت نیز مطابقت دارد [۱۹]. مطالعه حاضر مشخص نمود، افزایش زمان ریپرفیوژن، بیان بیشتر Bcl-2 را بدون در نظر گرفتن زمان القای ایسکمی به‌همراه دارد. در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۱۰ توسط Brait و همکارانش بین زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردیده است [۱۹]. شاید توضیح چنین اختلافی با نقش Bcl-2 به‌عنوان یک عامل متوقف‌کننده آپوپتوز و هم‌چنین کاهش سطح بیان ژن Bax در زمان‌های ۳ و ۶ دقیقه ایسکمی مرتبط باشد. در این زمان‌ها نیز اختلاف معنی‌داری بین سطح بیان ژن‌ها مشاهده نگردیده است و این در حالی است که با افزایش زمان ایسکمی سطح بیان ژن بیشتر شده است که با مطالعه ما نیز مطابقت دارد [۱۸]. بنابراین، می‌توان اظهار داشت که افزایش زمان ایسکمی احتمالاً سبب تطبیق بافت عصبی به آسیب ایجاد شده می‌شود. پایداری غشاء میتوکندری یکی از وقایع مهم در فرآیند بقاء سلول در آپوپتوز می‌باشد. Bcl-2 غشاء میتوکندری را از اثرات مخرب Bax محافظت می‌نماید [۱۸]. هدف دیگر این مطالعه بررسی بیان ژن Bax به‌عنوان یک عامل پیش‌برنده آپوپتوز بود. Bax در سیتوپلاسم سلول‌های طبیعی وجود دارد و به‌هنگام تحریک آپوپتوز به میتوکندری منتقل گردیده و به‌عنوان یک آغازگر مسیر آپوپتوز شناخته می‌شود [۲۰، ۲۱]. بنابراین، رابطه و نسبت بین Bax و Bcl-2 از عوامل مهم در این فرآیند می‌باشد. مطالعه ما

نشان داد ژن Bax در همه گروه‌ها بیان شده، ولی سطح بیان آن در گروه سوم پایین‌تر از Bcl-2 می‌باشد. این کاهش به نقش ژن Bax ارتباط دارد. Bcl-2 سبب مهار انتقال Bax به میتوکندری می‌گردد [۲۲]. بنابراین نسبت Bax و Bcl-2 و تعادل بین آنها حائز اهمیت است. در مطالعه ما نسبت بین Bax و Bcl-2 به‌صورت میانگین در هر گروه سنجیده شد (جدول شماره ۲). احتمالاً یک توضیح قابل ارائه برای اختلاف در نسبت بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 به نقش دقیق Bax بر می‌گردد که هنوز بر اساس اظهار محققین کاملاً مشخص نمی‌باشد [۲۰]. در مطالعه‌ای که به بررسی تغییرات هیستو پاتولوژیک نورون‌های ناحیه هیپوکامپ توسط نویسندگان در گروه علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی کاشان به روش بستن دو رگ و چهار رگ صورت گرفت، در هر دو روش نورون‌های غیر طبیعی مشاهده گردید (داده‌ها گزارش نشده‌اند). در مقایسه اثرات القای ایسکمی به روش بستن دو رگ و چهار رگ مشاهده شد که در هر ۲ روش تغییرات نورونی به‌صورت بروز نورون‌های غیر طبیعی دیده می‌شود که شدت آنها در روش بستن چهار رگ بیشتر بود. یکی از یافته‌های مورد توجه این مطالعه افزایش سطح mRNA ژن Bcl-2 در ۷۲ ساعت ریپرفیوژن بود. توصیه می‌شود به‌منظور تعیین دقیق‌تر سطح بیان ژن‌های موثر در فرآیند آپوپتوز زمان‌های بیشتر نیز مورد بررسی قرار گیرند. هم‌چنین، کاربرد مواد محافظت‌کننده در بیان ژن‌های موثر در آپوپتوز بررسی گردد.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی تجربه ایسکمی موقت و زمان ریپرفیوژن بعد از القای ایسکمی نقش مهمی در تنظیم بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 داشته و به‌دنبال آن روی بقاء بافت عصبی موثر می‌باشد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کاشان که تسهیلات لازم جهت تصویب و اجراء طرح تحقیقاتی با شماره ۸۹۵۹ و پایان نامه دانشجویی مربوط به این مقاله را فراهم نمودند. هم‌چنین، از گروه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کاشان که با اختیار قرار دادن تمام امکانات تحقیقاتی خود انجام این پروژه را تسهیل کردند، کمال تشکر و امتنان به‌عمل می‌آید.

References:

- [1] Slemmer JE, Zhu C, Landshamer S, Trabold R, Grohm J, Ardeschiri A, et al. Causal role of apoptosis-inducing factor for neuronal cell death following traumatic brain injury. *Am J Pathol*

2008; 173(6): 1795-805.

- [2] Yonekura I, Takai K, Asai A, Kawahara N, Kirino T. p53 potentiates hippocampal neuronal death caused by global ischemia. *J Cereb Blood*

Flow Metab 2006; 26(10): 1332-40.

[3] Büttner F, Cordes C, Gerlach F, Heimann A, Alessandri B, Luxemburger U, et al. Genomic response of the rat brain to global ischemia and reperfusion. *Brain Res* 2009; 1252: 1-14.

[4] Todd NV, Picozzi P, Crockard HA, Russell RR. Reperfusion after cerebral ischemia: influence of duration of ischemia. *Stroke* 1986;17(3): 460-6.

[5] Vakili A. Post-ischemic treatment of pentoxifyline reduces cortical not striatal infarct volume in transient model of focal cerebral ischemia in rat. *Brain Res* 2007;1144:186-91.

[6] Schaller B, Graf R. Cerebral Ischemia and Reperfusion: The Pathophysiologic Concept as a Basis for Clinical Therapy. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004; 24(4): 351-71.

[7] Xing B, Chen H, Zhang M, Zhao D, Jiang R, Liu X, et al. Ischemic postconditioning inhibits apoptosis after focal cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat. *Stroke* 2008; 39(8): 2362-9.

[8] Li JS, Zhang W, Kang ZM, Ding SJ, Liu WW, Zhang J, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning reduces ischemia-reperfusion injury by inhibition of apoptosis via mitochondrial pathway in rat brain. *Neuroscience* 2009; 159(4): 1309-15.

[9] Liang R, Pang ZP, Deng P, Xu ZC. Transient enhancement of inhibitory synaptic transmission in hippocampal CA1 pyramidal neurons after cerebral ischemia. *Neuroscience* 2009; 160(2): 412-8.

[10] Gustavsson M, Wilson MA, Mallard C, Rousset C, Johnston MV, Hagberg H. Global gene expression in the developing rat brain after hypoxic preconditioning: involvement of apoptotic mechanisms? *Pediatr Res* 2007; 61(4): 444-50.

[11] Hetz C, Vitte PA, Bombrun A, Rostovtseva TK, Montessuit S, Hiver A, et al. Bax channel inhibitors prevent mitochondrion-mediated apoptosis and protect neurons in a model of global brain ischemia. *J Biol Chem* 2005; 280(52): 42960-70.

[12] Wu C, Fujihara H, Yao J, Qi S, Li H, Shimoji K, et al. Different expression patterns of Bcl-2, Bcl-xl, and Bax proteins after sublethal forebrain ischemia in C57Black/Crj6 mouse striatum. *Stroke* 2003; 34(7): 1803-8.

[13] Faherty CJ, Xanthoudakis S, Smeyne RJ.

Caspase-3-dependent neuronal death in the hippocampus following kainic acid treatment. *Brain Res Mol Brain Res* 1999; 70(1): 159-63.

[14] Tamatani M, Mitsuda N, Matsuzaki H, Okado H, Miyake S, Vitek MP, et al. A pathway of neuronal apoptosis induced by hypoxia/reoxygenation: roles of nuclear factor-kappaB and Bcl-2. *J Neurochem* 2000; 75(2): 683-93.

[15] Kaneda K, Kashii S, Kurosawa T, Kaneko S, Akaike A, Honda Y, et al. Apoptotic DNA fragmentation and upregulation of Bax induced by transient ischemia of the rat retina. *Brain Res* 1999; 815(1): 11-20.

[16] Harrison DC, Davis RP, Bond BC, Campbell CA, James MF, Parsons AA, et al. Caspase mRNA expression in a rat model of focal cerebral ischemia. *Brain Res Mol Brain Res* 2001; 89(1-2): 133-46.

[17] Gill MB, Perez-Polo JR. Hypoxia ischemia-mediated cell death in neonatal rat brain. *Neurochem Res* 2008; 33(12): 2379-89.

[18] Clark RSB, Chen J, Watkins SC, Kochanek PM, Chen M, Stetler RA, et al. Apoptosis-suppressor gene bcl-2 expression after traumatic brain injury in rats. *J Neurosci* 1997;17(23): 9172-82.

[19] Brait VH, Jackman KA, Walduck AK, Selemidis S, Diep H, Mast AE, et al. Mechanisms contributing to cerebral infarct size after stroke: gender, reperfusion, T lymphocytes, and Nox2-derived superoxide. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010; 30(7): 1306-17.

[20] Cheng G, Wei L, Zhi-Dan S, Shi-Guang Z, Xiang-Zhen L. Atorvastatin ameliorates cerebral vasospasm and early brain injury after subarachnoid hemorrhage and inhibits caspase-dependent apoptosis pathway. *BMC Neurosci* 2009; 10(1): 7.

[21] Harukuni I, Bhardwaj A. Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. *Neurol Clin* 2006; 24(1): 1-22.

[22] Endo H, Kamada H, Nito C, Nishi T, Chan PH. Mitochondrial translocation of p53 mediates release of cytochrome c and hippocampal CA1 neuronal death after transient global cerebral ischemia in rats. *J Neurosci* 2006; 26(30): 7974-83.