

Effects of Usnic Acid on Apoptosis and Expression of Bax and Bcl-2 Proteins in Hippocampal CA1 Neurons Following Cerebral Ischemia-Reperfusion

Sohaila Erfani¹ , Tahereh Valadbeigi¹ , Mehdi Khaksari² , Ali Moghimi³ , Nahid Aboutaleb^{4*} 

¹ Dept of Biology, Faculty of Science, Ilam University, Ilam, Iran

² Dept of Physiology, Faculty of Medicine, Shahrood University of Medical Sciences, Shahrood, Iran

³ Rayan Research Center for Neuroscience and Behavior, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

⁴ Physiology Research Center, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Article Info

Article type:

Research article

Article History:

Received: 10 July 2021

Revised: 15 December 2021

Accepted: 22 December 2021

Published Online: 23 July 2022

* Correspondence to:

Nahid Aboutaleb

Physiology Research Center,
Department of Physiology,
Faculty of Medicine, Iran
University of Medical Sciences,
Tehran, Iran

Email: aboutaleb.n@iums.ac.ir

ABSTRACT

Introduction: Cerebral ischemia-reperfusion causes complex pathological mechanisms that lead to tissue damage, such as neuronal apoptosis. Usnic acid is a secondary metabolite of lichen and has various biological properties including antioxidant and anti-inflammatory activities. This study aimed to investigate the neuroprotective effects of usnic acid on apoptotic cell death and apoptotic-related proteins (Bax and Bcl-2) in the CA1 area of the hippocampus following cerebral ischemia-reperfusion.

Material & Methods: A total of 42 male Wistar rats were randomly divided into three groups (sham, ischemia-reperfusion, and ischemia-reperfusion+usnic acid). Ischemia was induced by occlusion of both common carotid arteries for 20 min. Usnic acid (25 mg/kg, intraperitoneally) was injected at the beginning of reperfusion time. The expression levels of Bax and Bcl-2 proteins were measured using the immunofluorescence method, and the rate of apoptotic cell death was determined using the TUNEL staining method.
(Ethic code: IR.SHMU.REC.1397.186)

Findings: In this study, cerebral ischemia increased apoptotic cell death in the CA1 area of the hippocampus. It was demonstrated that usnic acid significantly decreased apoptotic cell death by decreasing the expression of Bax pro-apoptotic protein and increasing the expression of Bcl-2 (anti-apoptotic protein).

Discussion & Conclusion: It can be concluded that usnic acid has a neuroprotective effect against cerebral ischemia-reperfusion damages by reducing cell death.

Keywords: Apoptosis, Hippocampus, Ischemia-reperfusion, Usnic acid

➤ How to cite this paper

Erfani S, Valadbeigi T, Khaksari M, Moghimi A, Aboutaleb N. Effects of Usnic Acid on Apoptosis and Expression of Bax and Bcl-2 Proteins in Hippocampal CA1 Neurons Following Cerebral Ischemia-Reperfusion. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2022;30(3): 101-111.

آثار اسنیک اسید بر آپوپتوز و بیان پروتئین های Bax و Bcl-2 نورون های ناحیه CA1 هیپوکامپ به دنبال ایسکمی - رپرفیوژن مغزی

سهیلا عرفانی^۱ ID، طاهره ولدبیگی^۱ ID، مهدی خاکساری^۲ ID، علی مقیمی^۳ ID، ناهید ابوطالب^۴ ID

^۱ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

^۲ گروه فیزیولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران

^۳ مرکز پژوهشی علوم اعصاب و رفتار رایان، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

^۴ مرکز تحقیقات فیزیولوژی و گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۱۹

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۰/۰۹/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۰۷

تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۰۵/۰۱

نویسنده مسئول:

ناهید ابوطالب

مرکز تحقیقات فیزیولوژی و گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

Email: aboutaleb.n@iums.ac.ir

مقدمه: ایسکمی - رپرفیوژن مغزی باعث ایجاد سازوکارهای پیچیده آسیب بافتی از جمله آپوپتوز نورون ها می شود. اسنیک اسید یک متابولیت ثانویه از گلسنگ است که خواص بیولوژیکی مختلفی چون فعالیت های آنتی اکسیدانی و ضد التهابی دارد. هدف از مطالعه حاضر بررسی آثار محافظت کننده عصبی اسنیک اسید بر مرگ سلولی آپوپتوز و پروتئین های مرتبط با آپوپتوز Bax و Bcl-2 در نورون های ناحیه CA1 هیپوکامپ به دنبال ایسکمی - رپرفیوژن مغزی بود. **مواد و روش ها:** ۴۲ موش صحرایی نر نژاد ویستار به طور تصادفی به سه گروه (شم، ایسکمی - رپرفیوژن و ایسکمی - رپرفیوژن + اسنیک اسید) تقسیم شدند. ایسکمی مغزی با انسداد شریان های کاروتید مشترک ایجاد گردید. تزریق اسنیک اسید (۲۵mg/kg)، به صورت داخل صفاقی در آغاز برقراری دوباره جریان خون صورت گرفت. میزان بیان پروتئین های Bax و Bcl-2 با استفاده از روش ایمونوفلورسنت اندازه گیری شد. برای تعیین میزان مرگ سلولی آپوپتوزی از رنگ آمیزی TUNEL استفاده گردید.

یافته ها: ایسکمی مغزی موجب افزایش آپوپتوز نورون های ناحیه CA1 هیپوکامپ شد. اسید اسنیک از طریق کاهش بیان پروتئین پیش آپوپتوزی Bax و افزایش بیان پروتئین آنتی آپوپتوزی Bcl-2، میزان مرگ سلولی آپوپتوزی را به شکل چشمگیری کاهش داد.

بحث و نتیجه گیری: اسنیک اسید از طریق کاهش مرگ سلولی می تواند اثر محافظتی عصبی در برابر آسیب های ناشی از ایسکمی - رپرفیوژن مغزی داشته باشد.

واژه های کلیدی: آپوپتوز، اسنیک اسید، ایسکمی - رپرفیوژن، هیپوکامپ

استناد: عرفانی، سهیلا؛ ولدبیگی، طاهره؛ خاکساری، مهدی؛ مقیمی، علی؛ ابوطالب، ناهید. آثار اسنیک اسید بر آپوپتوز و بیان پروتئین های Bax و Bcl-2 نورون های ناحیه CA1 هیپوکامپ به دنبال ایسکمی - رپرفیوژن مغزی. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، شهریور ۱۴۰۱؛ ۳۰(۳): ۱۱۱-۱۰۱.

ایسکمی - ریپرفیوژن مغزی یکی از مهم ترین علل مرگ و میر و ناتوانی در سراسر جهان تلقی می شود (۱). روش های درمانی سکتۀ مغزی بسیار اندک است؛ از این رو، توسعه و ایجاد روش ها و عوامل درمانی جدید یا درمان های ترکیبی در این زمینه ضروری به نظر می رسد (۲). سازوکارهای پاتولوژیک پیچیده ای در ایسکمی مغزی دخیل هستند که می توانند به آسیب منجر گردند. سمیت تحریکی عصبی، استرس اکسیداتیو، التهاب و آپوپتوز مهم ترین فرایندهایی هستند که با ایسکمی مغزی ارتباط دارند (۳، ۴). به خوبی نشان داده شده است که در سکتۀ مغزی ایسکمیک، فعال سازی چندین مسیر سیگنالینگ سلولی به آپوپتوز (مرگ برنامه ریزی شده) نورونی منجر می شود. مطالعات نشان می دهد که در زمان های گوناگون پس ایسکمی مغزی، بیان پروتئین مهم آنتی آپوپتوزی Bcl-2 کاهش و بیان پروتئین پیش آپوپتوزی Bax افزایش می یابد (۵).

گلشنک ها از مهم ترین منابع ترکیبات فعال بیولوژیکی هستند که به علت خاصیت درمانی ارزشمندشان همانند اغلب گیاهان، از دوران باستان به عنوان داروهای طبیعی در طب سنتی استفاده شده اند (۶). این ارگانیسیم ها فعالیت های بیولوژیکی بسیار متفاوتی از جمله خواص ضدالتهابی، آنتی اکسیدانی، ضد تب، ضد درد، ضد سرطان، ضد میکروب، ضد دیابت و ترمیم زخم دارند (۷). شایع ترین گلشنک، جنس *Usnea Dill. ex Adans* است که سابقۀ کاربرد پزشکی در سراسر جهان را دارد؛ به عنوان مثال، *Usnea longissima Ach* یک نوع از گونه های گلشنک است که به طور گسترده برای درمان آسیب های ناشی از التهاب پوستی استفاده می شود (۸).

اسنیک اسید آنتی بیوتیکی طبیعی است که به طور اختصاصی در گلشنک یافت می شود و در پزشکی و مصارف زیست محیطی کاربرد دارد. اسنیک اسید در بسیاری از انواع گلشنک شناخته شده از جمله *Evernie*، *Parmelia*، *Usnea*، *Cladonia*، *Hypotrachyna*

، *Ramalina*، *Lecanora* و *Alectoria* شناسایی شده است. در برخی از مطالعات، به خاصیت آنتی اکسیدانی و آنتی التهابی اسنیک اسید اشاره شده است (۹-۱۱). در مطالعه لی و همکاران نشان داده شده است که اسنیک اسید به علت داشتن آثار ضد التهاب عصبی، می تواند به عنوان کاندیدای درمانی بالقوۀ سودمندی برای بیماری پارکینسون (PD) و سایر بیماری های تخریب عصبی مرتبط با التهاب عصبی در نظر گرفته شود (۱۲).

با توجه به مطالب بالا و اهمیت سازوکارهای مولکولی ایسکمی مغز در دستیابی به یک عامل درمانی نوین برای ایسکمی مغزی، مطالعه حاضر با هدف بررسی آثار محافظتی اسنیک اسید بر میزان آپوپتوز و پروتئین های مرتبط آپوپتوزی Bax و Bcl-2 در نورون های ناحیۀ CA1 هیپوکامپ مغز به دنبال مدل ایسکمی - ریپرفیوژن مغزی در موش صحرایی نر انجام شده است.

مواد و روش ها

حیوانات و دارو: این تحقیق روی ۴۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (۳۰۰-۲۵۰ گرم) صورت گرفت که از مؤسسۀ پاستور تهران تهیه شده بودند. حیوانات در اتاق و قفس های استاندارد و محیط کنترل شده (۲۴-۲۲ درجۀ سانتی گراد و چرخۀ ۱۲/۱۲ ساعت روشنایی - تاریکی)، با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری گردیدند. برای تزریق، اسنیک اسید (سیگما آلدریج، ۳۲۹۹۶۷، آلمان) در DMSO حل شد. همه مراحل آزمایش بر اساس قوانین بین المللی نگهداری و مراقبت از حیوانات و با نظارت کمیته اخلاقی با کد اخلاق IR.SHMU.REC.1397.186 انجام گردیده است.

گروه های آزمایشی: حیوانات به طور تصادفی به سه گروه تقسیم شدند: گروه شم، گروه ایسکمی - ریپرفیوژن و گروه ایسکمی - ریپرفیوژن + اسنیک اسید (۱۴ سر در هر گروه). حیوانات در گروه ایسکمی -

ریپرفیوژن + اسنیک اسید، یک تزریق داخل صفاقی (IP) از اسنیک اسید (۲۵mg/kg) در آغاز زمان خون رسانی مجدد دریافت کردند. برای ایجاد مدل ایسکمی - ریپرفیوژن مغزی، انسداد شریان های کاروتید مشترک (CCA) صورت گرفت. در گروه شم، همان روش جراحی بدون انسداد شریان های کاروتید مشترک آن ها انجام شد.

القای ایسکمی - ریپرفیوژن گذرای مغزی: ایجاد مدل ایسکمی - ریپرفیوژن مغزی بر اساس روش جراحی بستن موقتی شریان های کاروتید مشترک انجام گردید (۱۳). پیش از شروع جراحی ایسکمی مغز، بی هوشی با استفاده از تزریق داخل صفاقی کتامین (۵۰mg/kg) و زایلازین (۱۰mg/kg) انجام شد؛ سپس هر دو سرخرگ کاروتید مشترک با دقت از عصب واگ جدا گردید. انسداد شریان کاروتید مشترک به مدت ۲۰ دقیقه، با استفاده از گیره های جراحی انجام شد. وقتی زمان انسداد به پایان رسید، گیره ها برای ایجاد ریپرفیوژن (خون رسانی مجدد) فوری برداشته شدند. برقراری دوباره جریان خون با مشاهده تأیید گردید. در طول جراحی، دمای رکتوم حیوانات در 36.5 ± 0.5 درجه سانتی گراد، با استفاده از سامانه گرمایش بازخوردی تنظیم شد. در پایان جراحی، حیوانات در قفس های جداگانه قرار گرفتند و دسترسی آزاد به غذا و آب داشتند.

آماده سازی بافت برای رنگ آمیزی: چهار روز پس از ایسکمی، تحت بی هوشی بسیار عمیق، فرایند ریپرفیوژن از طریق قلب، با محلول نمکی ۰/۹ درصد و به دنبال آن، پارافرمالدئید ۴ درصد در بافر فسفات ۰/۱ میلی مول (pH=7.4) انجام شد. پس از آن، بافت های مغز آن ها خارج گردید و در فیکساتیو مشابه به مدت ۳ روز قرار گرفت؛ سپس از مغزها بلوک های پارافینی تهیه و با استفاده از دستگاه میکروتوم، مقاطع کروئال با ضخامت ۷ میکرومتر برای رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی و ایمونوفلورسنت گرفته شد. مقاطع بر اساس اطلس پاکسینوس در محدوده بین ۳/۳ و ۴/۲ میلی متر پشت برگما تهیه گردید (۱۴).

اندازه گیری میزان ایمونواکتیویته Bcl-2 و Bax: برای ارزیابی میزان فعال سازی Bcl-2 و Bax، رنگ آمیزی ایمونوفلورسنت با استفاده از قطعات بافتی (۳ تا ۴ عدد سکشن در هر مغز) صورت گرفت (۱۵). انکوباسیون (۲۰ دقیقه در ۶۲ درجه سانتی گراد) و آب رسانی مجدد توسط سری نزولی الکل انجام شد. در مرحله بعدی، از پراکسید هیدروژن ۱۰ درصد در داخل متانول ۱۰ دقیقه برای کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز درونزا استفاده گردید. پس از آن، مقاطع بافتی در بافر تریس (pH=7.4) شسته شد و به دنبال آن، بازبانی آنتی ژن ها از طریق اتوکلاو به مدت ۱۱ دقیقه در بافر سترات (pH=6) انجام گردید. قطعات توسط سرم بز نرمال ۱۰ درصد، به مدت یک ساعت بلوکه شدند و سپس انکوباسیون با آنتی بادی ضد Bcl-2 و Bax (rabbit antibody against rat Abcam, UK) به عنوان یک آنتی بادی اولیه (با رقت ۱/۱۰۰) و برای یک شب (در دمای ۴ درجه سانتی گراد) صورت گرفت. پس از شستشو در PBS و انکوباسیون توسط آنتی بادی ثانویه (anti-rabbit secondary antibody, Abcam, UK) (با رقت ۱/۱۰۰۰)، برش های بافتی با فلوروکروم کونژوگه شدند؛ سپس فرایند رنگ آمیزی متقابل (counterstaining) با ۶'۴ دیامیدینو-۲-فیل ایندول (DAPI) در PBS به مدت ۵ دقیقه انجام گردید. پس از شستشو، سیگنال های فلورسنت ناحیه CA1 هیپوکامپ سمت راست، در هر اسلاید با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس (Labomed, USA, 400×) ارزیابی شدند. ابتدا تعداد سلول های مثبت مارکر مدنظر شمارش می شود؛ سپس تعداد کل هسته هایی که با رنگ آمیزی DAPI مشخص شده است، به عنوان تعداد کل سلول های آن ناحیه شمارش می گردند. در نهایت، درصد سلول های مثبت مارکر مدنظر نسبت به سلول ها محاسبه می شود که در تصاویر به شکل Merg مشاهده می گردد.

رنگ آمیزی تانل: برای تشخیص قطعات DNA نشان گذاری شده در سلول های دچار مرگ آپوپتوتیک، از کیت تشخیص مرگ سلولی آپوپتوز (In Situ Cell

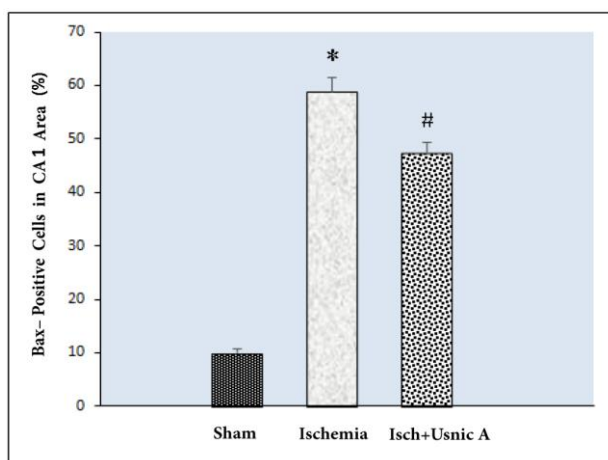
آزمون نشان داد، داده‌ها به‌طور نرمال توزیع شده‌اند. علاوه بر این، از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) برای مقایسه اختلافات بین گروه‌ها استفاده گردید و هنگامی که تفاوت معنی‌داری وجود داشت، یک آزمون تعقیبی شفه یا دانت تی-۳ (Scheffe's یا Dunnet's T3) برای تعیین محل اینکه تفاوت در کدام گروه‌ها رخ داده است، استفاده شد. سطح معنی‌داری $P \leq 0.05$ تعیین گردید. همه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS vol.16 تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

درمان با اسنیک اسید، میزان بیان پروتئین Bax پس از ایسکمی - جریان مجدد خون را کاهش می‌دهد. نتایج رنگ آمیزی ایمونوفلورسنت Bax نشان داد که در میزان درصد سلول‌های Bax مثبت ناحیه CA1 هیپوکامپ در میان گروه‌های مختلف، از نظر آماری اختلاف معناداری وجود دارد. پروتئین Bax در گروه شم به‌طور ضعیفی بیان شد ($10\% \pm 1.94$). درصد سلول‌های Bax مثبت در گروه ایسکمی ($58.86\% \pm 7.4$) در مقایسه با گروه شم افزایش یافت ($P < 0.001$). در گروه درمان با اسنیک اسید، درصد سلول‌های Bax مثبت ($47.36\% \pm 5.6$) نسبت به گروه ایسکمی کاهش یافت ($P < 0.01$) (شکل شماره ۱ و ۲).

(Death Detection Kit, Roche, Mannheim, Germany) بر اساس دستورالعمل شرکت تولیدکننده استفاده شد (۱۶). به‌طور خلاصه، پس از دیپارافینه کردن با زایلن، برش‌ها (سه برش برای هر نمونه حیوان) با استفاده از سری نزولی الکل و با پروتئیناز K در دمای اتاق انکوبه گردیدند؛ سپس برای مسدود کردن پراکسیداز درون زاد، انکوباسیون با ۳ درصد H_2O_2 در متانول انجام شد. پس از آن، مخلوط واکنش تانل (TUNEL reaction mixture) در اتمسفر مرطوب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد اضافه گردید. پس از آن، اسلایدها با PBS شسته شدند و سوبسترا DAB (3,3-diaminobenzidine) برای ۱۰ دقیقه به‌عنوان کروموزن استفاده گردید. علاوه بر این، همتاکسیلین برای رنگ آمیزی متقابل استفاده شد. سرانجام سلول‌های تانل مثبت با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی کمی گردیدند. شمارش در طول برش عرضی ۴۰۰ میکرومتر از طول CA1 ناحیه هیپوکامپ صورت گرفت. تعداد سلول‌های تانل مثبت در طول قسمت‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ شمارش شد.

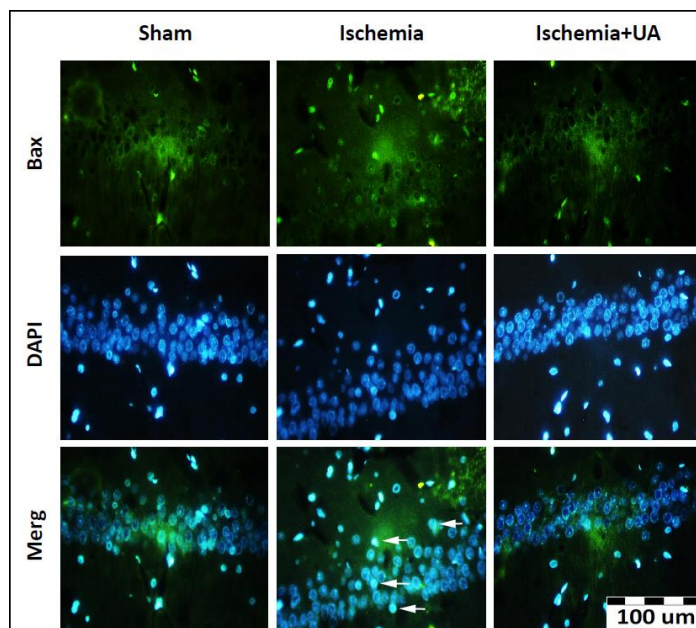
تحلیل آماری: از آمار توصیفی برای جمع‌بندی خصوصیات مجموعه داده‌ها شامل میانگین و انحراف معیار استفاده گردید. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون‌های مختلف بهره گرفته شد. آزمون کلموگروف-اسمیرنوف به‌عنوان آزمون نرمال بودن به کار رفت که این



شکل شماره ۱. درصد سلول‌های Bax مثبت در ناحیه CA1 هیپوکامپ در گروه‌های پژوهش پس از ایسکمی مغزی

* تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه شم ($P < 0.001$)

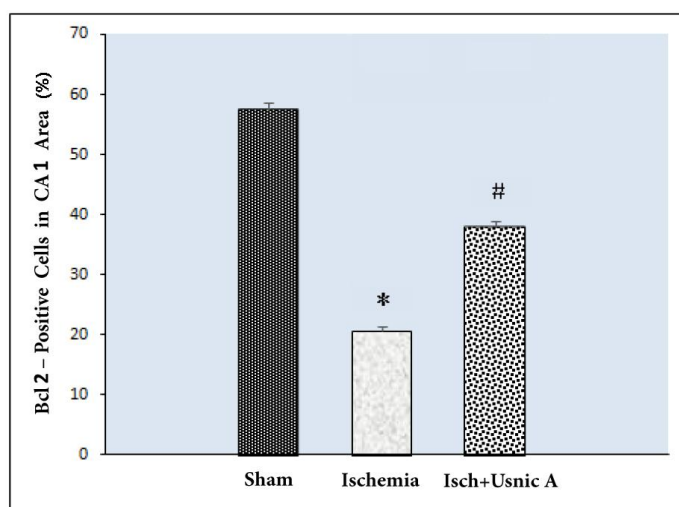
تفاوت معنی‌دار در مقایسه با گروه‌های شم ($P < 0.001$) و ایسکمی ($P < 0.01$)



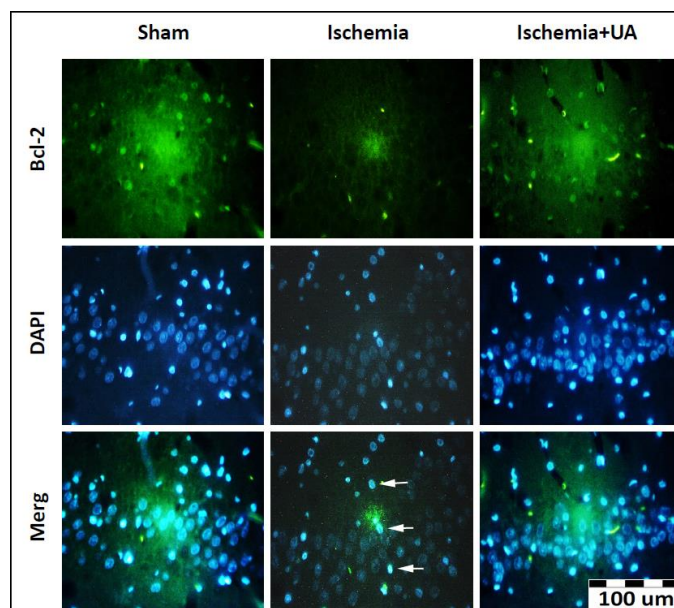
شکل شماره ۲. فتومیکرو گراف‌های رنگ آمیزی ایمونوفلورسنت Bax در ناحیه CA1 هیپوکامپ پس از ایسکمی مغزی در گروه‌های مختلف؛ رنگ سبز نشان‌دهنده مارکر (Bax) است. رنگ آبی (DAPI) هسته سلول‌ها را نشان می‌دهد. Merg نشان‌دهنده ترکیب رنگ آنتی‌بادی و هسته سلول‌ها است. (بزرگ‌نمایی $\times 400$). فلش‌ها نشان‌دهنده سلول‌های Bax مثبت هستند. همان‌طور که در شکل نشان داده شده است، میزان بیان پروتئین Bax در گروه ایسکمی به شکل چشمگیری افزایش یافته؛ اما در گروه اسنیک اسید این میزان کاهش پیدا کرده است.

ایسکمی مغزی درصد سلول‌های Bcl-2 مثبت از ایسکمی - جریان دوباره خون را افزایش می‌دهد. نتایج رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی Bcl-2 نشان داد که اختلاف معنی‌داری در درصد سلول‌های Bcl-2 مثبت (37.86%±3.13) به شکل معنی‌داری افزایش یافت (شکل شماره ۳ و ۴). ($P<0.001$)، همچنین در گروه درمانی با اسنیک اسید، درصد سلول‌های Bcl-2 مثبت در مقایسه با گروه شام کاهش داد (20.57%±1.92) را در مقایسه با گروه شام کاهش داد ($P<0.001$).

درمان با اسنیک اسید، میزان بیان پروتئین Bcl-2 پس از ایسکمی - جریان دوباره خون را افزایش می‌دهد. نتایج رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی Bcl-2 نشان داد که اختلاف معنی‌داری در درصد سلول‌های Bcl-2 مثبت (37.86%±3.13) به شکل معنی‌داری وجود داشت. بیان پروتئین Bcl-2 در گروه شام (57.43%±2.99) بالاتر بود.



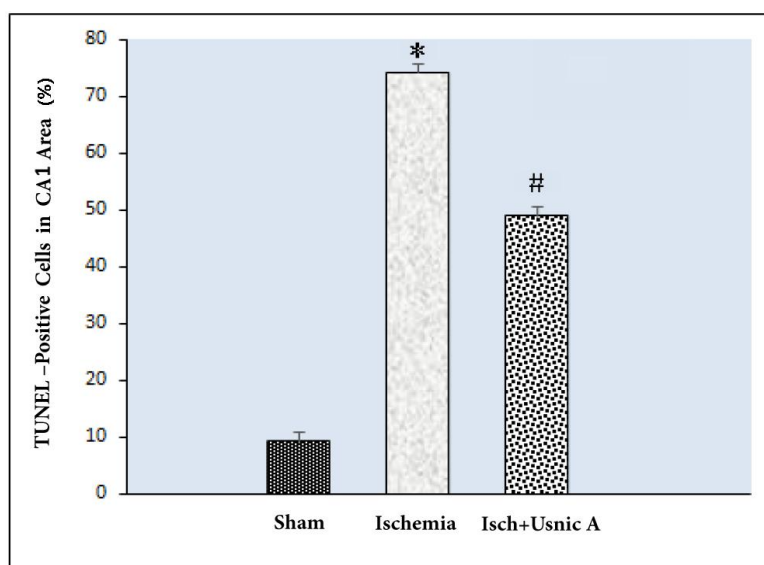
شکل شماره ۳. درصد سلول‌های Bcl-2 مثبت در ناحیه CA1 هیپوکامپ در گروه‌های پژوهش پس از ایسکمی مغزی * به‌طور معناداری در مقایسه با گروه شام متفاوت است ($P<0.001$). # در مقایسه با گروه‌های شام و ایسکمی، به‌طور معناداری متفاوت است ($P<0.001$).



شکل شماره ۴. فتومیکروگراف های رنگ آمیزی ایمونوفلورسنت Bcl-2 در ناحیه CA1 هیپوکامپ پس از ایسکمی مغزی در گروه های مختلف؛ رنگ سبز نشان دهنده مارکر (Bcl-2) است. رنگ آبی (DAPI) هسته سلول ها را نشان می دهد. Merg نشان دهنده ترکیب رنگ آنتی بادی و هسته سلول ها است. (بزرگ نمایی $\times 400$). فلش ها نشان دهنده سلول های Bax مثبت هستند. همان طور که در شکل نشان داده شده است، میزان بیان پروتئین Bcl-2 در گروه ایسکمی به شکل چشمگیری کاهش یافته؛ اما در گروه اسنیک اسید این میزان افزایش داشته است.

به طور چشمگیری افزایش یافته است ($P < 0.001$)؛ همچنین در موش های ایسکمیک تحت درمان با اسنیک اسید، درصد سلول های تانل مثبت ($49\% \pm 4.08$) در مقایسه با گروه ایسکمی، به شکل معناداری پایین آمد ($P < 0.001$)، (شکل شماره ۵ و ۶).

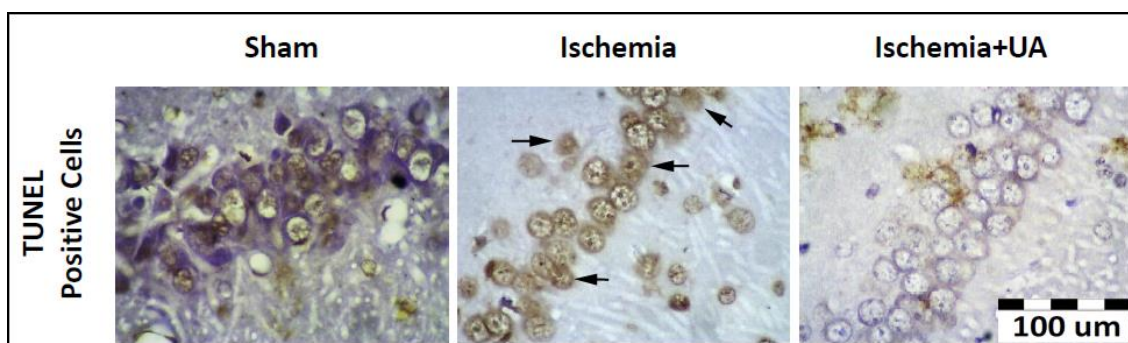
درمان با اسنیک اسید، آپوپتوز ناشی از ایسکمی-ریپرفیوژن را کاهش می دهد. نتایج به دست آمده از رنگ آمیزی تانل نشان داد که درصد سلول های تانل مثبت در ناحیه CA1 هیپوکامپ در گروه ایسکمی ($74.29\% \pm 3.64$) در مقایسه با گروه شم ($4.319.29\% \pm$).



شکل شماره ۵. درصد سلول های TUNEL مثبت در ناحیه CA1 هیپوکامپ در گروه های پژوهش پس از ایسکمی مغزی

* تفاوت معنادار در مقایسه با گروه شم ($P < 0.001$)

تفاوت معنادار در مقایسه با گروه های شم و ایسکمی ($P < 0.001$)



شکل شماره ۶. فتومیکروگراف‌های رنگ آمیزی تانل در ناحیه CA1 هیپوکامپ پس از ایسکمی مغزی در گروه‌های مختلف. فلش‌ها نشان‌دهنده سلول‌های تانل مثبت هستند. همان‌طور که در شکل نشان داده شده است، درصد سلول‌های تانل مثبت در گروه ایسکمی به شکل چشمگیری افزایش یافته؛ اما در گروه اسنیک اسید، این میزان پایین آمده است.

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، شواهد فراوانی درباره اسنیک اسید، به عنوان یک عامل محافظت نورونی در درمان آسیب ناشی از ایسکمی مغزی ارائه شده است. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که تزریق اسنیک اسید به طور معناداری میزان آپوپتوز ناشی از ایسکمی مغزی را در ناحیه CA1 هیپوکامپ کاهش می‌دهد. علاوه بر این، نتایج این مطالعه نشان داد که اسنیک اسید تأثیر مهمی در مهار میزان بیان پروتئین پیش آپوپتوزی Bax دارد و همچنین میزان بیان پروتئین آنتی آپوپتوزی Bcl-2 را افزایش می‌دهد.

آپوپتوز نورون‌ها در سازوکار پاتوژنز سکنه مغزی ایسکمیک نقش مهمی دارد و به عنوان مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده شناخته می‌شود (۲)؛ بنابراین، به مطالعات برای درک بهتر سازوکارهای مرگ سلول‌های عصبی و آسیب‌های مغزی و انجام پژوهش‌های مقایسه‌ای درباره چگونگی کاهش مرگ سلول‌های عصبی، افزایش بقای سلول و تقویت بازسازی و ترمیم مغز پس از آسیب، نیاز فوری وجود دارد (۱۷). یافته‌ها نشان می‌دهند که خانواده پروتئین‌های Bcl-2 می‌توانند با پروتئین‌های پیش آپوپتوزی مانند Bax ترکیب شوند و هترودیم‌هایی را به وجود بیاورند که آپوپتوز را تنظیم می‌کنند؛ از این رو، تنظیم Bcl-2 و فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ وابسته به آن PI3K/Akt/mTOR می‌تواند راهکار مهم و جدیدی برای هدف قرار دادن آپوپتوز در سکنه مغزی ایسکمیک باشد (۱۸).

ناحیه CA1 هیپوکامپ و به ویژه سلول‌های هرمی این ناحیه، یکی از مناطق حساس نسبت به ایسکمی مغزی هستند. از آنجاکه ناحیه CA1 هیپوکامپ یک منطقه مهم دخیل در یادگیری و حافظه است، ایسکمی مغزی موجب آسیب ناتوان‌کننده و پیش‌رونده و در نهایت به نقص در یادگیری و حافظه منجر می‌شود (۱۹). تاکنون، هیچ گزینه درمانی خاصی وجود ندارد که بتواند از اختلال عملکرد عصبی بعدی ناشی از آسیب به منطقه CA1 هیپوکامپ جلوگیری کند. تا همین اواخر، بسیاری از محققان همچنان با توجه بیشتر به تغییرات هیپوکامپ، در تلاش برای ایجاد عوامل محافظت نورونی در برابر ایسکمی مغزی به صورت آزمایشی هستند.

آسیب‌های میتوکندریایی در بیشتر موارد آپوپتوز سلول‌های عصبی نقش اساسی دارد؛ به عبارت دیگر، نفوذپذیری غشا خارجی میتوکندری با دریافت سیگنال آپوپتوتیک افزایش می‌یابد و در نتیجه، باعث کاهش توانایی غشای میتوکندری می‌شود و به دنبال آن، سبب جابجایی عامل پروآپوپتوتیک (سیتوکروم c) از فضای بین غشایی میتوکندری به سیتوزول می‌گردد. آزادسازی سیتوکروم c در سیتوزول به تشکیل مجموع آپوپتوزوم می‌انجامد. آپوپتوزوم اجازه فعال‌سازی خودکار را به کاسپاز-۹ می‌دهد که متعاقب آن، فعال‌سازی کاسپاز-۳ صورت می‌گیرد. فعال شدن کاسپاز-۳ باعث تکه‌تکه شدن DNA و مرگ سلول‌های عصبی آپوپتوتیک می‌شود (۲۰)، در حالی که پروتئین‌های ضد آپوپتوز مانند

Bcl-2 و Bcl-XL از تشکیل منافذ میتوکندریایی از طریق تشکیل هتروداپمرهایی با پروتئین Bax جلوگیری می کنند. Bax و Bak به طور مستقیم، در آزادسازی سیتوکروم C با تشکیل منافذ در غشای میتوکنندری واسطه گری می کنند (۲).

منافذ انتقال نفوذپذیری میتوکنندری پستانداران (MPTP)، در غشاهای داخلی و خارجی میتوکنندری، یک کانال غیراختصاصی برای انتقال سیگنال یا انتقال مواد میان ماتریس میتوکنندری و سیتوپلاسم از جمله حفظ هموستاز کلسیم، تنظیم سیگنال های استرس اکسیداتیو و انتقال پروتئین برانگیخته توسط برخی از محرک ها هستند. ثابت شده است که باز شدن مداوم MPTP باعث تحریک آپوپتوز نورون در سکنه مغزی ایسکمیک می شود. در همین حال، مهار آپوپتوز ناشی از افزایش بیش از حد MPTP، تأثیر بسیار خوبی در درمان سکنه مغزی ایسکمیک نشان داده است (۲۱).

گلکسنگ ها موجودات همزیستی هستند که از یک قارچ، یک جلبک و یا یک سیانوباکتری تشکیل شده اند و علاوه بر متابولیت های اولیه (به عنوان مثال اسیدهای چرب و کربوهیدرات ها)، متابولیت های ثانویه با ویژگی های منحصربه فرد دارویی تولید می کنند. اخیراً علاقه دوباره به گلکسنگ به عنوان منابع جدید مولکول های زیستی فعال دارویی، با مطالعه دقیق آغاز شده است و آثار ضد میکروبی، ضد التهابی و آنتی اکسیدانی و خصوصیات محافظتی نورون ها در برابر ROS داخل سلولی، از متابولیت های ثانویه آن ها گزارش شده است. این ویژگی های بیان شده برای اسنیک اسید مانند خواص آنتی اکسیدانی و ضد التهابی و همچنین کاهش فعال شدن پروتئین پیش آپوپتوزی (به عنوان مثال کاسپاز-۳) می تواند برای معرفی آن در درمان بیماری های مرتبط با استرس اکسیداتیو، از جمله اختلالات نورودژنراتیو مهم باشد (۲۲).

همسو با یافته های ما، نتایج تحقیقات اخیر نشان می دهد که اسنیک اسید خواص حفاظت سلولی از

سلول های شبیه دستگاه عصبی مرکزی در برابر مدل های سمیت سلولی مربوط به H_2O_2 (به واسطه کاهش تولید ROS)، سطح پراکسیداسیون لیپیدی و فعال سازی پروتئین پیش آپوپتوزی دارد (۲۲). در مطالعه مشابه دیگری گزارش شده است که درمان با اسنیک اسید موجب مهار استرس اکسیداتیو و پاسخ های التهابی در یک مدل آسیب حاد ریه موش ها، به واسطه افزایش فعالیت SOD و GSH و کاهش بیان کموکاین های التهابی شامل $IL-6$ ، $IL-8$ ، $TNF-\alpha$ و پروتئین التهابی ماکروفاژ ۲- $(MIP-2)$ می شود (۲۳). نشان داده شده است که افزایش برخی از سایتوکاین ها از جمله $IL-6$ ، $IL-1\beta$ و $TNF-\alpha$ که در مدل های ایسکمی وجود دارد، با مسیرهایی مرتبط اند که در مرگ عصبی آپوپتوتیک شرکت می کنند (۲۴).

می توان ترکیبات تزریق شده با IP را حتی ۱۰ ثانیه پس از تجویز در گردش خون سیستمیک شناسایی کرد (۲۵). از آنجا که سد خونی مغزی رابط اصلی میان خون و مایع بینایی مغز است، هنگامی که دارو از سد خونی مغزی عبور می کند، امکان تحویل فوری آن در کل حجم مغز وجود دارد (۲۶). از آنجا که نفوذ اسنیک اسید از سد خونی مغزی به واسطه سازوکار انتقال غیرفعال مشخص شده است (۲۷)، انتظار می رود اسنیک اسید با سرعت بالای ۱۰ ثانیه پس از تجویز، به سلول های مغزی برسد.

به طور کلی، نتایج این پژوهش نشان می دهد که درمان با اسنیک اسید به طور چشمگیری مرگ سلول آپوپتوزی ناحیه CA1 هیپوکامپ را کاهش می دهد. علاوه بر این، اسنیک اسید موجب بهبود بیان پروتئین ضد آپوپتوزی Bcl-2 و کاهش بیان پروتئین پرو آپوپتوزی Bax می شود؛ بنابراین، با توجه به آثار امیدوارکننده اسنیک اسید در شرایط پاتولوژیک ایسکمی مغزی، اسنیک اسید احتمالاً می تواند به عنوان ترکیب درمانی طبیعی برای کاهش تخریب عصبی در اختلالاتی مانند ایسکمی - ریپرفیوژن مغزی عمل کند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی شاهرود (شماره قرارداد: ۹۸۹۷) انجام شده است. از دانشگاه علوم پزشکی شاهرود که امکانات مالی و اجرایی پژوهش را فراهم کردند، تشکر و قدردانی می شود.

تعارض منافع

بین نویسندگان هیچگونه تعارضی در منافع انتشار این مقاله وجود ندارد.

کد اخلاق: IR.SHMU.REC.1397.186

References

- Nikitin D, Choi S, Mican J, Toul M, Ryu WS, et al. Development and Testing of Thrombolytics in Stroke. *J Stroke* 2021; 23:12-36. doi:10.5853/jos.2020.03349.
- Khoshnam S, Winlow W, Farzaneh M, Farbood Y, Fathi Moghaddam H. Pathogenic mechanisms following ischemic stroke. *Neurol Sci* 2017; 38:1167-86. doi:10.1007/s10072-017-2938-1.
- Surapaneni S, Prakash T, Ansari A, Goli D. Neuroprotective effect of Clerodendron glandulosum against acute transient ischemia reperfusion cerebral injury in rats. *J Neurol Neurorehabil Res* 2017; 2:14-20. doi:10.35841/neurology-neurorehabilitation.2.1.14-20
- Khoshnam SE, Winlow W, Farbood Y, Moghaddam HF, Farzaneh M. Emerging roles of microRNAs in ischemic stroke: as possible therapeutic agents. *J Stroke* 2017; 19:166. doi:10.5853/jos.2016.01368.
- Erfani S, Moghimi A, Aboutaleb N, Khaksari M. Protective Effects of Nucleobinding-2 After Cerebral Ischemia Via Modulating Bcl-2/Bax Ratio and Reducing Glial Fibrillary Acid Protein Expression. *Basic Clin Neurosci* 2019; 10:451-60. doi:10.32598/bcn.10.5.451.
- Cocchietto M, Skert N, Nimis P, Sava G. A review on usnic acid, an interesting natural compound. *Naturwissenschaften* 2002; 89:137-46. doi: 10.1007/s00114-002-0305-3.
- Luzina O, Salakhutdinov N. Biological activity of usnic acid and its derivatives: Part 1. Activity against unicellular organisms. *Russ J Bioorg Chem* 2016; 42:115-32. doi:10.1134/S1068162016020084
- Lai B, Upreti D. Ethnobotanical notes on three Indian lichens. *The Lichenologist* 1995; 27:77-9. doi:10.1006/lich.1995.0006
- Caviglia AM, Nicora P, Giordani P, Brunialti G, Modenesi P. Oxidative stress and usnic acid content in *Parmelia caperata* and *Parmelia soledians* (Lichenes). *Farmaco* 2001; 56:379-82. doi:10.1016/s0014-827x(01)01090-4.
- Luzina OA, Salakhutdinov NF. Usnic acid and its derivatives for pharmaceutical use: a patent review (2000-2017). *Expert Opin Ther Pat* 2018; 28:477-91. doi:10.1080/13543776.2018.1472239.
- Ramis IB, Vianna JS, Reis AJ, von Groll A, Ramos DF, Viveiros M, et al. Antimicrobial and efflux inhibitor activity of usnic acid against *Mycobacterium abscessus*. *Planta Med* 2018; 84:1265-70. doi:10.1055/a-0639-5412.
- Lee S, Lee Y, Ha S, Chung HY, Kim H, et al. Anti-inflammatory effects of usnic acid in an MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease. *Brain Res* 2020; 1;1730:146642. doi:10.1016/j.brainres.2019.146642.
- Erfani S, Aboutaleb N, Oryan S, Shamsaei N, Khaksari M, et al. Visfatin inhibits apoptosis and necrosis of hippocampus CA3 cells following transient global ischemia/reperfusion in rats. *Int J Pept Res Ther* 2015; 21:223-8. doi:10.1007/s10989-014-9449-1
- Aboutaleb N, Shamsaei N, Rajabi H, Khaksari M, Erfani S, et al. Protection of hippocampal CA1 neurons against ischemia/reperfusion injury by exercise preconditioning via modulation of Bax/Bcl-2 ratio and prevention of caspase-3 activation. *Basic clin neurosci* 2016; 7:21. PMID:27303596
- Erfani S, Moghimi A, Aboutaleb N, Khaksari M. Nesfatin-1 improve spatial memory impairment following transient global cerebral ischemia/reperfusion via inhibiting microglial and caspase-3 activation. *J Mol Neurosci* 2018; 65:377-384. doi:10.1007/s12031-018-1105-3.
- Aboutaleb N, Shamsaei N, Khaksari M, Erfani S, Rajabi H, et al. Pre-ischemic exercise reduces apoptosis in hippocampal CA3 cells after cerebral ischemia by modulation of the Bax/Bcl-2 proteins ratio and prevention of caspase-3 activation. *J Physiol Sci* 2015; 65:435-443. doi:10.1007/s12576-015-0382-7.
- Rodriguez J, Li T, Xu Y, Sun Y, Zhu C. Role of apoptosis-inducing factor in perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Neural Regen Res* 2020; 16:205-13. doi:10.4103/1673-5374.290875.
- Shao ZQ, Dou SS, Zhu JG, Wang HQ, Wang CM, et al. Apelin-13 inhibits apoptosis and excessive autophagy in cerebral ischemia/reperfusion injury. *Neural Regen Res* 2021; 16:1044-51. doi: 10.4103/1673-5374.300725.
- Pluta R, Ouyang L, Januszewski S, Li Y, Czuczwar SJ. Participation of Amyloid and Tau Protein in Post-Ischemic Neurodegeneration of the Hippocampus of a Nature Identical to Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 2021; 22:2460. doi:10.3390/ijms22052460.
- Aboutaleb N, Shamsaei N, Rajabi H, Khaksari M, Erfani S, et al. Protection of Hippocampal CA1 Neurons Against Ischemia/Reperfusion Injury by Exercise Preconditioning via Modulation of Bax/Bcl-2 Ratio and Prevention of Caspase-3 Activation. *Basic Clin Neurosci* 2016; 7:21-9. PMID:27303596.
- Li Y, Sun J, Wu R, Bai J, Hou Y, et al.

- Mitochondrial MPTP: A Novel Target of Ethnomedicine for Stroke Treatment by Apoptosis Inhibition. *Front Pharmacol* 2020; 11:352. doi:10.3389/fphar.2020.00352.
22. Fernández-Moriano C, Divakar PK, Crespo A, Gómez-Serranillos MP. Protective effects of lichen metabolites evernic and usnic acids against redox impairment-mediated cytotoxicity in central nervous system-like cells. *Food Chem Toxicol* 2017; 105:262-77. doi:10.1016/j.fct.2017.04.030.
23. Su Z-Q, Mo Z-Z, Liao J-B, Feng X-X, Liang Y-Z, et al. Usnic acid protects LPS-induced acute lung injury in mice through attenuating inflammatory responses and oxidative stress. *Int Immunopharmacol* 2014; 22:371-8. doi:10.1016/j.intimp.2014.06.043.
24. Wang L, Du F, Wang X. TNF- α induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell* 2008; 133:693-703. doi:10.1016/j.cell.2008.03.036.
25. Al Shoyaib A, Archie SR, Karamyan VT. Intraperitoneal Route of Drug Administration: Should it Be Used in Experimental Animal Studies? *Pharm Res* 2019;37:12. doi: 10.1007/s11095-019-2745-x.
26. Pardridge WM. Drug transport across the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab* 2012; 32:1959-72. doi: 10.1038/jcbfm.2012.126.
27. Studzińska-Sroka E, Majchrzak-Celińska A, Zalewski P, Sz wajgier D, Baranowska-Wójcik E, et al. Permeability of Hypogymnia physodes Extract Component-Physodic Acid through the Blood-Brain Barrier as an Important Argument for Its Anticancer and Neuroprotective Activity within the Central Nervous System. *Cancers (Basel)* 2021; 13:1717. doi:10.3390/cancers13071717.