Journal of Ilam University of Medical Sciences

P-ISSN: 1563-4728
E-ISSN: 2588-3135

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

Sohaila Erfani[1], Tahereh Valadbeigi[1], Mehdi Khaksari[2], Ali Moghimi[3], Nahid Aboutaleb[4*]

[1] Dept of Biology, Faculty of Science, Ilam University, Ilam, Iran
[2] Dept of Physiology, Faculty of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, 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

A B S T R A C T

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.

© The Author(s)

Publisher: Ilam University of Medical Sciences

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-10]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.5.8]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.101]

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام

P-ISSN: ۱۵۶۳-۴۷۲۸

E-ISSN: ۲۵۸۸-۳۱۳۵

آثار اسنیک اسید بر آپوپتوز و بیان پروتئین‌های Bax و Bcl-2 نورون‌های ناحیهٔ CA1 هیپوکامپ به دنبال ایسکمی- ریپرفیوژن مغزی

سهیلا عرفانی[۱]، طاهره ولدبیگی[۱]، مهدی خاکساری[۲]، علی مقیمی[۳]، ناهید ابوطالب[۴*]

[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

[۲] گروه فیزیولوژی پزشکی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران

[۳] مرکز پژوهشی علوم اعصاب و رفتار رایان، گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

[۴] مرکز تحقیقات فیزیولوژی و گروه فیزیولوژی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

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، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
Email:
aboutaleb.n@iums.ac.ir

چکیده

مقدمه: ایسکمی- ریپرفیوژن مغزی باعث ایجاد سازوکارهای پیچیدهٔ آسیب بافتی ازجمله آپوپتوز نورون‌ها می‌شود. اسنیک اسید یک متابولیت ثانویه از گلسنگ است که خواص بیولوژیکی مختلفی چون فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی دارد. هدف از مطالعهٔ حاضر بررسی آثار محافظت کنندهٔ عصبی اسنیک اسید بر مرگ سلولی آپوپتوز و پروتئین های مرتبط با آپوپتوز Bax و Bcl-2 در نورون‌های ناحیهٔ CA1 هیپوکامپ به دنبال ایسکمی- ریپرفیوژن مغزی بود.

مواد و روش ها: ۴۲ موش صحرایی نر نژاد ویستار به‌طور تصادفی به سه گروه (شم، ایسکمی- ریپرفیوژن و ایسکمی- ریپرفیوژن + اسنیک اسید) تقسیم شدند. ایسکمی مغزی با انسداد شریان‌های کاروتید مشترک ایجاد گردید. تزریق اسنیک اسید (۲۵mg/kg، به‌صورت داخل صفاقی) در آغاز برقراری دوبارهٔ 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 رنگ‌آمیزی TUNEL استفاده گردید.

یافته‌ها: ایسکمی مغزی موجب افزایش آپوپتوز نورون‌های ناحیهٔ CA1 هیپوکامپ شد. اسید اسنیک از طریق کاهش بیان پروتئین پیش آپوپتوزی Bax و افزایش بیان پروتئین آنتی‌آپوپتوزی Bcl-2، میزان مرگ سلولی آپوپتوزی را به شکل چشمگیری کاهش داد.

بحث و نتیجه‌گیری: اسنیک اسید از طریق کاهش مرگ سلولی می‌تواند اثر محافظتی عصبی در برابر آسیب‌های ناشی از ایسکمی- ریپرفیوژن مغزی داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: آپوپتوز، اسنیک اسید، ایسکمی- ریپرفیوژن، هیپوکامپ

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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-10]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.5.8]

[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.101]

حق‌مؤلف © نویسندگان

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.5.8]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.101]

مقدمه

ایسکمی- ریپرفیوژن مغزی یکی از مهم‌ترین علل مرگ‌ومیر و ناتوانی در سراسر جهان تلقی می‌شود (۱). روش های درمانی سکتهٔ مغزی بسیار اندک است؛ ازاین‌رو، توسعه و ایجاد روش‌ها و عوامل درمانی جدید یا درمان‌های ترکیبی در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد (۲). سازوکارهای پاتولوژیک پیچیده‌ای در ایسکمی مغزی دخیل هستند که می‌توانند به آسیب منجر گردند. سمیت تحریکی عصبی، استرس اکسیداتیو، التهاب و آپوپتوز مهم‌ترین فرایندهایی هستند که با ایسکمی مغزی ارتباط دارند (۴، ۳). به‌خوبی نشان داده‌شده است که در سکتهٔ مغزی ایسکمیک، فعال‌سازی چندین مسیر سیگنالینگ سلولی به آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی‌شده) نورونی منجر می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد که در زمان‌های گوناگون پس ایسکمی مغزی، بیان پروتئین مهم آنتی‌آپوپتوزی Bcl-2 کاهش و بیان پروتئین پیش‌آپوپتوزی Bax افزایش می‌یابد (۵).

گلسنگ‌ها از مهم‌ترین منابع ترکیبات فعال بیولوژیکی هستند که به علت خاصیت درمانی ارزشمندشان همانند اغلب گیاهان، از دوران باستان به‌عنوان داروهای طبیعی در طب سنتی استفاده شده‌اند (۶). این ارگانیسم‌ها فعالیت‌های بیولوژیکی بسیار متفاوتی ازجمله خواص ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی، ضدتب، ضددرد، ضدسرطان، ضدمیکروب، ضددیابت و ترمیم زخم دارند (۷). شایع‌ترین گلسنگ، جنس Usnea Dill. ex Adans است که سابقهٔ کاربرد پزشکی در سراسر جهان را دارد؛ به‌عنوان‌مثال، Usnea longissima Ach یک نوع از گونه‌های گلسنگ است که به‌طور گسترده برای درمان آسیب‌های ناشی از التهاب پوستی استفاده می‌شود (۸).

اسنیک اسید آنتی‌بیوتیکی طبیعی است که به‌طور اختصاصی در گلسنگ یافت می‌شود و در پزشکی و مصارف زیست‌محیطی کاربرد دارد. اسنیک اسید در بسیاری از انواع گلسنگ شناخته‌شده ازجمله Evernie ، Parmelia، Usnea، Cladonia ،Hypotrachyna ،Ramalina ، Lecanora و Alectoria شناسایی‌شده است. در برخی از مطالعات، به خاصیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌التهابی اسنیک اسید اشاره‌شده است (۱۱-۹). در مطالعهٔ لی و همکاران نشان داده‌شده است که اسنیک اسید به علت داشتن آثار ضدالتهاب عصبی، می‌تواند به‌عنوان کاندیدای درمانی بالقوهٔ سودمندی برای بیماری پارکینسون (PD) و سایر بیماری‌های 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، مطالعهٔ حاضر با هدف بررسی آثار محافظتی اسنیک اسید بر میزان آپوپتوز و پروتئین‌های مرتبط آپوپتوزی Bax و Bcl-2 در نورون‌های ناحیهٔ CA1 هیپوکامپ مغز به دنبال مدل ایسکمی- ریپرفیوژن مغزی در موش صحرایی نر انجام‌شده 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 مؤسسهٔ پاستور تهران تهیه‌شده بودند. حیوانات در اتاق و قفس‌های استاندارد و محیط کنترل‌شده (۲۴-۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد و چرخهٔ ۱۲/۱۲ ساعت روشنایی- تاریکی)، با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری گردیدند. برای تزریق، اسنیک اسید (سیگما آلدریچ، ۳۲۹۹۶۷، آلمان) در DMSO حل شد. همهٔ مراحل آزمایش بر اساس قوانین بین‌المللی نگهداری و مراقبت از حیوانات و با نظارت کمیتهٔ اخلاقی با کد اخلاق IR.SHMU.REC.1397.186 انجام گردیده است.

گروه های آزمایشی: حیوانات به‌طور 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-

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام / شهریور ۱۴۰۱، دوره ۳۰، شماره ۳، ۱۱۱-۱۰۱

ریپرفیوژن + اسنیک اسید، یک تزریق داخل صفاقی (IP) از اسنیک اسید (۲۵mg/kg) در آغاز زمان خون‌رسانی 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 آن‌ها انجام شد.

القای ایسکمی- ریپرفیوژن گذرای مغزی: ایجاد مدل ایسکمی- ریپرفیوژن مغزی بر اساس روش جراحی بستن موقتی شریان‌های کاروتید مشترک انجام گردید (۱۳). پیش از شروع جراحی ایسکمی مغز، بی‌هوشی 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 (خون‌رسانی مجدد) فوری برداشته شدند. برقراری دوبارهٔ جریان خون با مشاهده تأیید گردید. در طول جراحی، دمای رکتوم حیوانات در ۰/۵±۳۶/۵ درجهٔ سانتی‌گراد، با استفاده از سامانهٔ گرمایش بازخوردی تنظیم شد. در پایان جراحی، حیوانات در قفس های جداگانه قرار گرفتند و دسترسی آزاد به غذا و آب داشتند.

آماده‌سازی بافت برای رنگ‌آمیزی: چهار روز پس از ایسکمی، تحت بی‌هوشی بسیار عمیق، فرایند پرفیوژن 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، بافت‌های مغز آن‌ها خارج گردید و در فیکساتیو مشابه به مدت ۳ روز قرار گرفت؛ سپس از مغزها بلوک‌های پارافینی تهیه و با استفاده از دستگاه میکروتوم، مقاطع کرونال با ضخامت ۷ میکرومتر برای رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی و ایمونوفلورسنت گرفته شد. مقاطع بر اساس اطلس پاکسینوس در محدودهٔ بین ۳/۳ و ۴/۲ میلی‌متر پشت برگما تهیه گردید (۱۴).

اندازه‌گیری میزان ایمنواکتیویتی Bcl-2 و Bax: برای ارزیابی میزان فعال‌سازی Bcl-2 و Bax، رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت با استفاده از قطعات بافتی (۳ تا ۴ عدد سکشن در هر مغز) صورت گرفت (۱۵). انکوباسیون (۲۰ دقیقه در ۶۲ درجهٔ سانتی‌گراد) و آب‌رسانی مجدد توسط سری نزولی الکل انجام شد. در مرحلهٔ بعدی، از پراکسید هیدروژن۱۰ 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، بازیابی آنتی ژن ها از طریق اتوکلاو به مدت ۱۱ دقیقه در بافر سیترات (pH=6) انجام گردید. قطعات توسط سرم بز نرمال ۱۰ درصد، به مدت یک ساعت بلوکه شدند و سپس انکوباسیون با آنتی‌بادی ضد Bcl-2 و Bax (rabbit antibody against rat Abcam, UK) به‌عنوان یک آنتی‌بادی اولیه (با رقت ۱/۱۰۰) و برای یک شب (در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد) صورت گرفت. پس از شستشو در PBS و انکوباسیون توسط آنتی‌بادی ثانویه (anti-rabbit secondary antibody, Abcam, UK) (با رقت ۱/۱۰۰۰)، برش‌های بافتی با فلوئوروکروم کونژوگه شدند؛ سپس فرایند رنگ‌آمیزی متقابل (counterstaining) با ۶'۴ دیامیدینو-۲-فنیل ایندول (DAPI) در PBS به مدت ۵ دقیقه انجام گردید. پس از شستشو، سیگنال‌های فلورسنت ناحیهٔ CA1 هیپوکامپ سمت راست، در هر اسلاید با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس (Labomed, USA, 400×) ارزیابی شدند. ابتدا تعداد سلول‌های مثبت مارکر مدنظر شمارش می‌شود؛ سپس تعداد کل هسته‌هایی که با رنگ‌آمیزی DAPI مشخص‌شده است، به‌عنوان تعداد کل سلول‌های آن ناحیه شمارش می‌گردند. درنهایت، درصد سلول‌های مثبت مارکر مدنظر نسبت به سلول‌ها محاسبه می‌شود که در تصاویر به شکل Merg مشاهده می‌گردد.

رنگ‌آمیزی تانل: برای تشخیص قطعات DNA نشان‌گذاری‌شده در سلول‌های دچار مرگ آپوپتوتیک، از کیت تشخیص مرگ سلولی آپوپتوز (In Situ Cell

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-10]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.5.8]

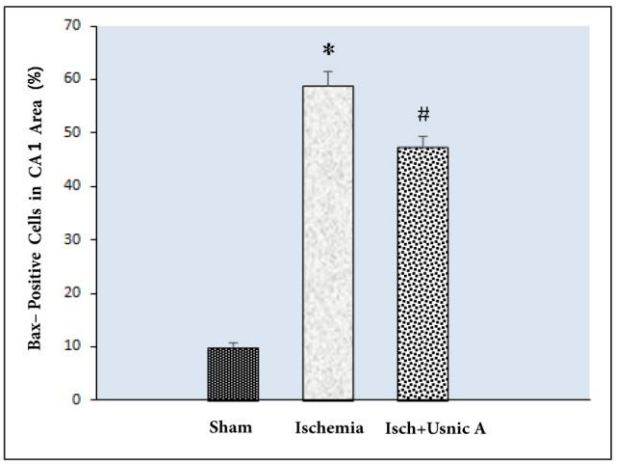
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.101]

(Death Detection Kit, Roche, Mannheim, Germany بر اساس دستورالعمل شرکت تولیدکننده استفاده شد (۱۶). به‌طور خلاصه، پس از دپارافینه 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 درجهٔ سانتی‌گراد اضافه گردید. پس از آن، اسلایدها با PBS شسته شدند و سوبسترا DAB (3,3-diaminobenzidine) برای ۱۰ دقیقه به‌عنوان کروموژن استفاده گردید. علاوه بر این، هماتوکسیلین برای رنگ آمیزی متقابل استفاده شد. سرانجام سلول های تانل مثبت با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی کمی گردیدند. شمارش در طول برش عرضی ۴۰۰ میکرومتر از طول CA1 ناحیهٔ هیپوکامپ صورت گرفت. تعداد سلول‌های تانل مثبت در طول قسمت‌های ناحیهٔ CA1 هیپوکامپ شمارش شد.

تحلیل آماری: از آمار توصیفی برای جمع‌بندی خصوصیات مجموعه داده‌ها شامل میانگین و انحراف معیار استفاده گردید. برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها از آزمون‌های مختلف بهره گرفته شد. آزمون کلموگروف-اسمیرنوف به‌عنوان آزمون نرمال بودن به‌کار رفت که این آزمون نشان داد، داده‌ها به‌طور نرمال توزیع شده‌اند. علاوه بر این، از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) برای مقایسهٔ اختلافات بین گروه‌ها استفاده گردید و هنگامی‌که 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 معنی داری $P\leq0.05$ تعیین گردید. همهٔ داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS vol.16 تجزیه‌وتحلیل شدند.

یافته ها

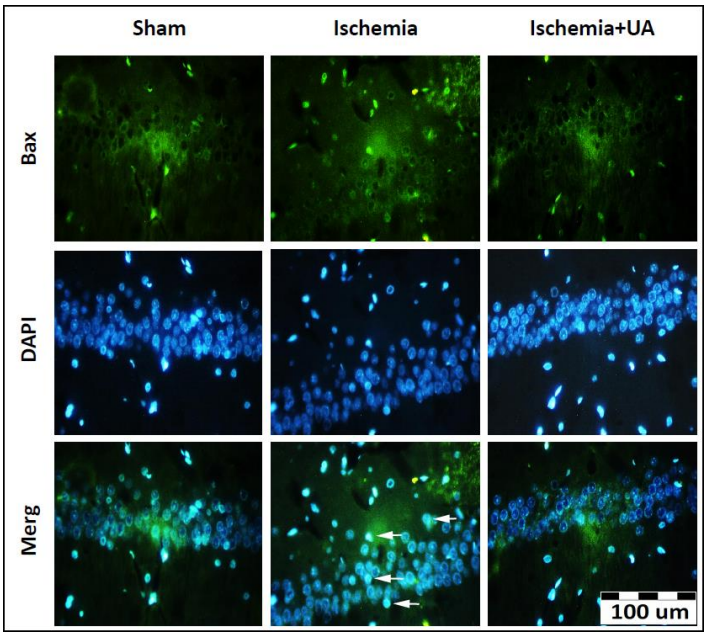
درمان با اسنیک اسید، میزان بیان پروتئین Bax پس از ایسکمی- جریان مجدد خون را کاهش می‌دهد. نتایج رنگ آمیزی ایمونوفلورسنت Bax نشان داد که در میزان درصد سلول‌های Bax مثبت ناحیهٔ CA1 هیپوکامپ در میان گروه‌های مختلف، از نظر آماری اختلاف معناداری وجود دارد. پروتئین Bax در گروه شم به‌طور ضعیفی بیان شد (10%±1.94).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



شکل شمارهٔ ۱. درصد سلول‌های Bax مثبت در ناحیهٔ 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 ($P<0.01$)

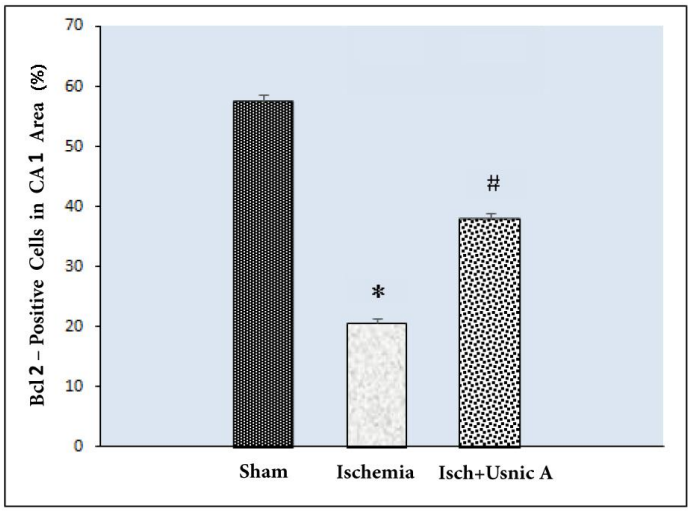
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.5.8]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.101]

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام / شهریور ۱۴۰۱، دوره ۳۰، شماره ۳، ۱۱۱-۱۰۱



شکل شمارهٔ ۲. فتومیکروگراف‌های رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت Bax در ناحیهٔ CA1 هیپوکامپ پس از ایسکمی مغزی در گروه‌های مختلف؛ رنگ سبز نشان‌دهندهٔ مارکر (Bax) است. رنگ آبی (DAPI) هستهٔ سلول‌ها را نشان می‌دهد. Merg نشان‌دهندهٔ ترکیب رنگ آنتی‌بادی و هستهٔ سلول‌ها است. (بزرگ‌نمایی ۴۰۰ x). فلش‌ها نشان‌دهندهٔ سلول‌های Bax مثبت هستند. همان‌طور که در شکل نشان داده‌شده است، میزان بیان پروتئین Bax در گروه ایسکمی به شکل چشمگیری افزایش یافته؛ اما در گروه اسنیک اسید این میزان کاهش پیدا کرده است.

درمان با اسنیک اسید، میزان بیان پروتئین Bcl-2 پس از ایسکمی- جریان دوبارهٔ خون را افزایش می دهد. نتایج رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی Bcl-2 نشان داد که اختلاف معنی‌داری در درصد سلول‌های Bcl-2 مثبت ناحیهٔ CA1 در میان گروه‌های مختلف وجود داشت. بیان پروتئین Bcl-2 در گروه شم (57.43%±2.99) بالاتر بود. ایسکمی مغزی درصد سلول‌های Bcl-2 مثبت (20.57%±1.92) را در مقایسه با گروه شم کاهش داد (P<0.001)؛ همچنین در گروه درمانی با اسنیک اسید، درصد سلول‌های Bcl-2 مثبت در مقایسه با گروه ایسکمی (37.86%±3.13) به شکل معنی‌داری افزایش یافت (P<0.001)، (شکل شمارهٔ ۳ و ۴).



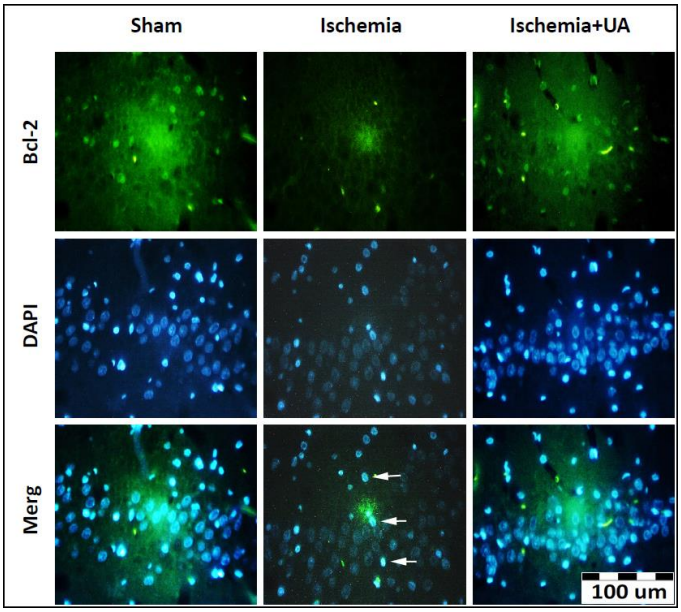
شکل شمارهٔ ۳. درصد سلول‌های Bcl-2 مثبت در ناحیهٔ CA1 هیپوکامپ در گروه‌های پژوهش پس از ایسکمی مغزی

* به‌طور معناداری در مقایسه با گروه شم متفاوت است (P<0.001).

در مقایسه با گروه‌های شم و ایسکمی، به‌طور معناداری متفاوت است (P<0.001).

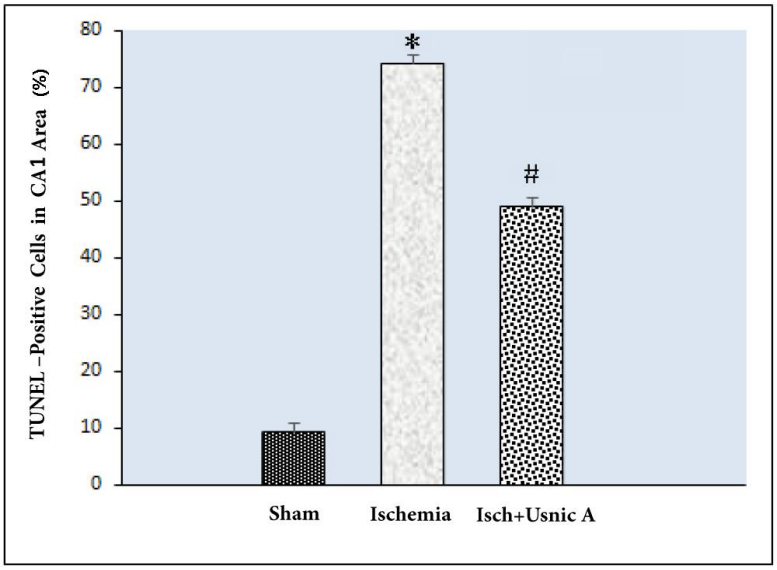
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-10]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.5.8]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.101]



شکل شمارهٔ ۴. فتومیکروگراف‌های رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت Bcl-2 در ناحیهٔ CA1 هیپوکامپ پس از ایسکمی مغزی در گروه‌های مختلف؛ رنگ سبز نشان‌دهندهٔ مارکر (Bcl-2) است. رنگ آبی (DAPI) هستهٔ سلول‌ها را نشان می‌دهد. Merg نشان‌دهندهٔ ترکیب رنگ آنتی‌بادی و هستهٔ سلول‌ها است. (بزرگ‌نمایی ۴۰۰ x). فلش‌ها نشان‌دهندهٔ سلول‌های Bax مثبت هستند. همان‌طور که در شکل نشان داده‌شده است، میزان بیان پروتئین Bcl-2 در گروه ایسکمی به شکل چشمگیری کاهش یافته؛ اما در گروه اسنیک اسید این میزان افزایش داشته است.

درمان با اسنیک اسید، آپوپتوز ناشی از ایسکمی-ریپرفیوژن را کاهش می دهد. نتایج به‌دست‌آمده از رنگ‌آمیزی تانل نشان داد که درصد سلول‌های تانل مثبت در ناحیهٔ CA1 هیپوکامپ در گروه ایسکمی (74.29%±3.64) در مقایسه با گروه شم (4.319.29%±)، به‌طور چشمگیری افزایش یافته است (P<0.001)؛ همچنین در موش‌های ایسکمیک تحت درمان با اسنیک اسید، درصد سلول‌های تانل مثبت (49%±4.08) در مقایسه با گروه ایسکمی، به شکل معناداری پایین آمد (P<0.001)، (شکل شمارهٔ ۵ و ۶).



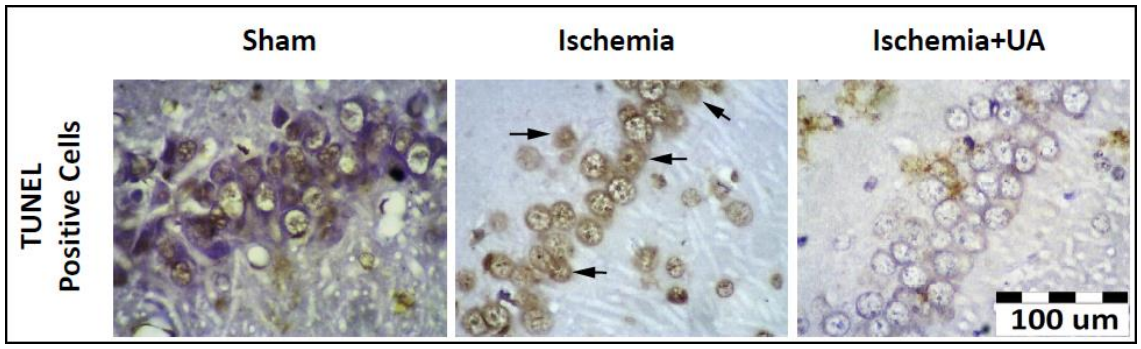
شکل شمارهٔ ۵. درصد سلول‌های TUNEL مثبت در ناحیهٔ CA1 هیپوکامپ در گروه‌های پژوهش پس از ایسکمی مغزی

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

تفاوت معنادار در مقایسه با گروه‌های شم و ایسکمی (P<0.001)

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.5.8]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.101]

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام / شهریور ۱۴۰۱، دوره ۳۰، شماره ۳، ۱۱۱-۱۰۱



شکل شمارهٔ ۶. فتومیکروگراف‌های رنگ‌آمیزی تانل در ناحیهٔ CA1 هیپوکامپ پس از ایسکمی مغزی در گروه‌های مختلف. فلش‌ها نشان‌دهندهٔ سلول‌های تانل مثبت هستند. همان‌طور که در شکل نشان داده‌شده 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 مطالعهٔ حاضر، شواهد فراوانی دربارهٔ اسنیک اسید، به‌عنوان یک عامل محافظت نورونی در درمان آسیب ناشی از ایسکمی مغزی ارائه‌شده است. نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که تزریق اسنیک اسید به‌طور معناداری میزان آپوپتوز ناشی از ایسکمی مغزی را در ناحیهٔ CA1 هیپوکامپ کاهش می‌دهد. علاوه بر این، نتایج این مطالعه نشان داد که اسنیک اسید تأثیر مهمی در مهار میزان بیان پروتئین پیش‌آپوپتوزی Bax دارد و همچنین میزان بیان پروتئین آنتی آپوپتوزی Bcl-2 را افزایش می‌دهد.

آپوپتوز نورون‌ها در سازوکار پاتوژنز سکتهٔ مغزی ایسکمیک نقش مهمی دارد و به‌عنوان مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده شناخته می‌شود (۲)؛ بنابراین، به مطالعات برای درک بهتر سازوکارهای مرگ سلول‌های عصبی و آسیب‌های مغزی و انجام پژوهش‌های مقایسه‌ای دربارهٔ 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 خانوادهٔ پروتئین‌های Bcl-2 می‌توانند با پروتئین‌های پیش آپوپتوزی مانند Bax ترکیب شوند و هترودیمرهایی را به‌وجود بیاورند که آپوپتوز را تنظیم می‌کنند؛ ازاین‌رو، تنظیم Bcl-2 و فعال سازی مسیر سیگنالینگ وابسته به آن PI3K/Akt/mTOR می‌تواند راهکار مهم و جدیدی برای هدف قرار دادن آپوپتوز در سکتهٔ مغزی ایسکمیک باشد (۱۸).

ناحیهٔ CA1 هیپوکامپ و به‌ویژه سلول‌های هرمی این ناحیه، یکی از مناطق حساس نسبت به ایسکمی مغزی هستند. ازآنجاکه ناحیهٔ CA1 هیپوکامپ یک منطقهٔ مهم دخیل در یادگیری و حافظه است، ایسکمی مغزی موجب آسیب ناتوان‌کننده و پیش‌رونده و درنهایت 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 منطقهٔ 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 به‌صورت آزمایشی هستند.

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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.5.8]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.101]

Bcl-2 و Bcl-XL از تشکیل منافذ میتوکندریایی از طریق تشکیل هترودایمرهایی با پروتئین Bax جلوگیری می‌کنند. Bax و Bak به‌طور مستقیم، در آزادسازی سیتوکروم c با تشکیل منافذ در غشای میتوکندری واسطه‌گری می‌کنند (۲).

منافذ انتقال نفوذپذیری میتوکندری پستانداران (MPTP)، در غشاهای داخلی و خارجی میتوکندری، یک کانال غیراختصاصی برای انتقال سیگنال یا انتقال مواد میان ماتریس میتوکندری و سیتوپلاسم ازجمله حفظ هموستاز کلسیم، تنظیم سیگنال های استرس اکسیداتیو و انتقال پروتئین برانگیخته توسط برخی از محرک‌ها هستند. ثابت‌شده است که باز شدن مداوم MPTP باعث تحریک آپوپتوز نورون در سکتهٔ مغزی ایسکمیک می‌شود. در همین حال، مهار آپوپتوز ناشی از افزایش بیش‌ازحد MPTP، تأثیر بسیار خوبی در درمان سکتهٔ مغزی ایسکمیک نشان داده است (۲۱).

گلسنگ‌ها موجودات همزیستی هستند که از یک قارچ، یک جلبک و یا یک سیانوباکتری تشکیل شده اند و علاوه بر متابولیت‌های اولیه (به‌عنوان‌مثال اسیدهای چرب و کربوهیدرات‌ها)، متابولیت‌های ثانویه با ویژگی‌های منحصربه‌فرد دارویی تولید می‌کنند. اخیراً علاقهٔ دوباره به گلسنگ به‌عنوان منابع جدید مولکول‌های زیستی فعال دارویی، با مطالعهٔ دقیق آغاز شده است و آثار ضدمیکروبی، ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی و خصوصیات محافظتی نورون‌ها در برابر ROS داخل سلولی، از متابولیت های ثانویهٔ آن‌ها گزارش‌شده است. این ویژگیهای بیان‌شده برای اسنیک اسید مانند خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی و همچنین کاهش فعال شدن پروتئین پیش آپوپتوزی (به‌عنوان‌مثال کاسپاز-۳) می‌تواند برای معرفی آن در درمان بیماری‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو، ازجمله 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 مدل‌های سمیت سلولی مربوط به H_2O_2 (به‌واسطهٔ کاهش تولید ROS)، سطح پراکسیداسیون لیپیدی و فعال‌سازی پروتئین پیش آپوپتوزی دارد (۲۲). در مطالعهٔ مشابه دیگری گزارش شده است که درمان با اسنیک اسید موجب مهار استرس اکسیداتیو و پاسخ های التهابی در یک مدل آسیب حاد ریهٔ موش ها، به‌واسطهٔ افزایش فعالیت SOD و GSH و کاهش بیان کموکاین‌های التهابی شامل TNF-α، IL-6، IL-8 و پروتئین التهابی ماکروفاژ -۲ (MIP-2) می‌شود (۲۳). نشان داده‌شده است که افزایش برخی از سایتوکاین ها ازجمله IL-6، IL-1β و TNF-α که در مدل‌های ایسکمی وجود دارد، با مسیرهایی مرتبط‌اند که در مرگ عصبی آپوپتوتیک شرکت می‌کنند (۲۴).

می‌توان ترکیبات تزریق‌شده با IP را حتی ۱۰ ثانیه پس از تجویز در گردش خون سیستمیک شناسایی کرد (۲۵). ازآنجاکه سد خونی مغزی رابط اصلی میان خون و مایع بینابینی مغز است، هنگامی‌که دارو از سد خونی مغزی عبور می کند، امکان تحویل فوری آن در کل حجم مغز وجود دارد (۲۶). از آنجاکه نفوذ اسنیک اسید از سد خونی مغزی به‌واسطهٔ سازوکار انتقال غیرفعال مشخص‌شده است (۲۷)، انتظار می‌رود اسنیک اسید با سرعت بالای ۱۰ ثانیه پس از تجویز، به سلول‌های مغزی برسد.

به‌طورکلی، نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که درمان با اسنیک اسید به‌طور چشمگیری مرگ سلول آپوپتوزی ناحیهٔ CA1 هیپوکامپ را کاهش می‌دهد. علاوه بر این، اسنیک اسید موجب بهبود بیان پروتئین ضدآپوپتوزی Bcl-2 و کاهش بیان پروتئین پروآپوپتوزی Bax می‌شود؛ بنابراین، با توجه به آثار امیدوارکنندهٔ اسنیک اسید در شرایط پاتولوژیک ایسکمی مغزی، اسنیک اسید احتمالاً می‌تواند به‌عنوان ترکیب درمانی طبیعی برای کاهش تخریب عصبی در اختلالاتی مانند ایسکمی- ریپرفیوژن مغزی عمل کند.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.5.8]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.101]

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام / شهریور ۱۴۰۱، دوره ۳۰، شماره ۳، ۱۱۱-۱۰۱

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی شاهرود (شمارۀ قرارداد: ۹۸۹۷) انجام‌شده است. از دانشگاه علوم پزشکی شاهرود که امکانات مالی و اجرایی پژوهش را فراهم کردند، تشکر و قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

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

کد اخلاق: IR.SHMU.REC.1397.186

References

1. 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.
2. 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.
3. 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
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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
8. Lai B, Upreti D. Ethnobotanical notes on three Indian lichens. The Lichenologist 1995; 27:77-9. doi:10.1006/lich.1995.0006
9. Caviglia AM, Nicora P, Giordani P, Brunialti G, Modenesi P. Oxidative stress and usnic acid content in Parmelia caperata and Parmelia soredians (Lichenes). Farmaco 2001; 56:379-82. doi:10.1016/s0014-827x(01)01090-4.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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
14. Aboutaleb N, Shamsaei N, Rajabi H, Khaksari M, Erfani S, et al. Protection of hippocampal CA1 neurons against ischemia/reperfusion injury by exercise preconditioning viamodulation of Bax/Bcl-2 ratio and prevention of caspase-3 activation. Basic clin neurosci 2016; 7:21. PMID:27303596
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. Li Y, Sun J, Wu R, Bai J, Hou Y, et al.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-10]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.5.8]

[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.101]

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, Szwajgier 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.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.5.8]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.101]