

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

Sohaila Erfani<sup>1</sup> , Tahereh Valadbeigi<sup>1</sup> , Mehdi Khaksari<sup>2</sup> , Ali Moghimi<sup>3</sup> , Nahid Aboutaleb<sup>4\*</sup> 

<sup>1</sup> Dept of Biology, Faculty of Science, Ilam University, Ilam, Iran

<sup>2</sup> Dept of Physiology, Faculty of Medicine, Shahrood University of Medical Sciences, Shahrood, Iran

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

<sup>4</sup> 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.

---



© The Author(s)

Publisher: Ilam University of Medical Sciences

## آثار اسینک اسید بر آپوپتوز و بیان پروتئین های Bax و Bcl-2 نورون های ناحیه CA1 هیپو کامپ به دنبال ایسکمی - ریپر فیوژن مغزی

سهیلا عرفانی<sup>۱</sup> , طاهره ولدیگی<sup>۱</sup> , مهدی خاکساری<sup>۲</sup> , علی مقیمی<sup>۳</sup> , ناهید ابوطالب<sup>\*</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

<sup>۲</sup> گروه فیزیولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهروود، شاهروود، ایران

<sup>۳</sup> مرکز تحقیقات فیزیولوژی و گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایران

<sup>\*</sup> مرکز تحقیقات فیزیولوژی و گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، 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، دانشکده پزشکی،

دانشگاه علوم پزشکی ایلام، تهران،

ایران

Email:  
aboutaleb.n@iums.ac.ir

### واژه های کلیدی:

آپوپتوز، اسینک اسید، ایسکمی- ریپر فیوژن، هیپو کامپ 

اسناد: عرفانی، سهیلا؛ ولدیگی، طاهره؛ خاکساری، مهدی؛ مقیمی، علی؛ ابوطالب، ناهید. آثار اسینک اسید بر آپوپتوز و بیان پروتئین های Bax و Bcl-2 نورون های ناحیه CA1 هیپو کامپ به دنبال ایسکمی - ریپر فیوژن مغزی. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، شهریور ۱۴۰۱؛ ۱۰(۳۰): ۱۱۱-۱۰۱.



ایسکمی- ریپر فیوژن مغزی یکی از مهم‌ترین علل مرگ و میر و ناتوانی در سراسر جهان تلقی می‌شود (۱). روش‌های درمانی سکته مغزی بسیار اندک است؛ از این‌رو، 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 (۳). به خوبی نشان داده شده است که در سکته مغزی ایسکمیک، فعال‌سازی چندین مسیر سیگنالینگ سلولی به آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی شده) نوروپنی منجر می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد که در زمان‌های گوناگون پس ایسکمی مغزی، بیان پروتئین مهم آنتی آپوپتوزی-2 Bcl-2 کاهش و بیان پروتئین پیش آپوپتوزی Bax افزایش می‌یابد (۵).

گلشنگ‌ها از مهم‌ترین منابع ترکیبات فعال بیولوژیکی هستند که به علت خاصیت درمانی ارزشمندانه همانند اغلب گیاهان، از دوران باستان به عنوان داروهای طبیعی در طب سنتی استفاده شده‌اند (۶). این ارگانیسم‌ها فعالیت‌های بیولوژیکی بسیار متفاوتی از جمله خواص ضدالتهابی، آنتی اکسیدانی، ضدتب، ضددرد، ضدسرطان، ضدمیکروب، ضددیابت و ترمیم زخم دارند (۷). شایع‌ترین گلشنگ، جنس Usnea Dill. ex Adans است که سابقاً کاربرد پزشکی در سراسر جهان را دارد؛ به عنوان مثال، Usnea longissima Ach یک نوع از گونه‌های گلشنگ است که به طور گسترده برای درمان آسیب‌های ناشی از التهاب پوستی استفاده می‌شود (۸). اسینیک اسید آنتی‌بیوتیکی طبیعی است که به طور اختصاصی در گلشنگ یافت می‌شود و در پزشکی و مصارف زیست‌محیطی کاربرد دارد. اسینیک اسید در بسیاری از انواع گلشنگ شناخته شده از جمله Evernia، Parmelia، Usnea، Cladonia، Hypotrachyna

## مواد و روش‌ها

حیوانات و دارو: این تحقیق روی ۴۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (۳۰۰-۲۵۰ گرم) صورت گرفت که از مؤسسه پاستور تهران تهیه شده بودند. حیوانات در اتاق و قفس‌های استاندارد و محیط کنترل شده ۲۲-۲۴ درجه سانتی‌گراد و چرخه ۱۲/۱۲ ساعت روشناختی- تاریکی، با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری گردیدند. برای تزریق، اسینیک اسید (سیگما آلدربیچ، ۳۲۹۹۶۷، آلمان) در DMSO حل شد. همه مراحل آزمایش بر اساس قوانین بین‌المللی نگهداری و مراقبت از حیوانات و با نظارت کمیته اخلاقی با کد اخلاق IR.SHMU.REC.1397.186 انجام گردیده است.

گروه‌های آزمایشی: حیوانات به طور تصادفی به سه گروه تقسیم شدند: گروه شم، گروه ایسکمی- ریپر فیوژن و گروه ایسکمی- ریپر فیوژن + اسینیک اسید ۱۴ سر در هر گروه. حیوانات در گروه ایسکمی-

اندازه گیری میزان ایمنو اکتیویتی *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 درون زا 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 اتو کلاو به مدت ۱۱ دقیقه در بافر سیترات (pH=6) انجام گردید. قطعات توسط سرم بز نرمال ۱۰ درصد، به مدت یک ساعت بلوکه شدن و سپس انکوباسیون با آنتی بادی ضد (rabbit antibody against rat Abcam, Bax and Bcl-2 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 فلورورکروم کونژو گه شدنده؛ سپس فرایند رنگ آمیزی متقابل (counterstaining) با ۶۴ دیامیدینو ۲-فنیل ایندول (DAPI) در PBS به مدت ۵ دقیقه انجام گردید. پس از شستشو، سیگنال های فلورسنت ناحیه CA1 هیپو کامپ سمت راست، در هر اسلاید با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس (Labomed, USA, 400 $\times$ ) 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 گردد. 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 آپوپتویک، از کیت تشخیص مرگ سلولی آپوپتوز (In Situ Cell

ریپر فیوژن + اسینیک اسید، یک تزریق داخل صفاقی (IP) از اسینیک اسید (25mg/kg) در آغاز زمان خون رسانی مجدد دریافت کردند. برای ایجاد مدل ایسکمی - ریپر فیوژن مغزی، انسداد شریان های کاروتید مشترک (CCA) صورت گرفت. در گروه شم، همان روش جراحی بدون انسداد شریان های کاروتید مشترک آنها انجام شد.

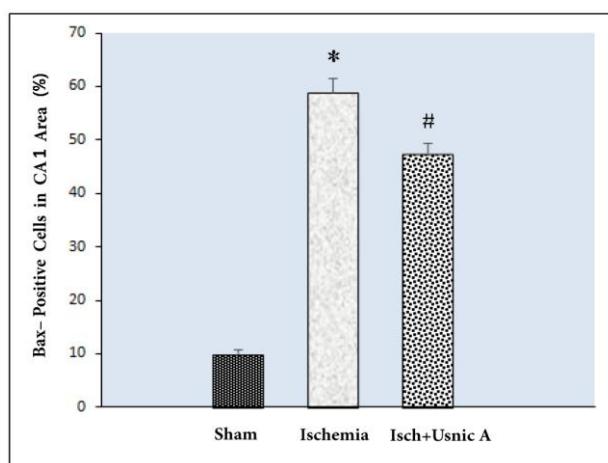
القای ایسکمی - ریپر فیوژن گذرای مغزی: ایجاد مدل ایسکمی - ریپر فیوژن مغزی بر اساس روش جراحی بستن موقعی شریان های کاروتید مشترک انجام گردید (۱۳). پیش از شروع جراحی ایسکمی مغز، بی هوشی با استفاده از تزریق داخل صفاقی کاتامین (50mg/kg) و زیالازین (10mg/kg) انجام شد؛ سپس هر دو سرخرگ کاروتید مشترک با دقت از 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 ریپر فیوژن (خون رسانی مجدد) فوری برداشته شدند. برقراری دوباره جریان خون با مشاهده تأیید گردید. در طول جراحی، دمای رکتوم حیوانات در ۳۶/۵±۰/۵ درجه سانتی گراد، با استفاده از سامانه گرمایش باز خوردی 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 پرفیوژن از طریق قلب، با محلول نمکی ۰/۹ درصد و به دنبال آن، پارافرمالدئید ۴ درصد در بافر فسفات ۱/۰ میلی مول (pH=7.4) انجام شد. پس از آن، بافت های مغز آنها خارج گردید و در فیکساتیو مشابه به مدت ۳ روز قرار گرفت؛ سپس از مغز ها بلوک های پارافینی تهیه و با استفاده از دستگاه میکرو توم، مقاطع کرونال با ضخامت ۷ میکرومتر برای رنگ آمیزی ایمونو هیستوشیمی و ایمونوفلورسنت گرفته شد. مقاطع بر اساس اطلس پاکسینوس در محدوده بین ۳/۳ و ۴/۲ میلی متر پشت بر گما تهیه گردید (۱۴).

آزمون نشان داد، داده ها به طور نرمال توزیع شده اند. علاوه بر این، از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) برای مقایسه اختلافات بین گروه ها استفاده گردید و هنگامی که تفاوت معنی داری وجود داشت، یک آزمون تعییسی شفه یا دانت تی-۳ (Dunnet's T3 یا Scheffe's) برای تعیین محل اینکه تفاوت در کدام گروه ها رخ داده است، استفاده شد. سطح معنی داری  $P \leq 0.05$  تعیین گردید. همه داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS vol.16 تجزیه و تحلیل شدند.

### یافته ها

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



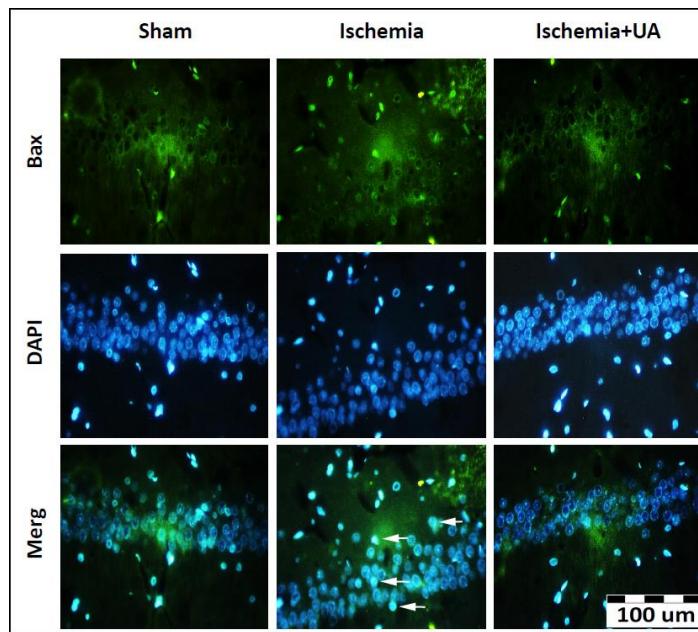
شکل شماره ۱. درصد سلول های CA1 مثبت در ناحیه Bax پس از ایسکمی مغزی

\* تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه شم ( $P < 0.001$ )

# تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه های شم ( $P < 0.001$ ) و ایسکمی ( $P < 0.01$ )

(Death Detection Kit, Roche, Mannheim, Germany) بر اساس دستور العمل شرکت تولید کننده استفاده شد (۱۶). به طور خلاصه، پس از دپارافینه کردن با زایلن، برش ها (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  $3\text{ }^{\circ}\text{C}_2\text{O}_2$  در متانول انجام شد. پس از آن، مخلوط واکنش تانل (TUNEL reaction mixture) در اتمسفر مرطوب در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی گراد اضافه گردید. پس از آن، اسلایدها با PBS شسته شدند و سوبسترا (3,3-diaminobenzidine) DAB برای ۱۰ دقیقه به عنوان کروموزن 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 ناحیه هیپوکامپ صورت گرفت. تعداد سلول های تانل مثبت در طول قسمت های ناحیه CA1 هیپوکامپ شمارش شد.

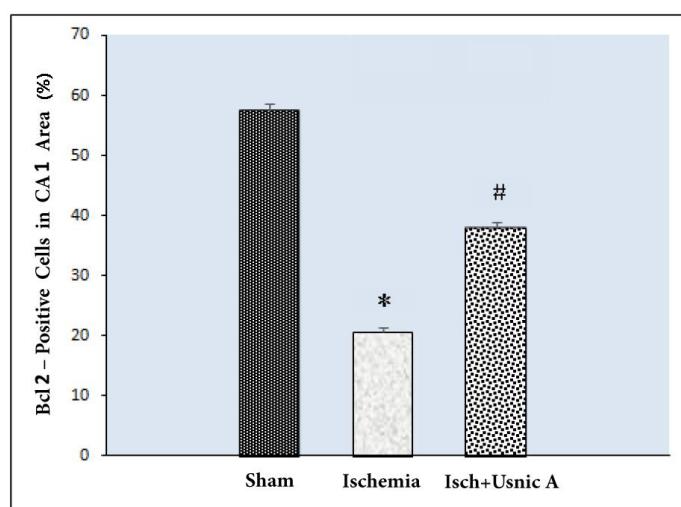
تحلیل آماری: از آمار توصیفی برای جمع بندی خصوصیات مجموعه داده ها شامل میانگین و انحراف معیار استفاده گردید. برای تجزیه و تحلیل داده ها از آزمون های مختلف بهره گرفته شد. آزمون کلمو گوف- اسمیرنوف به عنوان آزمون نرمال بودن به کار رفت که این



**شکل شماره ۲.** فتو میکرو گراف های رنگ آمیزی ایمونو فلورسنت Bax در ناحیه CA1 هیپو کامپ پس از ایسکمی مغزی در گروه های مختلف؛ رنگ سبز نشان دهنده مار کر (Bax) است. رنگ آبی (DAPI) هسته سلول ها را نشان می دهد. Merg. نشان دهنده ترکیب رنگ آنتی بادی و هسته سلول ها است. (بزرگنمایی ۴۰۰X). فلش ها نشان دهنده سلول های Bax مثبت هستند. همان طور که در شکل نشان داده شده است، میزان بیان پروتئین Bax در گروه ایسکمی به شکل چشمگیری افزایش یافته؛ اما در گروه اسینیک اسید این میزان کاهش پیدا کرده است.

ایسکمی مغزی در صد سلول های Bcl-2 مثبت (20.57% $\pm$ 1.92) را در مقایسه با گروه شم کاهش داد ( $P<0.001$ )؛ همچنین در گروه درمانی با اسینیک اسید، در صد سلول های Bcl-2 مثبت در مقایسه با گروه ایسکمی (37.86% $\pm$ 3.13) به شکل معنی داری افزایش یافت ( $P<0.001$ ). (شکل شماره ۳ و ۴).

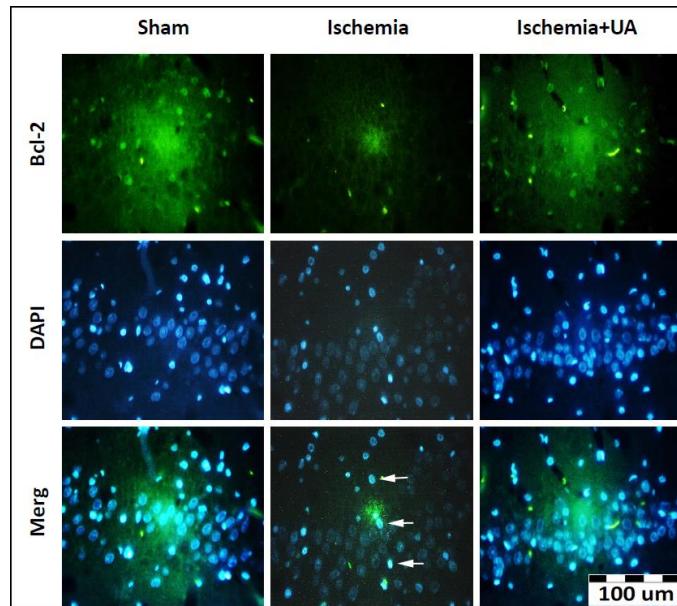
درمان با اسینیک اسید، میزان بیان پروتئین 2 Bcl پس از ایسکمی - جریان دوباره خون را افزایش می دهد. نتایج رنگ آمیزی ایمونو هیستوشیمی 2 Bcl نشان داد که اختلاف معنی داری در درصد سلول های Bcl-2 مثبت ناحیه CA1 در میان گروه های مختلف وجود داشت. بیان پروتئین 2 Bcl در گروه شم (57.43% $\pm$ 2.99) بالاتر بود.



**شکل شماره ۳.** درصد سلول های Bcl-2 مثبت در ناحیه CA1 هیپو کامپ در گروه های پژوهش پس از ایسکمی مغزی

\* به طور معناداری در مقایسه با گروه شم متفاوت است ( $P<0.001$ ).

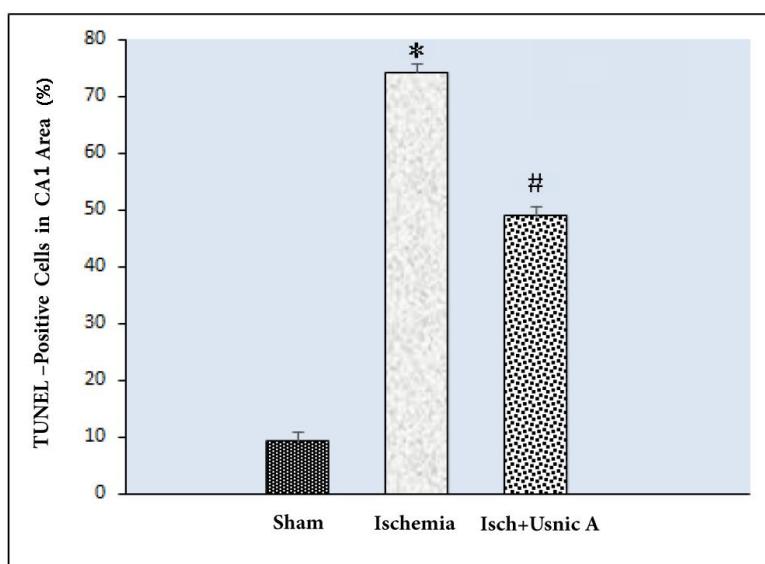
# در مقایسه با گروه های شم و ایسکمی، به طور معناداری متفاوت است ( $P<0.001$ ).



**شکل شماره ۴.** فتو میکرو گراف های رنگ آمیزی ایمونوفلورسنت 2-Bcl در ناحیه CA1 هیپو کامپ پس از ایسکمی مغزی در گروه های مختلف؛ رنگ سبز نشان دهنده مار کر (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. (بزرگنمایی  $400\times$ ). 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 اسیدیک اسید این میزان افزایش داشته است.

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

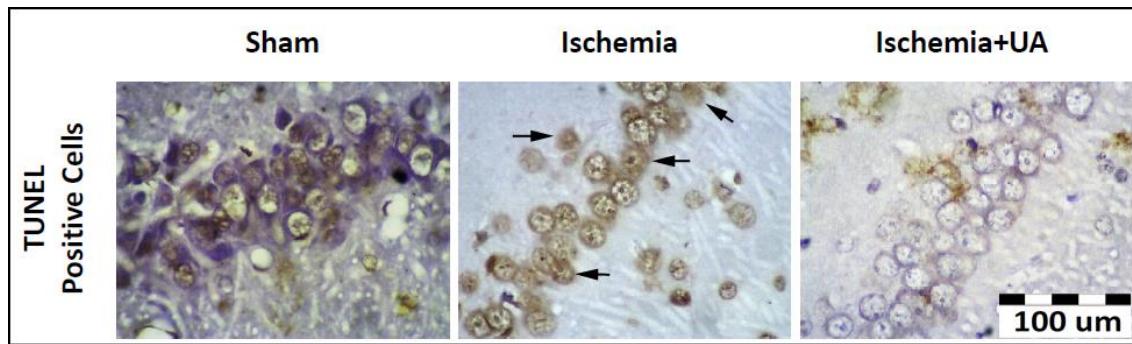
درمان با اسیدیک اسید، آپوپتوز ناشی از ایسکمی- ریپر فیوژن را کاهش می دهد. نتایج به دست آمده از رنگ آمیزی تانل نشان داد که درصد سلول های تانل مثبت در ناحیه CA1 هیپو کامپ در گروه ایسکمی ( $74.29\%\pm 3.64$ ) در مقایسه با گروه شم ( $43.19\%\pm 4.08$ )



**شکل شماره ۵.** درصد سلول های TUNEL مثبت در ناحیه CA1 هیپو کامپ 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. فوتومیکروگراف های رنگ آمیزی تانل در ناحیه CA1 هیپوکامپ پس از ایسکمی مغزی در گروه های مختلف. فلش ها نشان دهنده سلول های تانل مثبت هستند. همان طور که در شکل نشان داده شده است، درصد سلول های تانل مثبت در گروه ایسکمی به شکل چشمگیری افزایش یافته؛ اما در گروه اسینک اسید، این میزان پایین آمده است.

ناحیه CA1 هیپوکامپ و به ویژه سلول های 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 ناتوان کننده و پیش رونده و درنهایت به نقص در یادگیری و حافظه منجر می شود (۱۹). تاکنون، چیز 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.

آسیب های میتوکندریایی در بیشتر موارد آپوپتوز سلول های عصبی نقش اساسی دارد؛ به عبارت دیگر، نفوذ پذیری غشا خارجی میتوکندری با دریافت سیگنال آپوپتویک افزایش می یابد و درنتیجه، باعث کاهش توانایی غشاء میتوکندری می شود و به دنبال آن، سبب جابجایی عامل پرواپوپتویک (سیتوکروم c) از فضای بین غشاء ای میتوکندری به سیتوزول می گردد. آزادسازی سیتوکروم c در سیتوزول به تشکیل مجموع آپوپتوزوم می انجامد. آپوپتوزوم اجازه فعال سازی خود کار را به کاسپاز-۹ می دهد که متعاقب آن، فعال سازی کاسپاز-۳ صورت می گیرد. فعال شدن کاسپاز-۳ باعث تکه تکه شدن DNA و مرگ سلول های عصبی آپوپتویک می شود (۲۰)، درحالی که پروتئین های ضد آپوپتوز مانند

## بحث و نتیجه گیری

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

آپوپتوز نورون ها در سازو کار پاتوزن سکته مغزی ایسکمیک نقش مهمی دارد و به عنوان مرگ سلولی برنامه ریزی شده شناخته می شود (۲۱)، بنابراین، به مطالعات برای درک بهتر سازو کارهای مرگ سلول های عصبی و آسیب های مغزی و انجام پژوهش های مقایسه ای درباره چگونگی کاهش مرگ سلول های عصبی، افزایش بقای سلول و تقویت بازسازی و ترمیم مغز پس از آسیب، نیاز فوری وجود دارد (۱۷). یافته ها نشان می دهند که خانواده پروتئین های Bcl-2 می توانند با پروتئین های پیش آپوپتوزی مانند Bax ترکیب شوند و هترو دیمرهایی را به وجود یاورند که آپوپتوز را تنظیم می کنند؛ از این رو، تنظیم Bcl-2 و فعال سازی مسیر سیگنالینگ وابسته به آن PI3K/Akt/mTOR می تواند راهکار مهم و جدیدی برای هدف قرار دادن آپوپتوز در سکته مغزی ایسکمیک باشد (۱۸).

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 اسپرینک 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 TNF- $\alpha$ ، IL-6، IL-8 و پروتئین التهابی ماکروفاز - ۲ (MIP-2) می شود (۲۳). نشان داده شده است که افزایش برخی از سایتو کاین ها از جمله IL-6، IL-1 $\beta$  و TNF- $\alpha$  که در مدل های ایسکمی وجود دارد، با مسیر هایی مرتبط اند که در مرگ عصبی آپوپتوزیک 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 آنجاکه سد خونی مغزی رابط اصلی میان خون و مایع بینایینی مغز است، هنگامی که دارو از سد خونی مغزی عبور می کند، امکان تحویل فوری آن در کل حجم مغز وجود دارد (۲۶). از آنجاکه نفوذ اسپرینک اسید از سد خونی مغزی به واسطه سازو کار انتقال غیرفعال مشخص شده است (۲۷)، انتظار می رود اسپرینک 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 اسپرینک اسید به طور چشمگیری مرگ سلول آپوپتوزی ناحیه CA1 هیپو کامپ را کاهش می دهد. علاوه بر این، اسپرینک اسید موجب بهبود بیان پروتئین ضد آپوپتوزی Bcl-2 و کاهش بیان پروتئین پرو آپوپتوزی Bax می شود؛ بنابراین، با توجه به آثار امیدوار کننده اسپرینک اسید در شرایط پاتولوژیک ایسکمی مغزی، اسپرینک اسید احتمالاً می تواند به عنوان ترکیب درمانی طبیعی برای کاهش تخریب عصبی در اختلالاتی مانند ایسکمی - ریپرفیوزن مغزی عمل کند.

Bcl-XL و Bcl-2 از تشکیل منافذ میتوکندریایی از طریق تشکیل هترو دایمرهایی با پروتئین Bax جلوگیری می کنند. Bak و Bax به طور مستقیم، در آزادسازی سیتو کروم C با تشکیل منافذ در غشای میتوکندری واسطه گری می کنند (۲).

منافذ انتقال نفوذ پذیری میتوکندری پستانداران (MPTP)، در غشاهای داخلی و خارجی میتوکندری، یک کanal غیر اختصاصی برای انتقال سیگنال یا انتقال مواد میان ماتریس میتوکندری 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 سکته مغزی ایسکمیک می شود. در همین حال، مهار آپوپتوز ناشی از افزایش بیش از حد MPTP، تأثیر بسیار خوبی در درمان سکته مغزی ایسکمیک نشان داده است (۲۱).

گلشنگ ها موجودات هم زیستی هستند که از یک قارچ، یک جلبک و یا یک سیانو باکتری تشکیل شده اند و علاوه بر متابولیت های اولیه (به عنوان مثال اسید های چرب و کربوهیدرات ها)، متابولیت های ثانویه با ویژگی های منحصر به فرد دارویی تولید می کنند. اخیراً علاقه دوباره به گلشنگ 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 اسپرینک 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 اسپرینک اسید خواص حفاظت سلولی از

## تشکر و قدردانی

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

## تعارض منافع

بین نویسنده‌گان 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 soredians (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; 11730:146642. 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- $\alpha$  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.