



اثر تزریق آدنوزین پس از ایسکمی ریپرفیوژن مغزی بر بیان ژن NF-kB/p65 و سطح فعالیت ROS بافت هیپوکامپ مغز در موش‌های نر ویستار

آتوسا جوزانی: دانشجوی دکتری، گروه سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران
منیره موحدی: استادیار بیوشیمی، گروه سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران (*نویسنده مسئول)
m.movahhedi@iau-tnb.ac.ir

مریم خسروی: استادیار فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران
فرشته گلاب: استادیار فیزیولوژی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

چکیده

کلیدواژه‌ها

استرس اکسیداتیو، التهاب، هیپوکامپ، ایسکمی ریپرفیوژن مغزی

زمینه و هدف: واحد p65، یکی از زیر واحدهای NF-kB می‌باشد و فسفوریلاسیون آن توسط استرس اکسیداتیو باعث فعال شدن NF-kB می‌گردد. هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر تزریق آدنوزین پس از ایسکمی ریپرفیوژن مغزی بر بیان ژن NF-kB/p65 و سطح فعالیت گونه‌های واکنشگر اکسیژن (Reactive Oxygen Species-ROS) بافت هیپوکامپ مغز در موش‌های نر ویستار است.

روش کار: ۴۰ سر موش نر نژاد ویستار به‌طور تصادفی به ۴ گروه کنترل سالم (n=۱۰)، گروه ایسکمی ریپرفیوژن (n=۱۰)، گروه ایسکمی ریپرفیوژن + آدنوزین دوز ۰/۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم (n=۱۰) و گروه ایسکمی ریپرفیوژن + آدنوزین دوز ۰/۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم (n=۱۰) تقسیم شدند. ایسکمی در حیوانات توسط بستن شریان کاروتید به مدت ۴۵ دقیقه ایجاد شد. تزریق داخل صفاقی آدنوزین ۲۴ ساعت بعد از ایسکمی انجام شد. بیان ژن NF-kB/p65 و فعالیت ROS، به ترتیب توسط Real time PCR و اسپکتروفلوریمتر اندازه گیری شدند. از تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی بونفرونی جهت تحلیل داده‌ها استفاده گردید. سطح معنی‌داری $p < 0.05$ بود.

یافته‌ها: نتایج نشان داد، ایسکمی موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن NF-kB/p65 و فعالیت ROS در مقایسه با گروه کنترل شد ($p < 0.05$). همچنین هر دو دوز آدنوزین نیز منجر به کاهش معنی‌دار بیان ژن NF-kB/p65 و فعالیت ROS در مقایسه با گروه ایسکمی شد ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری: ایسکمی ریپرفیوژن مغزی باعث استرس اکسیداتیو می‌شود. به نظر می‌رسد، تزریق آدنوزین در کاهش استرس اکسیداتیو و التهاب ناشی از ایسکمی ریپرفیوژن مغزی مؤثر باشد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: حامی مالی نداشته است.

شیوه استناد به این مقاله:

Jozaie A, Movahedi M, Khosravi M, Golab F. The effects of adenosine injection after of brain ischemia reperfusion injury on gene expression of NF-kB/p65 and activity level of ROS in hippocampus tissue of male wistar rats. Razi J Med Sci. 2019;26(2):74-84.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 1.0 صورت گرفته است.



Original Article

The effects of adenosine injection after of brain ischemia reperfusion injury on gene expression of NF- κ B/p65 and activity level of ROS in hippocampus tissue of male wistar rats

Atossa Jozaie¹, PhD Student, Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran, Tehran, Iran

① **Monireh Movahedi**, Assistant Professor of Biochemistry, Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran, Tehran, Iran (*Corresponding author) m.movahedi@iautnb.ac.ir

Maryam Khosravi, Assistant Professor of Animal Physiology, Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran, Tehran, Iran.

Fereshteh Golab, Assistant Professor of Physiology, Department of Cellular and Molecular Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background: Unit of p65 is one of the subunits of NF- κ B and its phosphorylation by stress oxidative causes activation of NF- κ B. The aim of present study was to investigate the effects of adenosine injection after brain ischemia reperfusion injury on gene expression of NF- κ B /p65 and Reactive Oxygen Species (ROS) in hippocampus tissue of male wistar rats.

Methods: 40 male wistar rats were randomly divided into four groups, healthy control (n=10), ischemia reperfusion (n=10), ischemia reperfusion + adenosine dose of 0.1 mg/kg (n=10) and ischemia reperfusion + adenosine dose of 0.4 mg/kg (n=10). The animals were subjected to ischemia by the ligation of common carotid arteries for 45 min. Intraperitoneal injection of adenosine was done after 24 h ischemia in rats. The gene expression of NF- κ B /P65 and ROS activity were examined by Real time-PCR and Spectrofluorimeter, respectively. One-way ANOVA and Bonferroni post hoc test were used to analysis the data. The significant level was set at $p < 0.05$.

Results: The results showed that ischemia induced significant increase in gene expression of NF- κ B /p65 and ROS activity compared to control group ($p < 0.05$). Also, both dose of adenosine resulted in significant decrease in gene expression of NF- κ B /p65 and ROS activity compared to ischemia group ($p < 0.05$).

Conclusion: Brain ischemia reperfusion causes the stress oxidative. It appears that injection of adenosine is effective in reduction of stress oxidative and inflammation due to brain ischemia reperfusion.

Conflicts of interest: None

Funding: None

Keywords

Stress oxidative,
Inflammation,
Hippocampus,
Brain ischemia
reperfusion

Received: 22/12/2018

Accepted: 09/03/2019

Cite this article as:

Jozaie A, Movahedi M, Khosravi M, Golab F. The effects of adenosine injection after of brain ischemia reperfusion injury on gene expression of NF- κ B/p65 and activity level of ROS in hippocampus tissue of male wistar rats. Razi J Med Sci. 2019;26(2):74-84.

*This work is published under [CC BY-NC-SA 1.0 licence](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



دپلاریزه می‌کند (۱۰، ۱۱) که بعداً به اختلال میتوکندریایی منجر می‌شود. اختلالات میتوکندریایی در نتیجه‌ی ایسکمی مغزی رخ می‌دهد و مرگ سلولی به خصوص مسیر درونی آپوپتوز را توسعه می‌دهد (۱۰). میتوکندری در تولید ROS و تنظیم آپوپتوز نقش دارد و به عنوان فاکتور مهمی در تخریب عصب و ایسکمی مغزی گزارش شده است (۱۰). ایسکمی مغزی موقت که توسط ریپرفیوژن دنبال می‌شود، به‌طور معناداری تولید ROS، نیتریک اکساید و محصول پایانی پراکسیداسیون لیپیدی را افزایش می‌دهد و سبب کاهش سطوح گلوتاتیون پراکسیداز اندوژنی می‌شود (۱).

آدنوزین نقش مهمی در هایپوکسی و ایسکمی بازی می‌کند. در حال حاضر نقش آدنوزین خارج سلولی در التهاب ناشی از هایپوکسی در طول ایسکمی مشخص شده است (۱۲). آدنوزین تحت شرایط استرس اکسیداتیو تولید می‌شود و حفاظت سلولی را در تعدادی از سیستم‌های بدن تأمین می‌کند. آدنوزین اثراتش را توسط تعامل با انواع زیرمجموعه‌های گیرنده‌های مختلف آدنوزین (Adenosine receptors- AR)، شامل A1، A2A، A2B و A3AR میانجی می‌نماید (۱۳). زیر واحد A1AR آدنوزین، اعمال متعددی در سیستم عصبی مرکزی مانند تأمین حفاظت از سیتو بعد از ایسکمی و تروما را سبب می‌شود و همچنین نقش فعالیت گیرنده A1AR در محافظت از عصب در برابر آسیب ایسکمی نشان داده شده است (۱۴). رودولفی و همکاران نشان دادند که در طی ایسکمی این ویوو (In vivo)، تجمع A1AR، از بافت مغزی در مقابل آسیب محافظت می‌نماید (۱۵). همچنین افزایش آدنوزین خارج سلولی و فعال شدن A1AR، احتمالاً سودمندی‌هایی را در افرادی که از آسیب هایپوکسی حاد رنج می‌برند، دارد (۱۶). به علاوه، فعال شدن A1AR در مقابل ریپرفیوژن ایسکمی کلیه، کلیه را توسط کاهش مرگ سلولی، آپوپتوز و التهاب محافظت می‌کند (۱۷).

مهار A1AR، آسیب ناشی از هایپوکسی در

سکته ایسکمی، یکی از دلایل مرگ و ناتوانی در جهان می‌باشد. ایسکمی اغلب توسط ریپرفیوژن دنبال می‌شود و مشکلات دیگری مانند پاسخ التهابی، آپوپتوز و آسیب عصبی را سبب می‌شود (۱). آسیب ایسکمی ریپرفیوژن مغزی به جبران جریان خون بعد از یک دوره‌ی معین ایسکمی مغزی اشاره دارد که باعث افت عملکرد و تشدید اختلال مغز می‌شود (۲). بعد از سکته ایسکمی، سلول‌های نورون‌ها با توجه به شدت آسیب و توانایی سلول‌ها در سنتز آدنوزین تری فسفات (Adenosine triphosphate- ATP) توسط مکانیسم‌های نکروزی یا آپوپتوزی می‌میرند. نورون‌ها حساس به تغییرات اکسیژن هستند و هایپوکسی باعث مرگ سلول می‌شود (۳). مناطق مشخصی از مغز نسبت به ایسکمی مغزی حساس‌تر هستند (۴). هیپوکامپ یکی از آن نواحی است. در میان نورون‌های هیپوکامپ، نورون‌های CA1 هیپوکامپ، آسیب‌پذیری انتخابی به آسیب ایسکمی اعمال می‌کنند. علائم ظاهری مرگ سلولی در ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ بعد از یک دوره‌ی کوتاه ایسکمی به‌طور کامل مشخص می‌شود (۵). سپس، تخریب جسم سلولی پیرامیدال به‌طور تدریجی گسترش یافته و به آسیب و مرگ در ۷۹/۵٪ نورون‌های CA1 در طول هفت روز منجر می‌گردد (۶). ایسکمی و ریپرفیوژن موجب تجمع تولید گونه‌های واکنشگر اکسیژن (Reactive Oxygen Species- ROS) می‌شوند و در ادامه به آسیب اکسیداتیو بافت در مغز ایسکمی منجر می‌گردد (۷).

در دهه‌های گذشته، نقش ROS در آسیب ایسکمی ریپرفیوژن مغزی به‌طور وسیعی مورد بررسی قرار گرفته است و نشان داده شده است که استرس اکسیداتیو و تولید ROS در شروع فرایندهای آپوپتوز نقش دارند (۸). همچنین این مطالعات بیان کردند، استرس اکسیداتیو و شکل‌گیری اضافی رادیکال‌های آزاد در اختلال میتوکندریایی بعد از ایسکمی ریپرفیوژن مغزی دخالت دارند (۹، ۱۰). استرس اکسیداتیو، غشاء میتوکندریایی را توسط پراکسیداسیون لیپیدی،

مدل‌های درمان شده با داروی مهار NFκB، اثرات ضدالتهابی را تجربه کرده‌اند (۲۷) و NF-κB نقش پرو آپوپتیک را در مدل‌های ایسکمی بازی می‌کند (۲۱). از طرفی اطلاعات به دست آمده نشان داده‌اند که فعالیت NF-κB می‌تواند محافظتی یا مضر باشد. در ایسکمی ریپرفیوژن مغزی، فعالیت موقتی NF-κB می‌تواند موجب بیان فاکتور حفاظت عصبی در هیپوکامپ و محافظت از بافت مغز شود. با این وجود، حفظ یا بیان بیش از حد NF-κB می‌تواند به مرگ سلولی در هیپوکامپ منجر شود؛ بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که NF-κB با یک عملکرد دوگانه به عنوان تنظیم‌کننده‌ی بقاء سلولی در شرایط پاتولوژیکی عمل می‌کند. این موضوع قابل توجه است که اثر NF-κB در مغز عمدتاً بستگی به ناحیه، محرک، دوز و مدت حضور آن دارد (۲۸). چن و همکاران دریافتند نوع و مقدار زیر واحدهای NF-κB نقش تعیین‌کننده در آپوپتوز دارد (۲۹). به دلیل مکانیسم پیچیده و پیامدهای اجتماعی و اقتصادی ناشی از بیماری آسیب ریپرفیوژن مغزی، اخیراً پژوهشگران توجه بیشتری به آن نموده‌اند (۳۰). از سویی دیگر به دلیل اثر آدنوزین بر بیماری ایسکمی و نقش ROS و NF-κB /P65 در این آسیب، بررسی اثر تزریق آدنوزین (دو دوز مختلف ۰/۱ و ۰/۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم) پس از ایسکمی ریپرفیوژن مغزی بر بیان ژن NF-κB /P65 و سطح فعالیت ROS در بافت هیپوکامپ مغز موش‌های نر ویستار مورد مطالعه قرار گرفت.

روش کار

پژوهش حاضر از نوع تجربی است. ۴۰ سر موش نر نژاد ویستار بالغ با میانگین وزن ۲۵۰ تا ۲۸۰ گرم و سن ۱۰ تا ۱۲ هفته خریداری شدند. همه‌ی موش‌ها در قفس‌های پلی کربنات (۵ موش در هر قفس) در دمای ۲ ± ۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۵ درصد و تحت چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت بدون محدودیت در آب و غذا نگهداری شدند. سپس موش‌ها به‌طور تصادفی به ۴ گروه کنترل سالم (n=۱۰)، گروه ایسکمی ریپرفیوژن (n=۱۰)، گروه ایسکمی ریپرفیوژن + دوز یک آدنوزین (۰/۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم: AD1، n=۱۰) و گروه ایسکمی ریپرفیوژن + دوز دو آدنوزین (۰/۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم: AD2، n=۱۰) تقسیم شدند. جهت ایسکمی گلوبال هیپوکامپ، ابتدا موش‌ها با

هیپوکامپ موش را افزایش می‌دهد (۱۸). بعد از شروع ایسکمی، تعداد زیادی از رادیکال‌های اکسیژن شامل رادیکال‌های سوپراکسید آنیون و هیدروکسیل تولید می‌شوند. این رادیکال‌ها باعث آسیب و آغاز واکنش زنجیره‌ای می‌شود که به تولید ROS مختلف منجر می‌شود. ایسکمی مغزی باعث پراکسیداسیون لیپیدی شده که در نهایت کاهش سیالیت غشاء و نفوذپذیری بیشتر غشاء و پراکسیداسیون اسید نوکلئیک را همراه دارد. همه این عوامل در فعال شدن عامل هسته‌ای کاپا بتا (Nuclear factor kappa B- NF-κB) مشارکت دارند. به علاوه، ROS از طریق مسیر NF-κB درگیر در آسیب عصب می‌باشد (۱۹). علاوه بر این، فعالیت NF-κB می‌تواند بیان رادیکال‌های آزادی را که به‌نوبه‌ی خود باعث فعال شدن NF-κB می‌شود، توسعه بخشد (۱۹).

NF-κB از خانواده‌ی پروتئین‌های هترو یا هومودایمری است که از زیرواحدهای P50، P65 و P52 تشکیل شده است (۲۰) و مستقیماً به ROS پاسخ می‌دهد (۲۱) و یکی از فاکتورهای مهم رونویسی فعال بعد از ایسکمی مغزی می‌باشد. در این میان بیشتر به صورت کمپلکس هترودیمر p65/p50 است. زیرواحد p65 نقش مهمی در شرایط التهابی و تولید سایتوکاین‌ها دارا است (۲۲). فسفریلاسیون زیرواحد p65 منجر به کاهش اتصال NF-κB و مهارکننده‌ی IκB (Inhibitor of kappa B- IκB) در نتیجه فعال شدن NF-κB، می‌گردد (۲۳). به نظر می‌رسد فسفریلاسیون زیرواحد p65 جهت تنظیم شدن ژن‌ها توسط NF-κB مؤثر است، این فسفریلاسیون توانایی اتصال NF-κB به DNA را تغییر می‌دهد. یکی از عوامل مهم در فسفریلاسیون P65 و به دنبال آن فعال شدن مسیر NF-κB، استرس اکسیداتیو است (۲۴). نتایج مطالعه‌ی نشان داد القا ایسکمی کوتاه مدت موجب آسیب مغزی و مرگ سلول‌های عصبی در موش‌ها و کاهش بیان NF-κB /p50 می‌شود. در مقابل مهار NF-κB /p65 مکانیسم محافظتی در برابر آسیب ایجاد شده به وسیله آسیب موقت ایسکمی می‌باشد (۲۵). افزایش فعالیت NF-κB در بیشتر موش‌های دچار ایسکمی مغزی نیز دیده شده است و بیان‌کننده‌ی توسعه‌ی مرگ سلولی بوده است (۲۶). مطالعات اخیر درباره‌ی مدل‌های ایسکمی مغزی نشان داده‌اند که اعمال NF-κB مضر می‌باشد و

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای طراحی شده

ژن	نوع پرایمر	طول نوکلئوتید	Tm (°C)	طول محصول
RGap	F. primer : AAG TTC AAC GGC ACA GTC AAGG	۲۲	۶۱/۵۸	۱۲۱
	R. Primer: CAT ACT CAG CAC CAG CAT CAC C	۲۲	۶۱/۳۲	
NF-κB / P65	F.primer:CATACGCTGACCCTAGCCTG	۲۰	۵۹/۹۷	۱۳۵
	R.Primer:TTTCTTCAATCCGGTGGCGA	۲۰	۵۹/۹۶	

Slop نمودار به صورت $3/23$ - و کارائی تکنیک $E+0.98$ به دست آمد. در این مطالعه نتایج با استفاده از فرمول فافل و به صورت $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. مشخصات مربوط به پرایمر های استفاده شده در جدول ۱ آورده شده است.

اندازه گیری سطح فعالیت ROS بافت هیپوکامپ مغز با استفاده از DCF-DA که یک روش عمومی برای اندازه گیری ROS در انواع مختلفی از سلول ها است، با استفاده از تکنیک اسپکتروفلوریمتری انجام شد. به این ترتیب، ۵۰ میلی گرم از بافت هیپوکامپ مغز با ۱۰۰ میکرولیتر از DCF-DA به آرامی پیتاژ شد. سپس به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. بعد از سپری شدن مدت انکوباسیون بافت با دستگاه سونیکتور، خرد شده و به قطعات ریز تبدیل شد. سپس با دور ۱۵۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و با زمان ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول روئی با دستگاه اسپکتروفلوریمتر با طول موج ۴۸۸ نانومتر بررسی گردید. برای آنالیز داده ها با غلظت های لگاریتمی پنج، غلظت محاسبه و نمودار استاندارد رسم شد. سایر نمونه ها با استفاده از نمودار استاندارد ارزیابی شدند.

از آزمون کلموگروف اسمیرنوف (k-s) برای بررسی توزیع نرمال داده ها استفاده گردید. جهت بررسی تفاوت میانگین گروه ها از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (one way ANOVA) و جهت تعیین محل تفاوت بین گروه ها از آزمون تعقیبی بونفرونی استفاده گردید. سطح معنی داری برای تمام محاسبات < 0.05 در نظر گرفته شد. تمامی محاسبات با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۲ اجرا شد و نمودارها نیز با استفاده از نرم افزار Microsoft Excel نسخه ۱۶ رسم

استفاده از مخلوط کتامین (۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و زیلازین (۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم) تهیه شده از کمپانی الفاستان (Alfastan) به صورت تزریق درون صفاقی بیهوش شدند. موش ها بر روی تخت جراحی فیکس شدند و قسمت قدامی گردن موش تراشیده شد. سپس تحت شرایط استریل، در قسمت میانی گردن رت، برشی به اندازه $1/5 - 1$ سانتی متر داده شد. با مشخص شدن غلاف کاروتید، عصب واگ از غلاف جدا شد و شریان های کاروتید مشترک به صورت دو طرفه به مدت ۴۵ دقیقه بسته شد و سپس موضع عمل، بخیه گردید.

تزریق روزانه ی درون صفاقی دو دوز مختلف آدنوزین (۰/۴ میلی گرم بر کیلوگرم و ۰/۱ میلی گرم بر کیلوگرم) به مدت یک هفته پس از ۲۴ ساعت ریکاوری متعاقب ایسکمی انجام گرفت (۳۱). دوز داروی آدنوزین بر اساس LD 50% یا دوز کشنده تعیین شد. پژوهش با رعایت موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی با مجوز کد اخلاق از پژوهش به شماره IR.IAU.SRB.REC.۱۳۹۷،۱۳۴ انجام شد.

بیان ژن NF-κB/p65 بافت هیپوکامپ مغز توسط روش Real time&PCR انجام شد. ابتدا طراحی پرایمر انجام شد و سپس RNA کل از بافت ها استخراج گردید و به cDNA تبدیل گردید. سپس cDNA که کیفیت آن توسط خود PCR سنجیده شده بود، به روش PCR تکثیر شده و از نظر بیان ژن های ذکر شده مورد بررسی قرار گرفت. از ژن RGap به عنوان ژن رفرنس استفاده شد و اعداد حاصل از نمودار تکثیر برای ژن هدف در هر نمونه نسبت به ژن رفرنس نرمالیز گردید. به منظور بررسی Efficiency پرایمر ها نمودار استاندارد با استفاده از ۵ غلظت لگاریتمی رسم شد و

ROS در مقایسه با گروه ایسکمی بدون تزریق آدنوزین شد.

ROS بیان ژن‌های ایمنی و التهابی را تنظیم می‌کند (۳۴) و دارای نقش مهمی در مرگ عصبی می‌باشد (۳۵). همان‌طور که قبلاً ذکر شد، ایسکمی مغزی ای که توسط ریپرفیوژن دنبال می‌شود، باعث افزایش معنی دار تولید ROS می‌شود (۱). فاکتورهای زیادی مانند ROS، اضافه بار کلسیم و سایتوکاین‌های مختلف باعث فعال شدن NF-κB می‌شوند که در ایسکمی مغزی نیز نقش دارند (۳۶). گزارش‌های اولیه همبستگی فعالیت NF-κB با ایسکمی مغزی در سلول‌های گلیال مغز افراد را نشان داده است (۳۷). NF-κB می‌تواند اثر آپوپتوتیکی بر بقای عصبی داشته باشد (۳۶). التهاب با مرگ سلول‌های عصبی مرتبط بوده، باعث نقص عصبی می‌شود و NF-κB یکی از ژن‌های کلیدی مسبب التهاب بوده (۳۸)، به عنوان فاکتور رونویسی کلیدی برای ژن‌های مختلف درگیر در پاسخ‌های التهابی سکنه مانند TNF-α، IL-1B و IL-8 عمل می‌کند (۳۹). مطالعات پیشین نشان داده‌اند که NF-κB به‌طور مداوم در عصاره‌ی هسته هیپوکامپ بعد از ایسکمی مغزی فعال است (۳۶). از این رو حیواناتی که نقص در فعالیت NF-κB دارند، کمتر مشکوک به ایسکمی مغزی یا آسیب ریپرفیوژن مغزی هستند (۴۰). افزایش فعالیت NF-κB در بیشتر موش‌های دچار ایسکمی مغزی نیز دیده شده است و بیان‌کننده‌ی توسعه‌ی مرگ سلولی می‌باشد (۲۶) که همسو با نتایج مطالعه‌ی حاضر است. در مطالعه‌ی دیگر هم راستا با نتایج حاضر نیز، کراتسئونیک و همکاران، در مطالعه‌ی بر روی سلول‌های نورونی استخراج شده از موش نشان دادند، هنگامی که سلول‌ها در معرض شرایط ایسکمی و ریپرفیوژن قرار می‌گیرند به علت افزایش تولید رادیکال‌های آزاد در شرایط ریپرفیوژن فعالیت NF-κB در این سلول‌ها افزایش می‌یابد (۴۱).

ایسکمی موقت مغزی باعث تنظیم مثبت قابل توجهی از پروتئین‌های P50 و P65 در لحظه‌ی اولیه بعد از ایسکمی و بعد از آن می‌شود (۳۶). نتایج گزارش‌های این مطالعات همسو با افزایش بیان ژن NF-κB در بافت هیپوکامپ در مطالعه‌ی حاضر می‌باشد. جهت درک ارتباط میان ROS، NF-κB و آدنوزین در آسیب

می‌نماید. سکنه ایسکمی به دلیل عدم حمایت کافی خون مغزی و اکسیژن، به نکرور بافت مغز منجر می‌شود. گاهی اوقات ریپرفیوژن بعد از ایسکمی مغزی نه تنها عملکرد را بازیابی نمی‌کند بلکه می‌تواند موجب پیشرفت آسیب بافت و اختلال شود که به آن آسیب ایسکمی ریپرفیوژن مغزی می‌گویند (۳۲). نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد ایسکمی ریپرفیوژن مغزی باعث افزایش معنی دار بیان ژن NF-κB/P65 و سطح فعالیت ROS می‌شود. لیانگ و همکاران در مطالعه خود، اثر محافظتی پس آماده سازی ایسکمی در مقابل آپوپتوز ناشی از ایسکمی نقطه‌ای زودگذر بر فعالیت NF-κB/p65 را مورد بررسی قرار دادند. پس آماده سازی ایسکمی شامل سه دوره ۳۰ ثانیه‌ای ریپرفیوژن شریان مغز میانی در ۲ ساعت بعد از ایسکمی بود. یافته‌های آن‌ها نشان داد پس آماده سازی ایسکمی ناشی از ایسکمی نقطه‌ای کوتاه مدت، به‌طور آشکار منجر به کمتر شدن منطقه دچار انفارکتوس شده می‌شود و آپوپتوز نیز کاهش معناداری را در ریپرفیوژن ۲۴ ساعت بعد از ۲ ساعت ایسکمی موضعی نشان داد. از طرفی پس آماده سازی بعد از ایسکمی منجر به کاهش NF-κB/p65 در سیتوپلاسم شد اما در ریپرفیوژن بعد از ۲۴ ساعت افزایش پیدا کرد. آن‌ها اظهار داشتند اثرات حفاظتی پس آماده سازی بعد از ایسکمی، بر آپوپتوز نورونی ناشی از ایسکمی نقطه‌ای گذرا، با کاهش فعالیت NF-κB/p65 در نورون‌ها همراه است (۳۳). چن و همکاران گزارش کردند در ایسکمی ریپرفیوژن مغزی موضعی بیان NF-κB و TLR4 افزایش می‌یابد و ایسکمی ریپرفیوژن مغزی موضعی باعث آسیب مغز و آپوپتوز سلولی می‌شود که این وضعیت به دلیل فعال شدن مسیر NF-κB، TLR4 و زیر واحد آن، یعنی NF-κB/P65 می‌باشد که هم راستا با نتایج مطالعه حاضر بود (۳۲). مطالعه‌ی وانگ و همکاران نیز نشان داد بعد از ایسکمی ریپرفیوژن مغزی، شکل‌گیری ROS و فعالیت NF-κB افزایش می‌یابد و تزریق ۰/۱ و ۱ میکرو گرم بر کیلوگرم تاکسیفولین در یک ساعت بعد از ایسکمی، موجب کاهش فعالیت ROS و NF-κB شد (۱۹). همچنین نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد، تزریق هر دو دوز ۰/۱ و ۰/۴ میلی‌گرم آدنوزین نیز موجب کاهش معنی دار بیان ژن NF-κB/P65 و سطح فعالیت

(۳۹). در مطالعه‌ی حاضر، مقدار NF-κB/p65 بعد از تزریق هر دو دوز آدنوزین کاهش معنی‌داری یافت. در مطالعه‌ی بگ و همکاران القا ایسکمی کوتاه مدت موجب آسیب مغزی و مرگ سلول‌های عصبی در موش‌ها و کاهش NF-κB/p50 شد. در مقابل مهار NF-κB/p65 در نقش مکانیزم محافظتی در برابر آسیب ایجاد شده بوسیله آسیب موقت ایسکمی عمل کرد (۴۷). در وضعیت استراحت NF-κB به صورت نرمال تنها در سیتوپلاسم به پروتئین مهارکننده IκB متصل می‌شود. اما در هنگام ایسکمی مغزی یا ایسکمی ریپرفیوژن مغزی با افزایش ROS، NF-κB توسط Nuclear factor of kappa light polypeptide (IκBα) سیتوپلاسم گیر می‌افتد و توسط Iκβ کیناز (IκK) فسفوریله می‌شود و موجب کاهش و شکستن کمپلکس NF-κB/IκB می‌شود. وقتی سلول‌ها تحریک می‌شوند، NF-κB تحریک شده و داخل هسته منتقل می‌شود (۴۷). سپس NF-κB به KB خاص DNA متصل می‌شود و رونویسی ژن‌ها را تنظیم می‌کند (۳۶) و به تولید سایتوکاین‌های نوروتوکسیک هم چون IL-1-β، TNF-α و IL-α منجر می‌شود که موجب آسیب ثانویه به سلول‌های عصبی می‌شود (۳۸). با توجه به مکانیسم‌های درگیر، احتمالاً تزریق آدنوزین همراه با اثراتی که خود استرس اکسیداتیو بر افزایش آدنوزین دارد، باعث کاهش فعالیت ROS و مهار فعالیت پروتازوم شده و در نتیجه از تخریب پروتئین مهارکننده‌ی NF-κB (IκB) ممانعت کرده که این امر از انتقال NF-κB به درون هسته و فعالیت آن جلوگیری می‌کند تا کاهش فعالیت ROS و بیان ژن NF-κB/p65 بتوانند به عنوان عواملی برای جلوگیری از آسیب ناشی از ایسکمی ریپرفیوژن مغزی بشمار روند.

به‌طور خلاصه یافته‌های پژوهش حاضر نشان می‌دهد که تزریق ۰/۱ و ۰/۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم آدنوزین در مدل ایسکمی ریپرفیوژن مغزی موجب کاهش استرس اکسیداتیو و التهاب در هیپوکامپ می‌شود و احتمالاً تزریق آدنوزین در ضایعات ایسکمیک یک روش درمانی مؤثر باشد. در نهایت با توجه به افزایش ایسکمی ریپرفیوژن مغزی در جوامع مختلف و ارتباط بین متغیر TNF-α با NF-κB و ROS بررسی اثر آدنوزین بر بیان ژن TNF-α، استرس اکسیداتیو و متغیرهای آنتی

ایسکمی ریپرفیوژن مغزی، ما نیاز به درک اینکه چگونه ROS می‌تواند NF-κB را فعال کند و چگونگی تاثیر آدنوزین بر این متغیرها داریم (۳۶).

آدنوزین، یک متابولیت اندوژنی با عملکردهای مختلف از انتقال عصبی تا حفاظت عصبی در سیستم عصبی است (۴۲) که به‌طور مشخصی در درجه اول از طریق مشارکت A1R، A2AR و A3R در پاسخ به هایپوکسی مغزی، سکت و تروما افزایش می‌یابد (۴۳). گیرنده‌ی A1 از خانواده رسپتورهای پورینریژیک است که توزیع گسترده‌ای در سراسر بدن دارد. این رسپتورهای گلیکوپروتئینی فعالیت‌های زیادی را بر روی سلول انجام می‌دهند که از آن جمله می‌توان به فعال کردن آدنوزین سیکلاز، فسفولیپاز C، جابجایی سدیم و کلسیم و نیز اثر بر روی کانال‌های کلسیم، و پتاسیم اشاره کرد. یکی از عملکردهای مهم این گیرنده، افزایش مقاومت سلول در برابر انواع استرس‌های محیطی است که به دنبال فعال شدن آن، مرگ برنامه‌ریزی شده سلول یا آپوپتوز به تاخیر افتاده و به سلول فرصت ترمیم می‌دهد (۲۲-۲۰). با توجه به نقش ضد اکسیداتیوی، التهابی و ضد آپوپتوزی آدنوزین، سارانساری و همکاران نشان دادند که تحریک‌رهای آدنوزین، اثرات حفاظت عصبی در برابر اکسیتوتوکسیتی تحت شرایط آسیب سلولی را فراهم می‌کند (۴۴). هیو و همکاران نشان دادند گیرنده‌ی A1 آدنوزین، می‌تواند موجب تحمل در برابر آسیب ایسکمی ریپرفیوژن مغزی شود و این وضعیت مرتبط با کاهش استرس اکسیداتیو، التهاب و حفظ آنتی‌اکسیدان اندوژنی می‌باشد که در مطالعه‌ی حاضر نیز هر دو گروه دارای تزریق آدنوزین، کاهش معنی‌دار ROS و بیان ژن NF-κB را نشان داده‌اند (۴۵). پارک و همکاران همچنین بیان کردند فعالیت گیرنده‌های A1 در کلیه، از این بافت در مقابل آسیب ریپرفیوژن ایسکمی القاکننده‌ی مرگ سلولی، آپوپتوز و التهاب محافظت می‌نماید (۱۷).

فسفوریل‌اسیون P65 در سرین ۵۳۶ در دامنه‌ی انتقال فعال (Transactivation)، فعالیت رونویسی NF-κB را افزایش می‌دهد (۴۶). مطالعات پیشین بیان کرده‌اند که به دنبال ایسکمی فوکال، فعالیت NF-κB در نورون‌ها می‌تواند نفوذ نوتروفیل‌ها به داخل پارانشیم مغزی را واسطه نماید و درمان آن از فعالیت NF-κB جلوگیری کرده و موجب حفاظت عصبی شود

Curr Med Chem; 2008.15(1):1-14.

10. Chen SD, Yang DI, Lin TK, Shaw FZ, Liou CW, Chuang YC. Roles of oxidative stress, apoptosis, PGC-1 α and mitochondrial biogenesis in cerebral ischemia. *Int J Mol Sci*; 2011.12(10):7199-215.

11. Zarringol M. A review on regulation of autophagy by ROS (Reactive Oxygen Species). *Razi J Med Sci*; 2018.24(11):93-105.

12. Grenz A, Homann D, Eltzschig HK. Extracellular adenosine: a safety signal that dampens hypoxia-induced inflammation during ischemia. *Antioxid Redox Signal*; 2011.15(8):2221-34.

13. Fredholm BB, IJerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev*; 2001.53(4):527-52.

14. Laubach VE, French BA, Okusa MD. Targeting of adenosine receptors in ischemia-reperfusion injury. *Expert Opin Ther Targets*; 2011;15(1):103-18.

15. Rudolphi KA, Schubert P, Parkinson FE, Fredholm BB. Neuroprotective role of adenosine in cerebral ischaemia. *Trends Pharmacol Sci*; 1992.13:439-45.

16. Pearson T, Damian K, Lynas RE, Frenguelli BG. Sustained elevation of extracellular adenosine and activation of A1 receptors underlie the post-ischaemic inhibition of neuronal function in rat hippocampus in vitro. *J Neurochem*; 2006.97(5):1357-68.

17. Park SW, Kim JY, Ham A, Brown KM, Kim M, D'Agati VD, et al. A1 adenosine receptor allosteric enhancer PD-81723 protects against renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol-Renal Physiol*; 2012.303(5):F721-F32.

18. Jhaveri KA, Toth LA, Sekino Y, Ramkumar V. Nitric oxide serves as an endogenous regulator of neuronal adenosine A1 receptor expression. *J Neurochem*; 2006.99(1):42-53.

19. Wang YH, Wang WY, Chang CC, Liou KT, Sung YJ, Liao JF, et al. Taxifolin ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats through its anti-oxidative effect and modulation of NF-kappa B activation. *J Biomed Sci*; 2006.13(1):127-41.

20. Malinin NL, Boldin MP, Kovalenko AV, Wallach D. MAP3K-related kinase involved in NF-kB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature*; 1997.385(6616):540.

21. Shen WH, Zhang CY, Zhang GY. Modulation of IkappaB kinase autophosphorylation and activity following brain ischemia. *Acta Pharmacol Sin*; 2003.24(4):311-5.

22. Peng Y, Gallagher SF, Landmann R, Haines K, Murr MM. The role of p65 NF-kB/RelA in pancreatitis-induced kupffer cell apoptosis. *J Gastrointes Surg*; 2006.10(6):837-47.

اکسیدانی در بافت هیپوکامپ مغز در مطالعات آینده پیشنهاد می‌گردد.

تقدیر و تشکر

پژوهش حاضر برگرفته از بخشی از رساله دکتری با گرایش بیوشیمی می‌باشد و بدین وسیله از زحمات اساتید بزرگوار و دوستان عزیز که در اجرای پژوهش همکاری داشتند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Zhou J, Li M, Jin WF, Li XH, Zhang YY. Role of NF- κ B on Neurons after Cerebral Ischemia Reperfusion. *Int J Pharmacol*; 2018.14(4):451-9.

2. He Y, Wan H, Du Y, Bie X, Zhao T, Fu W, et al. Protective effect of Danhong injection on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *J Ethnopharmacol*; 2012.144(2):387-94.

3. Bin J, Wang Q, Zhuo YY, Xu JP, Zhang HT. Piperphenonamine (PPTA) attenuated cerebral ischemia-induced memory deficits via neuroprotection associated with anti-apoptotic activity. *Metabol Brain Dis*; 2012.27(4):495-505.

4. Payabvash S, Souza LC, Wang Y, Schaefer PW, Furie KL, Halpern EF, et al. Regional ischemic vulnerability of the brain to hypoperfusion: the need for location specific computed tomography perfusion thresholds in acute stroke patients. *Stroke*; 2011:STROKEAHA.110.600940.

5. Farhangi D, Sharifi ZN, Movassghi S. Evaluation of neuroprotective effect of propofol on pyramidal neurons in CA1 region of hippocampus among male lab rats following ischemia/transient overall reperfusion. *Med Sci J Islam Azad Uni*; 2016.26(3):149-56.

6. Kovalenko T, Osadchenko I, Nikonenko A, Lushnikova I, Voronin K, Nikonenko I, et al. Ischemia-induced modifications in hippocampal CA1 stratum radiatum excitatory synapses. *Hippocampus*; 2006.16(10):814-25.

7. Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: the evolution of a concept. *Redox Biol*; 2015.6:524-51.

8. Liu H, Zhang X, Du Y, Ji H, Li S, Li L, et al. Leonurine protects brain injury by increased activities of UCP4, SOD, CAT and Bcl-2, decreased levels of MDA and Bax, and ameliorated ultrastructure of mitochondria in experimental stroke. *Brain Res*; 2012.1474:73-81.

9. Crack PJ, Wong CH. Modulation of neuro-inflammation and vascular response by oxidative stress following cerebral ischemia-reperfusion injury.

23. Bohuslav J, Chen LF, Kwon H, Mu Y, Greene WC. p53 induces NF-κB activation by an IκB kinase-independent mechanism involving phosphorylation of p65 by ribosomal S6 kinase 1. *J Biol Chem*; 2004.279(25):26115-25.
24. Takada Y, Mukhopadhyay A, Kundu GC, Mahabeleshwar GH, Singh S, Aggarwal BB. Hydrogen peroxide activates NF-κB through tyrosine phosphorylation of IκBα and serine phosphorylation of p65 evidence for the involvement of IκBα kinase and Syk protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem*; 2003.278(26):24233-41.
25. Qian Y, Guan T, Huang M, Cao L, Li Y, Cheng H, et al. Neuroprotection by the soy isoflavone, genistein, via inhibition of mitochondria-dependent apoptosis pathways and reactive oxygen induced-NF-κB activation in a cerebral ischemia mouse model. *Neurochem Int*; 2012.60(8):759-67.
26. Crack PJ, Taylor JM, Ali U, Mansell A, Hertzog PJ. Potential contribution of NF-κB in neuronal cell death in the glutathione peroxidase-1 knockout mouse in response to ischemia-reperfusion injury. *Stroke*; 2006.37(6):1533-8.
27. Phillips JB, Williams AJ, Adams J, Elliott PJ, Tortella FC. Proteasome inhibitor PS519 reduces infarction and attenuates leukocyte infiltration in a rat model of focal cerebral ischemia. *Stroke*; 2000.31(7):1686-93.
28. Crack PJ, Taylor JM. Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free Rad Biol Med*; 2005.38(11):1433-44.
29. Chen X, Kandasamy K, Srivastava RK. Differential roles of RelA (p65) and c-Rel subunits of nuclear factor κB in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand signaling. *Cancer Res*; 2003.63(5):1059-66.
30. Zhu T, Yao Q, Wang W, Yao H, Chao J. iNOS induces vascular endothelial cell migration and apoptosis via autophagy in ischemia/reperfusion injury. *Cell Physiol Biochem*; 2016.38(4):1575-88.
31. Mirghani SJ PM, Yaghoobpour Yekani O, Zamani M, Feizolahi F, Nikbin S, Derakhshideh A, et al. Role or synergistic interaction of adenosine and vitamin D3 versus high intensity interval training and isocaloric moderate intensity training: An experimental protocol. *JMIR Res Protocols*; 2018:1-21.
32. Chen J, Yang C, Xu X, Yang Y, Xu B. The effect of focal cerebral ischemia-reperfusion injury on TLR4 and NF-κB signaling pathway. *Experim Ther Med*; 2018.15(1):897-903.
33. Liang J, Luan Y, Lu B, Zhang H, Luo YN, Ge P. Protection of ischemic postconditioning against neuronal apoptosis induced by transient focal ischemia is associated with attenuation of NF-κB/p65 activation. *PLoS One*; 2014.9(5):e96734.
34. Chen X, Song M, Zhang B, Zhang Y. Reactive oxygen species regulate T cell immune response in the tumor microenvironment. *Oxid Med Cell Long*; 2016.2016.
35. Beckhauser TF, Francis-Oliveira J, De Pasquale R. Reactive oxygen species: physiological and physiopathological effects on synaptic plasticity: supplementary issue: brain plasticity and repair. *J experimneurosci*; 2016.10:JEN. S39887.
36. Shen WH, Zhang CY, Zhang GY. Antioxidants attenuate reperfusion injury after global brain ischemia through inhibiting nuclear factor-kappa B activity in rats. *Acta Pharmacol Sin*; 2003.24(11):1125-30.
37. Terai K, Matsuo A, McGeer EG, McGeer PL. Enhancement of immunoreactivity for NF-κB in human cerebral infarctions. *Brain Res*; 1996.739(1-2):343-9.
38. Qin WY, Luo Y, Chen L, Tao T, Li Y, Cai YL, et al. Electroacupuncture Could Regulate the NF-B Signaling Pathway to Ameliorate the Inflammatory Injury in Focal Cerebral Ischemia/Reperfusion Model Rats. *Evid-Based Complem Alter Med*; 2013.2013.
39. Sun BZ, Chen L, Wu Q, Wang HL, Wei XB, Xiang YX, et al. Suppression of inflammatory response by flurbiprofen following focal cerebral ischemia involves the NF-κB signaling pathway. *Int J Clin Experim Med*; 2014.7(9):3087.
40. Schneider A, Martin-Villalba A, Weih F, Vogel J, Wirth T, Schwaninger M. NF-κB is activated and promotes cell death in focal cerebral ischemia. *Nature Med*; 1999.5(5):554.
41. Kratsovnik E, Bromberg Y, Sperling O, Zoref-Shani E. Oxidative stress activates transcription factor NF-κB-mediated protective signaling in primary rat neuronal cultures. *J Mol Neurosci*; 2005.26(1):27-32.
42. Fredholm B. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ*; 2007.14(7):1315.
43. Cunha RA. Neuroprotection by adenosine in the brain: from A1 receptor activation to A2A receptor blockade. *Purinerg Signal*; 2005.1(2):111-34.
44. Saransaari P, Oja SS. Mechanisms of adenosine release in the developing and adult mouse hippocampus. *Neurochem Res*; 2002.27(9):911-8.
45. Hu S, Dong H, Zhang H, Wang S, Hou L, Chen S, et al. Noninvasive limb remote ischemic preconditioning contributes neuroprotective effects via activation of adenosine A1 receptor and redox status after transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res*; 2012.1459:81-90.
46. Takeshima E, Tomimori K, Kawakami H, Ishikawa C, Sawada S, Tomita M, et al. NF-κB activation by Helicobacter pylori requires Akt-mediated phosphorylation of p65. *BMC Microbiol*; 2009.9(1):36.
47. Beg AA, Finco TS, Nantermet PV, Baldwin AS. Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I kappa B alpha: a

mechanism for NF-kappa B activation. Mol Cell Biol; 1993.13(6):3301-10.