مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و پنجم/شماره‌ی ۴۳۹/هفته‌ی سوم شهریور ماه ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۲۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۵/۱۳

تأثیر آگونیست گیرنده‌ی آدنوزین و اسید اسکوربیک بر فراساختار نورون‌های ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ به دنبال ایسکمی- ریپرفیوژن

محمد زمانی[۱]، منصوره سلیمانی[۲]، اکرم علیزاده[۳]، مجید کاتبی[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: در طی ایسکمی مغزی، جریان خون و اکسیژن مغز کاهش می‌یابد و بعد از برقراری مجدد جریان خون و بازگشت اکسیژن در سلول‌ها، آسیب‌های شدیدتر ناشی از تولید و تهاجم رادیکال‌های آزاد ایجاد می‌گردد. نظر به این که آسیب هیپوکامپ بعد از ایسکمی- ریپرفیوژن باعث اختلالات زیادی در این عضو می‌شود، در مطالعه‌ی حاضر، تأثیر محافظتی گیرنده‌ی A1 (N6-cyclopentyladenosine یا CPA) و اسید اسکوربیک بر هیپوکامپ، مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: تعداد ۳۵ سر موش سوری نر به صورت تصادفی در ۵ گروه قرار گرفتند. برای القای ایسکمی، شریان‌های کاروتید مشترک حیوان ۱۵ دقیقه بسته شدند. CPA و اسید اسکوربیک روزانه و داخل پریتونئوم، اولی به مدت ۷ روز پس از ایسکمی و دومی از دو هفته قبل تا یک هفته بعد از ایسکمی تزریق شدند. در روز ۲۰ پس از القای ایسکمی، مغز موش‌ها تثبیت، آماده و با میکروسکوپ الکترونی گذاره بررسی شدند.

یافته‌ها: بررسی فراساختار نورون‌های هیپوکامپ حیوانات با میکروسکوپ الکترونی گذاره (Transmission electron microscope یا TEM) و بر اساس معیارهای موجود، حفظ و بهبودی ارگانل‌های درون سلولی به ویژه میتوکندری‌ها را در گروه‌های درمانی پس از آسیب ایسکمی- ریپرفیوژن نشان داد. در گروه درمان ترکیبی، این حفاظت بیشتر دیده شد.

نتیجه‌گیری: تزریق داخل صفاقی CPA و اسید اسکوربیک به دنبال ایسکمی- ریپرفیوژن، موجب کاهش آسیب و تخریب نورون‌های CA1 هیپوکامپ می‌شود.

واژگان کلیدی: ایسکمی، ناحیه‌ی CA1، هیپوکامپ، N6-cyclopentyladenosine، اسید اسکوربیک، فراساختار

ارجاع: زمانی محمد، سلیمانی منصوره، علیزاده اکرم، کاتبی مجید. **تأثیر آگونیست گیرنده‌ی آدنوزین و اسید اسکوربیک بر فراساختار نورون‌های ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ به دنبال ایسکمی- ریپرفیوژن.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۶؛ ۳۵ (۴۳۹): ۸۶۹-۸۶۲

مقدمه

ایسکمی مغزی، به عنوان یک مسأله‌ی جدی در پزشکی، ناشی از کاهش جریان خون و ذخیره‌ی اکسیژن است که باعث مرگ بافت مغزی در اثر تغییر ارتباطات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک ناشی از اختلال جریان خون می‌شود. این تغییرات، شامل کاهش انرژی و آسیب میتوکندری، اسیدوز ناشی از تولید بی‌هوازی لاکتات و تورم آستروسیت‌ها و فشار به عروق مغزی می‌باشند (۱).

بیشتر انرژی نورون‌ها صرف حفظ گرادیان یونی در طول غشای سلولی می‌شود. در دقیقه‌ی اول بعد از توقف جریان خون مغزی، Adenosine triphosphate (ATP) در نورون‌ها ابتدا به وسیله‌ی Adenosine diphosphate (ADP)، فسفات و فسفوکراتین بازسازی می‌شود. بعد از دو دقیقه، انرژی نورون‌ها و فعالیت پمپ سدیم- پتاسیم کاهش و پتاسیم به خارج سلول جریان می‌یابد. آن گاه، یون‌های سدیم و کلراید به داخل سلول جریان می‌یابند و غشای سلول دپولاریزه می‌شود. مقادیر بالای کلسیم داخل سلولی، آنزیم‌های پروتولیتیک را فعال می‌کند که پروتئین‌های سلولی به خصوص پروتئین‌های اسکلت سلولی را تجزیه می‌کنند. تجمع کلسیم، آندونوکلئازهای هسته را فعال می‌کند و موجب شکسته شدن

۱- استادیار، گروه آناتومی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران
۲- دانشیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی و گروه آناتومی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
۳- استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران
۴- دانشیار، گروه آناتومی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندرعباس، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: مجید کاتبی
Email: majidkatebi@gmail.com

کروماتین‌ها و شروع روند آپوپتوز می‌شود. همچنین، آنزیم‌های فسفولیپاز را فعال می‌کند که به فسفولیپیدهای غشای سلولی حمله و موجب انتشار اسید آرشیدونیک می‌شود (۲).

اسید آرشیدونیک، برای پایداری غشای سلولی ضروری است. آزاد شدن آن نقش مهمی در تشدید آسیب‌های ایسکمی- ریپرفیوژن دارد. اسید آرشیدونیک، اثر مستقیم بر میتوکندری دارد و علاوه بر مهار مستقیم آنزیم‌های تنفسی، موجب تشکیل رادیکال‌های آزاد می‌شود. آنزیم بزرگ لاکتات دهیدروژناز (Lactate dehydrogenase یا LDH) از غشای آسیب دیده نشت می‌کند. LDH بافتی یا خونی، القا کننده‌ی مرگ سلولی در طول ایسکمی- ریپرفیوژن است (۳). آسیب ناشی از ریپرفیوژن، به مراتب بیشتر است؛ به این ترتیب که در طول دوره‌ی ایسکمی، تجمع اسید لاکتیک موجب کاهش pH سلولی می‌شود که به دنبال ریپرفیوژن افزایش می‌یابد.

به محض ریپرفیوژن، کلسیم وارد میتوکندری می‌شود، اما منافذ نفوذپذیری گذرا، به خاطر اسیدیته‌ی پایین بسته باقی می‌ماند. افزایش pH در نتیجه‌ی ریپرفیوژن، می‌تواند آن‌ها را باز کند. اگر این منافذ بسته بمانند یا ATP بتواند آن‌ها را ببندد، سلول‌هایی ایجاد می‌شود که با آپوپتوز می‌میرند، اما بدون ATP کافی، باز بودن آن‌ها، موجب نکروز می‌شود. Nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen (NADH) اکسیداز، در ریپرفیوژن با اکسیژن تازه واکنش می‌دهد و سوپر اکسید تولید می‌کند. سوپر اکسید با Proteins iron-sulfur واکنش می‌دهد و موجب کاهش فعالیت آن‌ها می‌شود و باعث تشکیل رادیکال هیدروکسیل می‌شود. سوپر اکسید با نیتریک اکسید واکنش می‌دهد و رادیکال آزاد پروکسی نیتریت تشکیل می‌دهد.

هیپوکامپ، یک ناحیه‌ی کلیدی مغز است که در حافظه و یادگیری نقش دارد و همچنین، نقش مهمی در تشکیل حافظه‌ی جدید و تجزیه و تحلیل اطلاعات فضایی ایفا می‌کند (۴). هیپوکامپ، شامل نواحی CA1، CA2، CA3 و CA4 است. ناحیه‌ی CA1 در مجاورت سوبیکولوم و ناحیه‌ی CA3 در مجاورت فیمبریا، فورنیکس و شبکه‌ی کوروئیدی قرار دارد. همچنین، ناحیه‌ی CA2 بخش کوچکی بین CA1 و CA3 می‌باشد و ناحیه‌ی CA4 نیز در ناف دنتیت گیروس قرار گرفته است. سلول‌های پیرامیدال ساختاری هرمی دارند (۵). بخش عمده‌ی الیاف آوران به هیپوکامپ از لایه‌های ۲ و ۳ قشر انتورینال می‌آید که از طریق الیاف پرفورانت به آن می‌رسد. هیپوکامپ و قشر انتورینال، مرکز اصلی حافظه در مغز هستند (۶). گیرنده‌ی A1 از خانواده‌ی گیرنده‌های پورینرژیک است که توزیع گسترده‌ای در سراسر بدن حیوانات دارد. این گیرنده‌های گلیکوپروتئینی فعالیت‌های مختلفی را بر روی سلول انجام می‌دهند که از آن جمله، می‌توان به فعال کردن آدنوزین سیکلاز، فسفولیپاز C، جابه‌جایی سدیم و کلسیم و نیز اثر بر روی کانال‌های کلسیم، کلر و پتاسیم اشاره کرد.

همچنین، آدنوزین در ارتباط با سایر هورمون‌ها، در مسیرهای تحریکی و یا مهاری شرکت می‌کند و نیز فعالیت گیرنده‌ی A1، باعث کاهش و یا افزایش اتصال سایر گیرنده‌ها به پروتئین G می‌شود. آزادسازی درون سلولی آدنوزین، باعث خاتمه‌ی حملات صرعی می‌شود (۷). N6-cyclopentyladenosine (CPA) به عنوان آگونیست اختصاصی برای گیرنده‌ی A1 در موش عمل می‌کند و اغلب مطالعاتی که با استفاده از ایجاد مدل‌هایی در موش صورت می‌گیرد، با استفاده از این دو ماده انجام می‌شود. از CPA در مطالعات هیپوکامپ استفاده‌ی زیادی شده و بهترین آگونیست معرفی شده برای گیرنده‌ی آدنوزین نوع ۱ است (۸).

افزایش میزان نوکلئوتید آدنوزین خارج سلولی بعد از ایسکمی، موضوع مطالعاتی شد که افزایش بیان ژن گیرنده‌ی A1 در حین ایسکمی و کاهش بیان آن ژن در طی ریپرفیوژن را نشان دادند. نقش مهاری گیرنده‌های A1 فعال شده بر روی التهاب و نکروز و آپوپتوز سلول‌های ایسکمیک در کلیه مطالعه شده است. این مطالعات، نقش این گیرنده‌ها بر روی تولید رادیکال‌های آزاد از روی لیپوساکاریدهای تحریک شده‌ی غشای سلولی را نشان دادند (۹).

تأثیر محافظتی ناشی از فعال‌سازی گیرنده‌ی آدنوزین در بیماری‌های مخرب مغزی مانند الزایمر و پارکینسون به اثبات رسیده است. همچنین، گفته شده است که ایسکمی گلوبال مغزی، سبب مرگ نورون های پیرامیدال CA1 هیپوکامپ و کاهش قدرت یادگیری و حافظه فضایی در موش می شود. محققین نشان دادند که مدل ایسکمی گلوبال مغزی، موجب نورودژنراسیون وسیع در ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ، استریاتوم و نئوکورتکس می‌شود (۱۰).

مطالعات کاهش آپوپتوز سلولی بعد از ایسکمی ریپرفیوژن در ناحیه‌ی هیپوکامپ به دنبال بیان ژن گیرنده‌ی A1، کاهش فعالیت کاسپاز ۳ و نیز کاهش میزان پروتئین Bax و افزایش میزان پروتئین Bcl2 در هنگام فعال شدن این گیرنده را به اثبات رساند.

همچنین، آگونیست گیرنده‌ی آدنوزین، می‌تواند مانع مرگ نورون‌های منطقه‌ی ایسکمیک قشر مغز گردد و اثر پیش‌گیرانه‌ای در برابر ایسکمی مغزی از خود نشان می‌دهد (۱۱). فیزیولوژی گیرنده‌های A1 به طور وسیعی در مغز بررسی شده و مکانیسم‌های مربوط به فعالیت این دو گیرنده و آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌های مختلف آن‌ها مورد آزمایش قرار گرفته است و در نهایت، بر نقش حفاظتی آن‌ها در آسیب‌ها و استرس‌های اکسیداتیو به خصوص ایسکمی تأکید شده است (۱۲). نقش سمیت‌زدایی ویتامین C در ارتباط با رادیکال‌های آزاد، از مدت‌ها قبل مورد توجه بوده است.

اولین مطالعات نشان داد که این ماده، آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد را تعدیل می‌کند و به حداقل می‌رساند. نقش آنتی‌اکسیدان‌ها به خصوص ویتامین C در حذف رادیکال‌های آزاد در سیستم عصبی رت‌های مبتلا به دیابت نیز به اثبات رسیده است. نشان داده شده است که ویتامین C در هنگام التهاب مغزی، به کندی قابل عبور از سد خونی- مغزی است (۱۴-۱۳). بیوسنتز اسید اسکوربیک یا ویتامین C از گلوکز و گالاکتوز و یا مشتقات آن‌ها صورت می‌گیرد. این ویتامین در بدن انسان، به دلیل فقدان آنزیم L– گلونولاکتون اکسیداز، ساخته نمی‌شود (۱۵). بدن انسان، روزانه به ۷۵ میلی‌گرم ویتامین C نیاز دارد. افزایش آن بیش از این مقدار، باعث دفع از طریق ادرار می‌شود. رژیم غذایی مناسب، می‌تواند ذخیره‌ی مناسبی از آن را برای شرایط بحرانی در کبد فراهم آورد (۱۶).

با توجه به اهمیت صدمات نورون‌های هیپوکامپ پس از ایسکمی- ریپرفیوژن، در این مطالعه به بررسی اثر تجویز هم‌زمان آگونیست گیرنده‌ی A1 و اسید اسکوربیک بر فراساختار نورون‌های آن پرداخته شده است.

روش‌ها

مدل بیولوژیک: ۳۵ سر موش سوری نر نژاد Bulb-c با وزن ۴۵-۳۵ گرم تحت شرایط استاندارد با دوره‌ی روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته و دمای ۳ ± ۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد با دسترسی کامل به آب آشامیدنی و غذای کافی مورد مطالعه قرار گرفتند.

گروه‌بندی حیوانات: حیوانات از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی ایران تهیه و به صورت تصادفی در ۵ گروه قرار گرفتند.

گروه شاهد: ۷ سر موش

گروه ایسکمی: ۷ سر موش که تحت القای ایسکمی قرار گرفتند.

گروه Experimental: ۲۱ موش که به طور تصادفی در ۳ زیر گروه قرار می‌گیرد:

A: گروه Pre treatment که از دو هفته قبل تا یک هفته بعد از ایسکمی به میزان ۱۰۰ میلی گرم/کیلوگرم به صورت روزانه اسید اسکوربیک دریافت کردند (n = ۷)

B: گروه Post treatment که ۱ میلی‌گرم/کیلوگرم آگونیست گیرنده‌ی A1 را از روز هفتم بعد از ایسکمی به مدت ۷ روز دریافت کردند (n = ۷).

C: گروه Pre & post treatment که علاوه بر اسید اسکوربیک قبل و بعد از ایسکمی، آگونیست گیرنده‌ی A1 را هم بعد از ایسکمی دریافت کردند (n = ۷).

ایجاد مدل ایسکمی: با استفاده از کتامین (Ketamine) ۱۰۰ میلی‌گرم و گزیلازین (Xylazine) ۱۰ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم وزن، حیوانات بیهوش و روی میز ثابت شدند. تحت شرایط استریل، قسمت قدامی گردن تراشیده و برشی ۱/۵ سانتی‌متری داده شد، شریان کاروتید مشترک دو طرف با کلمپ‌های شریانی برای ۱۵ دقیقه بسته شدند. سپس، جریان خون برقرار شد. دمای بدن حیوان بین ۲۴-۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد حفظ شد (۱۷).

تثبیت (Fixation) به روش پرفیوژن: حیوان با دز بالای کتامین (۱۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرک) و گزیلازین (۱۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) به طور عمیق بیهوش شد. با برش میانی جدار قدامی شکم، دیافراگم و کناره‌ی خارجی دنده‌ها، قلب دارای ضربان نمایان شد. کاتتر مخصوص پرفیوژن وارد بطن چپ گردید و پس از آن، برشی در دهلیز راست برای خروج خون ایجاد شد. آئورت نزولی با پنس کلامپ شد. ابتدا، ۷۵-۵۰ سی‌سی نرمال‌سالین برای خارج کردن خون در مدت ۱۰-۵ دقیقه و سپس، ۱۰۰-۷۵ سی‌سی پارافرمالدئید ۴ درصد در محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH = ۷/۴، در مدت ۱۵-۱۰ دقیقه از رگ‌ها عبور داده شد. پس از پایان پرفیوژن، مغز با دقت خارج و در محلول Karnovsky's (ترکیب پارافرمالدئید و گلوتارالدئید) قرار داده شد.

میکروسکوپ الکترونی (مطالعه‌ی فراساختاری): پس از پرفیوژن، هیپوکامپ برای مطالعات فراساختاری جدا شد و به محلول Karnovsky's منتقل گردید و ۲ ساعت در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس، مراحل طبق جدول ۱ انجام شد.

سپس، نمونه‌ها قالب‌گیری و برای پلیمریزه شدن رزین به مدت ۲۴ ساعت در Oven ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تهیه‌ی برش‌های نیمه نازک (Semi thin): با استفاده از اولترا میکروتوم (Leica. Ultracut)، برش‌های ۵۰۰ نانومتری تهیه گردید. برش‌ها روی لام تمیز منتقل و خشک شدند. سپس، توسط چند قطره رنگ تولوئیدین بلو ۱ درصد به مدت ۵ دقیقه رنگ شدند. بعد از شستشو با آب مقطر و خشک شدن، لامل چسبانده و با میکروسکوپ نوری مطالعه شد تا محل مناسب برای برش‌های فوق نازک مشخص گردد.

تهیه‌ی برش‌های فوق نازک (Ultrathin): بعد از تعیین محل مناسب برش‌ها، توسط اولترا میکروتوم، برش‌های ۷۰-۵۰ نانومتری تهیه گردید. برش‌ها به گریدهای ۲۰۰ مش منتقل و پس از خشک شدن به صورت زیر رنگ‌آمیزی شدند:

- رنگ‌آمیزی با اورانیل استات اشباع شده در اتانول ۵۰ درجه به مدت ۱۵ دقیقه
- سه بار شستشو در آب مقطر

جدول ۱. مراحل تهیه‌ی بلوک برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی

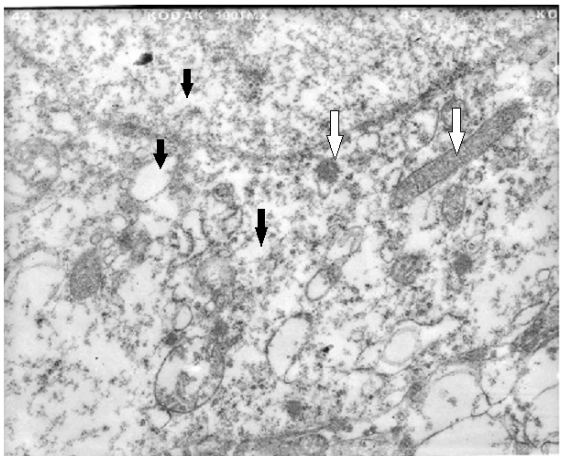
ترتیب انجام کار	نام مرحله	مدت زمان	تعداد تکرار
۱	شستشو با بافر فسفات سالین ۰/۱ مولار	۱۵ دقیقه	۲ بار
۲	تتراکسید اسمیوم ۱٪	۱/۵ ساعت	۱ بار
۳	شستشو با بافر فسفات سالین ۰/۱ مولار	۱۵ دقیقه	۲ بار
۴	آب‌گیری با استون ۵۰٪	۱۵ دقیقه	۱ بار
۵	آب‌گیری با استون ۷۰٪	۱۵ دقیقه	۱ بار
۶	آب‌گیری با استون ۹۰٪	۱۵ دقیقه	۱ بار
۷	آب‌گیری با استون ۱۰۰٪	۳۰ دقیقه	۲ بار
۸	ترکیب استون ۱- رزین ۱	۱ ساعت	۱ بار
۹	ترکیب استون ۱- رزین ۲	۲ساعت	۱ بار
۱۰	ترکیب استون ۱- رزین ۲	تمام شب	۱ بار
۱۱	رزین کامل	۲ ساعت	۱ بار
۱۲	رزین کامل	۴ ساعت	۱ بار

- خشک شدن در هوای اتاق
- رنگ‌آمیزی با سیترات سرب به مدت ۲۰ دقیقه
- سه بار شستشو در آب مقطر
- خشک شدن در هوای اتاق

مطالعه با میکروسکوپ الکترونی گذاره (Transmission electron microscope یا TEM): گریدهای تهیه شده توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره (Ziess ,EM 900) دانشگاه علوم پزشکی ایران مطالعه گردید.

یافته‌ها

مطالعات نشان داده‌اند که یکپارچگی و نظم غشای هسته و تراکم ارگانل‌های اطراف آن و نیز توزیع کروماتین در هنگام بروز ایسکمی، با حالت طبیعی متفاوت است. در ایسکمی، غشای هسته ملتهب می‌شود و توزیع کروماتین به هم می‌ریزد و ارگانل‌ها از اطراف هسته دور می‌شوند و به ویژه میتوکندری آسیب می‌بیند (شکل ۱). در مطالعه‌ی حاضر، به ویژه تغییرات میتوکندری بر اساس معیارهای مورد استفاده در سایر تحقیقات (۱۸)، بررسی و نتایج ارایه شده‌اند (جدول ۲).



شکل ۱. فتوگراف از فراساختار سلولی نورون ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ گروه ایسکمی (x ۵۲۱۳). هسته در بالا و سایر اندامک‌ها در پایین دیده می‌شود. واکوئلیزاسیون در هسته و سیتوپلاسم (پیکان تیره) و تخریب شدید میتوکندری‌ها (پیکان سفید) دیده می‌شود.

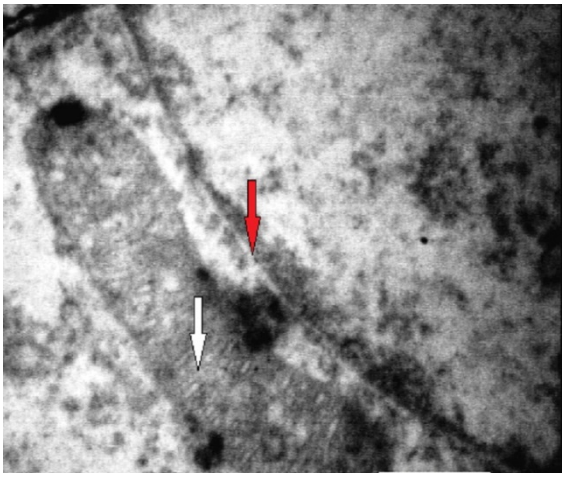
جدول ۲. تغییرات فراساختار میتوکندری‌ها به دنبال ایسکمی- ریپرفیوژن و درمان با ویتامین C و N6-cyclopentyladenosine (CPA)

گروه‌ها	نظم کریستاها	فضای بین کریستاها	تراکم ماتریکس
شاهد	طبیعی	طبیعی	طبیعی
ایسکمی	پارگی + + +	اتساع + + +	فقدان + + +
درمان با ویتامین C	پارگی + +	اتساع +	فقدان ++
درمان با CPA	پارگی ++	اتساع +	فقدان +
درمان با ویتامین C و CPA	پارگی +	اتساع -	فقدان +

خفیف: +، متوسط: ++، شدید: +++

CPA: N6-cyclopentyladenosine

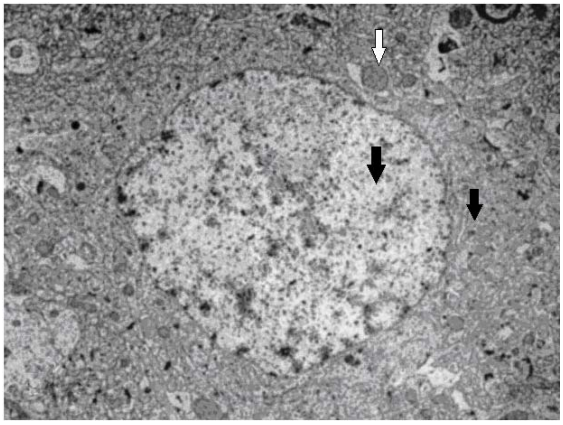
نتایج بررسی و مقایسه‌ی فراساختار نورون‌های هیپوکامپ در گروه شاهد و گروه ایسکمی- ریپرفیوژن نشان می‌دهد که به دنبال این رویداد، تغییرات نکروتیک و آپوپتوتیک در هسته و سیتوپلاسم (میتوکندری) رخ می‌دهد (شکل ۱). این بررسی، نشان می‌دهد که در گروه درمان با ویتامین C، پارگی کریستاهای میتوکندری کمتر بود و فضای بین کریستاها اتساع کمتری را نشان می‌داد. در گروه درمانی با CPA، هم اتساع بین کریستاهای میتوکندری کمتر بود و هم تراکم ماتریکس طبیعی‌تر بود. در گروه ترکیبی (شکل ۲)، نظم کریستاها و فضای بین کریستاها و ماتریکس به گروه شاهد نزدیک‌تر دیده شد (شکل ۳).



شکل ۲. فتوگراف از فراساختار سلولی نورون ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ گروه درمان ترکیبی (x ۱۲۹۳۰). هسته در بالا و میتوکندری در پایین قرار دارد. غشای هسته یکپارچگی دارد و التهابی دیده نمی‌شود. میتوکندری با کریستاهای منظم دیده می‌شود که نشان دهنده‌ی به حداقل رسیدن تأثیر ایسکمی بر روی این ساختارها با مصرف همزمان ویتامین C و N6-cyclopentyladenosine (CPA) است (پیکان قرمز غشای هسته و پیکان سفید کریستاهای میتوکندری را نشان می‌دهند).

بحث

هیپوکامپ، یک ناحیه‌ی کلیدی در مغز است و آسیب آن پس از ایسکمی- ریپرفیوژن اختلال زیادی در عملکرد آن ایجاد می‌کند. بررسی و تحقیق در مورد چگونگی محافظت و کاهش دادن صدمه به هیپوکامپ پس از ایسکمی- ریپرفیوژن اهمیت زیادی دارد. در این مطالعه، از میان مدل‌های حیوانی موجود برای مطالعه‌ی ایسکمی- ریپرفیوژن، مدل انسداد شریان‌های کاروتید مشترک استفاده شد. بستن هر دو کاروتید مشترک (Contralateral carotid artery occlusion یا CCO) به مدت ۱۵ دقیقه، موجب آسیب سلولی گسترده در ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ می‌شود.



شکل ۳. فتوگراف از فراساختار سلولی نورون ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ گروه شاهد (x ۵۰۰۰). هسته در مرکز و سایر ارگانل‌ها در اطراف آن قرار دارند. غشای هسته و توزیع ارگانل‌های سلولی حالت طبیعی دارند و واکوئلیزاسیونی در هسته و سیتوپلاسم دیده نمی‌شود و توزیع کروماتین در هسته طبیعی است (پیکان تیره). میتوکندری‌ها طبیعی و سالم هستند (پیکان سفید).

اثبات شده است که میتوکندری‌ها، از حساس‌ترین ارگانل‌های سلول هستند که در آسیب‌های سلولی نظیر ایسکمی، نظم کریستاهای آن‌ها از بین می‌رود و تخریب می‌شوند (۱۹). بنابراین، در مطالعه‌ی حاضر، بررسی دقیق میتوکندری‌ها در کنار وضعیت هسته صورت گرفت.

در این مطالعه، با تزریق اسکوربیک اسید قبل از القای ایسکمی، نقش پیش‌گیرانه‌ی آن در ایجاد تغییرات ناشی از ایسکمی بررسی شده است. در مطالعه‌ای نقش این ویتامین در حفاظت از نورون‌های هیپوکامپ موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت در هنگام ایسکمی به اثبات رسید. دانشمندان، مکانیسم غالب در مورد این عملکرد را به خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن نسبت می‌دهند (۲۰). در مطالعه‌ای، این ویتامین از کاهش تعداد نورون‌های هیپوکامپ به دنبال ایسکمی جلوگیری کرد (۲۱). حفظ یکپارچگی غشای سلولی و ممانعت از آسیب به هسته و سایر ارگانل‌های حساس سلولی، به خصوص میتوکندری‌ها را از اثرات آنتی‌اکسیدانی این ویتامین بر شمرده‌اند (۲۲).

در یک تحقیق دیگر، نقش CPA در حفاظت از نورون‌های مغز موش‌های صحرایی تازه متولد شده به اثبات رسید و بیان شد که این ماده، مانع فعال شدن کاسپاز ۳ و نیز مانع آزاد شدن سیتوکروم C از میتوکندری‌ها می‌شود و فرصت ترمیم سلولی را افزایش می‌دهد (۲۳). در مطالعات گذشته، اثر این ماده در جلوگیری از مرگ سلول‌ها در حالت هیپوکسی در قشر مغز نیز به اثبات رسیده بود (۲۴) و نیز بیان شده بود که CPA دارای نقش آنتی‌اکسیدانی خفیفی نیز هست (۲۵).

در مجموع، مکانیسم‌های احتمالی نقش این گیرنده را در غیر

فعال کردن کاسپاز ۳ و ممانعت از ورود سیتوکروم C از فضای بین دو غشای میتوکندری به درون سیتوپلاسم و جلوگیری از شروع واکنش آبشاری کاسپازها هم از مسیر برون سلولی با استفاده از گیرنده‌های مرگ و هم از طرق مسیر درون سلولی وابسته به سیتوکروم C و میتوکندری می‌دانند (۲۶).

در این مطالعه، به بررسی تأثیر استفاده‌ی همزمان از هر دو عامل بر فراساختار نورون‌های هیپوکامپ پرداخته شد. با توجه به نتایج به دست آمده، انتظار می‌رفت آسیب نورونی به دنبال ایسکمی در گروه درمان ترکیبی با CPA و ویتامین C کاهش قابل توجهی داشته باشد که با نتایج به دست آمده، هم‌خوانی داشت. با توجه به مطالعات انجام گرفته در مورد مکانیسم‌های این مواد و با توجه به یافته‌های این مطالعه، به نظر می‌رسد که تجمیع خواص آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌آپوپتوتیکی که درباره‌ی این دو ماده به اثبات رسیده است، در هنگام بروز ایسکمی می‌تواند از آسیب دیدگی نورون‌های زیادی جلوگیری کند و به دنبال آن، مانع از مرگ نورون‌های آسیب دیده شود. هر دوی این مکانیسم‌ها، در واقع با حفظ فراساختار سلول‌های ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ، می‌تواند باعث حفظ نورون‌های زیادی از مرگ و حفظ عملکرد این ناحیه از مغز می‌شود.

نتیجه‌گیری نهایی این که استفاده‌ی هم‌زمان از آگونیست گیرنده‌ی A1 و اسکوربیک اسید، می‌تواند باعث کاهش آسیب و تغییرات فراساختاری در نورون‌ها به ویژه میتوکندری آن‌ها در هنگام ایسکمی در ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ شود..

تشکر و قدردانی

این مطالعه، با حمایت مالی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران و در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی آن دانشگاه انجام شده است. بدین وسیله، از همکاری صمیمانه‌ی همه‌ی همکاران آن مراکز تقدیر و تشکر می‌شود.

References

1. Lee JM, Grabb MC, Zipfel GJ, Choi DW. Brain tissue responses to ischemia. J Clin Invest 2000; 106(6): 723-31.
2. Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH. A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide. Ann Neurol 1992; 32(3): 297-311.
3. Camarata PJ, Heros RC, Latchaw RE. "Brain attack": the rationale for treating stroke as a medical emergency. Neurosurgery 1994; 34(1): 144-57.
4. Eichenbaum H. Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. Neuron 2004; 44(1): 109-20.
5. Buttner-Ennever J. The rat brain in stereotaxic coordinates. J Anat 1997; 191(Pt 2): 315–7.
6. Taupin P. The hippocampus: Neurotransmission and plasticity in the nervous System. New York, NY: Nova Biomedical Books; 2008.
7. Vollert C, Forkuo GS, Bond RA, Eriksen JL. Chronic treatment with DCPCX, an adenosine A(1) antagonist, worsens long-term memory. Neurosci Lett 2013; 548: 296-300.
8. Johansson B, Halldner L, Dunwiddie TV, Masino SA, Poelchen W, Gimenez-Llort L, et al. Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98(16): 9407-12.
9. Modlinger PS, Welch WJ. Adenosine A1 receptor antagonists and the kidney. Curr Opin Nephrol Hypertens 2003; 12(5): 497-502.
10. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Ischemia/Reperfusion. Compr Physiol 2016; 7(1): 113-70.
11. Sai K, Yang D, Yamamoto H, Fujikawa H, Yamamoto S, Nagata T, et al. A(1) adenosine receptor signal and AMPK involving caspase-9/-3 activation are responsible for adenosine-induced RCR-1 astrocytoma cell death. Neurotoxicology 2006; 27(4): 458-67.
12. Zamani M, Soleimani M, Golab F, Mohamadzadeh F, Mehdizadeh M, Katebi M. NeuroProtective effects of adenosine receptor agonist coadministration with ascorbic acid on CA1 hippocampus in a mouse model of ischemia reperfusion injury. Metab Brain Dis 2013; 28(3): 367-74.
13. Wilson MK, Baguley BC, Wall C, Jameson MB, Findlay MP. Review of high-dose intravenous vitamin C as an anticancer agent. Asia Pac J Clin Oncol 2014; 10(1): 22-37.
14. Hossein Hassanshahi G, Hassanshahi J, Zamani M, Hakimizadeh E, Soleimani M. Comparison of therapeutic effects of vitamin c and coq10 in reducing of damaged cells in mice hippocampus following ischemia-reperfusion. J Mazandaran Univ Med Sci. 2012; 22 (94): 2-13. [In Persian].
15. Melani A, Pugliese AM, Pedata F. Adenosine receptors in cerebral ischemia. Int Rev Neurobiol 2014; 119: 309-48.
16. Shugalei I. Features of vitamin C metabolism and the functional status of the liver in alcoholism and alcoholic delirium in the stage of detoxification therapy. Zh Nevropatol Psikhiatr Im S S Korsakova 1987; 87(2): 240-3. [In Russian].
17. Stafford A. Potentiation of adenosine and the adenine nucleotides by dipyridamole. Br J Pharmacol Chemother 1966; 28(2): 218-27.
18. Zarch AV, Toroudi HP, Soleimani M, Bakhtiarian A, Katebi M, Djahanguiri B. Neuroprotective effects of diazoxide and its antagonism by glibenclamide in pyramidal neurons of rat hippocampus subjected to ischemia-reperfusion-induced injury. Int J Neurosci 2009; 119(9): 1346-61.

19. Schmidt W, Reymann KG. Proliferating cells differentiate into neurons in the hippocampal CA1 region of gerbils after global cerebral ischemia. Neurosci Lett 2002; 334(3): 153-6.
20. Niwano Y, Saito K, Yoshizaki F, Kohno M, Ozawa T. Extensive screening for herbal extracts with potent antioxidant properties. J Clin Biochem Nutr 2011; 48(1): 78-84.
21. Miura S, Ishida-Nakajima W, Ishida A, Kawamura M, Ohmura A, Oguma R, et al. Ascorbic acid protects the newborn rat brain from hypoxic-ischemia. Brain Dev 2009; 31(4): 307-17.
22. Frei B, England L, Ames BN. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86(16): 6377-81.
23. Cotter MA, Love A, Watt MJ, Cameron NE, Dines KC. Effects of natural free radical scavengers on peripheral nerve and neurovascular function in diabetic rats. Diabetologia 1995; 38(11): 1285-94.
24. O'Neill MJ, Hicks CA, Ward MA, Osborne DJ, Wishart G, Mathews KS, et al. LY393615, a novel neuronal Ca(2+) and Na(+) channel blocker with neuroprotective effects in models of in vitro and in vivo cerebral ischemia. Brain Res 2001; 888(1): 138-49.
25. Joshi VK, Sharma SK. Comparative fermentation behaviour, physico-chemical and sensory characteristics of plum wine as effected by type of preservative. Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel 1995; 17(3-4): 65-73.
26. Zamani M, Katebi M, Mehdizadeh M, Kafami L, Soleimani M. Combination therapy with A1 receptor agonist and vitamin C improved working memory in a mouse model of global ischemia-reperfusion. Basic Clin Neurosci 2013; 4(2): 111-6.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 16.05.2017
Vol. 35, No. 439, 3rd Week, September 2017
Accepted: 04.08.2017

Effect of Adenosine Receptor Agonist and Ascorbic Acid on Ultrastructure of Hippocampal CA1 Neurons after Ischemia-Reperfusion Injury

Mohammad Zamani[1], Mansoureh Soleimani[2], Akram Alizadeh[3], Majid Katebi[4]

Original Article

Abstract

Background: In brain ischemia, blood and oxygen supply decrease and after reperfusion, free radicals and reactive oxygen species (ROS) cause severe damage. As hippocampal injury after ischemia-reperfusion causes some complications, in this study we analyzed the effect of adenosine receptor agonist (N6-cyclopentyladenosine or CPA) and ascorbic acid on ultrastructure of hippocampal CA1 neurons after ischemia-reperfusion.

Methods: 35 male rats in 5 groups were used. Ischemia-reperfusion performed by occlusion of common carotids for 15 minutes. CPA and ascorbic acids were intraperitoneally injected for 7 days after ischemia, and 2 weeks before and for 7 days after ischemia, respectively. After 20 days, brain samples were isolated, prepared, and assayed using transmission electron microscopy (TEM).

Findings: Ultrastructure assay of hippocampal CA1 neurons after ischemia-reperfusion with transmission electron microscopy showed recovery of intracellular organelles particularly mitochondria of treated groups. In combination therapy, these improvements were better.

Conclusion: Intraperitoneal injection of CPA and ascorbic acid after ischemia-reperfusion can reduce neural damage in CA1 region of hippocampus.

Keywords: Ischemia, CA1 region, Hippocampal, N6-cyclopentyladenosine, Ascorbic acid, Ultrastructure

Citation: Zamani M, Soleimani M, Alizadeh A, Katebi M. **Effect of Adenosine Receptor Agonist and Ascorbic Acid on Ultrastructure of Hyppocampal CA1 Neurons after Ischemia-Reperfusion Injury.** J Isfahan Med Sch 2017; 35(439): 862-9.

1- Assistant Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran
2- Associate Professor, Cellular and Molecular Research Center AND Department of Anatomy, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
4- Associate Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran
Corresponding Author: Majid Katebi, Email: majidkatebi@gmail.com