تأثیر تجویز مناکوئینون-4 بر بیان ژن‌های عوامل پیش‌برنده التهاب به دنبال ایسکمی/ ریپرفیوژن مغزی سرتاسری گذرا در هیپوکامپ موش صحرایی نر نژاد ویستار

بهرام فرهادی مقدم[1]، مسعود فریدونی[2*]

1. دانشجوی دکتری فیزیولوژی جانوری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
2. استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: 1398/08/17
تاریخ پذیرش: 1398/09/17

چکیده

زمینه و هدف: مطالعات فراوانی نشـان داده است که فرایندهای التهابی ناشی از ایسکمی/ ریپرفیوژن مغزی، منجر به ایجاد آسـیب‌های مغزی و اختلالات شـناختی می‌گردد. از سوی دیگر، مناکوئینون-4 (MK-4)، یکی از مهم‌ترین انواع ویتامین کا (K2)، دارای تأثیرات ضـدالتهابی اسـت؛ لذا در این مطالعه، تأثیرات تجویز MK-4 بر میزان بیان ژن‌های عوامل پیش‌برنده التهاب به دنبال ایسـکمی/ ریپرفیوژن مغزی سـرتاسری در هیپوکامپ موش‌های صحرایی نر بررسی گردید.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، 20 موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با وزن تقریبی 300 تا 250 گرم به‌طور تصادفی، انتخاب و در ۵ گروه آزمایشی بررسی شدند: گروه کنترل (سالم)، شم (جراحی، بدون بستن شریان‌های کاروتید)، ایسکمی/ ریپرفیوژن، ایسکمی/ ریپرفیوژن + تزریق درون‌صفاقی DMSO به‌عنوان حلال MK-4، درمان (ایسکمی/ ریپرفیوژن + تزریق درون‌صفاقی MK-4). به‌منظور ایجاد مدل ایسکمی هر دو شریان کاروتید مشترک به مدت 20 دقیقه مسدود شدند. در گروه درمانی، تجویز درون‌صفاقی MK-4 (200mg/kg) ۲۰ دقیقه پس از ایسکمی (بلافاصله و 2 ساعت پس از ریپرفیوژن) انجام شد. 24 ساعت پس از ریپرفیوژن، میزان mRNA ژن‌های TNF-α، IL-1β و IL-6 بررسی گردید.

یافته‌ها: تجویز درون‌صفاقی MK-4 به‌طور معنی‌داری میزان بیان mRNA ژن‌های عوامل پیش‌برنده التهابی شامل TNF-α (P<0.05)، IL-1β و IL-6 (P<0.001) به دنبال ایسکمی/ ریپرفیوژن را کاهش داد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که تجویز MK-4 پس از القای ایسکمی/ ریپرفیوژن مغزی توانسته است موجب کاهش بیان عوامل پیش‌برنده التهاب در هیپوکامپ شود و احتمالاً از این طریق منجر به بروز اثرات حفاظت نورونی می‌شود.

کلیدواژه‌ها:
مناکوئینون-4، ایسکمی مغزی گذرا، عامل نکروز توموری آلفا، اینترلوکین 6، اینترلوکین ۱ بتا

1. مقدمه

استروک[1] یا سکته مغزی، زمانی رخ می‌دهد که جریان خون به مغز مختل یا دچار کاهش شـود (1). ایسـکمی یا انسداد عروق خونی تغذیه‌کننده مغز، متداول‌ترین وجه سـکته مغزی (2) و دومین عـامـل بروز مرگ‌ومیر بـه‌شـمار می‌آید (3). مطالعات فراوانی نشان داده‌اند که به دنبال ایست قلبی[2]، اختلالات مغزی ناشـی از آسـیب ایسـکمی/ ریپرفیوژن (بازگشت مجدد جریان خون به ناحیه آسـیب‌دیده) سـرتاسری مغز اتفاق می‌افتد (4). به‌علاوه حتی دوره‌های کوتاه‌مدت ایسکمی (کمتر از 10 دقیقه)

1 Stroke
2 Cardiac arrest

* نویسندهٔ مسئول: مسعود فریدونی
نشانی: مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی
تلفن: 09155242015 نمابر: 051-38762227
رایانامه: fereidoni@um.ac.ir
شناسه ORCID: 0000-0001-5250-898X
شناسه ORCID نویسنده اول: 0000-0001-7357-1929

مجلهٔ علمی ـ پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دورهٔ 28، شمارهٔ 1، فروردین و اردیبهشت 1400، ص 115-122
آدرس سایت: http://jsums.medsab.ac.ir رایانامه: journal@medsab.ac.ir
شاپای چاپی: 1606-7487

نیز می‌تواند منجر به آسیب‌های مغزی پایداری به‌ویژه در ناحیه حساس هیپوکامپ مغز گردد (5). در این بین، برقراری مجدد جریان خون یا ریپرفیوژن، سبب بروز بسیاری از اثرات مخرب می‌گردد (6)؛ به‌طوری که امروزه بسیاری از تحقیقات، به بررسی ریپرفیوژن (7) و حفاظت نورونی به دنبال برقراری مجدد جریان خون پس از ایسکمی پرداخته‌اند (3). ولیکن تاکنون اقدامات بالینی صورت‌گرفته به‌منظور تعدیل دارویی سازوکار(ها)ی آسیب ایسکمی، چندان موفقیت‌آمیز نبوده‌اند (8).

یکی از مهم‌ترین عواقب ریپرفیوژن، بروز فرایندهای التهابی در مغز می‌باشد (9) که به‌واسطه افزایش بیان ژن‌های عوامل التهابی نظیر عامل نکروز تومور آلفا (TNF-α)، اینترلوکین-1بتا (IL-1β) و اینترلوکین 6 (IL-6) رخ می‌دهد و با فعال کردن میکروگلیا و آستروسیت‌ها در مغز موجب آسیب به سد خونی مغزی، تجمع گلبول‌های سفید، افزایش تولید دیگر میانجی‌های التهابی در مغز، ادم مغزی و سرانجام مرگ با تأخیر نورون‌ها (آپوپتوز) می‌گردد (10-12). افزایش سطح این عوامل پیش‌برنده التهاب به دنبال ایسکمی، موجب افزایش حجم ضایعه و تشدید اختلالات نورولوژیکی در نواحی مختلف مغز می‌گردد. در این بین TNF-α و IL-1β به‌عنوان مهم‌ترین عوامل التهابی در مغز، آسیب‌های سلولی را آغاز و پاسخ‌های التهابی ثانویه‌ای را القا می‌کنند که طولانی‌تر و گاهی مزمن هستند (13). همچنین میکروگلیاها و آستروسیت‌های فعال می‌شوند به دنبال ایسکمی مغزی با تولید کموکاین ها و سیتوکاین‌های پیش‌برنده التهابی، نقش مهمی را در ایجاد التهاب ایفا می‌کنند (14, 15) که در نهایت با افزایش نفوذپذیری عروق و برهم‌کنش میان لکوسیت‌ها و اندوتلیوم عروق منتج به ادم مغزی می‌گردد (16-18). بنابراین تعدیل تولید عوامل پیش‌برنده التهاب، یکی از راهکارهای درمانی آسیب‌های ناشی از ایسکمی می‌باشد (19). مناکوئینون-4[1] یکی از مهم‌ترین انواع ویتامین K2 می‌باشد که در بافت‌های مختلف بدن وجود دارد (20). این ویتامین با خاصیت چربی‌دوستی، به‌راحتی قادر است از سد خونی- مغزی عبور کند (21). تحقیقات گوناگون نشان‌دهنده تأثیرات ضد دردی و ضدالتهابی این ویتامین در مدل‌های حیوانی درد و التهاب می‌باشد (22-25). بروز التهاب حاصل از افزایش سطح عوامل التهابی، یکی از مهم‌ترین نتایج بروز آسیب ایسکمی/ریپرفیوژن مغزی و همچنین عامل تأثیرگذاری در گسترش اختلالات ایسکمی است (26-28). تحقیقات نشان داده است که در این بین داروها یا روش‌های درمانی می‌توانند از اهمیت بالایی برخوردار باشند که بتوانند عوامل آسیب‌های ایسکمی/ ریپرفیوژن را با عوارض جانبی کمتر برای کاهش آسیب تحت تأثیر قرار دهند؛ لذا هدف این تحقیق، بررسی تأثیر تجویز MK-4 بر میزان بیان mRNA ژن‌های پیش‌برنده التهاب عصبی به‌عنوان عامل مهمی در بروز آسیب‌های ایسکمی/ ریپرفیوژن در ناحیه هیپوکامپ موش صحرایی نر می‌باشد.

2. مواد و روشها

1.2. حیوانات

در این مطالعه تجربی، 20 سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با وزن تقریبی 250 تا 300 گرم و محدوده سنی 3-2 ماهگی به‌کار گرفته شدند. حیوانات مورداستفاده در این پژوهش، در حیوان‌خانه دانشکده علوم پایه دانشگاه فردوسی مشهد و در شرایط استاندارد آزمایشگاهی و در قفس‌های پی.وی.سی نگهداری شدند. تغذیه جانوران با دسترسی آزادانه به غذای فشرده استاندارد (شرکت به‌پرور تهران) و آب لوله‌کشی شهری انجام گرفت. شایان ذکر است که دسترسی حیوانات به آب و غذا از 24 ساعت پیش از عمل جراحی، محدود گردید سپس حیوانات مذکور به‌طور تصادفی در 5 گروه 5 تایی به شرح مقابل قرار گرفتند: گروه کنترل (سالم)، شم (جراحی، بدون بستن شریان‌های کاروتید)، ایسکمی/ ریپرفیوژن، ایسکمی/ ریپرفیوژن + تزریق صفاقی DMSO به‌عنوان حلال MK-4، درمان (ایسکمی/ ریپرفیوژن + تزریق صفاقی MK-4). گروه‌های شاهد (سالم)، شم (انجام مراحل جراحی بدون بستن شریان‌های کاروتید)، ایسکمی/ ریپرفیوژن، ایسکمی/ ریپرفیوژن+ تزریق صفاقی حلال دارو، درمان (ایسکمی/ ریپرفیوژن+ مناکوئینون-4) قرار گرفتند. تمام مراحل این پژوهش منطبق با دستورالعمل‌های کمیته اخلاق دانشگاه فردوسی و موازین بین‌المللی اخلاق پژوهشی انجام پذیرفت و با شناسه تأیید IR.UM.REC. 1398.085 به ثبت رسید.

2.2. روش جراحی برای ایجاد ایسکمی/ ریپرفیوژن سرتاسری مغزی گذرا

ابتدا حیوانات به‌وسیله تزریق داخل صفاقی مخلوطی از کتامین (100 میلی‌گرم/ کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (20 میلی‌گرم/ کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند و سپس روی میز جراحی

1 Menaquinone-4

مخصوص، ثابت شدند. در زیر استریوی جراحی، ابتدا برشی به طول 2 سانتی‌متر در جلوی گردن حیوان ایجاد شد و شریان کاروتید مشترک آشکار شدند. سپس شریان‌های کاروتید مشترک هر دو طرف، از عضلات و عصب واگ جدا و با استفاده از کلمپ فلزی به مدت 20 دقیقه بسته شدند (دوره ایجاد ایسکمی). مطالعات پیشین حاکی از آن بودند که بروز ایسکمی به مدت 20 دقیقه برای القای مرگ سلولی و به راه افتادن آبشار پیام‌رسانی مرگ سلولی، کافی خواهد بود (29). پس از 20 دقیقه کلمپ‌ها برداشته شدند تا جریان خون مجدداً برقرار شود (دوره ریپرفیوژن). در تمام طول مدت جراحی و پس از آن تا زمان اتمام بیهوشی، درجه حرارت بدن حیوان به‌صورت رکتال با کمک دماسنج اندازه‌گیری شد و با پتوی الکتریکی در محدوده فیزیولوژیک نگاه داشته شد. حیوانات پس از عمل جراحی با دسترسی آزاد به آب و غذا به قفس خود بازگردانده و به طور جداگانه نگهداری شدند.

3.2. تهیه محلول قابل تزریق مناکوئینون-4 (Menaquinone-4)

داروی مناکوئینون-4 (11032-49-8) به‌صورت جامد از شرکت Labseeker خریداری و در فریزر 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. به‌منظور تهیه یک میلی‌لیتر از داروی قابل‌تزریق به‌صورت درون‌صفاقی، 200 میلی‌گرم دارو پس از توزین در لوله ریخته شد و با افزودن یک میلی‌لیتر از حلال شامل ۱ درصد Dimethyl sulfoxide (DMSO) و 99 درصد سرم فیزیولوژی (30) تهیه گردید. در گروه آزمایشی درمانی تجویز صفاقی MK-4 با دوز 200 میلی‌گرم بر کیلوگرم طی دو مرتبه به مدت ۲۰ دقیقه پس از ایسکمی (شروع ریپرفیوژن) و 2 ساعت پس از آن انجام شد.

4.2. استخراج بافت هیپوکامپ

با توجه به اینکه معمولاً عوامل التهابی، در کوتاه‌ترین زمان پس از آسیب در مغز تولید می‌شوند، در این پژوهش، بررسی بیان ژن‌های عوامل التهابی 24 ساعت پس از ریپرفیوژن انجام گردید (31). بدین منظور، سر حیوانات در گروه‌های آزمایشی مختلف پس از بیهوشی عمیق با تزریق صفاقی کتامین (100 mg/kg)، با گیوتین جدا گردید. پس از خارج کردن مغز از جمجمه، هیپوکامپ‌های راست، جدا شد و برای بررسی بیان ژن‌های التهابی استفاده گردید. دلیل انتخاب هیپوکامپ این بود که این قسمت از مغز به‌ویژه ناحیه CA1 آن سریع‌تر از سایر بخش‌های مغز تحت تأثیر آسیب ایسکمیک قرار می‌گیرد (32). هیپوکامپ‌ها ابتدا در نیتروژن مایع منجمد و سپس تا انجام مراحل استخراج RNA در فریزر 80- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

5.2. بررسی کمّی بیان ژن‌های التهابی توسط Real-Time PCR

به‌منظور بررسی کمی بیان ژن‌های موردنظر در بافت هیپوکامپ، از روش Real-Time PCR استفاده گردید. بدین‌منظور، پس از هموژن کردن بافت هیپوکامپ، کل RNA بافت استخراج شد و به‌منظور از بین بردن آلودگی DNA در نمونه‌ها و کاهش خطا در مراحل بعدی، کلیه نمونه‌ها با آنزیم DNase I (Thermo Fisher Scientific) تیمار شدند. برای بررسی کیفیت و اطمینان از صحت فرایند استخراج RNA، نمونه‌ها با کمک ژل الکتروفورز جداسازی و بررسی شدند. در ادامه با استفاده از کیت سنتز cDNA (Thermo Fisher Scientific) محتوای RNA به cDNA تک‌رشته‌ای تبدیل شد. سپس میزان cDNA مربوط به هر ژن به کمک دستگاه (Real-Time Thermal Cyclers) بررسی گردید (33). حال با توجه به مقدار اولیه DNA موجود، می‌توان بیان ژن‌ها را بررسی کرد. برای ژن‌های موردنظر، پرایمرهای Forward و Reverse با سیستم Primer-BLAST و توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی مطابق جدول 1 طراحی و تولید گردید. ژن‌های TNF-α، IL-1beta و IL-6 به‌عنوان ژن‌های هدف که پیش‌برنده التهاب هستند انتخاب شدند و ژن Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) نیز به‌عنوان ژن مرجع[1] انتخاب شد. واکنش Real-Time PCR در پلیت‌های 96 خانه با درهای اپتیکال و به کمک دستگاه CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System انجام شد. داده‌ها به کمک نرم‌افزار CFX Manager ثبت و استخراج شدند.

6.2. روش‌های آماری

در این تحقیق، داده‌ها به‌صورت mean±SEM ارائه شدند و تجزیه‌وتحلیل آماری به کمک نرم‌افزار GraphPad Prism 6 انجام و توزیع متعادل داده‌های هر گروه به کمک آزمون آماری Bartlett's test بررسی گردید. آزمون‌های آماری شامل تجزیه‌وتحلیل یک‌طرفه ANOVA برای بررسی اثربخشی تیمار و آزمون تعقیبی Tukey برای مقایسه میانگین داده‌ها بین گروه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. حداقل سطح معنی‌داری $p<0.05$ در نظر گرفته شد و نمودارها به کمک نرم‌افزار Microsoft Excel رسم گردید.

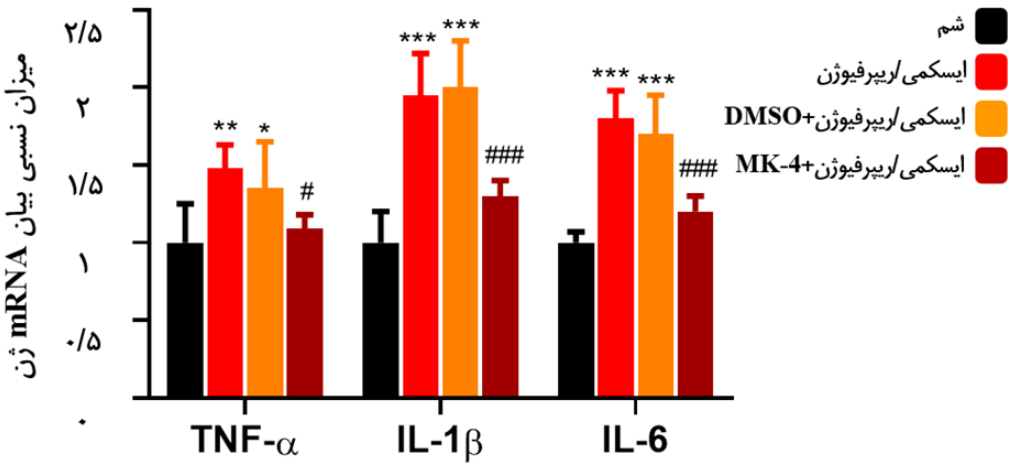
1 Housekeeping gene

3. یافته ها

کاهش میزان بیان ژن‌های عوامل پیش‌برنده التهاب پس از تجویز درون صفاقی مناکوئینون-4 در موش صحرایی نر مدل ایسکمی/ ریپرفیوژن. افزایش سطح بیان mRNA ژن‌های مرتبط با عوامل پیش‌برنده التهاب، یکی از اصلی‌ترین نتایج ایسکمی/ ریپرفیوژن مغزی سرتاسری است. همان‌طور که در شکل 1 نشان داده شده است میزان بیان mRNA ژن‌های TNF-α ($p < 0.01$)، IL-1β ($p < 0.001$) و IL-6 ($p < 0.001$) در هیپوکامپ حیوانات متحمل ایسکمی/ ریپرفیوژن در مقایسه با گروه‌های کنترل و شم، افزایش معنی‌داری یافت (با توجه به اینکه تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و گروه شم مشاهده نشد، در نمودار فقط گروه شم نمایش داده شده‌است). این در حالی است که تزریق درون‌صفاقی مناکوئینون-4 (MK-4) توانست میزان بیان mRNA این ژن‌ها را پس از ایسکمی/ ریپرفیوژن، به‌طور قابل‌توجهی کاهش دهد (TNF-α ($p < 0.05$)، IL-1β ($p < 0.001$) و IL-6 ($p < 0.001$)) و تقریباً به سطح کنترل بازگرداند (شکل 1).

جدول 1. پرایمرهای طراحی شده برای ژن‌های پیش‌برنده التهاب

ردیف	نام ژن	نوع پرایمر	نقطه ذوب (Tm)	توالی پرایمر
1	GAPDH	F	60/68	AGTGCCAGCCTCGTCTCATA
		R	60/39	ATGAAGGGGTCGTTGATGGC
2	TNF-α	F	60/03	ATGGGCTCCCTCTCATCAGT
		R	59/76	GCTTGGTGGTTTGCTACGAC
3	IL-1β	F	59/73	CAGCTTTCGACAGTGAGGAGA
		R	59/68	TTGTCGAGATGCTGCTGTGA
4	IL-6	F	60/46	CATTCTGTCTCGAGCCCACC
		R	60/74	GCTGGAAGTCTCTTGCGGAG



شکل 1. اثر تجویز درون‌صفاقی دوز 200 میلی‌گرم/کیلوگرم مناکوئینون-4 (MK-4) بلافاصله و دو ساعت پس از ریپرفیوژن بر میزان بیان mRNA ژن‌های TNF-α، IL-1β و IL-6 نسبت به ژن مرجع GAPDH

القای ایسکمی/ ریپرفیوژن، موجب افزایش سطح بیان mRNA ژن‌های TNF-α، IL-1β و IL-6 به‌صورت قابل‌توجهی در قیاس با گروه شم شد. اما تجویز MK-4 منجر به جلوگیری از افزایش بیان ژن‌های این عوامل پیش‌برنده التهابی به دنبال ایسکمی/ ریپرفیوژن گردید. داده‌ها به‌صورت mean±SEM گزارش شدند و با روش ANOVA یک‌طرفه و پساآزمون T_{Tukey} مورد تجزیه‌وتحلیل آماری قرار گرفتند.

$p<0.05$*، $p<0.01$ و $p<0.001$*** نسبت به گروه شم و $p<0.05$# و $p<0.001$ ### نسبت به گروه ایسکمی/ ریپرفیوژن (N = 5).**

4. بحث و نتیجه گیری

ایسکمی، یکی از متداول‌ترین وجوه حملات مغزی است که می‌توان آن را با روش انسداد کاروتیدهای مشترک با مدت زمان مشخصی در حدود 20 دقیقه در مدل‌های حیوانی با هدف بررسی رخدادها و عوارض پس از ایست قلبی در مغز ایجاد کرد (34). در این حالت، خون‌رسانی به مغز کاهش می‌یابد و سلول‌های موجود در بافت مغز (نورون‌ها و نوروگلیاها) با کمبود شدید اکسیژن و مواد غذایی مواجه می‌شوند که این امر می‌تواند به‌سرعت موجب مرگ سلولی به‌خصوص در ناحیه بسیار حساس هیپوکامپ گردد (35). سلول‌های آسیب‌دیده در فرایندهای سوخت‌وساز، هومئوستازی یون‌ها، رهایش مقادیر میانجی گلوتامات و عملکرد کانال‌های کلسیمی، دچار اختلال می‌شوند. همچنین ایجاد استرس اکسیداتیو با فعالیت رادیکال‌های آزاد که منجر به آسیب‌های غشایی می‌شود و التهاب در نهایت به مرگ سلولی ناشی از آپوپتوز و نکروز ختم می‌شود (36, 37). در نتیجه ساختار و عملکرد مغز تحت تأثیر ایسکمی، روند طبیعی خود را از دست می‌دهد. مطالعات نشان می‌دهد که هیپوکامپ در زمان‌های مشخصی تحت تأثیر عوارض ایسکمی قرار می‌گیرد (38). در مطالعه حاضر، به‌منظور درک رخدادهای التهابی ناشی از ایسکمی/ ریپرفیوژن مغزی، به بررسی سطوح تغییرات بیان ژنی در 24 ساعت پس از ایسکمی/ ریپرفیوژن پرداخته شده‌است. تحقیقات نشان می‌دهد که ایسکمی/ ریپرفیوژن سرتاسری مغز می‌تواند با افزایش مرگ نورونی در هیپوکامپ بر حافظه کاری یا کوتاه‌مدت نیز تأثیر بگذارد و موجب بروز نقصان در آن گردد (39, 40). نتایج تحقیقات منتشر نشده ما نیز حاکی از آن بود که مناکوئینون-4، ادم مغزی، مرگ سلولی در ناحیه CA1 هیپوکامپ و اختلالات حافظه‌های کوتاه و بلندمدت فضایی را به‌طور چشمگیری در قیاس با گروه ایسکمی/ ریپرفیوژن کاهش داده است. کمبود انرژی در ایسکمی/ ریپرفیوژن موجب به برهم‌خوردن تعادل لاکتات، یون‌های هیدروژن، سدیم و کلسیم می‌گردد. همچنین استرس اکسیداتیو ناشی از ایسکمی و فعالیت عوامل التهابی در ناحیه هیپوکامپ به دنبال ایسکمی موجب تغییر در نفوذپذیری عروق و ادم مغزی می‌گردد (41, 42). مشخص است که آسیب مغزی به دنبال ایسکمی با پاسخ‌های التهابی همراه است که به دیاپدز سلول‌های ایمنی، تجمع آنها و فعال‌سازی آستروسیت‌ها و میکروگلیاها منجر می‌شود (43). بنابراین منطقی است که احتمال داده شود با کاهش عوامل التهابی به‌وسیله مناکوئینون-4 نفوذپذیری عروق مغزی و به تبع آن، ادم مغزی کاهش یابد (44). تغییرات التهابی طی مراحل اولیه ایسکمی استروک رخ می‌دهد و نقشی مرکزی در نتیجه بیماری دارد. بیان میانجی‌های التهابی TNF-α، IL-1β و IL-6 در شرایط پاتولوژیکی همچون ایسکمی/ ریپرفیوژن افزایش می‌یابد. سیتوکاین‌های پیش‌برنده التهاب، با روش‌های متفاوتی، از سلول‌هایی نظیر لوکوسیت‌ها، میکروگلیاها و آستروسیت‌ها آزاد می‌شوند. این میانجی‌ها، تعدیل‌کننده برهم‌کنش‌های انواع مختلفی از سلول‌ها در تعدادی از بیماری‌ها هستند. به‌ویژه IL-1β، IL-6 و TNF-α نقش بسیار مهم و اساسی را در التهاب هیپوکامپ در پاسخ به ایسکمی/ ریپرفیوژن سرتاسری مغزی ایفا می‌کند (45-47). بدین ترتیب داروها و روش‌های درمانی ضدالتهابی می‌توانند رنج‌های ناشی از ایسکمی استروک را کاهش دهند (47). از مناکوئینون-4 در سایر پژوهش‌ها نیز به‌عنوان عامل درمان درد، التهاب و بیماری‌های مزمن با پشتوانه التهابی نظیر سیستیک فیبروزیس، التهابات روده‌ای، پانکراتیت، بیماری مزمن کلیوی و اوستئوپروزیس استفاده شده است (22, 48, 49). بررسی‌ها درباره فعالیت ضدالتهابی ویتامین‌های کا1 و کا2 (مناکوئینون-4) به این دلیل که این ترکیبات دارای سمیت بسیار اندکی هستند مورد توجه قرار گرفته‌اند (48, 50).

گمان می‌رود که ویتامین K با مهار مجموعه NF-κB (Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) پیام رسانی سلولی مربوط به التهاب را مهار می‌کند. یافته‌های مربوط به بیماری‌های التهابی در سطوح *in vitro* و *in vivo* نشان‌دهنده نقش گسترده IL-6 و TNF-α در این آسیب‌ها است (51). یافته‌های پیشین نشان داده‌اند که کاتابولیت‌های ویتامین کا در غلظت‌های زیاد دارویی این ویتامین با سرکوب ترانسلوکیشن NF-κB به هسته سلول‌ها در سامانه اعصاب، اثر مهاری خود را بر رهایش IL-6 و TNF-α اعمال می‌نماید (44, 48, 52). این در حالی است که مناکوئینون-4 (ویتامین کا2) بر عملکرد IL-1β نیز تأثیر مهاری دارد (53). در این تحقیق، نتایج حاصل از سنجش میزان بیان mRNA ژن‌های عوامل التهابی با روش Real-time PCR نشان داد که تجویز دوز 200 میلی‌گرم بر کیلوگرم مناکوئینون-4 بلافاصله پس از ایسکمی/ ریپرفیوژن مغزی توانسته است به کاهش میزان بیان ژن‌های TNF-α، IL-1β و IL-6 در بافت هیپوکامپ بیانجامد (شکل 1). کاهش تولید این سیتوکاین‌های التهابی، به کاهش آسیب مغزی و مرگ سلولی می‌انجامد. در مجموع نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که که مناکوئینون-4 (MK-4) با کاهش سطح تولید عوامل پیش‌برنده التهاب توانسته است از شدت آسیب ناشی از ایسکمی/ ریپرفیوژن مغزی فراگیر بکاهد.

قدردانی و تشکر

این مقاله، حاصل بخشی از طرح پژوهشی مرتبط با رساله دکتری (کد 3/44184 تأیید شده در تاریخ 1396/03/02) در دانشگاه فردوسی مشهد است. بدین وسیله نویسندگان مقاله، مراتب تشکر و قدردانی خود را از مساعدت و یاری معاونت پژوهشی دانشگاه و گروه زیست‌شناسی دانشگاه فردوسی مشهد در انجام این پروژه ابراز می‌دارند.

References

[1]. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. International review of cell and molecular biology. 2012;298:229.

[2]. Titomanlio L, Fernández-López D, Manganozzi L, Moretti R, Vexler ZS, Gressens P. Pathophysiology and neuroprotection of global and focal perinatal brain injury: lessons from animal models. Pediatric neurology. 2015;52(6):566-84.

[3]. Chamorro Á, Dirnagl U, Urra X, Planas AM. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. The Lancet Neurology. 2016;15(8):869-81.

[4]. Reis C, Akyol O, Araujo C, Huang L, Enkhjargal B, Malaguit J, Gospodarev V, Zhang JH. Pathophysiology and the monitoring methods for cardiac arrest associated brain injury. Int J Mol Sci. 2017 ;18(1):129.

[5]. Wu M-y, Yiang G-t, Liao W-T, Tsai AP-Y, Cheng Y-L, Cheng P-W, et al. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury. Cellular Physiology and Biochemistry. 2018;46(4):1650-67.

[6]. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. Int Rev Cell Mol Biol. 2012;298:229-317.

[7]. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia–reperfusion injury. The Journal of pathology. 2000;190(3):255-66.

[8]. O'Collins VE, Macleod MR, Donnan GA, Horky LL, van der Worp BH, Howells DW. 1,026 experimental treatments in acute stroke. Annals of neurology. 2006;59(3):467-77.

[9]. Lo EH, Moskowitz MA, Jacobs TP. Exciting, Radical, Suicidal. Stroke. 2005;36(2):189-92.

[10]. Del Zoppo GJ, Mabuchi T. Cerebral microvessel responses to focal ischemia. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. 2003;23(8):879-94.

[11]. Tsai JP, Albers GW. Reperfusion versus recanalization: the winner is…. Am Heart Assoc; 2015.

[12]. Stoll G, Kleinschnitz C, Nieswandt B. Combating innate inflammation: a new paradigm for acute treatment of stroke? Ann N Y Acad Sci. 2010;1207:149-54.

[13]. Aktas O, Ullrich O, Infante-Duarte C, Nitsch R, Zipp F. Neuronal damage in brain inflammation. Arch Neurol. 2007;64(2):185-9.

[14]. Kudabayeva M, Kisel A ,Chernysheva G, Smol'yakova V, Plotnikov M, Khodanovich M, editors. The increase in the number of astrocytes in the total cerebral ischemia model in rats. Journal of Physics: Conference Series; 2017: IOP Publishing.

[15]. Li M, Li Z, Yao Y, Jin W-N, Wood K ,Liu Q, et al. Astrocyte-derived interleukin-15 exacerbates ischemic brain injury via propagation of cellular immunity. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2017;114(3):E396-E405.

[16]. Hosomi N, Ban CR, Naya T, Takahashi T, Guo P, Song X-yR, et al. Tumor necrosis factor-α neutralization reduced cerebral edema through inhibition of matrix metalloproteinase production after transient focal cerebral ischemia. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. 2005;25(8):959-67.

[17]. Chatzipanteli K, Vitarbo E, Alonso OF, Bramlett HM, Dietrich WD. Temporal profile of cerebrospinal fluid, plasma, and brain interleukin-6 after normothermic fluid-percussion brain injury: effect of secondary hypoxia. Ther Hypothermia Temp Manag. 2012;2(4):167-75.

[18]. Boutin H, LeFeuvre R, Horai R, Asano M, Iwakura Y, Rothwell N. Role of IL-1α and IL-1β in ischemic brain damage. Journal of Neuroscience. 2001;21(15):5528-34.

[19]. Chamorro Á, Meisel A, Planas AM, Urra X, Van De Beek D, Veltkamp R. The immunology of acute stroke .Nature Reviews Neurology. 2012;8(7):401-10.

[20]. Okano T, Shimomura Y, Yamane M, Suhara Y, Kamao M, Sugiura M, et al. Conversion of phylloquinone (vitamin K1) into menaquinone-4 (vitamin K2) in mice two possible routes for menaquinone-4 accumulation in cerebra of mice. Journal of Biological Chemistry. 2008;283(17):11270-9.

[21]. Li J, Lin JC, Wang H, Peterson JW, Furie BC, Furie B, et al. Novel role of vitamin k in preventing oxidative injury to developing oligodendrocytes and neurons. Journal of Neuroscience. 2003;23(13):5816-26.

[22]. Onodera K, Zushida K, Kamei J. Antinociceptive effect of vitamin K2 (menatetrenone) in diabetic mice. Jpn J Pharmacol. 2001;85(3):335-7.

[23]. Onodera K, Shinoda H, Zushida K, Taki K, Kamei J. Antinociceptive effect induced by intraperitoneal administration of vitamin K2 (menatetrenone) in ICR mice. Life Sci. 2000;68(1):91-7.

[24]. Hajipoor F, Fereidoni M, Moghimi A. Effects of Intrathecal Administration of Vitamin K2 on Pain in the Tail Flick and Formalin Test in Rats. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 2014;24(119):132-40.

[25]. Hajipoor F, Fereidoni M, Moghimi A. The Effect of Intrathecal Administration of Vitamin K2 on Inflammatory Rat Paw Edema Induced by Formalin. Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences. 2014;22(4):1379-86.

[26]. Sharifi Z-N, Abolhassani F, Zarrindast MR, Movassaghi S, Rahimian N, Hassanzadeh G. Effects of FK506 on hippocampal CA1 cells following transient global ischemia/reperfusion in Wistar rat. Stroke research and treatment. 2012;2012.

[27]. Albasser MM, Amin E, Lin T-CE, Iordanova MD, Aggleton JP. Evidence that the rat hippocampus has contrasting roles in object recognition memory and object recency memory. Behavioral Neuroscience. 2012;126(5):659.

[28]. Liu H, Wu X, Luo J, Wang X, Guo H, Feng D, et al. Pterostilbene Attenuates Astrocytic Inflammation and Neuronal Oxidative Injury After Ischemia-Reperfusion by Inhibiting NF-kappaB Phosphorylation. Front Immunol. 2019;10:2408.

[29]. Sharifi Z-N, Abolhassani F, Zarrindast MR, Movassaghi S, Rahimian N, Hassanzadeh G. Effects of FK506 on hippocampal CA1 cells following transient global ischemia/reperfusion in Wistar rat. Stroke research and treatment. 2012;2012.

[30]. VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. BioTechniques. 2008;44(5):26-619.

[31]. Liu H, Wu X, Luo J, Wang X, Guo H, Feng D, et al. Pterostilbene Attenuates Astrocytic Inflammation and Neuronal Oxidative Injury After Ischemia-Reperfusion by Inhibiting NF-kappaB Phosphorylation. Front Immunol. 2019;10:2408.

[32]. Zuo W, Zhang W ,Han N, Chen NH. Compound IMM-H004, a novel coumarin derivative, protects against CA1 cell loss and spatial learning impairments resulting from transient global ischemia. CNS Neurosci Ther. 2015;21(3):280-8.

[33]. VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. BioTechniques. 2008;44(5):619-26.

[34]. Anrather J, Iadecola C. Inflammation and Stroke: An Overview. Neurotherapeutics. 2016;13(4):661-70.

[35]. Wahul AB, Joshi PC, Kumar A, Chakravarty S. Transient global cerebral ischemia differentially affects cortex, striatum and hippocampus in Bilateral Common Carotid Arterial occlusion (BCCAo) mouse model. J Chem Neuroanat. 2018;92:1-15.

[36]. Fu SH, Zhang HF, Yang ZB, Li TB, Liu B, Lou Z, et al. Alda-1 reduces cerebral ischemia/reperfusion injury in rat through clearance of reactive aldehydes. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2014;387(1):87-94.

[37]. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 2007;35(4):495-516.

[38]. Wahul AB, Joshi PC, Kumar A, Chakravarty S. Transient global cerebral ischemia differentially affects cortex, striatum and hippocampus in Bilateral Common Carotid Arterial occlusion (BCCAo) mouse model. J Chem Neuroanat. 2018;92:1-15.

[39]. Mizushina Y, Maeda J, Irino Y, Nishida M, Nishiumi S, Kondo Y, et al. Effects of intermediates between vitamins K(2) and K(3) on mammalian DNA polymerase inhibition and anti-inflammatory activity. Int J Mol Sci. 2011;12(2):1132-115.

[40]. Lee D, Park J, Yoon J, Kim MY, Choi HY, Kim H. Neuroprotective effects of Eleutherococcus senticosus bark on transient global cerebral ischemia in rats. J Ethnopharmacol. 2012;139(1):6-11.

[41]. Xing J, Lu J. HIF-1α activation attenuates IL-6 and TNF-α pathways in hippocampus of rats following transient global ischemia. Cellular Physiology and Biochemistry. 2016;39(2):511-20.

[42]. Lamanna JC, Kaiserman-Abramof I, Xu K, Daugherty S, Chávez JC, Pichiule P. Acute and Delayed Effects of Transient Global Cerebral Ischemia on Rat Brain Capillary Endothelial Cells in Vivo. Ischemic Blood Flow in the Brain: Springer; 2001. p. 319-25.

[43]. Lamanna JC, Kaiserman-Abramof I, Xu K, Daugherty S, Chávez JC, Pichiule P. Acute and Delayed Effects of Transient Global Cerebral Ischemia on Rat Brain Capillary Endothelial Cells in Vivo. Ischemic Blood Flow in the Brain: Springer; 2001:319-25.

[44]. Mizushina Y, Maeda J, Irino Y, Nishida M, Nishiumi S, Kondo Y, et al. Effects of intermediates between vitamins K(2) and K(3) on mammalian DNA polymerase inhibition and anti-inflammatory activity. Int J Mol Sci. 2011;12(2):1115-32.

[45]. Wang C, Liu M, Pan Y, Bai B, Chen J. Global gene expression profile of cerebral ischemia-reperfusion injury in rat MCAO model. Oncotarget. 2017;8(43):74607.

[46]. Xing J, Lu J. HIF-1α activation attenuates IL-6 and TNF-α pathways in hippocampus of rats following transient global ischemia. Cellular Physiology and Biochemistry. 2016;39(2):511-20.

[47]. Wang Q, Dai P, Bao H, Liang P, Wang W, Xing A, et al. Anti-inflammatory and neuroprotective effects of sanguinarine following cerebral ischemia in rats. Experimental and therapeutic medicine. 2017;13(1):263-8.

[48]. Hodges SJ, Pitsillides AA, Ytrebø LM, Soper R. Anti-inflammatory actions of vitamin K. Vitamin K2: Vital for Health and Wellbeing. 2017:153.

[49]. Onodera K, Shinoda H, Zushida K, Taki K, Kamei J. Antinociceptive effect induced by intraperitoneal administration of vitamin K2 (menatetrenone) in ICR mice. Life sciences. 2000;68(1):91-7.

[50]. Pucaj K, Rasmussen H, Møller M, Preston T. Safety and toxicological evaluation of a synthetic vitamin K2, menaquinone-7. Toxicology mechanisms and methods. 2011;21(7):520-32.

[51]. Li T-F, Ma J, Han X-W, Jia Y-X, Yuan H-F, Shui S-F, et al. Chrysin ameliorates cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury in rats by regulating the PI3K/Akt/mTOR pathway. Neurochemistry International. 2019:104496.

[52]. Ferland G. Vitamin K and the nervous system: an overview of its actions .Adv Nutr. 2012;3(2):204-12.

[53]. Matsuda T, Kondo A, Tsunashima Y, Togari A. Inhibitory effect of vitamin K2 on interleukin-1β-stimulated proliferation of human osteoblasts. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2010;33(5):804-8

The effect of Menaquinone-4 administration on the expression of pro-inflammatory factors following transient global cerebral ischemia/reperfusion in the hippocampus of male Wistar rat

Bahram Farhadi Moghaddam[1], Masoud Fereidoni[2*]

1. PhD Student in Animal Physiology, Dept. of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2. Professor, Dept. of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Abstract

Introduction: Many investigations revealed that the inflammatory process induced by cerebral ischemia/reperfusion causes brain damages and cognitive impairments. On the other hand, Menaquinone-4 (MK-4) is one of the important vitamin K2 types that has anti-inflammatory effects. Therefore, in this study, we investigated the effect of administration of MK-4 on the level of gene expression of pro-inflammatory cytokines following global ischemia/reperfusion in the hippocampus of male Wistar rats.

Materials and Methods: In this research, 20 adult male Wistar rats (250-300 g) were randomly selected in 5 experimental groups and studied: control (intact), sham (surgery without carotid artery occlusion), ischemia/reperfusion, ischemia/reperfusion + intraperitoneal (i.p.) injection of DMSO as MK-4 solvent, treatment (ischemia/reperfusion + i.p. injection of MK-4). For induction ischemic model, common carotid occlusion was performed for 20 minutes. In the treatment group i.p. injection of 200 mg/kg MK-4 was done 20 minutes after obstruction (immediately and 2 hours after reperfusion). 24 hours after reperfusion, mRNA expression level of TNF-α, IL-1β and IL-6 were assessed.

Results: I.p. administration of MK-4 could significantly decrease mRNA expression level of TNF-α ($P<0.05$), IL-1β and IL-6 ($P<0.001$) induced by ischemia/reperfusion.

Conclusion: The findings of this study show that MK-4 administration following cerebral ischemia/reperfusion could diminish the expression of the pro-inflammatory factors in the hippocampus and maybe cause neuroprotective effects.

Received: 2019/11/08
Accepted: 2019/12/08

Keywords: Menaquinone-4 (menatetrenone), Transient cerebral ischemia, Tumor Necrosis Factor-alpha, Interleukin-1beta, Interleukin-6