Effect of Auraptene on the Expression of c-Jun N-Terminal Kinase Pathway Genes in the Hippocampus of Adult Male Rats Following Cerebral Hypoperfusion Ischemia

Shah Vali S[1], Rafieirad M[2*]
1.MSc Student, Department of Biology, Iz.c, Islamic Azad University, Izeh, Iran
2.Associate professor, Department of Biology, Iz.c, Islamic Azad University, Izeh, Iran, Maryam.Rafieirad@iau.ac.ir

Received: *2025/2/9* Accepted: *2025/7/19*

Abstract

Background: Cerebral hypoperfusion ischemia activates stress pathways and induces apoptosis in neurons. The JNK (MAPK8) gene, as part of oxidative stress and inflammatory pathways, plays a key role in cell death and neuronal survival. The present study sought to assess the effect of auraptene on the expression of JNK1 (MAPK8), C-fos, and C-jun genes in the hippocampus of rats subjected to cerebral hypoperfusion ischemia.

Materials and Methods: A total of 50 male Wistar rats were assigned to five groups: control, ischemia, and three ischemia groups receiving different doses of auraptene (12.5, 25, and 50 mg/kg). Ischemia was induced by bilateral carotid artery occlusion, and gene expression was measured using real-time PCR.

Results: A significant increase was observed in the expression of MAPK8, C-fos, and C-jun genes in the ischemia group compared to the control group ($P<0.001$). Moreover, the administration of auraptene at doses of 12.5, 25 and 50 mg/kg significantly reduced the expression of these genes compared to the ischemia group ($P<0.001$).

Conclusion: Auraptene probably inhibits stress and inflammatory pathways, preventing the upregulation of genes associated with ischemic injury. Furthermore, it exerts a protective effect against damage caused by cerebral hypoperfusion ischemia.

Keywords: Auraptene, Cerebral hypoperfusion ischemia, JNK signalling pathway, Rat.

Citation: Shah Vali S, Rafieirad M. Effect of Auraptene on the Expression of c-Jun N-Terminal Kinase Pathway Genes in the Hippocampus of Adult Male Rats Following Cerebral Hypoperfusion Ischemia. Yafte. 2025; 27(3):50-63.

***Correspondence Address: Department of Biology, Izeh Branch, Islamic Azad University, Izeh**

Email: Maryam.Rafieirad@iau.ac.ir

اثر اوراپتن بر بیان ژن مسیر c-Jun N-Terminal Kinase در هیپوکامپ موش صحرایی نر بالغ متعاقب ایسکمی هیپوپرفیوژن مغزی

ثریا شاه ولی[1]، مریم رفیعی راد[2*]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، واحد ایذه، دانشگاه آزاد اسلامی، ایذه، ایران

۲-دانشیار، گروه زیست شناسی، واحد ایذه، دانشگاه آزاد اسلامی، ایذه، ایران

یافته / دوره ۲۷ / شماره ۳ / پاییز ۱۴۰۴ / مسلسل ۱۰۵

چکیده

دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۱۱/۲۱ پذیرش مقاله: ۱۴۰۴/۴/۲۳

مقدمه: ایسکمی هیپوپرفیوژن مغزی باعث فعال‌سازی مسیرهای استرس و آپوپتوز در نورون‌ها می‌شود. ژن **JNK (MAPK8)** به عنوان بخشی از مسیرهای استرس اکسیداتیو و التهابی، نقش کلیدی در مرگ سلولی و بقای نورون‌ها دارد هدف بررسی تأثیر اوراپتن بر بیان ژن‌های **JNK1 (MAPK8)**، **C-fos** و **C-jun** در هیپوکامپ موش‌های صحرایی تحت مدل ایسکمی هیپوپرفیوژن مغزی می باشد.

مواد و روش‌ها: ۵۰ موش نر ویستار به ۵ گروه (کنترل، ایسکمی و ۳ گروه ایسکمی + دوزهای۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اوراپتن) تقسیم شدند. ایسکمی با انسداد شریان‌های کاروتید ایجاد شد و بیان ژن‌ها با روش **Real time PCR** اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: افزایش معنادار بیان ژن‌های **MAPK8**، **C-fos** و **C-jun** در گروه ایسکمی نسبت به کنترل ($P < ۰/۰۰۱$) و کاهش قابل توجه بیان این ژن‌ها با تجویز اوراپتن در دوزهای ۱۲،۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ($P < ۰/۰۰۱$) را نشان داد.

بحث و نتیجه‌گیری: اوراپتن احتمالاً با مهار مسیرهای استرس و التهاب، از افزایش بیان ژن‌های مرتبط با آسیب ایسکمیک جلوگیری کرده و اثر محافظتی در برابر آسیب‌های ناشی از ایسکمی هیپوپرفیوژن مغزی دارد.

واژه‌های کلیدی: اوراپتن، مسیر سیگنالینگ **JNK**، ایسکمی هیپوپرفیوژن، موش صحرایی.

***آدرس مکاتبه: ایذه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ایذه، گروه زیست شناسی.**

پست الکترونیک: Maryam.Rafieirad@iau.ac.ir

مقدمه

ارتباط بین ایسکمی مغزی و استرس اکسیداتیو به طورمستقیم و گسترده بررسی شده است. ایسکمی مغزی می‌تواند باعث افزایش استرس اکسیداتیو شود. این افزایش به دلیل تولید فراورده‌های آزاد اکسیژن و افزایش فعالیت آنزیم‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو است (۱). این افزایش استرس اکسیداتیو می‌تواند باعث آسیب بیشتر به بافت‌های مغزی و افزایش احتمال بروز بیماری‌های عصبی مانند دیابت، پارکینسون، و سکته مغزی شود (۲). یکی از مسیرهای سیگنالینگ که در پاسخ به استرس‌های اکسیداتیو در طول ایسکمی بسیار فعال می‌شود و نقش مهمی در آپوپتوز و التهاب دارد مسیر c-Jun N-Terminal Kinase است (۳،۴).

MAPK8 یکی از اعضای خانواده پروتئین‌های کیناز فعال‌شده با میتوژن (MAPK) است که به‌طور خاص به عنوان JNK1 نیز شناخته می‌شود (۵). و در پاسخ به محرک‌های استرسی مختلف مانند اشعه ماوراء بنفش، استرس اکسیداتیو، گرما و شوک اسمزی و آسیب ایسکمی/پرفیوژن مجدد مغز و قلب فعال می شوند (۶،۷). تنش‌ها می‌توانند به وسیله گیرنده‌های سطح سلول، کینازها، پروتئین‌ها یا مسیرهای سیگنالی دیگر فعال‌سازی JNKرا آغاز کنند. پس از فعال‌سازی، JNK توسط کینازهای فسفریله کننده به ویژه MAPK که خود یک کیناز است، در محل آمینو انتهایی نشانه‌گذاری می‌شود. این فسفریله کردن باعث افزایش فعالیت کینازی JNK می‌شود. پس از فسفریله شدن، JNK از سیتوپلاسم به هسته سلول حرکت می‌کند. این انتقال می‌تواند توسط سیگنال‌های مختلف از جمله فسفریله کردن نقاط دیگر JNK، تعامل با پروتئین‌های حمله‌کننده و یا تغییرات در پروتئین‌های ذاتی JNK اتفاق بیفتد.

در هسته سلول، JNK با فاکتورهای رونویسی مانند c-Junو ATF2 تعامل می‌کند. با فسفریله کردن این فاکتورها در نقاط خاص، JNK توانایی آنها را در تنظیم فعالیت ژنی افزایش می‌دهد. به عنوان مثال، فسفریله کردن c-Jun توسط JNK باعث فعال‌سازی فاکتور-AP 1شده و بازیابی ژن‌های مرتبط با این مسیر نقش مهمی در تنظیم فرآیندهای سلولی مانند آپوپتوز، التهاب و بقای سلولی ایفا می‌کند (۸).

مطالعات نشان داده‌اند استرس اکسیداتیو و در نتیجه فعال شدن مسیر JNK در پیشرفت اختلال عملکرد سلول‌های بتا که در دیابت یافت می‌شود، دخیل است و بنابراین یک هدف درمانی برای دیابت است (۹). بطورکلی مهار این مسیر می‌تواند اثرات محافظت‌کننده قابل‌توجهی در برابر آسیب‌های ناشی از ایسکمی داشته باشد و مطالعات قبل نشان داده اند که D-JNKI1، یک مهارکننده خاص JNK، در مدل‌های حیوانی سکته مغزی به شدت محافظت کننده عصبی است (۴).

اوراپتن (۷-ژرانیلوکسی کومارین) معروف‌ترین و فراوان‌ترین پرنیلوکسی کومارین موجود در طبیعت است. این ماده توسط گونه‌های گیاهی مختلف، عمدتاً خانواده‌های *Rutaceae* و *Umbeliferae (Apiaceae)* سنتز می‌شود، که شامل بسیاری از میوه‌ها و سبزیجات خوراکی مانند لیمو، گریپ‌فروت و پرتقال هستند. اوراپتن اثر قابل‌توجهی در پیشگیری از بیماری‌های دژنراتیو دارد و به‌ویژه به‌عنوان یکی از امیدبخش‌ترین عوامل شیمیایی طبیعی برای پیشگیری از چندین نوع سرطان گزارش شده است (۱۰). اوراپتن دارای خواص درمانی متنوعی مانند اثر ضد دیابت، ضد پروتوزوآ، ضد باکتری، ضد قارچ، ، ضد لیشمانیوز، ضد التهابی، ضد هلیکوباکتر و فعالیت‌های ایمنومودولاتوری است (۱۱،۱۲). این ترکیب تأثیر قابل‌توجهی در درمان چندین بیماری مزمن از جمله فشار خون بالا، کبد چرب غیرالکلی و فیبروز سیستیک نشان داده است (۱۰). این ماده همچنین تأثیر قابل توجهی در پیشگیری از بیماری‌های دژنراتیو از

خود نشان داده است،و یکی از امیدوارکننده ترین عوامل شیمیایی طبیعی شناخته شده می باشد (۱۰). با توجه به کاربرد گسترده‌ی اوراپتن در حوزه‌ی دارویی، باید بررسی دقیق‌تری درباره‌ی اثربخشی و ایمنی این دارو انجام شود. اگرچه گزارش‌های متعددی در مورد سمیت ترکیبات کومارین وجود دارد اما شواهدی از اثرات سمی اوراپتن در مطالعات وجود ندارد. در آزمایشات مربوط به اثرات ضد سرطانی اوراپتن، حیوانات ۱۰۰-۵۰۰ پی پی ام اوراپتن مخلوط در جیره دریافت کردند و هیچ نشانه‌ای از سمیت مشاهده نشد (۱۳).

با توجه به نقش کلیدی مسیر JNK در فرآیندهای التهابی و آپوپتوز ناشی از ایسکمی-هیپوپرفیوژن مغزی، این مطالعه با هدف بررسی اثر اوراپتن بر بیان ژن‌های مرتبط با این مسیر در ناحیه هیپوکامپ موش‌های صحرایی نر بالغ طراحی شده است. یافته‌های این پژوهش می‌توانند بینش جدیدی در مورد مکانیسم‌های احتمالی نوروپروتکتیو اوراپتن و نیز شناسایی اهداف درمانی جدید برای آسیب‌های ناشی از ایسکمی مغزی ارائه دهند.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، ۵۰ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۵۰ گرم از حیوان‌خانه دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور تهیه شدند. حیوانات در شرایط استاندارد با چرخه نور ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای کنترل‌شده ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. آب و غذای کافی به‌طور آزاد در اختیار آن‌ها قرار گرفت.

حیوانات به‌طور تصادفی به پنج گروه ده‌تایی تقسیم شدند:

- گروه کنترل: سالم بدون القای ایسکمی و بدون دریافت دارو.

- گروه ایسکمی: با انسداد هر دو شریان کاروتید مشترک.

- سه گروه ایسکمی + اوراپتن: دریافت‌کننده اوراپتن با دوزهای ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌روش تزریق داخل صفاقی به مدت ۲۸ روز

روش تهیه اوراپتن

اوراپتن در این پژوهش از شرکت گل اکسیر پارس مشهد تهیه شد و در دوزهای مورد نظر تهیه و تجویز گردید.

روش جراحی برای ایجاد ایسکمی

پس از یک روز محرومیت غذایی به حیوانات، بیهوشی با کتامین/ زیلازین (۱۰میلی گرم/۹۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی) القاء گردید. شکافی در وسط بخش شکمی پوست گردن ایجاد می شود و بافت چربی زیر پوستی برداشته شد و از بافت تیروئید دور شد و شریان کاروتید پس از مشاهده و آشکار شدن از بافت‌های اطراف جدا شد و به وسیله ابزارهای بخیه‌ی پوستی با دو گره محکم در حول رگ (بالا و پایین) مسدود و سپس شریان‌ها به طور کامل قطع شدند. حیوانات پس از به هوش آمدن اجازه داشتند تا آب و غذا مصرف کنند. بعد از یک هفته جراحی مشابهی در طرف دیگر انجام شد (۱۴).

استخراج RNA وcDNA

پس از ۲۸ روز، حیوانات با گیوتین مخصوص حیوانات کوچک کشته شده و سپس استخوان جمجمه کنار زده شده تا ناحیه هیپوکامپ دو طرف مشخص گردد هیپوکامپ دو طرف برای استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفت.

RNA ناحیه هیپوکامپ با استفاده از کیت استخراج RNA (RNX) مطابق با پروتکل استاندارد شرکت سازنده استخراج شد.

RNA با اتانول رسوب داده شد و در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. غلظت RNA با

اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. سپس cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA از RNA نمونه ها ساخته شد.

واکنش PCR

از واکنش زنجیرهای پلی مراز برای بیان ژن های MAPK8، C-fos و C-jun به عنوان ژن‌های هدف و ACT به عنوان ژن ساختمانی (Keeper House) جهت کنترل داخلی استفاده شد و صحت بررسی های PCRبا استفاده از ژنACT تایید گردید. با استفاده از پرایمرها (جدول ۱)، از cDNA سنتز شده بر اساس پروتکل، واکنش PCR به شرح زیر انجام گرفت. دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد، ۳ دقیقه، در هر سیکل دناتوراسیون، ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه. دمای اتصال برای پرایمرMAPK8 ۶۸ درجه سانتی‌گراد ۳۰ثانیه پرایمر، پرایمر-fos و C-jun ،۶۱ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه و پرایمرACT ،۶۱ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه با استفاده از دمای گرادیان تعیین گردید. دمای تکثیر برای هر سیکل ۷۲ درجه سانتی گراد، ۴۵ ثانیه بود. برای پرایمرهای MAPK8، C-fos و C-jun ۳۷ سیکل و برایACT ۳۳ سیکل انجام گردید. به منظور تکمیل نهایی ساختار DNA های تکثیر شده، نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه تکثیر نهایی را انجام دادند. بهبود کیفیت واکنش PCR برای هر نمونه و پرایمر با استفاده از رقیق سازی سریالی انجام گرفت تا تعداد سیکل مناسب برای انجام این واکنش تعیین گردد. پس از تهیه عکس از ژل، میزان تراکم باندها توسط نرم افزار UVI(geltec) دنسیتومتری یا تراکم سنجی و با استفاده از روش(semi PCR quantity نیمه کمی) مقایسه بین گروه‌ها انجام گردید. نسبت میزان تراکم باند ژن هدف از هر گروه بر میزان تراکم باند ژن ساختمانی (یعنیACT) از همان گروه محاسبه شد و میانگین این نسبت در سه بار تکرار آزمایشات به صورت درصد بیان نسبت به گروه کنترل نمایش داده شد (۱۵).

اندازه گیری بیان ژن

در پایان آزمایش موش‌ها را تشریح و هیپوکامپ را جدا کرده و بیان ژن را با روش Real-time RT-PCR بررسی گردید. واکنش برای هر یک از ژن‌ها به صورت سه تایی بوده و ۲ بار تکرار می‌گردد. طراحی پرایمرهای اختصاصی مورد نیاز نیز با استفاده از برنامه نسخه نرم افزار پرایمر ۳(http://frodo.wi.mit.edu)0.4.0 " صورت گرفت در نهایت داده‌های حاصل از Real-time RT-PCR با استفاده از فرمول PFAFFL محاسبه شد.

$$Gene\ expression\ ratio = \frac{(E_{GOI})^{\Delta Ct\ GOI}}{(E_{HKG})^{\Delta Ct\ HKG}}$$

جدول ۱. توالی پرایمرهای طراحی شده (۱۹-۱۶)

Gene	Primers
β-actin	Forward: TGTCACCAACTGGGACGATA
	Reverse: GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA
MAPK8	Forward: CACCACCAAAGATCCCTGAC
	Reverse: GCACCTAAAGGAGACGGCTG
C-fos	Forward:ACCATGATGTTCTCGGGTTTCA
	Reverse:CACTAGAGACGGACAGATCTGC
C-jun	Forward:CATTTTCTGACCAACTGCCTGG
	Reverse: TCCCTTTTCTTTACGGTCTCGG

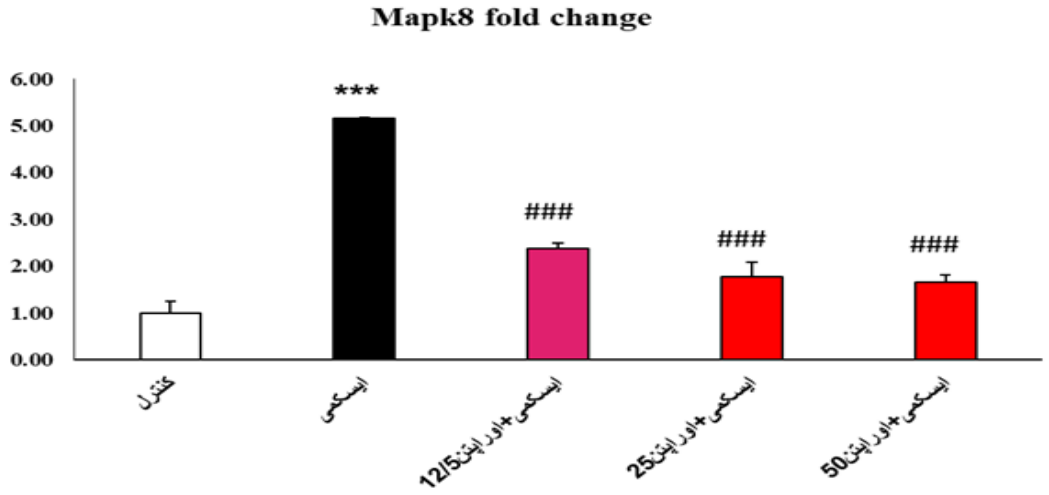
روش های آماری

تجزیه و تحلیل آماری بین گروه-های مختلف با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۲۲ انجام شد. جهت تعیین اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مورد نظر در آزمون‌های رفتاری از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey استفاده گردید. از نظر آماری مقادیر P <۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

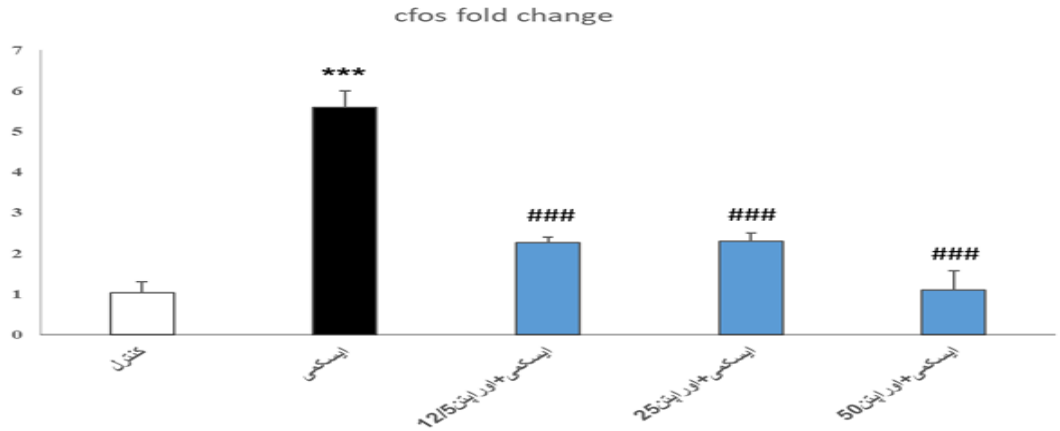
یافته‌ها

بررسی‌های این مطالعه نشان داد که در گروه ایسکمی، افزایش معناداری در بیان ژن MAPK8 نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (P < ۰/۰۰۱). با تجویز اوراپتن در دوزهای ۱۲،۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، کاهش قابل توجهی در بیان ژن MAPK8 در مقایسه با گروه ایسکمی ایجاد شد (P < ۰/۰۰۱) (شکل ۱).

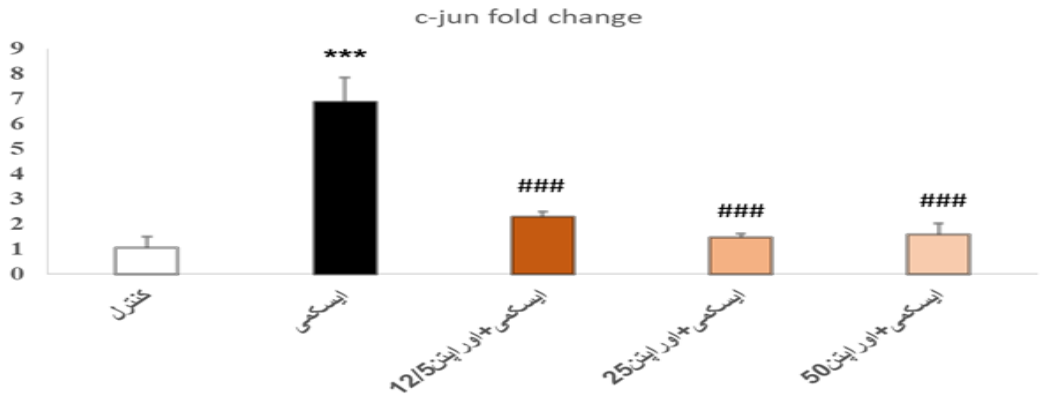
همچنین، بیان ژن C-fos در گروه ایسکمی نسبت به گروه کنترل به‌طور معناداری افزایش یافت ($P < ۰/۰۰۱$). در گروه‌های دریافت‌کننده اوراپتن، کاهش معناداری در بیان ژن C-fos مشاهده شد. این کاهش در دوزهای ۱۲/۵ ($P < ۰/۰۰۱$)، ۲۵ ($P < ۰/۰۰۱$) و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ($P < ۰/۰۰۱$) نسبت به گروه ایسکمی به‌ترتیب بیشتر شد (شکل ۲). در مورد ژن C-jun، نتایج نشان داد که بیان این ژن در گروه ایسکمی نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری داشت ($P < ۰/۰۰۱$). تجویز اوراپتن در دوزهای ۱۲/۵ ($P < ۰/۰۰۱$)، ۲۵ ($P < ۰/۰۰۱$) و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ($P < ۰/۰۰۱$) منجر به کاهش معنادار بیان ژن C-jun در مقایسه با گروه ایسکمی شد (شکل ۳). این یافته‌ها حاکی از آن است که اوراپتن با دوزهای مختلف می‌تواند به‌طور مؤثری از افزایش بیان ژن‌های مرتبط با استرس و التهاب ناشی از ایسکمی جلوگیری کند و اثرات محافظتی قابل توجهی در مدل تجربی ایسکمی هیپوپرفیوژن مغزی داشته باشد.



شکل ۱. تأثیر دوزهای مختلف اوراپتن بر تغییرات بیان ژن MAPK8 در بافت هیپوکامپ پس از ایسکمی هیپوپرفیوژن. مقایسه بین گروه‌های کنترل، ایسکمی و ایسکمی درمان‌شده با اوراپتن انجام شد. علامت (***) نشان‌دهنده اختلاف معنادار بین گروه ایسکمی و گروه کنترل، و علامت (###) بیانگر اختلاف معنادار بین گروه ایسکمی و گروه‌های درمان‌شده با اوراپتن است. (میله‌های خطا در نمودار نشان‌دهنده انحراف معیار هستند.)



شکل ۲. نمودار آنالیز آماری ژن fos-C در بافت هیپوکامپ به دنبال ایسکمی هیپوپرفیوژن. بین گروه های کنترل، ایسکمی و ایسکمی دریافت کننده اوراپتن. علامت(***) بیانگر اختلاف معنادار بین گروه ایسکمی و کنترل و علامت(###) بیانگر اختلاف معنادار بین گروه ایسکمی و ایسکمی درمان شده با اوراپتن است. (میله‌های خطا در نمودار نشان‌دهنده انحراف معیار هستند.)



شکل ۳. نمودار آنالیز آماری ژن C-jun در بافت هیپوکامپ به دنبال ایسکمی هیپوپرفیوژن. بین گروه‌های کنترل، ایسکمی و ایسکمی دریافت کننده اوراپتن. علامت(***) بیانگر اختلاف معنادار بین گروه ایسکمی و کنترل و علامت(###) بیانگر اختلاف معنادار بین گروه ایسکمی و ایسکمی درمان شده با اوراپتن است. (میله‌های خطا در نمودار نشان‌دهنده انحراف معیارهستند.)

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج بررسی نشان داد که در گروه ایسکمی میزان بیان ژن‌های MAPK8، C-fos و C-jun افزایش یافته است. با این حال، در گروه‌های ایسکمی که دوزهای مختلف اوراپتن دریافت کرده بودند، کاهش معناداری در بیان این ژن‌ها مشاهده شد. بیشترین کاهش در دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اوراپتن مشاهده شد.

MAPK8، معروف به JNK1، نقش مهمی در پاسخ‌های سلولی به استرس اکسیداتیو ایفا می‌کند. وقتی سلول‌ها در معرض استرس اکسیداتیو قرار می‌گیرند، فراورده‌های آزاد اکسیژن (ROS) تولید می‌شوند که می‌توانند به DNA، پروتئین‌ها و لیپیدها آسیب برسانند. این آسیب‌ها باعث فعال شدن مسیرهای سیگنالینگ مختلف، از جمله مسیر JNK، می‌شوند (۳). بنابراین گفته شده است که مسیر سیگنال دهی JNK یک تعدیل کننده کلیدی در مرگ سلولی است که توسط گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن فعال می شود (۲۰). فسفوریلاسیون JNK در طی ایسکمی بیضه گزارش شده است (۲۱). ارتباط سه پروتئین JNK، c-Fos و c-Jun به این صورت است که JNK نقش مهمی در فسفریلاسیون و فعال‌سازی پروتئین‌های c-Jun و c-Fos ایفا می‌کند. با فسفریلاسیون c-Jun، JNK فعالیت ترانسکریپشنال آن را افزایش می‌دهد که این کار در تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با تکثیر سلولی، تمایز و آپوپتوز مؤثر است. همچنین JNK با فعال‌سازی فاکتورهای ترانسکریپشن مانند TCF/Elk-1، بیان ژن c-Fos را تحریک می‌کند. این سه پروتئین با هم به صورت مجموعه‌ای به نام AP-1 عمل کرده و تنظیم بیان ژن‌های خاص را انجام می‌دهند (۲۲). مطالعات متعدد نشان می دهد که مسیرهای سیگنالینگ با واسطه JNK نقش اساسی در آسیب ایسکمی / خونرسانی مجدد مغز و میوکارد ایفا می‌کند. مکانیسم های مرتبط با JNK در پیش شرطی‌سازی و پس از شرطی‌سازی قلب و مغز نقش دارند و امروزه مهارکننده‌های JNK با پتانسیل درمانی بالا شناسایی شده‌اند (۳). فِرِر و همکارانش توزیع JNK فسفریله شده و زیرلایه آن c-Jun را در مراحل اولیه پس از ریپرفیوژن در مدل حیوانی انسداد شریان کاروتید میانی در موش مطالعه کردند. این مطالعه نشان داد که فسفریلاسیون هسته‌ای JNK و c-Jun چهار ساعت پس از ریپرفیوژن در ناحیه مرکزی انفارکتوس افزایش می‌یابد؛ همچنین، سطح افزایش یافته فسفریلاسیون سیتوپلاسمی آن‌ها در منطقه بین ناحیه سالم و ناحیه انفارکتوس مشاهده می‌شود (۲۳). چمبرز و همکارانش نشان دادند که سیگنال‌دهی وابسته به JNK منجر به تولید گونه‌های

فعال اکسیژن، اختلال در عملکرد میتوکندری و از دست دادن کاردیومیوسیت‌ها می‌شود (۲۴). همچنین نشان داده شده است که می‌تواند فرآیندهایی مشابه شرایط پیش‌ازایسکمی را القا کند و از مرگ سلولی ناشی از هایپوکسی از طریق مسیرهای سیگنال‌دهی مرتبط با JNK محافظت می‌کند (۲۵). فعال‌سازی JNKها به طور قابل‌توجهی به آسیب ایسکمی/بازپرفیوژن میوکارد در طی پیوند قلب کمک می‌کند (۲۶). داده‌های اخیر نشان داده‌اند که JNK در سرکوب تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی نقش دارد. با توجه به اینکه سلول‌های بنیادی مزانشیمی نقش مهمی در بازیابی قلب از آسیب پس‌ازایسکمی دارند (۲۷)، پیشگیری از سرکوب فعالیت تکثیری آن‌ها با استفاده از مهارکننده‌های JNK ممکن است دارای ارزش درمانی برای درمان ضایعات ایسکمی باشد. همچنین مهارکننده های ملکولی کوچک JNK باعث محافظت عصبی در مدلهای تخریب کننده عصبی می‌شوند (۲۸). مواد محافظت‌کننده عصبی گیاهی به عنوان داروهای جدید سکته مغزی، به دلیل تأثیرات قوی محافظتی بر مغز در مدل‌های حیوانی سکته مغزی، به‌طور قابل‌توجهی مورد توجه محققان قرار گرفته‌اند. مکانیسم اصلی عملکرد آنها احتمالاً به خواص ضد التهابی‌شان مرتبط است، اگرچه سایر مکانیسم‌ها مانند ضد اکسیدان و محافظت از عروق نیز پیشنهاد شده اند (۲۹). به‌طورکلی، آنتی‌اکسیدان‌ها و عصاره‌های گیاهی می‌توانند بر مسیر JNK تأثیرگذار باشند و می‌توانند به طور مستقیم یا غیر مستقیم اثرات مثبتی بر سلامت سلولی داشته باشند (۳۰). فلاوانول‌های اپیکاتچین و ۳'-O-متیل اپیکاتچین نشان داده شده‌اند که از سلول‌های عصبی در برابر آسیب اکسیداتیو محافظت می‌کنند. این مکانیسم از طریق سرکوب JNK و مولکول های پایین‌دستی آن، c-Jun و پرو-کاسپاز-۳، عمل می‌کند (۳۱). تعدادی شواهد محتمل وجود دارند که فلاونوئیدها می‌توانند با مسیر JNK تعامل داشته باشند. به عنوان مثال، فلاونوئیدها می‌توانند با جلوگیری از فعال‌سازی JNK، آپوپتوز ناشی از استرس اکسیداتیو را مهار کنند. این کار از طریق تأثیر بر یکی از پروتئین‌های فعال‌کننده MAPKKK در مسیرهای بالادستی که سیگنال‌ها را به JNK منتقل می‌کنند، انجام می‌شود (۳۰). درمان با (−) اپیکاتچین-۳-گالات در غلظت‌های ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار فعال‌سازی JNK ناشی از تابش UV-B را در کراتینوسیت‌ها کاهش داد (۳۲). کوئرستین، یکی از فراوان‌ترین فلاونوئیدهای موجود در بسیاری از میوه‌ها و سبزیجات، و EGCG که به وفور در چای سبز یافت می‌شود، هر دو فسفریلاسیون JNK و مسیر MAPK p38 القا شده توسط H2O2 را پس از ۶۰ دقیقه از مواجهه مهارکردند (۳۲). میرستین که در انگور، توت‌ها، سایر میوه‌ها و سبزیجات یافت می‌شود، یک فلاونوئید مهم است که از طریق کاهش تنظیم p38 و JNK، به بقای سلول در برابر آپوپتوز ناشی از H2O2 کمک می‌کند. فلاونوئیدها با مهار انتخابی این کینازها می‌توانند اثرات مثبتی بر بسیاری از بیماری‌ها که ناشی از افزایش تنظیم مسیرهای p38 و JNK هستند، داشته باشند. میرستین از طریق تنظیم مسیرهای سیگنال‌دهی MAPK و PI3K/Akt از آپوپتوز ناشی از استرس اکسیداتیو جلوگیری می‌کند (۳۳). عملکردهای بازدارنده یا تحریک‌کننده مختلف فلاونوئیدها بر روی این مسیرها تأثیر زیادی بر عملکرد سلولی دارند و این کار را با تغییر حالت فسفریلاسیون مولکول‌های هدف انجام می‌دهند. علاوه بر این، فلاونوئیدها با فعال‌سازی عوامل مختلف ترانسکریپشن، می‌توانند تنظیمات مختلف ژن‌ها را تعدیل کنند (۳۴). اوراپتن یک مولکول چندکارکردی، یک کومارین مونوترپن طبیعی و دارای فعالیت بیولوژیکی است که می‌تواند مسیرهای سیگنال‌دهی درون‌سلولی را که التهاب، رشد سلولی و آپوپتوز را کنترل می‌کنند، تنظیم کند. این مولکول به دلیل فعالیت‌های ضد التهابی و

آنتی‌اکسیدانی و نیز خواص ضد سرطان، ضد باکتری، محافظت‌کننده عصبی و محافظت‌کننده از کبد، پتانسیل درمانی در پیشگیری و درمان بیماری‌های مختلف دارد (۱۲،۱۳). اوراپتن، به عنوان فلاونوئید مرکبات، مانع از نقص عملکرد سیستولیک پس از سکته قلبی در موش‌ها می‌شود وبه عنوان یک عامل جدید و مؤثر برای درمان نارسایی قلبی در انسان مورد توجه قرار گرفته‌است (۳۵). اوراپتن، که در گیاه Zanthoxylum schinifolium یافت می‌شود، فعالیت آپوپتوزنیک علیه سلول‌های آلانیک لکسمیا Jurkat T cells انسان نشان می‌دهد. این فعالیت با فعال‌سازی کاسپاز-۸ ناشی از استرس ER مرتبط است که سپس زنجیره‌های کاسپاز وابسته به میتوکندری و غیر وابسته به میتوکندری را تحریک می‌کند (۳۶). مطالعه اثرات محافظت‌کننده عصبی اوراپتن پس از آسیب مغزی ناشی از ضربه در موش‌های نر نشان داد که احتمالاً اوراپتن از عوارض آسیب مغزی از طریق کاهش ادم مغزی، تعدیل استرس اکسیداتیو و کاهش سطح سیتوکین‌های التهابی جلوگیری می‌کند (۳۷). اثر تجویز اوراپتن بر انسداد دو طرفه شریان کاروتید عمومی که ایسکمی گلوبال مغزی را در موش‌ها القا می‌کند، نشان داد که اوراپتن به طور موثری با منع فعال‌سازی میکروگلیا، بیان سیکلواکسیژناز-۲ توسط آستروسیت‌ها سبب کاهش مرگ سلول‌های عصبی در نورون‌ها در نواحی CA1، CA2 و CA3 هیپوکامپ پس از آسیب‌های ایسکمیک می‌شود (۳۸). این یافته‌ها حاکی از آن است که اوراپتن به عنوان یک عامل محافظت‌کننده عصبی در مغز ایسکمیک عمل می‌کند، که ممکن است این اثر از طریق سرکوب پاسخ التهابی حاصل شود. علاوه بر این، اوراپتن با کاهش ایسکمی و بهبود حافظه در یک مدل موش با دمانس عروقی، تأثیرات مثبتی را نشان داد (۳۹،۴۰). اوراپتن با تعدیل فعالیت متالوپروتئینازهای ماتریکس و JNK، مهاجرت و تهاجم سلول‌های سرطانی را مهار می‌کند. این امر می‌تواند از گسترش سلول‌های سرطانی جلوگیری کند و به اثرات ضد توموری آن کمک کند (۴۱).

اوراپتن، یک ترکیب طبیعی با خواص ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی، اثرات محافظت‌کننده عصبی در برابر آسیب‌های ناشی از ایسکمی هیپوپرفیوژن مغزی نشان می‌دهد. این مطالعه تأثیر اوراپتن بر بیان ژن JNK در هیپوکامپ موش‌های صحرایی را بررسی کرد. نتایج نشان داد که اوراپتن به طور معناداری بیان ژن JNK و ژن های cjun , Cfos را در هیپوکامپ موش های ایسکمی شده کاهش می‌دهد، که این امر احتمالا با کاهش مرگ سلول‌های عصبی همراه بود. اوراپتن با مهار مسیر JNK و احتمالا کاهش سیتوکین‌های التهابی، از آپوپتوز و ادم مغزی جلوگیری می‌کند. همچنین، این ترکیب با تعدیل مسیرهای مرتبط با MAPK، استرس اکسیداتیو و التهاب را کاهش می‌دهد. این یافته‌ها نشان می‌دهند که اوراپتن می‌تواند به عنوان یک عامل محافظت‌کننده عصبی در شرایط ایسکمی مغزی عمل کند و پتانسیل درمانی برای بهبود آسیب‌های عصبی دارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بدینوسیله از کلیه افرادی که در انجام این تحقیق مشارکت و همکاری داشتهاند، تشکر و قدردانی مینمایند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافعی در نگارش این پژوهش ندارند.

حمایت مالی

این مقاله بخشی از پایان‌نامه دوره ارشد است که با حمایت مالی خود دانشجو انجام شده است. در این راستا از دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهت فراهم نمودن امکانات آزمایشگاهی برای اجرایی شدن این پروژه تشکر و قدردانی میشود.

مشارکت نویسندگان

مریم رفیعی راد: طراحی علمی، گردآوری و تجزیه و تحلیل داده‌ها، ثریا شاه ولی: انجام آزمایشات، مریم رفیعی راد: نگارش مقاله، اصلاح و تایید نهایی مقاله را انجام داده اند.

ملاحظات اخلاقی

پروتکل این پژوهش مطابق با قوانین بین‌المللی اخلاق در استفاده از حیوانات آزمایشگاهی تنظیم و توسط کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد با شماره تصویب IR.IAU.SHK.REC.1403.108 تأیید شد.

References

1. Jurcau A, Ardelean AL. Oxidative stress in ischemia/reperfusion injuries following acute ischemic stroke. Biomedicines. 2022;10(3):574. DOI: 10.3390/biomedicines10030574
2. Feng C, Liu S, Zhou F, Gao Y, Li Y, Du G, et al. Oxidative stress in the neurodegenerative brain following lifetime exposure to lead in rats: changes in lifespan profiles. Toxicology. 2019;411:101-9. DOI: 10.1016/j.tox.2018.11.003
3. Shvedova M, Anfinogenova Y, Atochina-Vasserman EN, Schepetkin IA, Atochin DN. c-Jun N-terminal kinases (JNKs) in myocardial and cerebral ischemia/reperfusion injury. Front Pharmacol. 2018;9:715. DOI: 10.3389/fphar.2018.00715
4. Benakis C, Bonny C, Hirt L. JNK inhibition and inflammation after cerebral ischemia. Brain Behav Immun. 2010;24(5):800-11. DOI: 10.1016/j.bbi.2009.11.001
5. Barutcu SA, Girnius N, Vernia S, Davis RJ. Role of the MAPK/cJun NH(2)-terminal kinase signaling pathway in starvation-induced autophagy. Autophagy. 201;14(9):1586-95. DOI: 10.1080/15548627.2018.1466013
6. Armstrong SC. Protein kinase activation and myocardial ischemia/reperfusion injury. Cardiovasc Res. 2004;61(3):427-36. DOI: 10.1016/j.cardiores.2003.09.031
7. Atochin DN, Schepetkin IA, Khlebnikov AI, Seledtsov VI, Swanson H, Quinn MT, et al. A novel dual NO-donating oxime and c-Jun N-terminal kinase inhibitor protects against cerebral ischemia-reperfusion injury in mice. Neurosci Lett. 2016;618:45-9. DOI: 10.1016/j.neulet.2016.02.033
8. Yung JHM, Giacca A. Role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in obesity and type 2 diabetes. Cells. 2020;9(3):706. DOI: 10.3390/cells9030706
9. Kaneto H, Kawamori D, Nakatani Y, Gorogawa S, Matsuoka TA. Oxidative stress and the JNK pathway as a potential therapeutic target for diabetes. Drug News Perspect. 2004;17(7):447-53. DOI: 10.1358/dnp.2004.17.7.863704
10. Derosa G, Maffioli P, Sahebkar A. Auraptene and its role in chronic diseases. Adv Exp Med Biol. 2016;929:399-407. DOI: 10.1007/978-3-319-41342-6_19
11. Nagao K, Yamano N, Shirouchi B, Inoue N, Murakami S, Sasaki T, et al. Effects of citrus auraptene (7-geranyloxycoumarin) on hepatic lipid metabolism in vitro and in vivo. J Agric Food Chem. 2010;58(16):9028-32. DOI: 10.1021/jf1020329
12. Bibak B, Shakeri F, Barreto GE, Keshavarzi Z, Sathyapalan T, Sahebkar A. A review of the pharmacological and therapeutic effects of auraptene. Biofactors. 2019;45(6):867-79. DOI: 10.1002/biof.1550
13. Vakili T, Iranshahi M, Arab H, Riahi B, Roshan NM, Karimi G. Safety evaluation of auraptene in rats in acute and subacute toxicity studies. Regul Toxicol

Pharmacol. 2017;91:159-64. DOI: 10.1016/j.yrtph.2017.10.025
14. Nazari Par Chestani Z, Rafieirad M. The effect of herniarin on anxiety behaviors and depression following chronic cerebral ischemia hypoperfusion in male rats. Experim Animal Biol. 2021;9(3):93-103. DOI: 10.30473/eab.2020.48847.1740
15. Shaibani Z, Rafieirad M. Protective effect of Oleuropein on memory impairment and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetes rats via modulation of NF-kB and Nrf-2 pathways. J Adv Biomed Sci. 2024;14(2):115-27. DOI: 10.18502/jabs.v14i2.15756
16. Li L, Yang J, Liu B, Zou Y, Sun M, Li Z, et al. P2Y12 shRNA normalizes inflammatory dysfunctional hepatic glucokinase activity in type 2 diabetic rats. Biomed Pharmacother. 2020;132:110803. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110803
17. Aamani N, Bagheri A, Masoumi Qajari N, Malekzadeh Shafaroudi M, Khonakdar-Tarsi A. JNK and p38 gene and protein expression during liver ischemia-reperfusion in a rat model treated with silibinin. Iran J Basic Med Sci. 2022;25(11):1373-81. DOI: 10.22038/ijbms.2022.60550.13422
18. Sharp FR, Sagar SM, Hicks K, Lowenstein D, Hisanaga K. c-fos mRNA, Fos, and Fos-related antigen induction by hypertonic saline and stress. J Neurosci. 1991;11(8):2321-31. DOI: 10.1523/jneurosci.11-08-02321.1991
19. Vleugel MM, Greijer AE, Bos R, van der Wall E, van Diest PJ. c-Jun activation is associated with proliferation and angiogenesis in invasive breast cancer. Hum Pathol. 2006;37(6):668-74. DOI: 10.1016/j.humpath.2006.01.022
20. Shen HM, Liu ZG. JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species. Free Radic Biol Med. 2006;40(6):928-39. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.10.056
21. Alotaibi SR, Renno WM, Al-Maghrebi M. c-Jun N-terminal kinase supports autophagy in testicular ischemia but triggers apoptosis in ischemia-reperfusion injury. Int J Mol Sci. 2024;25(19):10446. DOI: 10.3390/ijms251910446
22. Chen J, Ye C, Wan C, Li G, Peng L, Peng Y, et al. The roles of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in infectious diseases. Int J Mol Sci. 2021;22(17):9640. DOI: 10.3390/ijms22179640
23. Ferrer I, Friguls B, Dalfó E, Planas AM. Early modifications in the expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK/ERK), stress-activated kinases SAPK/JNK and p38, and their phosphorylated substrates following focal cerebral ischemia. Acta Neuropathol. 2003;105(5):425-37. DOI: 10.1007/s00401-002-0661-2
24. Chambers JW, Pachori A, Howard S, Iqbal S, Lograsso PV. Inhibition of JNK mitochondrial localization and signaling is protective against ischemia/reperfusion injury in rats. J Biol Chem.

2013;288(6):4000-11. DOI: 10.1074/jbc.m112.406777
25. Walshe CM, Laffey JG, Kevin L, O'Toole D. Sepsis protects the myocardium and other organs from subsequent ischaemic/reperfusion injury via a MAPK-dependent mechanism. Intensive Care Med Exp. 2015;3(1):35. DOI: 10.1186/s40635-014-0035-9
26. Vassalli G, Milano G, Moccetti T. Role of mitogen-activated protein kinases in myocardial ischemia-reperfusion injury during heart transplantation. J Transplant. 2012;2012:928954. DOI: 10.1155/2012/928954
27. Wu J, Li J, Zhang N, Zhang C. Stem cell-based therapies in ischemic heart diseases: a focus on aspects of microcirculation and inflammation. Basic Res Cardiol. 2011;106(3):317-24. DOI: 10.1007/s00395-011-0168-x
28. Probst GD, Bowers S, Sealy JM, Truong AP, Hom RK, Gallemmo RA, et al. Highly selective c-Jun N-terminal kinase (JNK) 2 and 3 inhibitors with in vitro CNS-like pharmacokinetic properties prevent neurodegeneration. Bioorg Med Chem Lett. 2011;21(1): 315-19. DOI: 10.1016/j.bmcl.2010.11.010
29. Subedi L, Gaire BP. Phytochemicals as regulators of microglia/macrophages activation in cerebral ischemia. Pharmacol Res. 2021;165:105419. DOI: 10.1016/j.phrs.2021.105419
30. Spencer JP. The interactions of flavonoids within neuronal signalling pathways. Genes Nutr. 2007;2(3):257-73. DOI: 10.1007/s12263-007-0056-z
31. Schroeter H, Spencer JP, Rice-Evans C, Williams RJ. Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3. Biochem J. 2001;358(Pt3):547-57. DOI: 10.1042/0264-6021:3580547
32. Huang CC, Wu WB, Fang JY, Chiang HS, Chen SK, Chen BH, et al. (-)-Epicatechin-3-gallate, a green tea polyphenol is a potent agent against UVB-induced damage in HaCaT keratinocytes. Molecules. 2007;12(8):1845-58. DOI: 10.3390/12081845
33. Kang KA, Wang ZH, Zhang R, Piao MJ, Kim KC, Kang SS, et al. Myricetin protects cells against oxidative stress-induced apoptosis via regulation of PI3K/Akt and MAPK signaling pathways. Int J Mol Sci. 2010;11:4348-60. DOI: 10.3390/ijms16011482
34. Mansuri ML, Parihar P, Solanki I, Parihar MS. Flavonoids in modulation of cell survival signalling pathways. Genes Nutr. 2014;9(3):400. DOI: 10.1007/s12263-014-0400-z
35. Kawaguchi S, Sunagawa Y, Murakami A, Wada H, Takahashi K, Shimatsu A, et al. Auraptene, a citrus flavonoid, prevents the deterioration of systolic function after myocardial infarction in rats. J Card Fail. 2011;17(9):S154. Link
36. Jun DY, Kim JS, Park HS, Han CR, Fang Z, Woo MH, et al. Apoptogenic activity of auraptene of Zanthoxylum schinifolium

toward human acute leukemia Jurkat T cells is associated with ER stress-mediated caspase-8 activation that stimulates mitochondria-dependent or -independent caspase cascade. Carcinogenesis. 2007;28(6):1303-13. DOI: 10.1093/carcin/bgm028

37. Keshavarzi Z, Amiresmaili S, Shahrokhi N, Bibak B, Shakeri F. Neuroprotective effects of auraptene following traumatic brain injury in male rats: The role of oxidative stress. Brain Res Bull. 2021;177: 203-09. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2021.09.021
38. Okuyama S, Minami S, Shimada N, Makihata N, Nakajima M, Furukawa Y. Anti-inflammatory and neuroprotective effects of auraptene, a citrus coumarin, following cerebral global ischemia in mice. Eur J Pharmacol. 2013;699(1-3):118-23. DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.11.043
39. Etemad L, Zamani M, Iranshahi M, Roohbakhsh A. The protective effect of auraptene against oxidative stress and pentylenetetrazol-induced chemical kindling in mice. Iran J Pharm Res. 2019;18(3):1395-1402. DOI: 10.22037/ijpr.2019.1100747
40. Ghanbarabadi M, Iranshahi M, Amoueian S, Mehri S, Motamedshariaty VS, Mohajeri SA. Retraction notice to "Neuroprotective and memory enhancing effects of auraptene in a rat model of vascular dementia: Experimental study and histopathological evaluation" [Neurosci Lett. 623 (2016) 13-21]. Neurosci Lett. 2024;843:138002. DOI: 10.1016/j.neulet.2016.04.047
41. Kawabata K, Murakami A, Ohigashi H. Citrus auraptene targets translation of MMP-7 (matrilysin) via ERK1/2-dependent and mTOR-independent mechanism. FEBS Letters. 2006;580(22):5288-94. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.08.072