Sport Physiology **Volume 15, No 58, 2023, Page 125-148**

Research Paper

Neuroprotective Effect of the Combination of Aerobic Exercise and Adenosine on the A2A Receptor Gene Expression and Complications of Cerebral Stroke in the Hippocampus of adult Male Rat

S. Ramezani[1], M. Moazami[2], N. Bijeh[3], A. Rashid Lamir[4]

Received: 2023/09/03 **Accepted: 2023/12/02**

Abstract

Objectives: Stroke is a neurological disorder and the second leading cause of death worldwide. Recently, studies on neuroprotective treatments for stroke have become a hot topic globally. The present study aimed to investigate the effect of a combination of aerobic exercise and adenosine on the expression of the A2a receptor gene and the consequences of stroke injury in the hippocampus of male rat. **Materials and Methods**: 50 male Wistar rats (8-10 weeks old, weighing 240-270 grams) were randomly divided into five groups: (sham, control+ischemia, ischemia+exercise, ischemia+adenosine, and ischemia+adenosine +exercise). After inducing ischemia, rats ran on a treadmill five days per week according to the training protocol. This exercise started at a speed of 20 meters per minute with a zero slope for 18 minutes in the first week and, following the principle of gradual increase, reached a speed of 30 meters per minute with a slope of 10 degrees for 50 minutes in the eighth week. Adenosine (0.3 mg/kg) once per day to Adenosine-treated groups were injected. 48 hours after completing the exercise protocol, the rats were euthanized, and hippocampal tissue was collected for cell death, examined by Nissel tissue staining and measuring of the A2a gene expression using the RT- PCR method. The data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) and post hoc Bonferroni's test. **Results**: The number of dead cells increased in the ischemia group compared to the sham and decreased in the ischemia+adenosine+exercise and ischemia+exercise groups compared to the ischemia group. The A2a expression in group ischemia+adenosine+exercise, ischemia+exercise, and ischemia+adenosine showed respectively the highest increase, with a significant difference compared to the sham (P<0/001) and control+ischemia (P<0/001) groups. **Conclusion**: Aerobic exercise and adenosine, interacting together as a neuroprotective compound, can serve as a neuroprotective combination by increasing the expression of the A2a receptor gene and

1. Email: saeedramezani_pnubujnord@yahoo.com
2. Email: moazami@um.ac.ir
3. Email: bijeh@um.ac.ir
4. Email: rashidlamir@um.ac.ir

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

stimulating the signaling and mechanisms related to the reduction of cell death, providing therapeutic and protective effects against ischemic stroke-induced consequences.

Keywords: Neuroprotective; Adenosine; A2a Receptor; Cerebral stroke; Aerobic Exercise; Hippocampus.

Extended Abstract

Background and Purpose

Stroke is one of the main causes of neurological disability worldwide and the second cause of death, with high social and economic burden (1). Research on neuroprotective therapy for cerebral ischemia has been a hot topic worldwide (2, 3). Numerous studies have demonstrated that exercise can produce protective effects on cerebral ischemia, and that exercise may protect the integrity of the blood-brain barrier, promote neovascularization, reduce neuronal apoptosis, and eventually lead to an improvement in neurological function after cerebral ischemia. (4, 5). Additionally, numerous authors have proposed adenosine and its receptors (A1, A2A, A2B, and A3ARs) as an important target for therapeutic implementation in the treatment of stroke (6). Among them, stimulation of A2A has been reported to reduce the secretion of proinflammatory cytokines in various neurological disease conditions (7). In recent years, it emerged that both central and peripheral A2A receptors play important roles at different times of brain ischemia (6, 7). Therefore, the aim of this study was to investigate the neuroprotective effect of the combination of aerobic exercise and adenosine on the A2AR gene expression and complications of cerebral stroke in the hippocampus of an adult male rat.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Animals

Fifty adult male Wistar rats (8-10 weeks old, weighing 240-270 grams) were randomly distributed into five groups, including the sham (n = 10), control+ischemia (n = 10), ischemia+exercise (n = 10), ischemia+adenosine (n = 10), and ischemia+adenosine+exercise (n = 10). The experimental groups received a subcutaneous injection of adenosine (0.3 mg/kg of body weight) for 3 h before the test. For 3 days before the experiment, the rats were housed under controlled room temperature (approximately 22±3◦C), with a relative humidity of approximately 55/7±3%, and a 12 h light-12 h dark cycle (07:00 a.m. to 19:00 p.m.) with sufficient access to food and water. Exercise protocol consisted of acclimatized treadmill training for 3 days at speeds of 15m/min, 10-15 min/day,

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

at an inclination of 0°, and subsequently, formal treadmill running, 5 days per week, started at 20 m/min, at an inclination of 0° for 18 minutes and increased by the end of the 8 week, reaching a maximum of 30 m/min, at an inclination of 10°, 50 min/day. The entire pretreatment was conducted at room temperature during the daytime. Animals in the non-exercise groups were left on the treadmill for the same period of time without running. No electrical shock or aversive stimuli were present and the treadmill was designed to prevent the animals from falling off. Relative gene expression was quantified by the Livak method (2-ΔΔCT). SPSS26 software was applied for data analysis. Data were analyzed by one-way ANOVA, followed by Bonferroni's post hoc analysis for comparisons among groups and at the significance level of $p \leq 0.05$.

Transient global ischemia induction

A bilateral neck incision was made after anesthetizing the gerbils with ketamine (60 mg/kg body weight) and xylazine (4-5 m/kg body weight). Then two common carotid arteries were exposed and closed using arterial clamps for 45 minutes. After removing the clamps, a five-minute period of re-establishment of blood flow in the carotid arteries began, which was confirmed by observation, and after re-perfusion, the wounds were sutured. During the surgery, the rectal temperature of the rats was maintained at 36.5±0.5 degrees centigrade using a feedback heating system. After surgery, the animals were returned to their cages with free access to food and water.

Treatment

Based on preliminary data and previous studies, adenosine drug (Wockhardt Company, Ukraine) at the rate of 0.3 mg/kg of body weight was injected intraperitoneally (IP) three hours before exercise to ischemia+adenosine and ischemia+adenosine+exercise groups. The control group was also injected with normal saline in the same amount and method.

Findings

The results of Nissel staining showed more death of hippocampal CA1 neuronal cells in the ischemia group compared to the sham group and a decrease in cell death in the ischemia+exercise+adenosine, ischemia+exercise, and ischemia+adenosine groups compared to the ischemia group ($P<0.05$). The results of the analysis of variance for gene expression in the experimental groups showed statistically significant differences among the 5 groups. Figure (3), used for inter-group comparisons with the post hoc Bonferroni test, demonstrated that gene expression of A2A in the group of ischemia+adenosine+exercise differed

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

significantly from that in the sham and control groups, but not from the groups of ischemia+exercise and ischemia+adenosine. The group of ischemia+exercise showed significant differences from the sham and ischemic control groups, but not from the groups of ischemia+adenosine+exercise and ischemia+adenosine. Additionally, the group of ischemia+adenosine showed no significant differences from the groups of ischemia+adenosine+exercise and ischemia+exercise, but displayed significant differences compared to the sham and ischemic control groups. In this study, the groups of ischemia+adenosine+exercise, ischemia+exercise, and ischemia+adenosine exhibited the highest A2A gene expression.

Conclusion

The beneficial effects of aerobic exercise and adenosine, following multiple analyses and controlling for risk factor changes, were observed. It has been reported that low-intensity aerobic exercise and various pharmacological compounds increase AMPK activity in the hippocampus of animals in ischemia/hypoxia conditions. AMPK leads to increased expression of HIF-1α and target genes like HIF-1α, including the enzyme acto-5 nucleotidase, a key enzyme in saffron production, and A2AR, resulting in improved neurological outcomes after ischemic stroke. The results of this study also suggest that eight weeks of aerobic exercise and adenosine injection can effectively improve the consequences of cerebral infarction. When used independently or in a neuroprotective combination after ischemic stroke, they exhibit multiple protective effects due to increased A2AR gene expression and associated signaling mechanisms, potentially serving as effective strategies to mitigate cerebral consequences of ischemic stroke. This effect may be due to the impact of exercise and adenosine on the regulation of genes influencing angiogenic and biogenic regulators, glutamatergic and GABAergic neurotransmitters, and brain cell function. However, further studies are required to validate these findings. It is recommended to investigate different doses of adenosine simultaneously in future research. Moreover, using various endurance exercise parameters may provide more accurate insights into the effects of exercise on these variables.

Article Message

The message of the article suggests that if the positive effects observed in this study are replicated in human subjects, aerobic exercise as a non-pharmacological A2AR agonist and adenosine as a pharmacological A2AR agonist can synergistically contribute to effective therapeutic interventions for reducing the effects of cerebral infarction.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

Conflict of Interest

In the current research, there is no conflict of interest with any particular person or organization.

Author Contributions

All authors contributed to the design, execution, and writing of all sections of the present research.

References

1. Mollet I, Marto JP, Mendonça M, Baptista MV, Vieira Helena LA. Remote but not Distant: a Review on Experimental Models and Clinical Trials in Remote Ischemic Conditioning as Potential Therapy in Ischemic Stroke. Molecular Neurobiology. 2022 Jan; 59(1):294–325. https://doi.org/10.1007/s12035-021-02585-6
2. Daniele, S. G., Trummer, G., Hossmann, K. A., Vrselja, Z., Benk, C., Gobeske, K. T., et al. Brain vulnerability and viability after ischemia. Nat. Rev. Neurosci. 2021; 22, 553–572. doi:10.1038/s41583-021-00488-y
3. Wang, Y., Reis, C., Applegate, R. II, Stier, G., Martin, R., and Zhang, J. H. Ischemic conditioning-induced endogenous brain protection: applications pre-, per- or post-stroke. Exp. Neurol. 2015; 272, 26–40. doi: 10.1016/j.expneurol. 2015.04.009
4. Zhang H, Xie Q, Hu J. Neuroprotective Effect of Physical Activity in Ischemic Stroke: Focus on the Neurovascular Unit. Front. Cell. Neurosci. 2022 Mar; 16:860573 jayegozin 18 beshe. https://doi.org/10.3389/fncel.2022.860573
5. Liebelt B, Papapetrou P, Ali A, Guo M, Ji X, Peng C, et al. Exercise preconditioning reduces neuronal apoptosis in stroke by up-regulating heat shock protein-70 (heat shock protein-72) and extracellular-signal-regulated kinase 1/2. Neuroscience. 2010 Apr; 14; 166(4):1091-100
6. KO I-G, Jin J-J, Hwang L, Kim S-H, Kim C-J, Jeon JW, et al. Adenosine A2A receptor agonist polydeoxyribonucleotide ameliorates short-term memory impairment by suppressing cerebral ischemia-induced inflammation via MAPK pathway. PLoS ONE. 2021 Mar; 16(3): e0248689. https://doi.org/ 10.1371/journal.pone.0248689
7. Zhou Y, Zeng X, Li G, Yang Q, Xu J, Zhang M, et al. Inactivation of endothelial adenosine A2A receptors protects mice from cerebral ischemia-induced brain injury. Br J Pharmacol. 2019; 176(13):2250–63. http://doi.org/10.1111/bph.14673 PMID: 30931525 RESEARCH ARTICLE

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

فیزیولوژی ورزشی دوره ۱۵ ، شماره ۵۸، تابستان ۱۴۰۲ .صص ۱۴۸-۱۲۵

مقالهٔ پژوهشی

اثر نوروپروتکتیو ترکیب تمرین هوازی و آدنوزین بر بیان ژن گیرندهٔ A2a و عوارض ناشی از سکتهٔ مغزی در هیپوکامپ موش صحرایی نر بالغ

سعید رمضانی[۱]، مهتاب معظمی[۲]، ناهید بیژه[۳]، امیر رشیدلمیر[۴]

۱. دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۲. دانشیار گروه فیزیولوژی ورزشی ، دانشکده علوم ورزشی ، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران (نویسنده مسئول)
۳. دانشیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۴. استاد گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۱۱

چکیده

سکتهٔ مغزی نوعی اختلال نورولوژیک و دومین عامل مرگ‌ومیر در جهان است. به‌تازگی مطالعه درباره درمان نوروپروتکتیو سکته به بحثی داغ در جهان تبدیل شده است. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر نوروپروتکتیو ترکیب تمرین هوازی و آدنوزین بر بیان ژن گیرنده A2a و عوارض ناشی از سکته مغزی در هیپوکامپ موش نر صحرایی انجام شد. پنجاه سر موش نر بالغ نژاد ویستار (سن ۱۰-۸ هفته، وزن ۲۷۰-۲۴۰ گرم) به‌صورت تصادفی در پنج گروه (شم، کنترل+ایسکمی، ایسکمی+تمرین، ایسکمی+آدنوزین و ایسکمی+آدنوزین+تمرین) تقسیم شدند. پس از القای ایسکمی، موش‌ها طبق پروتکل تمرین پنج روز در هفته روی تردمیل دویدند که این تمرین با سرعت ۲۰ متر در دقیقه با شیب صفر به‌مدت ۱۸ دقیقه در هفته اول شروع شد و با رعایت اصل افزایش تدریجی به‌سرعت ۳۰ متر در دقیقه با شیب ۱۰ درجه به‌مدت ۵۰ دقیقه به هفته هشتم رسید. آدنوزین (۰/۳ mg/kg) یک‌بار در روز به گروه‌های درمان‌شده آدنوزین تزریق شد. ۴۸ ساعت پس از اتمام پروتکل تمرینی، موش‌ها کشته شدند و بافت هیپوکامپ برای بررسی مرگ سلولی به روش نیسل و بیان ژن A2a به‌روش Real time PCR برداشته شد. داده‌ها با آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و**

1. Email: saeedramezani_pnubujnord@yahoo.com
2. Email: moazami@um.ac.ir
3. Email: bijeh@um.ac.ir
4. Email: rashidlamir@um.ac.ir

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

آزمون تعقیبی بونفرونی تجزیه و تحلیل شد. تعداد سلول‌های مرده در گروه ایسکمی در مقایسه با گروه شم افزایش یافت و در گروه‌های ایسکمی+تمرین+آدنوزین و ایسکمی+تمرین در مقایسه با گروه ایسکمی کاهش یافت. بیان ژن A2a در گروه‌های ایسکمی+آدنوزین+تمرین، ایسکمی+تمرین و ایسکمی+آدنوزین به‌ترتیب بیشترین افزایش را داشت؛ به‌گونه‌ای‌که در مقایسه با گروه شم (P<0.001) و گروه کنترل+ایسکمی (P<0.001) معنادار بود. تمرین هوازی و آدنوزین در تعامل با هم به‌صورت یک ترکیب نوروپروتکتیو می‌توانند با افزایش بیان ژن گیرنده A2a و تحریک سیگنالینگ و مکانیسم‌های مرتبط با کاهش مرگ سلولی، اثر درمانی و محافظتی بر عوارض ناشی از سکته داشته باشند.

واژگان کلیدی: نوروپروتکتیو، آدنوزین، گیرنده A2a، سکته مغزی، تمرین هوازی، هیپوکامپ.

مقدمه

سکتهٔ مغزی نوعی اختلال نورولوژیک است و در اثر فقدان خون‌رسانی به قسمتی از بافت مغز ایجاد می‌شود. سکته دومین عامل مرگ‌ومیر (۵-۱) و یکی از خطرناک‌ترین (۶) و ناتوان‌کننده‌ترین بیماری‌ها با آثار اجتماعی-اقتصادی گسترده در دنیا است (۴) که البته هنوز ماهیت آن مبهم است و سازوکار دقیق آن کشف نشده است (۶). در جهان سالانه ۵.۵ میلیون نفر به علت سکته مغزی دچار مرگ می‌شوند (۱). ۸۵ درصد از سکته‌های مغزی توسط ایسکمی و ۱۵ درصد به‌واسطه هموراژی[1] به‌وقوع می‌پیوندد (۴). در سکته ایسکمیک که با شروع حاد اختلالات نوروژنیک به‌مدت حداقل ۲۴ ساعت مشخص می‌شود (۷، ۵)، جریان خون مغزی به دلیل انسداد عروق خونی قطع می‌شود (۴، ۲، ۱) و فرایندی بسیار پیچیده در سطح سلول و بافت شروع می‌شود که به‌اصطلاح آبشار ایسکمیک نامیده می‌شود و منجر به آسیب بافتی و بروز سکته ایسکمیک می‌شود (۷). سکته مغزی روند کلی بسیار پیچیده‌ای دارد و با تغییرات متنوع پاتوفیزیولوژیک ازجمله کاهش نورون‌ها، التهاب، آدم مغزی، آپوپتوز، ضعف سیستم ایمنی، اختلال در حافظه و عملکرد سیناپسی همراه است (۲)؛ ازاین‌رو درمان با عوامل چندمنظورهٔ درون‌زا گزینهٔ بهتری برای جلوگیری از تشدید آسیب‌های سکته است. به‌تازگی نیز مطالعه درباره درمان نوروپروتکتیو سکته مغزی بحثی داغ در جهان شده است (۸، ۱). درک مکانیسم‌ها و یافتن یک دارو یا ترکیب نوروپروتکتیو مؤثر برای ایجاد نوروپروتکشن در مقابل این بیماری و به‌ویژه شناسایی مکان‌های هدف جدید برای درمان، توان‌بخشی، محافظت و جلوگیری از بروز مجدد سکته، ضروری به نظر می‌رسد.

1. Hemorrhage

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

ورزش‌درمانی با هدف بهبود ناتوانی‌های جسمی پس از سکته ایسکمیک مدت‌هاست به‌عنوان کاندیدای منطقی برای توان‌بخشی عصبی در نظر گرفته شده است (۸) و بسیاری از مطالعات اثرات نوروپروتکتیو و مثبت فعالیت ورزشی بر عملکرد هیپوکامپ را در مدل‌های حیوانی با محافظت از مغز در برابر اختلالات نوروژنیک نشان داده‌اند (۹، ۱). ازجمله این اثرات، افزایش بقا سلول‌های عصبی، کاهش اختلالات عصبی، بهبود سد خونی مغزی، نگهداری سیستم عصبی-عروقی و بهبود اختلال عملکرد پس از سکته مغزی ایسکمیک است (۱۰، ۶). یانگ[1] و همکاران طی مطالعه‌ای مشاهده کردند که سه هفته دویدن روی تردمیل به‌مدت پنج روز در هر هفته، اختلالات عملکرد نورونی و همچنین حجم انفارکتوس را در موش صحرایی دچار ایسکمی کاهش می‌دهد (۱۱). ژانگ[2] و همکاران نشان دادند که دویدن روی تردمیل حیوانات پس از ایسکمی/رپرفیوژن مغزی، حفاظت عصبی درخورتوجهی را از طریق کاهش گلوتامات و بهبود آدم مغزی و ضایعات مغزی ایجاد می‌کند (۶). در مطالعه‌ای دیگر بر موش‌های صحرایی که فعالیت ورزشی انجام داده بودند، کاهش حجم انفارکت و آدم مغزی و نتایج نورولوژیک بهتر پس از ۶۰ دقیقه ایسکمی مغزی گزارش شد (۱۲). با توجه به نتایج مطالعات اثر نوروژنیک ورزش در مغز به ناحیه هیپوکامپ محدود می‌شود و تمرینات ورزشی می‌تواند از طریق کم‌خونی موقتی در طولانی‌مدت نوروژنز و آنژیوژنز را در بافت‌ها افزایش دهد (۸)؛ با وجود این، هنوز اطلاعات دقیقی درمورد نوع، مدت و شدت فعالیت ورزشی و مکانیسم‌های دقیق مرتبط که می‌تواند موجب حفاظت عصبی شود، موجود نیست.

گروه دیگری از مطالعات، یافتن دارویی جدید درخصوص ایسکمی مغزی را ضرورت دانسته‌اند (۱۴، ۱۳). ناحیه CA1 هیپوکامپ یکی از حساس‌ترین نواحی مغز نسبت به ایسکمی است (۹) که بعد از ۱۵ دقیقه انسداد شریان کاروتید مشترک خسارات چشمگیری در این ناحیه ایجاد می‌شود (۴). اعتقاد بر این است که آدنوزین از ایسکمی/ هیپوکسی مغزی جلوگیری می‌کند و به‌عنوان عامل درمانی پس از سکته ایسکمیک، میزان آسیب را کاهش می‌دهد و کاندیدای اصلی برای محافظت از عصب معرفی شده است (۱۶، ۱۵). آدنوزین میانجی فیزیولوژیک و عامل محافظت‌کننده عصبی درون‌زای قوی است که تقریباً از تمام بافت‌ها و اندام‌های حاضر در پستانداران ترشح می‌شود (۱۷، ۱۶).

بیان شده است که بعد از گذشت ۱۵ دقیقه از القای ایسکمی، سطح خارج سلولی آن که از آدنین نوکلئوتیدهای رهاشده از سلول‌ها مشتق می‌شود، افزایش پیدا کرده و اثرات حفاظتی خود را اعمال

1.Yang
2. Zhang

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

می‌کند (۱۸). حدود بیست سال است که آدنوزین به علت اثراتش بر کاهش رهایش گلوتامات، کاهش مقادیر $Ca2^{+}$ داخل سلولی و هیپرپلاریزاسیون مستقیم سلول‌های عصبی، به‌عنوان ترکیب محافظت-کننده سیستم عصبی شناخته می‌شود (۲۰، ۱۹). با توجه به دخالت آدنوزین در شرایط مختلف پاتولوژیک، هدف قرار دادن زیرگروه‌های خاص گیرنده آدنوزین در عروق با استفاده از آگونیست‌ها یا آنتاگونیست انتخابی گیرنده‌های آدنوزین، می‌تواند منافع درمانی بالقوه در درمان سکته مغزی داشته باشد (۲۲، ۲۱). اضافه‌کردن مقادیر کم آدنوزین به فضای خارج سلولی غلظت آن را افزایش می‌دهد و حفاظت عصبی-عروقی را ایجاد می‌کند (۲۳). آدنوزین چندین جنبه از عملکردهای بافتی را از طریق فعال‌کردن چهار گیرنده متصل به پروتئین G تنظیم می‌کند. گیرنده‌های آدنوزین شامل فعال-کننده‌ها (A2a, A2b) و مهارکننده‌های (A1,A3) آدنیلات سیکلاز است (۲۴، ۲۲، ۲۱). گیرنده A2a مهم‌ترین گیرنده آدنوزین است که توزیع بسیار گسترده‌ای در هیپوکامپ دارد و بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک را در مغز تنظیم می‌کند. براساس بررسی‌های پیشین، اتساع شریان‌های پارانشیم مغز توسط آدنوزین، اساساً به‌واسطه فعال‌شدن گیرنده A2a آدنوزینی ایجاد می‌شود و نشان داده شده است که تحریک گیرنده A2a باعث کاهش عملکرد سایتوکین‌های پیش‌التهابی در انواع بیماری‌های نورولوژیک می‌شود (۲۴، ۲۱، ۱۷، ۹). پاپالی و پپونی[1] در تحقیقی اظهار کردند که گیرنده‌های A2a یکی از مهم‌ترین گیرنده‌های آدنوزین است که در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک مغزی دخیل است و اثرات بالقوه نوروپروتکتیو و نوروتوکسی دارد (۲۵). همچنین فریدهولم[2] مطرح کرد که آدنوزین در شرایط مختلف استرسی افزایش می‌یابد و از طریق گیرنده‌های A1، A3 ، A2a و A2b با افزایش عرضه اکسیژن/ نسبت به تقاضا، پیش‌آماده‌سازی، اثرات ضدالتهابی و تحریک رگ‌سازی، اثرات محافظتی درمقابل سکته ایسکمیک اعمال می‌کند. این محقق بیان کرد که گیرنده‌های آدنوزین ممکن است مکمل مفیدی در بسیاری از روش‌های درمانی باشند (۲۶). همچنان نقش گیرنده‌های A2a آدنوزین در ایسکمی مغزی کمتر شناخته شده است. از طرفی سکته مغزی واقعه ناگهانی است که پیشگیری از وقوع آن همیشه امکان‌پذیر نیست، حتی اگر عوامل خطرساز آن شناسایی شوند. به‌علاوه به دلیل فرصت درمانی محدود سکته مغزی و فرایند پاتوفیزیولوژیک پیچیده این بیماری، استفاده از تنها یک عامل در درمان این بیماری ایده‌آل به نظر نمی‌آید؛ بنابراین انجام مطالعه برای یافتن ترکیبات و روش‌های مؤثر در درمان سکته و شناسایی مکانیسم‌های محافظت عصبی ناشی از

1. Popoli & Pepponi
2. Fredholm

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

تعامل تمرین ورزشی و داروی آدنوزین به‌صورت اگزوژنیک (دارو درمانی) به‌ویژه در ارتباط با مرگ نورون‌ها در ناحیه CA1 هیپوکامپ که به ایسکمی حساس‌ترند، می‌تواند از مباحث اساسی در حوزه درمان و توان‌بخشی این بیماری باشد؛ بنابراین هدف مطالعه حاضر، بررسی اثر نوروپروتکتیو ترکیب تمرین هوازی و آدنوزین بر بیان ژن گیرنده A2a و عوارض ناشی از سکته مغزی در هیپوکامپ موش صحرایی نر بالغ بود.

روش پژوهش

پژوهش حاضر از نوع تجربی با گروه کنترل بود. در این پژوهش ۵۰ سر موش صحرایی نر بالغ (۱۰-۸ هفته) نژاد ویستار با محدوده وزنی ۲۷۰-۲۴۰ گرم که از انستیتو پاستور آمل خریداری شده بودند، به‌عنوان حجم نمونه به‌صورت تصادفی در پنج گروه آزمایشی اصلی (تعدادهر گروه=۱۰) مطالعه شدند: ۱. شم، ۲. کنترل+ایسکمی، ۳. ایسکمی+تمرین، ۴. ایسکمی+آدنوزین و ۵. ایسکمی+آدنوزین+تمرین. حجم نمونه براساس نتایج مطالعات گذشته تعیین شد. سالم‌بودن حیوانات، شباهت نژادی، سنی و وزنی آزمودنی‌ها به دلیل همگن‌سازی گروه‌ها، معیارهای ورود به پژوهش بودند. علت انتخاب موش نر، ساده‌تربودن سیستم هورمونی و تداخل کمتر هورمون‌های جنسی با داروها بود. در این پژوهش با توجه به سیاست‌های حمایت از حیوانات (بر اساس خط‌مشی‌های قرارداد هلسینگی) تمام آزمایش‌های مربوط انجام شد و قوانین راهنمای انستیتوی ملی سلامت در نگهداری حیوانات آزمایشگاهی نیز رعایت شد. این پژوهش با تأیید کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد با کد IR.UM.REC.1398.151 تصویب شد.

روش نگهداری و تغذیه: به‌منظور کاهش استرس و عادت به شرایط، یک هفته پیش از شروع طرح، حیوانات در آزمایشگاهی با دمای محیطی ۳±۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۳±۵۵/۷ درصد و چرخه روشنایی/تاریکی ۱۲: ۱۲ ساعته (۷ صبح روشنایی و ۷ شب خاموشی) با تهویه مناسب در داخل قفسه‌های از جنس پلی‌کربنات شفاف مخصوص جوندگان با درپوش فلزی (طول ۳۰، عرض و ارتفاع ۱۵ سانتی‌متر) که با تراشه‌های تمیز چوب کف آن‌ها پوشانده شده بود، نگهداری شدند. آب موردنیاز به‌صورت آزاد در بطری‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری ویژه حیوانات آزمایشگاهی در دسترس بود و به ازای هر ۱۰۰ گرم از وزن هر موش، پنج گرم غذا براساس وزن‌کشی هر هفته یک‌بار، در قفس قرار داده می‌شد.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

روش القای سکته ایسکمیک: ابتدا موش‌ها با تزریق داخل‌صفاقی ترکیبی از کتامین[1] (۶۰mg/kg) (شرکت Rotexmedica، آلمان) و زایلازین[2] (۴-۵ mg/kg) (شرکت Alfasan، هلند) بی‌هوش شدند. سپس شریان کاروتید مشترک دوطرف (Common Carotid Artery, CCA) از صفحه کاروتید خود آزاد شد و عصب واگ به‌دقت از شریان کاروتید جدا شد و به‌مدت ۴۵ دقیقه با استفاده از کلمپ‌های شریانی مسدود شد (۲۷). پس از برداشتن کلمپ‌ها، یک دوره برقراری مجدد جریان خون پنج‌دقیقه‌ای در شریان‌های کاروتید آغاز شد که با مشاهده تأیید شد و پس از خون‌رسانی مجدد زخم‌ها بخیه شدند. در طول عمل جراحی، درجه حرارت مقعدی رت‌ها با استفاده از یک سیستم گرمایش تنظیم بازخوردی در ۰/۵±۳۶/۵ درجه سانتی‌گراد حفظ شد. حیوانات پس از عمل جراحی با دسترسی آزاد به آب و غذا به قفس خود بازگردانده شدند.

پروتکل تمرین هوازی: موش‌های گروه‌های تمرینی قبل از شروع برنامه ورزشی اصلی، سه جلسه با سرعت ۱۵ متر در دقیقه با شیب صفر به‌مدت ۱۵-۱۰ دقیقه به‌عنوان مرحله آشنایی با نوارگردان و با هدف برنامه‌ریزی دقیق‌تر با توجه به پروتکل استاندارد (۲۸) ویژه موش‌های نر ویستار، تمرین کردند. مرحله گرم‌کردن شامل پنج دقیقه دویدن با شدت ۱۵ متر در دقیقه بود. سپس پروتکل اصلی تمرین هوازی پنج روز در هفته با سرعت ۲۰ متر در دقیقه با شیب صفر به‌مدت ۱۸ دقیقه در هفته اول شروع شد و با رعایت اصل افزایش تدریجی، شدت، مدت و شیب تمرین به‌طور فراینده افزایش یافت تا به‌سرعت ۳۰ متر در دقیقه با شیب ۱۰ درجه به‌مدت ۵۰ دقیقه در هفته هشتم رسید. در انتهای هر جلسه نیز دویدن به‌مدت سه دقیقه با شدت ۱۰ متر در دقیقه به‌عنوان مرحله سردکردن انجام شد. در هفته آشنایی با نوارگردان برای شرطی‌سازی موش‌ها از ترکیب شوک الکتریکی، مالیدن و لمس‌کردن دم برای اجرای تمرین استفاده شد، ولی در دوره تمرین اصلی پژوهش برای از بین بردن اثر استرس شوک الکتریکی فقط از لمس‌کردن و مالیدن دم برای انجام تمرین استفاده شد. همچنین به‌منظور رعایت شرایط محیطی یکسان برای همه رت‌ها، هم‌زمان با گروه تمرینی و در زمان مشابه، موش‌های گروه‌های بدون تمرین در معرض نوارگردان روشن بدون حرکت قرار گرفتند.

پروتکل تزریق آدنوزین: داروی آدنوزین (شرکت Wockhardt کشور اوکراین) به میزان ۰/۳ mg/kg از وزن بدن روزانه به‌صورت زیرصفاقی (IP) سه ساعت قبل از تمرین به گروه‌های ایسکمی+آدنوزین و

1. Ketamine
2. Xylazine

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

ایسکمی+آدنوزین+تمرین تزریق شد. به گروه کنترل نیز به مقدار و روش مشابه نرمال سالین تزریق شد. الگوی حجم تزریق و مدت‌زمان آن، بر پایه پژوهش‌های قبلی و نیز پاسخ دوز دارویی بود (۹).

تهیه نمونه بافتی و رنگ‌آمیزی نیسل: برای بررسی میزان آسیب و مرگ سلولی با روش رنگ‌آمیزی نیسل در مرکز هیستوژنوتک تهران، پس از بی‌هوشی عمیق با پرفیوژن داخل قلبی سرم فیزیولوژیک حاوی ۵۰ U/ml هپارین، بافر فسفات ۰/۱ مولار در پارافرمالدئید ۴ درصد، بافت مغز رت‌ها برداشته شد و به‌مدت ۲۴ ساعت به محلول تثبیت‌کننده مشابه منتقل شد. سپس مراحل آماده‌سازی بافتی انجام شد؛ قالب پارافینی از نمونه‌های مغز تهیه شد؛ با میکروتم روتاری مدل ۸۲۰ لایکا از آن‌ها برش‌های عرضی با ضخامت هفت میکرومتر تهیه شد و روی لام‌های سیلانه منتقل شد تا با محلول کرزیل فست ویوله ۰/۱ درصد رنگ‌آمیزی شود. از برش‌ها تصاویری با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ توسط میکروسکوپ نوری تهیه شد و در امتداد خطی به طول ۴۰۰ میکرومتر از ناحیه CA1 هیپوکامپ، توسط نرم‌افزار Imag J شمارش سلولی انجام شد (۲۴، ۲). در این بررسی سلول‌های مرده به شکل تیره و کاملاً نامنظم با هسته و هستک نامشخص قابل‌تشخیص است.

استخراج RNA و سنتز cDNA: برای بررسی بیان ژن A2a از تکنیک Real Time PCR استفاده شد. به‌منظور بررسی‌های مولکولی در سطح بیان ژن، ابتدا استخراج RNA از بافت‌ها در همه گروه‌های بررسی‌شده، طبق پروتکل شرکت سازنده (کیاژن، آلمان) انجام گرفت. ابتدا به تخمک‌ها ۳۰۰-۲۰۰ لاندا کیازول اضافه شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸۰- قرار گرفت. برای جلوگیری از تأثیر آهنگ شبانه‌روزی، نمونه‌گیری‌ها از ساعت ۷.۳۰ شروع شد و ساعت ۱۱ به پایان رسید. پس از یک دقیقه محلول با دور ۱۲۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از افزودن ایزوپروپرانول نمونه‌ها در سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. پس از خارج‌کردن از سانتریفیوژ مایع رویی تخلیه شد و روی آن یک سی‌سی الکل ۷۰ اضافه شد. پس از Vortex کردن، مخلوط در سانتریفیوژ به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۷۵۰۰ قرار گرفت. به‌منظور حل‌کردن RNA به میزان ۲۰ لاندا آب مقطر ۶۰ درجه روی پلاک داخل میکروتیوب ریخته شد. سپس کمی با سرسمپلر پیپتاژ و به‌مدت پنج دقیقه بر روی صفحه ۶۰ درجه قرار داده شد. پس از استخراج RNA با خلوص و غلظت زیاد از تمامی نمونه‌های مطالعه‌شده، مراحل سنتز cDNA طبق پروتکل شرکت سازنده (Fermentas, USA) انجام گرفت و سپس cDNA سنتزشده برای انجام واکنش رونویسی معکوس استفاده شد. پرایمرها به‌صورت لیوفیلیزه در دسترس قرار گرفتند. از تکنیک RT-qPCR برای تأیید بیان ژن مطالعه‌شده به‌صورت کمّی استفاده شد. به‌منظور تهیه cDNA تک‌رشته‌ای از پرایمر Oligo dt (MWG-Biotech, Germany) و آنزیم نسخه‌برداری معکوس شد (Fermentas) و براساس پروتکل مربوطه

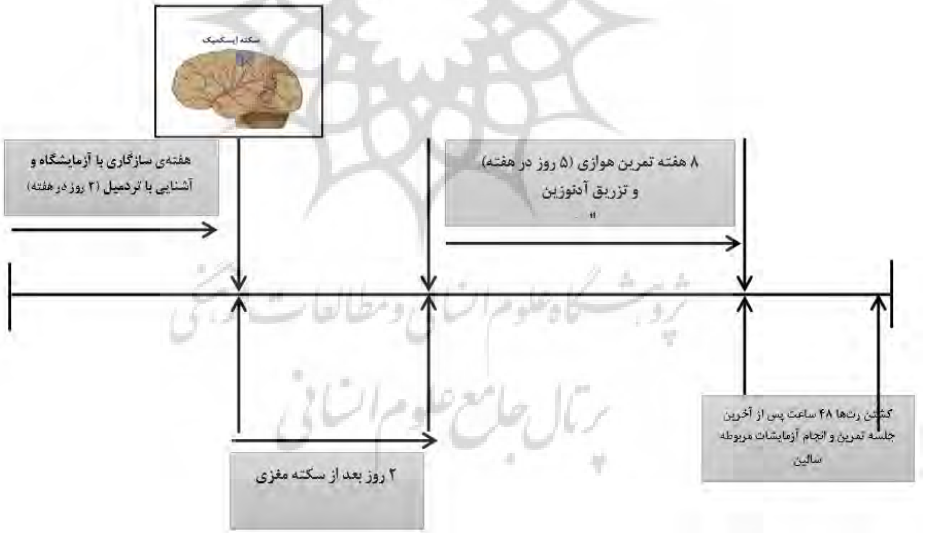
Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

انجام شد. نسبت بیان ژن A2A، با روش مقایسه‌ای چرخه آستانه (Thereshold Cycle: CT) ارزیابی شد.

توالی پرایمرهای پژوهش به‌صورت زیر است:

Adenosine Receptor1 (A2a)
Forward: TCTAAATGCTGGGAGGTCAA
Adenosine Receptor1 (A2a)
Reverse: CTCACGGTGGTCCTTTGTTG
SREBP1-c Forward: AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG
SREBP1-c Reverse: CATACTCAGCACCAGCATCACC

پس از تحلیل آزمایشگاهی، از فرمول لیواک ($2^{-(\Delta\Delta CT)}$) برای fold change و تفاوت‌های بین‌گروهی هریک از شاخص‌ها با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و تفاوت‌های درون‌گروهی با آزمون تعقیبی بونفرونی بررسی شد. داده‌ها با نرم افزار اس‌پی‌اس‌اس[1] نسخه ۲۶ در سطح معناداری $P\leq0.05$ تجزیه و تحلیل شدند.



شکل ۱- مراحل اجرای پروتکل پژوهش

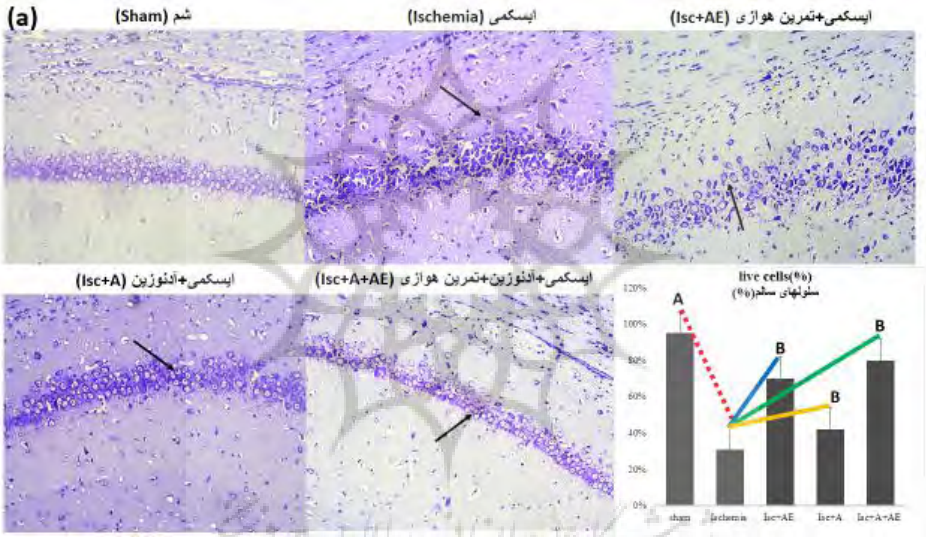
Figure 1- The stages of implementing the research protocol

1. SPSS

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

نتایج

بررسی درصد تغییرات (Δ%) وزن پیش و پس از آزمون، نشان از کاهش وزن بیشتر و معنادار در گروه ایسکمی+تمرین (۲/۱۸-) و ایسکمی+آدنوزین+تمرین (۲/۷۶-) داشت که احتمالاً تمرین هوازی و تزریق آدنوزین از طریق افزایش سوخت‌وساز، انرژی‌زایی و درنتیجه بهبود عملکرد هوازی باعث این کاهش در گروه‌های تمرینی شده است. نتایج رنگ‌آمیزی نیسل نیز مرگ بیشتر سلول‌های نورونی ناحیه CA1 هیپوکامپ در گروه ایسکمی در مقایسه با گروه شم و کاهش مرگ سلولی در گروه‌های ایسکمی+تمرین+آدنوزین، ایسکمی+تمرین و ایسکمی+آدنوزین در مقایسه با گروه ایسکمی را نشان داد ($P<0.05$) (شکل شماره دو-a و b).

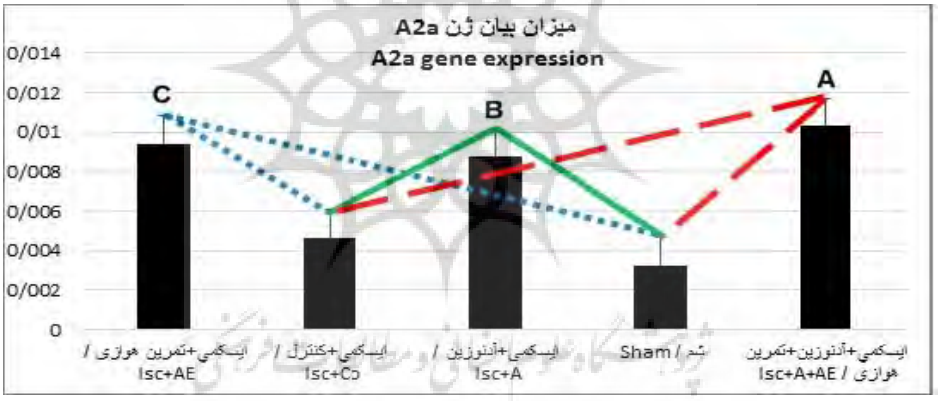


شکل ۲- (a). فتومیکروگراف‌های رنگ‌آمیزی نیسل در ناحیه CA1 متعاقب سکته ایسکمیک مغزی (فلش مشکی سلول‌های نورونی سالم را نشان می‌دهد)، (b). مقایسه درصد نورون‌های سالم ناحیه CA1 در گروه-های پنج‌گانه پژوهش پژوهش (A. مقایسه گروه شم با ایسکمی و B. اختلاف گروه‌های ایسکمی+آدنوزین+تمرین، ایسکمی+تمرین و ایسکمی+آدنوزین با گروه ایسکمی را نشان می‌دهد) ($P<0.05$).

Figure 2- (a). Photomicrographs of Nissel staining in the CA1 region following ischemia stroke (The black arrow shows healthy neurons). (b). Comparison of the percentage of healthy neurons in the CA1 region in the five research groups (A. shows the comparison of the sham group with ischemia, and B. shows the difference between the ischemia+adenosine+exercise, ischemia+exercise, and ischemia+adenosine groups with the ischemia group).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

نتایج تحلیل واریانس بیان ژن A2a آزمودنی‌ها در بین پنج گروه اختلاف معنادار آماری را نشان داد (P<0.001 و F=21.000). برای پیگیری اختلاف بین گروه‌ها از آزمون تعقیبی بونفرونی استفاده شد. نتایج نشان داد، بیان ژن A2a در گروه ایسکمی+آدنوزین+تمرین با گروه شم (P<0.001) و گروه کنترل (P<0.001) اختلاف معناداری داشت، اما با گروه‌های ایسکمی+تمرین (P=1.000) و ایسکمی+آدنوزین (P=1.000) اختلاف معناداری را نشان نداد. گروه ایسکمی+تمرین با گروه‌های شم (P<0.001) و کنترل+ایسکمی (P<0.001) اختلاف معنادار داشت، ولی با گروه‌های ایسکمی+آدنوزین+تمرین (P=1.000) و ایسکمی+آدنوزین (P=1.000) اختلاف معناداری نداشت. علاوه بر این، گروه ایسکمی+آدنوزین با گروه‌های ایسکمی+آدنوزین+تمرین (P=1.000) و ایسکمی+تمرین (P=1.000) تفاوت معناداری نداشت، اما در مقایسه با گروه‌های شم (P<0.001) و کنترل+ایسکمی (P=0.001) اختلاف معناداری را نشان داد. در این پژوهش گروه‌های ایسکمی+آدنوزین+تمرین، ایسکمی+تمرین و ایسکمی+آدنوزین به‌ترتیب بیشترین میزان بیان ژن A2a را نشان دادند (شکل شماره سه).



شکل ۳- تغییرات بیان ژن گیرنده A2a در موش‌های گروه‌های پنج‌گانه پژوهش (**A**- نشان‌دهنده تفاوت معنادار گروه ایسکمی+آدنوزین+تمرین (Isc+A+AE) با گروه شم و گروه کنترل+ایسکمی (Isc+Co)، **B**- نشان‌دهنده تفاوت معنادار گروه ایسکمی+تمرین (Isc+AE) با گروه شم و گروه کنترل+ایسکمی، **C**- نشان‌دهنده تفاوت معنادار گروه ایسکمی+آدنوزین (Isc+A) با گروه شم و کنترل+ایسکمی)

Figure 3- The relative gene expression changes graph for A2a in the five groups of the study revealed significant differences. (**A**- indicates significant difference between group ischemia+adenosine+exercise from the sham and control+ischemia groups. **B**- indicates significant difference between group ischemia+exercise from the sham and control+ischemia groups. **C**- indicates significant difference between group adenosine+exercise from the sham and control+ischemia).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

بحث و نتیجه‌گیری

مغز، بافتی ایستا نیست و سازش‌پذیری عملکردی، متابولیک و ساختاری آن در پاسخ به تقاضاهای تجربی و محیطی جالب‌توجه است (۲۹، ۶). سکته مغزی ایسکمیک کمترین درمان مؤثر را دارد و تاکنون استراتژی مؤثری برای معضل ایسکمی یافت نشده است؛ بنابراین در این مطالعه از ترکیب تمرین ورزشی و آدنوزین به‌عنوان یک استراتژی درمانی مناسب و جدید در نقش یک ترکیب نوروپروتکتیو استفاده شد. تجزیه و تحلیل یافته‌ها نشان داد که تمرین هوازی و آدنوزین به‌صورت مستقل یا به‌صورت تعاملی پس از القای سکته ایسکمی می‌توانند باعث افزایش معنادار بیان ژن گیرنده A2a و کاهش مرگ نورونی از نوع آپوپتوز در ناحیه CA1 هیپوکامپ حیوانات شوند. هیپوکامپ، ناحیه کلیدی در مغز است و آسیب آن پس از ایسکمی-ریپرفیوژن اختلال زیادی در عملکرد آن ایجاد می‌کند (۳، ۲). در این مطالعه تمرین هوازی برای کاهش عوامل خطرزا و حفاظت نورورنی بعد از سکته ایسکمی، وارد عمل می‌شود و از طریق افزایش غلظت آدنوزین تولیدی، اثر حفاظت نورونی درون‌زا ایجاد می‌کند که موجب زنده‌ماندن نورون‌ها درمقابل عوارض ناشی از سکته مغزی ایسکمیک خواهد شد (۱۰). نورون‌زایی در تمام قسمت‌های مغز اتفاق نمی‌افتد، اما در هیپوکامپ به‌شدت رخ می‌دهد (۳۰).

همسو با مطالعه حاضر، یافته‌های پژوهش ژانگ و همکاران نشان داد که ورزش به‌عنوان مانعی در مقابل آسیب‌های التهابی در هنگام رپرفیوژن مغزی عمل می‌کند (۶). میزوتانی[1] و همکاران در پژوهشی نشان دادند که فعالیت بدنی (پنج روز در هفته به‌مدت ۱۲ هفته) پس از سکته ایسکمی مغزی، به‌واسطه کالمودولین و افزایش فاکتور رشد عصبی نورون‌ها را قادر به دریافت مواد غذایی می‌کند؛ درنتیجه باعث تنظیم مجدد نورونی، کاهش آنفارکتوس در هیپوکامپ و بهبود عملکرد حرکتی می‌شود (۳۱). در مطالعه ژانگ و همکاران اجرای تمرین ورزشی (۳۰ دقیقه در روز، پنج روز در هفته، به‌مدت سه هفته) باعث افزایش جریان خون، کاهش حجم ضایعه مغزی، افزایش نوروپروتکتیو و ریکاوری سریع‌تر در موش‌های دچار ایسکمی مغزی شد (۳۲). کارول[2] و همکاران نیز بیان کردند که تمرین تردمیل با شدت کم باعث حفاظت نورون‌ها و آکسون‌ها از آسیب‌های اکسیتوتوکسیک می‌شود (۳۳). این محققان مهم‌ترین دلیل یافته‌های خود را افزایش جریان خون، بیان فاکتورهای تروفیک و شکل‌پذیری عصبی به دنبال ورزش دانستند (۳۴)؛ بنابراین به نظر می‌رسد اگرچه ما در مطالعه حاضر

1. Mizutani
2. Carrol

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

ژن‌های مرتبط با گیرنده A2a را بررسی نکردیم، برخی از مطالعات نشان دادند که این بهبود می‌تواند به دلیل سیگنالینگ و مکانیسم‌هایی باشد که در مطالعات آن‌ها بررسی شده است؛ با وجود این، نتایج برخی مطالعات نیز با مطالعه حاضر همسو نبود (۳۵، ۲۹، ۱۰). لیبلت[1] و همکاران به مطالعه اثر سه هفته تمرین ورزشی (به‌مدت پنج روز در هفته و هر روز ۳۰ دقیقه) بر کاهش اثرات ایسکمی در موش‌های دچار سکته مغزی پرداختند. نتایج نشان داد، مدت‌زمان بیشتر ورزش برای کاهش عوارض ناشی از سکته کافی نبود (۱۰). همچنین لیو[2] و همکاران در تحقیقی مشابه هیچ تغییری را در پروتئین‌های ضد آپوپتوز مشاهده نکردند (۲۹). به‌هرحال، تفاوت پروتکل تمرینی، نوع بافت و روش اندازه‌گیری آن، نوع موش‌ها و سالم و بیماربودن آن‌ها، اجباری یا داوطلبانه‌بودن تمرین و روش القای ایسکمی ممکن است بتوانند تفاوت نتایج را توجیه کنند.

اثرات مفید تمرینات ورزشی و آدنوزین، البته پس از تحلیل‌های چندگانه به‌همراه کنترل تغییرات عوامل خطرزا ملاحظه شده است. گزارش شده است که تمرینات هوازی با شدت کم، ایسکمی/هیپوکسی و بسیاری از ترکیبات دارویی/مواد مغذی موجب افزایش فعالیت AMPK در هیپوکامپ حیوانات می‌شود (۳۷، ۱۶)؛ بنابراین دوز مصرفی آدنوزین ممکن است نقش مهمی در نوع فعال‌شدن AMPK داشته باشد؛ زیرا آدنوزین هنگامی که در غلظت‌های فیزیولوژیک اضافه شود، AMPKرا فعال می‌کند و چون تولید آدنوزین به میزان استفاده از ATP بستگی دارد، در زمان ورزش تجمع آن افزایش می‌یابد (۱۹، ۳). AMPK موجب افزایش بیان HIF-1α و ژن‌های هدف HIF-1α همچون آنزیم اکتو۵-نوکلئوتیداز[3]، مهم‌ترین آنزیم تولیدکننده آدنوزین و گیرنده آن می‌شود و از این طریق نتایج نورولوژیک بهتری را پس از سکته ایسکمیک به همراه خواهد داشت (۳۸). هارت[4] و همکاران در تحقیقی نقش HIF-1α را در محافظت از ایسکمی به‌وسیله تأثیر آن بر القای مهم‌ترین آنزیم فعال‌کننده آدنوزین، اکتو 5-نوکلئوتیداز، و گیرنده A2 آدنوزین نشان دادند (۳۹). در مطالعه حاضر نیز به نظر می‌رسد به دلیل قطع گردش خون ناشی از ایسکمی و نیز اجرای تمرین هوازی، هایپوکسی در سلول‌های مغز تشدید می‌شود و باعث افزایش چشمگیری در بیان mRNA ژن HIF-1α (بیان نشد) و در ادامه افزایش غلظت آدنوزین و فعال‌شدن گیرنده‌های آن به‌ویژه A2a و درنتیجه کاهش مرگ سلولی از نوع آپوپتوز در گروه‌های تمرینی می‌شود.

1. Liebekt
2. Liu
3. 5-Ecto-Nucleotidase
4. Hart

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

یک مکانیسم احتمالی دیگر در زمینه قابلیت نوروپروتکتیو تمرین ورزشی و آدنوزین، القای رگ‌زایی است. رگ‌زایی‌درمانی که جزئی از روش‌های درمانی است، شامل رگ‌زایی تحریکی در بیماری‌های همچون سکته ایسکمیک است (۴۰). نشان داده شده است که رگ‌زایی به تسریع بهبود بیماری سکته مغزی در موش‌های مبتلا به ایسکمی منجر می‌شود (۴۱). ورزش نیز آثاری مثل انسداد گذرای شریان مرکزی (ایسکمی/ریپرفیوژن) دارد (۲۹). مطالعات نشان داد که ورزش با ایجاد استرس برشی در دیواره عروق از مسیر وابسته به NO باعث افزایش رگ‌زایی می‌شود (۴۲). NO با مهار کاسپاز-۳ و به کمک پروتئین S– نیتروزیلیشن[1]، به‌طور مستقیم و غیرمستقیم باعث مهار آپوپتوز ناشی از ایسکمی می‌شود (۴۳). گرتز و همکاران در تحقیقی بر حیوانات نشان دادند که چهار هفته فعالیت بدنی داوطلبانه از طریق فعال‌کردن AMPK و با افزایش نیتریک اکساید سنتاز (eNOS) رگ‌زایی در مغز را بهبود می‌دهد و باعث افزایش جریان خون مغزی می‌شود (۳۰). افزایش تراکم رگ‌های خونی مغز در واحد حجم باعث بلوک‌شدن مولکول چسبان بین سلولی و مهار تجمع نوتروفیل‌ها شده و درنهایت منجر به کاهش احتمال عوارض سکتهٔ مغزی می‌شود (۳). از طرفی ال گلوتامات یک ناقل مهم عصبی-تحرکی در سیستم عصبی مرکزی است که بیان شده است آزادسازی گلوتامات و استفاده از آنتاگونیست‌های آن اثر حفاظت عصبی دارد و به‌صورت بالقوه سبب افزایش مقاومت مغزی در مقابل ایسکمی می‌شود که احتمالاً آدنوزین یکی از این آنتاگونیست‌ها باشد (۴، ۲). ناحیه CA1 هیپوکامپ غنی از اعصاب گلوماتاترژیک[2] و گیرنده N–متیل–D-آسپارتات (NMDA) است. NMDA یک گیرنده یونوتروپیک[3] گلوتامات و یکی از اجزای اصلی سیستم گلوتاماترژیک است که با نوروژنز و پلاستیسیته سیناپسی مرتبط است. مطالعات نشان داد که فعالیت ورزشی بسیاری از نوروترانسمیترهای مغز ازجمله گلوتاماترژیک و گاباارژیک[4] را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد و با کاهش رهایش گلوتامات و افزایش بیان انتقال‌دهنده‌های گلوتامات، موجب مقاومت در برابر ضایعات مغزی و کاهش آسیب پس از سکته ایسکمیک و نیز بهبود نتایج آزمون‌های عملکردی می‌شود (۴۴، ۴). مدل‌های حیوانی نشان داد که اتصال گلوتامات به گیرنده NMDA در جسم مخطط از مرگ سلول‌های مغزی جلوگیری می‌کند (۸). ژانگ و همکاران نشان دادند که دویدن روی تردمیل حیوانات پس از ایسکمی/رپرفیوژن مغزی، حفاظت عصبی درخورتوجهی را از طریق کاهش گلوتامات، ادم مغزی و ضایعات مغزی ایجاد می‌کند

1. Protein s-nitrosylation
2. Glutamatergic
3. Ionotropic
4. Gaba-argic

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

(۴۵). مطالعه فینگ[1] و همکاران بر رت‌هایی که تحت‌تأثیر تمرین با تردمیل (۳۰ دقیقه در روز، شش روز در هفته، به‌مدت سه هفته) قرار داشتند، افزایش برداشت گلوتامات از فضای سیناپسی را پس از القای ایسکمی نشان داد (۴۶)؛ بنابراین در این پژوهش نیز افزایش بیان گیرنده A2a در گروه‌های تجربی احتمالاً توسط AMPK تحریک شده و باعث تجمع آدنوزین شده است. احتمالاً آدنوزین هم به‌عنوان آنتاگونیست گلوتامات موجب مهار فعالیت آنزیم نیتریک اکسید سنتتاز نورونی و به دنبال آن کاهش غلظت کلسیم درون‌سلولی از طریق مهار کانال‌های کلسیمی شده و با کاهش رهایش گلوتامات، مانع حساسیت‌زدایی و سمیت تحریکی آن در سیستم عصبی و درنتیجه کاهش آسیب‌های مغزی و آپوپتوز ناشی از سکته مغزی ایسکمیک می‌شود.

در مطالعه حاضر نتیجه برهم‌کنش و هم‌افزایی اثر پس‌تیمار تزریق آدنوزین و تمرین هوازی، حاکی از افزایش بیان ژن گیرنده A2a و کاهش مرگ سلول‌های نورونی ناحیه CA1 هیپوکامپ در گروه ایسکمی+آدنوزین+تمرین در مقایسه با گروه کنترل+ایسکمی و گروه شم بود؛ ازاین‌رو میزان آدنوزین برون‌زاد ناشی از تزریق آدنوزین ممکن است نقش تقویت‌کننده‌ای برای آدنوزین درون‌زاد تولیدی ناشی از ورزش هوازی داشته باشد و احتمالاً بر سازگاری فیزیولوژیک بدن با ورزش تأثیرگذار باشد. در این راستا گزارش شد، هر دارویی که آنزیم پرولیل هیدروکسیلاز[2] را مهار کرده و درنتیجه HIF-1α و A2a را فعال کند، می‌تواند برای ایسکمی و اختلالات آن مؤثر باشد (۳۹). همسو با این یافته، پژوهش ژائو[3] و همکاران بر تزریق آدنوزین در سگ‌های گروه ایسکمی/ریپرفیوژن در مقایسه با گروه کنترل، کاهش معناداری آسیب مغزی و آپوپتوز سلول عصبی مغز را نشان داد (۴۷). افزون بر این، قرارگرفتن سلول‌ها در معرض ایسکمی/هایپوکسی که در اثر ورزش هوازی ایجاد می‌شود، تقاضای انرژی و اکسیژن سلولی را افزایش می‌دهد و موجب افزایش فعالیت نوکلئوتیداز وکاهش فعالیت آدنوزین کیناز می‌شود. این ازدیاد غلظت آدنوزین تولیدی ناشی از تعامل تزریق آدنوزین و تمرین هوازی از طریق افزایش گردش خون و رگ‌زایی عروق مغزی (۴۶، ۳۷، ۱۷) و افزایش A2a (۲۶، ۲۵) نقش‌های حمایت‌کنندگی را اعمال می‌کند. همسو با این یافته، برایان جی[4] و همکاران بیان کردند که در اثر تزریق آدنوزین، ورزش، شرایط همراه با ایسکمی مغزی و تغییر و تبدیل افزایش‌یافته ATP، تجمع آدنوزین اتفاق می‌افتد (۲۴). پاسخ حاصل می‌تواند ناشی از حساس‌شدن، تنظیم افزایشی در

1. Feng
2. Prolyl Hydroxylase
3. Zaho
4. Brian

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

تعـداد گیرنده‌های A2a آدنوزینی و تغییراتی در مسیرهای انتقال پیام داخل سلولی باشد (۲۵). گیرنده A2a به‌عنوان مهم‌ترین گیرنده آدنوزین و واسطه هر دو اثر بالقوه حفاظت نورونی و نوروتوکسیک[1] عمل می‌کند. بررسی‌ها حاکی از ارتباط تنگاتنگ بین مسیرهای A2a و عوامل نوتروفیک در سلول‌های عصبی است؛ به‌طوری‌که تعامل بین A2a و عوامل مختلف نوروتروفیک در کنترل پاسخ‌های حفاظتی مغز پس از ایسکمی مغزی بسیار مؤثر است (۱۷). آدن[2] و همکاران موش‌ها را در معرض ایسکمی/ هیپوکسی (اکسیژن ۸ درصد پس از انسداد شریان کاروتید چپ) قرار دادند و بیان کردند که مسدودشدن گیرنده‌های A2a عاملی برای افزایش آسیب مغزی و ایجاد اختلال در برخی شاخص‌های رفتاری و عملکرد حرکتی است (۱۶). نتیجه شگفت انگیز این پژوهش نشان می‌دهد که تحریک A2a ها ممکن است مکانیسم‌های حفاظتی مهمی در شرایط آسیب مغزی ایسکمیک به همراه داشته باشد. نتایج کلی مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد، هشت هفته تمرین هوازی و تزریق آدنوزین می‌تواند بر بهبود عوارض سکته مغزی مؤثر واقع شود. این اثر ممکن است به دلیل تأثیرگذاری ورزش و آدنوزین از طریق بیان ژن‌های مؤثر بر تنظیم‌کننده‌های آنژوژنیک و بایوژنیک، و نوروترانسمیترهای گلوتاماترژیک و گاباارژیک و عملکرد سلول‌های مغزی باشد؛ البته این موضوع به انجام مطالعات بیشتر نیاز دارد.

پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های بعدی اثر دوزهای مختلف آدنوزین به‌طور هم‌زمان بررسی شود. همچنین استفاده از پارامترهای مختلف تمرین استقامتی می‌تواند اطلاعات دقیق‌تری را دربارهٔ اثر تمرین بر این متغیرها ارائه کند.

پیام مقاله

اگر اثرات مثبت یافته‌های پژوهش حاضر در آزمودنی‌های انسانی نیز تکرار شود، تمرین هوازی به‌عنوان آگونیست غیرداورویی A2AR و آدنوزین به‌عنوان آگونیست دارویی A2AR می‌توانند به‌عنوان دو مداخله درمانی مهم و به‌صورت سینرژی، بر کاهش عوارض ناشی از سکته مغزی مؤثر باشند.

تشکر و قدردانی

از تمامی عزیزانی که در اجرای پژوهش حاضر نقش داشتند، تشکر و قدردانی می‌کنیم.

1. Neurotoxic
2. Ǻdén

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

منابع

1. Andrea V, and Emanuela M. State of the art and future of stem cell therapy in ischemic stroke: why don't we focus on their administration? Bioengineering. 2023;10(1):118
2. Shan Y, Wang L, Sun J, Chang Sh, Wei D, Lv H. Exercise preconditioning attenuates cerebral ischemia-induced neuronal apoptosis, Th17/Treg imbalance, and inflammation in rats by inhibiting the JAK2/STAT3 pathway. Brain and Behavior. 2023;13(6):e3030.
3. Qin Ch, Yang Sh, Cho Y-H, Zhang H, Pang X-W, Chen L, et al. Signaling pathways involved in ischemic stroke: molecular mechanisms and therapeutic interventions. Signal Transduction and Targeted Therapy. 2022;7:215.
4. Mollet I, Marto JP, Mendonça M, Baptista MV, Vieira Helena LA. Remote but not distant: a review on experimental models and clinical trials in remote ischemic conditioning as potential therapy in ischemic stroke. Molecular Neurobiology. 2022;59(1):294–325.
5. Campbell BCV, De Silva DA, Macleod MR, Coutts SB, Schwa mm LH, Davis SM, et al. Ischemic stroke. Nat Rev Dis Primers. 2019;5(1):70.
6. Zhang H, Lee JY, Borlongan CV, Tajiri N. A brief physical activity protects against ischemic stroke. Brain Circ. 2019;5(3):112-8.
7. Caplan LR. Transient ischemic attack: definition and natural history. Current Atherosclerosis Reports. 2006;(8)4:276-80.
8. Zhang H, Xie Q, Hu J. Neuroprotective effect of physical activity in ischemic stroke: focus on the neurovascular unit. Front Cell Neurosci. 2022;16:860573.
9. Maleki M, Hatami Nemati H, Ahmadi H, Nasri S. The effect of short- and long-term exercise courses on memory impairment induced by ethidium bromide injection in the hippocampus of the brain of male rats. Sport Physiology. 2022;14(55):71-94. (In Persian).
10. Liebelt B, Papapetrou P, Ali A, Guo M, Ji X, Peng C, et al. Exercise preconditioning reduces neuronal apoptosis in stroke by up-regulating heat shock protein-70 (heat shock protein-72) and extracellular-signal-regulated kinase 1/2. Neuroscience. 2010;14;166(4):1091-100.
11. Yang X, He Z, Zhang Q, Wu Y, Hu Y, Wang X, et al. Pre-ischemic treadmill training for prevention of ischemic brain injury via regulation of glutamate and its transporter GLT-1. Int J Mol Sci. 2012;13(8):9447-59.
12. Wang YL, Lin CH, Chen CC, Chang CP, Lin KC, Su FC, et al. Exercise preconditioning attenuates neurological injury by preserving old and newly formed HSP72-containing neurons in focal brain ischemia rats. Int J Med Sci. 2019;16(5):675-85.
13. Gill SS, Rochon PA, Herrmann N, Lee PE, Sykora K, Gunraj N, et al. Atypical antipsychotic drugs and risk of ischemic stroke: population based retrospective cohort study. BMJ. 2005;330:7489445.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

14. Maulaz AB, Bezerra DC, Michael P, Bogousslavsky J. Effect of discontinuing aspirin therapy on the risk of brain ischemic stroke. Archives of Neurology. 2005;62(8):1217-20.
15. Daniele SG, Trummer G, Hossmann KA, Vrselja Z, Benk C, Gobeske KT, et al. Brain vulnerability and viability after ischaemia. Nat Rev Neurosci. 2021;22:553–72.
16. Ådén U, Haldner L, Lagercrantz H, Dalmau I, Ledent C, Fredholm BB. Aggravated brain damage after hypoxic ischemia in immature adenosine A2A knockout mice. Stroke. 2003;34(3):739-44.
17. Assaife-Lopes N, Sousa VC, Pereira DB, Ribeiro JA, Chao MV, and Sebastião AM Activation of adenosine A2A receptors induces TrkB translocation and increases BDNF-mediated phospho-TrkB localization in lipid rafts: implications for neuromodulation. Journal of Neuroscience. 2010;30(25):8468-80.
18. Hasko G, Pacher P, Vizi ES, Illes P. Adenosine receptor signaling in the brain immune system. Trends Pharmacol Sci. 2005;26(10):511-16.
19. Aymerich I, Foufelle F, Ferre P, Casado F, Pastor M. Extracellular adenosine activates AMPdependent protein kinase (AMPK). J Cell Sci. 2006;119(Pt 8):1612-21.
20. Wardas J. Neuroprotective role of adenosine_in the CNS. J Pharmacol. 2002;54(4): 313-26.
21. KO I-G, Jin J-J, Hwang L, Kim S-H, Kim C-J, Jeon JW, et al. Adenosine A2A receptor agonist polydeoxyribonucleotide ameliorates short-term memory impairment by suppressing cerebral ischemia-induced inflammation via MAPK pathway. PLoS ONE. 2021;16(3):e0248689.
22. Colgan SP, HK Eltzschig. Adenosine and hypoxiainducible factor signaling in intestinal injury and recovery. Annu Rev Physiol. 2012;74:153-75.
23. Duflot S, Riera B, Fernández- Veledo S, Casadó V, Norman RI, Casado FJ, et al. ATP-sensitive K(+) channels regulate the concentrative adenosine transporter CNT2 following activation by A(1) adenosine receptors. Mol Cell Biol. 2004;24(7):2710-9.
24. Brian J K. Adenosine A2a receptors and O (2) sensing in development. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2011;301(3):R601-R22.
25. Popoli Patrizia and Rita Pepponi. Potential. Therapeutic relevance of adenosine A2B and A2A receptors in the central nervous system. CNS & Neurological Disorder. 2012;11(6):664-74.
26. Fredholm BB. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. Cell Death & Differentiation. 2007;14(7):1315-23.
27. Bansal S, Sangha KS, Khatri P. Drug treatment of acute ischemic stroke. Am J Cardiovasc drugs. 2013;13(1):57–69.
28. Leandr CG, Levada AC, Hirabara SM, Manhães-d Castro R, et al. A program of moderate physical training fo rats based on maximal oxygen consumption. Journal of Stren. 2007;21(3):751-6.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

29. Liu J, Gu Y, Guo M, & Ji X. Neuroprotective effects and mechanisms of ischemic/hypoxic preconditioning on neurological diseases. CNS Neuroscience & Ther. 2021;27(8):869–82.
30. Gertz K, Priller J, Kronenberg G, Fink KB, Winter B, Schröck H, Shengbo Ji, et al. Physical activity improves long-term stroke outcome via endothelial nitric oxide synthase–dependent augmentation of neovascularization and cerebral blood flow. Circulation ResearchVolume. 2006;99(10):1132-40.
31. Mizutani K, Sonoda S, Yamada K, Beppu H, Shimpo K. Alteration of protein expression profile following voluntary exercise in the perilesional cortex of rats with focal cerebral infarction. Brain Res. 2011;14(16):61-8.
32. Zhang Q, Zhang L, Yang X, Wan Y, Jia J. The effects of exercise preconditioning on cerebral blood flow change and endothelin-1 expression after cerebral ischemia in rats. J Stroke Cerebrovascular Dis. 2014;23:1696-702.
33. Carrol TJ, Barry B, Riek S, Carson RG. Resistance training enhances the stability of sensorimotor coordination. Proc Biol Sci .2001;268(1464):221-7.
34. Quaney BM, Boyd LA, McDowd JM, Zahner LH, He J, Mayo MS, et al. Aerobic exercise improves cognition and motor function post stroke. Nauru rehabilitat. 2009;23(9):879-85.
35. Svensson M, Rosvall P, Boza-Serrano A, Andersson E, Lexell J, Deierborg T. Forced treadmill exercise can induce s tress and increase neuronal damage in a mouse model of global cerebral ischemia. Neurobiology of Stress. 2016;5:8-18.
36. Fang JS, Gillies RD, Gatenby RA, Adaptation to hypoxia and acidosis in carcinogenesis and tumor progression. Semin Cancer Biol. 2008; 18(5):330-7.
37. Hardie DG, Scott JW, Pan DA, Hudson ER. Management of Cellular Energy by the AMP Activated Protein Kinase System. FEBS Lett. 2003;546(1):113–20.
38. Vanessa S. Peroxisome proliferator-activated receptors as targets to treat non-alcoholic fatty liver disease.World J Hepatol. 2015;7(8):1012–9.
39. Hart ML, Hypoxia-inducible factor-1alpha-dependent protection from intestinal ischemia/reperfusion injury involves ecto-5'-nucleotidas (CD73) and the A2B adenosine receptor. J Immunol. 2011;186(10): 4367-74.
40. Le Y-Z, Xu B, Chucair-Elliott AJ, Zhang H, and Zhu M. VEGF Mediates Retinal Müller Cell Viability and Neuroprotection through BDNF in Diabetes. Biomolecules. 2021;11(5):712.
41. Oyamada N, Itoh H, Sone M, Yamahara K, Miyashita K, Park K, et al. Transplantation of vascular cells derived from human embryonic stem cells contributes to vascular regeneration after s troke in mice. Journal of Translational Medicine. 2008;6(1): 54.
42. Viboolvorakul S, Patumraj S. Exercise Training could improve age-related changes in cerebral blood flow and capillary vascularity through the upregulation of vegf and enos. Biomed Res International. 2014;2014;230791.
43. Natasha T L, Lin K O, Prajwal G, Che Mohd N, Muzaimi M, Harshal H. Nandurkar et AL. Role of purinergic signalling in endothelial dysfunction and thrombo-

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License

inflammation in ischemic stroke and cerebral small vessel disease. Biomolecules. 2021;11(7):994.
44. Garcia GE, Truong LD, Li P, Zhang P, Du J, Chen J-F et al. Adenosine A2A receptor activation and macrophage-mediated experimental glomerulonephritis. The FASEB Journal.2008;22(2):445-54.
45. Zhang P, Yu H, Zhou N, Zhang J, Wu Y, Zhang Y, et al. Early exercise improves cerebral blood flow through increased angiogenesis in experimental stroke rat model. Journal of neuroengi, 2013;10(1):43.
46. Feng R, Zhang M, Wang X, Li WB, Ren SQ, and Zhang F. Pre-ischemic exercise alleviates oxidative damage following ischemic stroke in rats. Exp Ther Med. 2014;8(4):1325-9.
47. Zhao ZQ, Budde JM, Morris C, Wang NP, Velez DA, Muraki S, et al. Adenosine attenuates reperfusion-induced apoptotic cell death by modulating expression of Bcl-2 and Bax proteins. J Mol Cell Cardiol. 2001;33(1):57-68.

استناد به مقاله

رمضانی سعید، معظمی مهتاب، بیژه ناهید، رشیدلمیر امیر. اثر نوروپروتکتیو ترکیب تمرین هوازی و آدنوزین بر بیان ژن گیرندۀ A2a و عوارض ناشی از سکتۀ مغزی در هیپوکامپ موش صحرایی نر بالغ. فیزیولوژی ورزشی. تابستان ۱۴۰۲؛ ۱۵(۵۸):۴۸-۱۲۵.
شناسۀ دیجیتال: 10.22089/SPJ.2023.15507.2277

S. Ramezani, M. Moazami, N. Bijeh, A. Rashid Lamir. Neuroprotective Effect of the Combination of Aerobic Exercise and Adenosine on the A2A Receptor Gene Expression and Complications of Cerebral Stroke in the Hippocampus of adult Male Rat. Summer 2023; 15(58): 125-48. (In Persian). Doi: 10.22089/SPJ.2023.15507.2277

پرتال جامع علوم انسانی

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Public License