

## ارزیابی تغییرات بیومارکرهای پاسخ استرس اکسیداتیو در مغز موش‌های آلوده به عفونت هاری وحشی

فاطمه شیرقاسمی آلان (MSc)<sup>۱</sup>، رضا حاجی حسینی (PhD)<sup>۲</sup>، آزاده رسولی (PhD)<sup>۳</sup>، مریم فاضلی (PhD)<sup>۳\*</sup>

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

۲- گروه بیوشیمی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۳- گروه ویروس‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

دریافت: ۸۸/۱۰/۱۶؛ اصلاح: ۹۹/۱/۱۷؛ پذیرش: ۹۹/۴/۱۵

### خلاصه

**سابقه و هدف:** ویروس هاری باعث سالانه ۶۰ هزار مرگ در جهان شده و یک خطر اقتصادی و اجتماعی شناخته می‌شود. اطلاع از تکثیر ویروس هاری و میان‌کنش آن با سلول میزبان هر چند در ابتدای راه است، جهت طراحی داروها و واکسن‌های بهینه کمک شایانی می‌کند؛ لذا هدف از انجام این مطالعه، ارزیابی تغییرات آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دسموتاز (SOD)، ترکیب شیمیایی نیتریک اکساید (NO) و فعالیت ژن NF-kB به عنوان بیومارکرهای پاسخ استرس اکسیداتیو، در بافت مغز موش‌های آلوده به ویروس هاری وحشی می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، ۱۶ موش ناهمخون (Outbred) ۲۱ روزه در دو گروه ۸ تایی سالم و آزمون تقسیم شدند. پس از تعیین تیترو ویروس هاری وحشی مورد مطالعه، موش‌ها در گروه آزمون، به صورت درون سری (Intracerebrally= IC) با ۰/۰۳ میلی‌لیتر ویروس هاری وحشی و با LD50 ۵۰ و با استفاده از سرنگ همیلتون ۰/۲۵ دریافت کردند. جهت ارزیابی تغییرات آنزیم‌های کاتالاز، NO، SOD از کیت و روش رنگ سنجی استفاده گردید و فعالیت NF-kB با Real-Time PCR با توجه به ژن SdhA بررسی شد.

**یافته‌ها:** در این بررسی، فعالیت کاتالاز در مغز موش‌های آلوده (۰/۱۴±۰/۰۰۷) نسبت به موش‌های سالم (کنترل) (به ترتیب ۰/۶۷±۰/۰۰۸) کاهش معنی‌داری داشت (p=۰/۰۱). در این مطالعه تجربی، فعالیت SOD در مغز موش‌های آلوده (۳±۰/۲) نسبت به موش‌های سالم (کنترل) (۵/۷±۰/۰۰۱) کاهش معنی‌داری داشت (p=۰/۰۳۵). سنجش تجمع NO بر روی بافت مغز گروه آلوده (۹/۸±۰/۰۴) نسبت به سالم (۹/۴±۰/۰۳) افزایش معنی‌داری داشت (p=۰/۰۲۵). همچنین، میزان بیان NF-kB در مغز موش‌های آلوده به ویروس هاری ۰/۱ بیان این ژن در مغز موش‌های سالم بود.

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد ویروس هاری، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و SOD را کاهش و NO را افزایش می‌دهد. همچنین، بیان NF-kB در مغز موش‌های آلوده به ویروس هاری کاهش یافت که می‌تواند به دلیل تاثیر ویروس بر مسیر سیگنالینگ سلولی باشد.

**واژه‌های کلیدی:** ویروس هاری، استرس اکسیداتیو، انتقال پیام.

### مقدمه

ویروس هاری، از خانواده رابدوویریده جنس لیساوویروس، راسته مونونگاویرال می‌باشد (۱). این ویروس عامل بیماری حاد سیستم اعصاب مرکزی است که باعث آنسفالیت کشنده در انسان و حیوانات می‌شود (۲). ویروس هاری باعث سالانه ۶۰ هزار مرگ در جهان شده و یک خطر اقتصادی و اجتماعی شناخته می‌شود (۳). ویروس در محل گزش در بافت عضله تکثیر یافته و سپس به طرف اعصاب محیطی می‌رود. ویروس، اعصاب حسی و حرکتی محیطی را مبتلا کرده و به طور اختصاصی به گیرنده‌های میانجی عصبی استیل کولین و محل اتصال عصب به عضله متصل می‌شود (۴). پاتوژنز ویروس هاری وحشی با سوبه‌های ضعیف‌تر مانند CVS تفاوت دارد؛ مثلاً هاری وحشی از القا آپاتوز در سلول‌های عصبی جلوگیری می‌کند و به

ندرت سلول‌های گلایالی را آلوده می‌کند. هر چند سوبه‌های ضعیف‌تر باعث ایجاد آپاتوز در این سلول‌ها می‌گردند. همچنین، داده‌ها نشان می‌دهد که سوبه‌های وحشی ویروس هاری ایجاد یک پاسخ التهابی متوسط در سیستم عصبی می‌کنند. چنین پیشنهاد می‌کنند که مکانیسم‌های تنظیمی در طی دوره عفونت به منظور کاهش التهاب القایی سیستم عصبی برقرار می‌گردند (۱و۲). استرس اکسیداتیو نقش مهمی در بیماری‌های مختلف ویروسی از جمله هاری دارد (۴). استرس اکسیداتیو با عدم تعادل بین تولید گونه‌های اکسیژن فعال و مکانیسم دفاع آنتی‌اکسیدانی طبیعی، تعریف می‌شود که می‌تواند باعث ایجاد التهاب مزمن نیز گردد. استرس اکسیداتیو با فعال نمودن عوامل مختلف رونویسی، منجر به بیان افتراقی برخی از

این مقاله حاصل پایان‌نامه فاطمه شیرقاسمی آلان دانشجوی رشته زیست‌شناسی سلولی و مولکولی و طرح تحقیقاتی به شماره ۱۶۷/د/۱۲۵۴ دانشگاه پیام نور استان تهران می‌باشد.

\*مسئول مقاله؛ دکتر مریم فاضلی

آدرس: همدان، دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، گروه ویروس‌شناسی پزشکی. تلفن: ۰۸۱-۳۸۳۸۱۹۳۹

E-mail: m\_fazeli@pasteur.ac.ir

**تزریق ویروس:** پس از تعیین تیترا ویروس هاری وحشی مورد مطالعه، موش‌ها در گروه آزمون، به صورت IC با ۰/۰۳ میلی‌لیتر ویروس هاری وحشی و با LD 50 و با استفاده از سرنگ همپلتون ۰/۲۵ مورد چالش قرار گرفتند و پنج روز بعد از تزریق ویروس، موش‌هایی که علائم سه گانه هاری یعنی فلجی، تشنج و تحریک پذیری را نشان دادند، به روش اخلاقی کشته شده و مغز آنها جهت انجام مطالعات بعدی خارج و در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. جهت بررسی وجود ویروس هاری در مغز موش‌های دارای علائم، آزمون FAT طبق دستورالعمل انجام گردید (۱۰). **ارزیابی تغییرات بیومارکرهاي پاسخ استرس اکسیداتیو:** بررسی پارامترهای مذکور، NO و کاتالاز در بافت مغز موش‌های آلوده به ویروس هاری با استفاده از کیت سنجش شرکت نوند سلامت (Natrix™، ایران) و SOD، کیت شرکت طب پژوهان رازی (ایران) با استفاده از دستورالعمل‌های موجود در کیت‌های مذکور و روش رنگ سنجی، انجام گردید.

#### بررسی بیان ژن NF-kB به روش Real Time PCR

**استخراج RNA:** جهت استخراج RNA موجود در بافت‌های مغزی، از TRIzol (Invitrogen Life Technologies) بر اساس دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت سازنده استفاده شد. سپس، غلظت RNA با Nanodrop 2000 تعیین شد. در نهایت، RNA تا زمان استفاده در دمای ۸۰-°C نگه داری شد. **سنتز cDNA:** ۵ μl RNA جهت سنتز cDNA با استفاده از کیت Invitrogen (آمریکا) و مطابق با دستورالعمل ارائه شده در کیت استفاده شد. cDNA جهت مرحله Real Time PCR در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد جهت استفاده‌های بعدی، نگهداری شد.

**طراحی پرایمر:** طراحی پرایمر با استفاده از نرم افزار Primer 3 انجام، اختصاصیت آن با استفاده از سایت NCBI BLAST و ساختار ثانویه آن توسط نرم افزار Gene Runner بررسی شد. در نهایت توسط شرکت ژن فن اوران (ایران) سنتز گردید. توالی پرایمرهای استفاده شده در جدول ۱ آورده شده است.

**واکنش زنجیره ای پلیمرز PCR بر روی ژن Sdha:** جهت بررسی کیفیت cDNA، از PCR استفاده شد. طبق پروتکل Taq DNA Polymerase Master Mix RED با شماره کاتالوگ ۱۸۰۳۰۱ (آمپلیکون، آلمان)، تمام مواد به همراه پرایمرهای طراحی شده، با هم ترکیب و در دستگاه ترموسایکلر (RAD، آمریکا) گذاشته شد. سپس، الکتروفورز محصولات PCR جهت تایید واکنش، بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ انجام شد.

**Real Time PCR نسبی:** به منظور بررسی تغییرات بیانی ژن NF-kB و مقایسه آن با ژن مرجع Sdha واکنش با استفاده از دستگاه Corbett مدل RG-6000 انجام پذیرفت. کلیه مراحل واکنش بر اساس دستورالعمل کیت 5x HOT qPCR Mix Plus (no ROX) EvaGreen® FIREPol® با شماره کاتالوگ 08-25-00001 انجام گردید.

**محاسبات بیان ژن NF-kB:** به منظور محاسبه میزان تغییرات بیان ژن NF-kB از روش  $\Delta\Delta CT$  استفاده شد. در این روش، اختلاف CT ژن مورد نظر و CT ژن کنترل داخلی در نمونه‌های مورد نظر محاسبه شد ( $\Delta CT1$  و  $\Delta CT2$ ). در نهایت، دو  $\Delta CT$  از هم، کم و برای محاسبه میزان بیان ژن (RQ) در فرمول  $2^{-\Delta\Delta CT}$  قرار داده شد. تجزیه و تحلیل‌های آماری آزمایش‌های مختلف ایمنی با استفاده از نرم‌افزار Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) و آزمون t با دو نمونه مستقل انجام شد.

ژن‌های درگیر در مسیرهای التهابی می‌شود و در نهایت می‌تواند منجر به اختلال عملکرد اسیدهای نوکلئیک، پروتئین‌ها و لیپیدها گردد (۴). از جمله آنزیم های استرس اکسیداتیو می‌توان به کاتالاز و سوپراکساید دسموتاز SOD اشاره کرد. کاتالاز تقریباً در همه موجودات زنده یافت می‌شود و از مهم‌ترین آنزیم‌ها در محافظت از سلول در مقابل رادیکال‌های آزاد می‌باشد که نقش مهمی را در مقابل واکنش‌های التهابی ایفا می‌کند (۵). SOD، یکی از انواع مهم دفاع آنتی اکسیدانی است و تقریباً در تمامی سلول‌هایی که در معرض اکسیژن قرار دارند، وجود دارد. سوپراکساید یک محصول فرعی و ثانویه متابولیسم اکسیژن است و اگر تحت کنترل نباشد، موجب بروز انواع متفاوتی از آسیب‌های سلولی می‌گردد (۶). به علاوه، نیتریک اکساید (NO) مولکول مهمی در پیام رسانی سلولی است که در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک دخالت دارد (۷).

چون هاری در مناطق فقیرنشین رخ می‌دهد، مطالعات اندکی تاکنون بر روی بیماری زایی آن انجام شده است. به نظر می‌رسد مطالعات بیشتری جهت شناسایی مسیرهای بیماری زایی ویروس مورد نیاز باشد؛ اطلاع از چرخه تکثیر ویروس هاری و میان کنش آن با سلول میزبان هر چند در ابتدای راه است، جهت طراحی داروها و واکسن‌های بهینه کمک شایانی خواهد کرد، لذا هدف از انجام این مطالعه، ارزیابی تغییرات آنزیم‌های کاتالاز و SOD، NO و فعالیت NF-kB به عنوان بیومارکرهاي پاسخ استرس اکسیداتیو، در بافت مغز موش‌های آلوده به هاری وحشی می‌باشد. امید است که نتایج ارائه شده توسط این مطالعه شروع گامی مفید و موثر در راستای درمان و پیشگیری هاری و کنترل این بیماری در کشور باشد.

#### مواد و روش‌ها

**حیوانات:** در این تحقیق مداخله‌ای پس از تصویب در کمیته اخلاق انستیتو پاستور ایران با کد IR.PII.REC.1398.002 از ۴۶ موش ماده ناهمگون The Naval Medical Research (NMRI) (Outbred Mice) Institute با وزن متوسط ۱۴-۱۱ گرم استفاده گردید که از مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. این نوع موش‌ها، سویه‌های موجود در طبیعت هستند (۸). موش‌ها تا پایان آزمایش در شرایط اخلاقی نگهداری شدند. از ۳۰ سر موش جهت تعیین تیترا ویروس استفاده گردید و باقی حیوانات به صورت تصادفی در دو گروه ۸ تایی (گروه اول، موش‌های کنترل یا سالم و گروه دوم، موش‌های آزمون یا آلوده به ویروس هاری) تقسیم شدند.

**تولید ویروس هاری و تعیین LD50 ویروس تولید شده:** جهت انجام چالش، ابتدا تیترا ویروس مشخص شد. نمونه‌ای از مغز حیوان که از طریق آزمون FAT آلودگی آن به هاری اثبات شده بود، جهت انجام آزمون‌های بعدی انتخاب گردید. سوسپانسیون یکنواخت ۲۰٪ وزنی بافت مغز در محلول رقیق کننده استریل (یا همان سرم اسب ۲٪ در آب مقطر) تهیه شد. سپس از آن، هر یک از رقت‌های سریالی ۱۰<sup>-۵</sup>، ۱۰<sup>-۶</sup> و ۱۰<sup>-۷</sup> تهیه شده و هر کدام از این رقت‌ها، درون سری (Intracerebrally= IC)، به ۱۰ موش تزریق گردید. از روز پنجم، موش‌های تزریق شده، پایش شده و تا ۱۴ روز تعداد موش‌های زنده و مرده ثبت گردید. LD 50 ویروس مورد استفاده با روش اسپرمن - کاربر (Spearman-Kärber) و با نرم افزار آماری مناسب، بر اساس تعداد موش‌های زنده و مرده در این مدت، محاسبه گردید (۹).

جدول ۱. توالی پرایمرهای طراحی شده جهت بررسی بیان ژن NF-κB و ژن خانه‌دار Sdha

پرایمرها ژن‌های مورد مطالعه	پرایمر F	پرایمر R	طول محصول (نوکلئوتید)
Sdha	۵'-GGA GGT ATC AAT GCT GCT CTG-۳'	۵'-CTG TCA TGT AAT GGA TGG CGT-۳'	۱۱۸
NF-κB	CGCAAAGGACCTACGAGAC	TGGGGGAAAACATCAAAG	۱۹۳

## یافته‌ها

### نتایج ارزیابی تغییرات بیومارکرهای پاسخ استرس اکسیداتیو

کاتالاز و SOD: در این مطالعه، آزمون سنجش فعالیت کاتالاز و SOD بر روی بافت همگن مغز دو گروه موش‌های آلوده به ویروس هاری و سالم انجام پذیرفت و نتایج ذیل به دست آمد. نتایج نشان از کاهش معنی دار فعالیت آنزیم کاتالاز و SOD ( $p=0/01$ ) و ( $p=0/035$ ) در بافت مغز گروه آلوده نسبت به گروه کنترل دارد. فعالیت کاتالاز و SOD در گروه کنترل به ترتیب  $0/67 \pm 0/008$  و  $0/14 \pm 0/007$  nmol/min/ml و در گروه آلوده به ترتیب  $0/7 \pm 0/001$  و  $0/2 \pm 0/001$  nmol/min/ml بود.

NO: پس از سنجش میزان تجمع نیتریک اکساید مشخص شد که رادیکال آزاد NO در بافت مغز موش‌های گروه آلوده نسبت به گروه کنترل دارد ( $p=0/025$ ). میزان تجمع NO در گروه کنترل  $9/4 \pm 0/03$  mU/mg و در گروه آلوده  $9/8 \pm 0/04$  μM بود.

### بیان NF-κB:

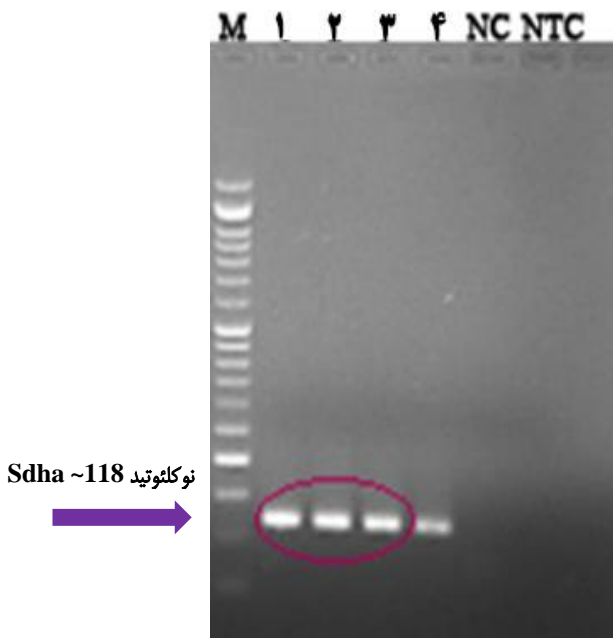
نتایج حاصل از استخراج RNA مغز موش‌های مورد مطالعه با استفاده از دستگاه نانودراپ: به منظور کنترل کیفیت استخراج و تعیین میزان غلظت RNA استخراج شده از بافت‌های مذکور، نانو دراپ انجام گردید. آلودگی به پروتئین را با کنترل نسبت  $260/280$  سنجیده و میزان مطلوب آن را نزدیک به ۲ در نظر گرفته شده است (۱).

نتایج بررسی ژن‌های Sdha (نتایج آزمایش PCR ژن Sdha) بر روی ژل آگارز ۲٪ جهت تایید مراحل استخراج RNA و سنتز cDNA: با استفاده از ۰/۵ میکرولیتر پرایمر با غلظت ۱۰ پیکومول باندهای غیر اختصاصی در این ژن حذف شد. باند شارپ با وضوح بالا در ژن Sdha مشاهده شد (شکل ۱).

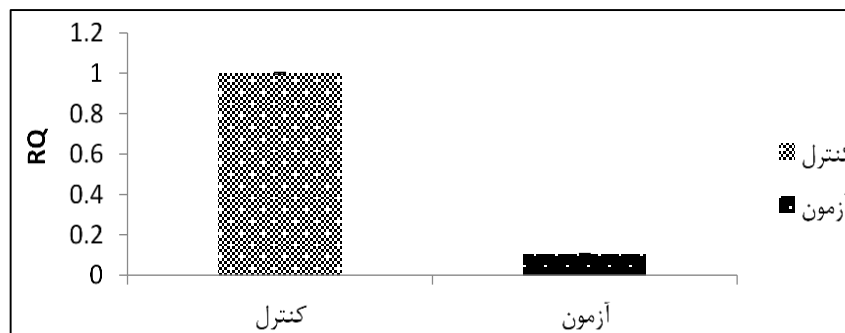
نتایج بیان ژن NF-κB نسبت به ژن خانه‌دار در مغز موش‌های آلوده به ویروس هاری در مقایسه با موش‌های سالم: نتایج نشان‌دهنده کاهش میزان بیان ژن NF-κB در بافت مغز پس از عفونت هاری در مقایسه با گروه کنترل (موش‌های سالم) بود. با استفاده از فرمول توضیح داده شده در بند محاسبات بیان ژن NF-κB، بیان ژن NF-κB در مغز موش‌های آلوده به ویروس هاری به میزان ۰/۱ بیان این ژن در مغز موش‌های سالم بود (شکل ۲).

### نتایج منحنی ذوب ژن‌های Sdha و NF-κB حاصل از Real Time PCR:

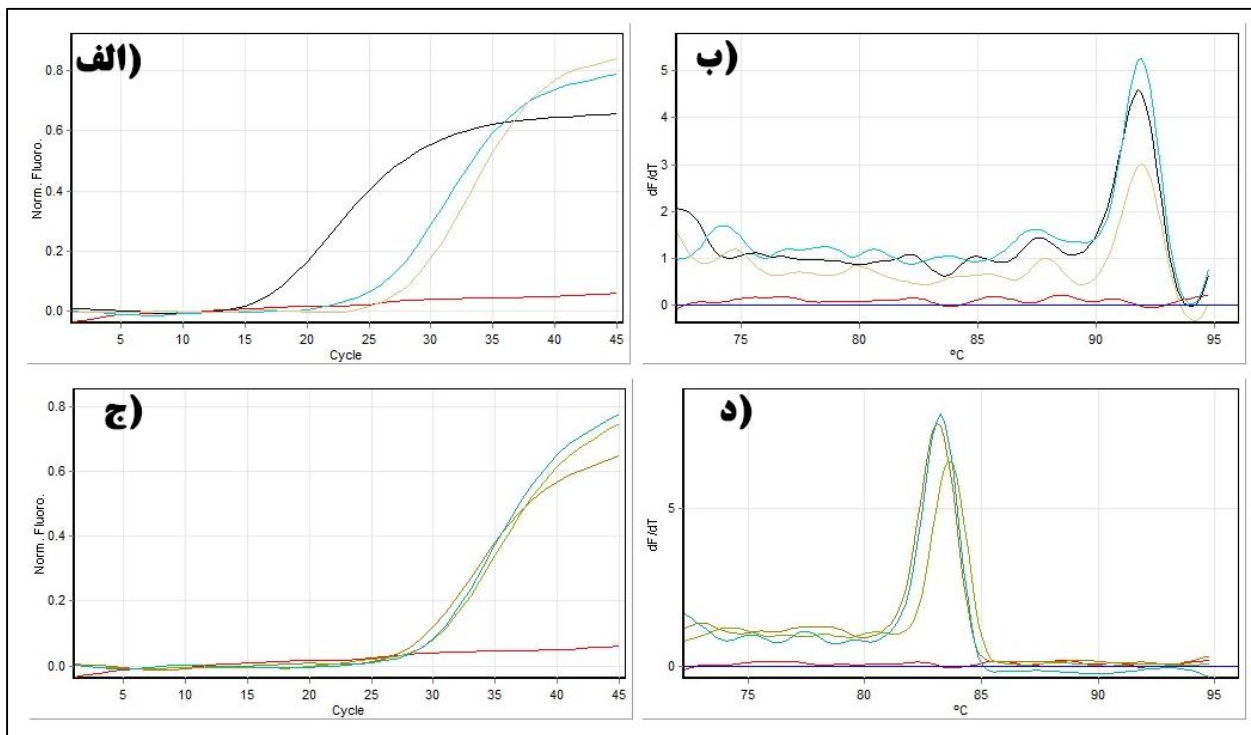
به منظور حصول اطمینان از عدم حضور پیک‌های غیر اختصاصی و عدم وجود آلودگی، بررسی منحنی ذوب ژن‌های مورد استفاده ضروری است (شکل‌های ۳ ب و د). شکل‌های ۳ الف و ج نمونه‌ای از منحنی تکثیر ژن‌های Sdha و NF-κB می باشد.



شکل ۱. محصول PCR مربوط به ژن Sdha با اندازه ۱۱۸ نوکلئوتید. چاهک M: مارکر Ladder 50bp. چاهک ۱: دمای ۵۹ درجه سانتی‌گراد، چاهک ۲: دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، چاهک ۳: دمای ۶۱ درجه سانتی‌گراد، چاهک ۴: دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد، چاهک NC: نمونه کنترل منفی (بدون نمونه). همان طور که در شکل مشخص است دماهای ۵۹-۶۱ درجه سانتی‌گراد باند واضح‌تری نشان دادند.



شکل ۲. نمودار ستونی میزان بیان ژن NF-κB در بافت مغز موش‌های مبتلا به هاری. نتایج به دست آمده در این مطالعه، نشان از کاهش معنی‌دار ژن NF-κB پس از ورود ویروس هاری به درون سلول مغزی را نشان داد ( $p < 0/05$ )؛ آزمون: گروه موش‌های آلوده شده به ویروس هاری، کنترل: گروه موش‌های سالم.



شکل ۳. (الف و ب) منحنی‌های تکثیر و ذوب ژن NF- $\kappa$ B در کنار کنترل منفی؛ (ج و د) منحنی‌های تکثیر و ذوب ژن خانه‌دار Sdha در کنار کنترل منفی. وجود منحنی ذوب در یک دمای یکسان برای هر یک از ژن‌ها نشان از عدم وجود محصول غیر اختصاصی و نماینده کارکرد صحیح پرایمرهای اختصاصی در این ژن می‌باشند.

### بحث و نتیجه گیری

را تنظیم کند (۲۴). مطالعات متعددی نشان داده‌اند که NO ممکن است در پاتوژنز بیماری‌های مختلف التهاب عصبی/دژنراتیو و تخریب میلین اعصاب مرکزی نقش کلیدی دارد. در سیستم عصبی مرکزی، الیگودندروسیت‌ها، در مقایسه با سایر سلول‌های گلیال، بیشترین حساسیت را نسبت به NO دارند و ممکن است مرگ الیگودندروسیت مکانیسم اصلی در پاتوفیزیولوژی MS باشد (۲۵). در این مطالعه، همسو با مطالعه انجام شده توسط Jackson و همکاران و سایر مطالعات مشابه، سطح NO افزایش یافته است (۲۳-۲۱). طی مطالعه‌ای، Ubol و همکارانش نشان دادند مهار آنزیم NO سنتتاز مرگ موش را در اثر هاری به تعویق می‌اندازد (۲۲).

میتوکندری سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی گسترده برای سم زدایی ROS، از جمله SOD، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز، فسفولیپید هیدروپراکسیداز، گلوتاتیون-پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز دارد (۲۶). فعالیت SOD منجر به انتقال الکترون به رادیکال سوپراکسید و تبدیل آن به مولکول پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) می‌شود. پراکسید هیدروژن حاصل از فعالیت SOD، خود یک گونه فعال از اکسیژن است که می‌تواند منجر به آسیب اکسیداتیو بیومولکول‌ها شود و توسط آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان دیگر به  $H_2O$  احیا می‌شود (۲۷ و ۲۸). همچنین، آنزیم کاتالاز یک متالوپروتئین آنتی‌اکسیدان است که منجر به انتقال الکترون یک مولکول  $H_2O_2$  به مولکول  $H_2O_2$  دیگر و تبدیل آنها به آب و اکسیژن می‌شود (۲۹). برای مقابله با تنش اکسیداتیو، سلول‌های گیاهی، آنزیم‌های سمیت زدایی رادیکال اکسیژن از قبیل SOD، پراکسیداز و کاتالاز سنتز می‌کنند. در بسیاری از بیماری‌های عفونی نشان داده شده است که نقص در تولید این آنزیم‌ها باعث افزایش بیماری زایی

نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد ویروس هاری، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و SOD را کاهش و میزان NO را افزایش می‌دهد. تغییر در این بیومارکرهای پاسخ استرس اکسیداتیو احتمالاً برای فرار از سیستم ایمنی ذاتی میزبان می‌باشد. همچنین در این مطالعه، بیان NF- $\kappa$ B در مغز موش‌های آلوده به ویروس هاری کاهش یافت که می‌تواند به دلیل تاثیر ویروس بر مسیر سیگنالینگ سلولی باشد. اولین سد دفاعی علیه ویروس هاری ایمنی ذاتی می‌باشد. مطالعات نشان داده است التهاب بازوی اصلی پاسخ سیستم ایمنی ذاتی در مقابل عامل عفونی خارجی به شمار می‌رود (۱۳ و ۱۲). آنزیم‌هایی همچون کاتالاز و SOD به عنوان اولین خط مکانیسم دفاعی، نقش مهمی در برابر استرس اکسیداتیو دارند (۱۴).

استرس‌های اکسیداتیو در بیماری‌های ویروسی نقش دارند (۱۵). اما در هاری وحشی، ویروس از ایجاد پاسخ‌های التهابی برای افزایش عمر سلول‌های آلوده و تکثیر ویروس جلوگیری می‌کند (۱۶ و ۱۷). همچنین، نشان داده شده که آسیب اکسیداتیو یکی از اجزای مهم انسفالیت حاد تجربی ناشی از ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ در موش (۱۸) و در عفونت ویروس نقص ایمنی بدن (۱۹)، بویژه در افراد مبتلا به زوال عقل می‌باشد (۲۰).

مطالعه Jackson و همکاران نشان داد که ویروس هاری باعث آسیب آکسونال نرون‌ها از طریق استرس اکسیداتیو می‌گردد (۲۱). در حالت التهاب، تولید NO به عنوان یک میانجی کلیدی توسط عروق به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد و به استرس اکسیداتیو کمک می‌کند (۲۳ و ۲۲). ایزوفورم eNOS که باعث تولید NO در حد نانومولار می‌شود و می‌تواند بیان مولکول‌های پیش التهابی مانند فاکتور هسته‌ای NF- $\kappa$ B، سیکلواکسیژناز و همچنین سیتوکین‌های پیش التهابی

NF-κB را مسئول پاسخ ایمنی طبیعی علیه هاری معرفی نمود (۳۴). نتایج نشان داد که فعالیت های آنزیمهای کاتالاز و SOD و بیان ژن NF-κB، به عنوان بیومارکرهای پاسخ استرس اکسیداتیو و التهاب، در بافت مغز موش های آلوده به ویروس هاری وحشی در مقایسه با مغز موش های سالم کاهش معنی داری می یابد. همچنین در این مطالعه NO در مغز موش های آلوده افزایش چشمگیری نشان داد. لذا جهت طراحی و تولید واکنش های درمانی علیه عفونت هاری می توان از ترکیباتی که باعث تحریک بیان مسیرهای پاسخ به استرس اکسیداتیو می شود، استفاده نمود. همچنین جهت مطالعات دقیق تر می توان از تزریق ویروس در ناحیه خاصی از مغز موش های مورد مطالعه به وسیله جراحی استروئوتاکسیک و کاشت الکترودهای تحریک استفاده نمود.

### تقدیر و تشکر

بدینوسیله از دانشگاه پیام نور واحد تهران شرق به خاطر حمایت مالی از این مطالعه و همچنین بخش تحقیقات و مرکز رفرانس هاری انستیتو پاستور ایران به دلیل همه حمایت های مالی و علمی، تقدیر و تشکر می گردد.

می گردد (۳۰). همسو با مطالعات انجام شده اندکی که در ارتباط با تاثیر ویروس هاری وحشی بر فعالیت آنزیمهای کاتالاز و SOD تاکنون انجام شده است، در این مطالعه نشان داده شد که فعالیت آنزیمهای کاتالاز در مغز موش های آلوده به ویروس هاری در مقایسه با مغز موش های سالم کاهش چشمگیری دارد. در مطالعه ای تاثیر استرس اکسیداتیو بر روی آنسفالومیلیت خودایمنی (EAE) مورد بررسی قرار گرفته که نشان می دهد که فعالیت آنزیم SOD دچار کاهش شده و NO افزایش چشم گیری داشت که مطابق با نتایج به دست آمده در این مطالعه می باشد (۳۱).

یافته های به دست آمده در این مطالعه همسو با مطالعه Habjan و همکاران کاهش معنی دار بیان ژن NF-κB در مغز موش های آلوده به ویروس هاری وحشی نسبت به موش های سالم را نشان داد (۳۲). Kammouni و همکاران، دریافتند که NF-κB، به عنوان یک پل مهم ارتباطی بین عفونت CVS و استرس اکسیداتیو عمل می کند (۳۳). در این مطالعه نشان داده شد که عفونت با هاری، از طریق مهار فعال سازی هسته ای NF-κB استرس اکسیداتیو ایجاد می کند. پروتئین فسفاتاز ویروس CVS می تواند به طور مستقیم فعالیت NF-κB را مهار کند. در مطالعه Luco و همکاران، RelA<sub>p43</sub> یکی از اعضای خانواده

## Evaluation of Changes in Biomarkers of Oxidative Stress Response in the Brain of Mice Infected with Street Rabies Virus

F. Shirghasemi Alalan (MSc)<sup>1</sup>, R. Hajhosseini (PhD)<sup>2</sup>, A. Rasooli (PhD)<sup>2</sup>, M. Fazeli (PhD)<sup>\*3</sup>

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, I.R.Iran

2. Department of Biochemistry, Faculty of Science, Payame Noor University, Tehran, I.R.Iran

3. Department of Medical Virology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 23; 2021; PP: 38-45

Received: Jan 6<sup>th</sup> 2020, Revised: Apr 5<sup>th</sup> 2020, Accepted: Jul 5<sup>th</sup> 2020.

### ABSTRACT

**BACKGROUND AND OBJECTIVE:** The rabies virus infection leads to 60,000 deaths worldwide each year and is considered an economic and social hazard. Although our knowledge of the rabies virus replication and its interaction with the host cell is in its infancy, it helps us design optimal drugs and vaccines. Therefore, the aim of this study was to evaluate the changes in catalase and superoxide dismutase (SOD) enzymes, nitric oxide (NO) chemical composition and NF-κB gene activity as biomarkers of oxidative stress response in brain tissue of mice infected with street rabies virus.

**METHODS:** In this experimental study, 16 21-day-old outbred mice were divided into two groups of healthy and experimental (n=8). After determining the titer of rabies virus, the mice in the experimental group received 0.03 ml of rabies virus with LD50 intracerebrally (IC) using Hamilton 0.25 ml syringe. To evaluate the changes of catalase, NO, and SOD enzymes, test kit and colorimetric method were used and NF-κB activity was evaluated by Real-Time PCR according to Sdha gene.

**FINDINGS:** In this study, catalase activity in the brains of infected mice ( $0.14 \pm 0.007$ ) was significantly reduced compared to healthy mice (control) ( $0.67 \pm 0.008$ ) ( $p=0.01$ ). In this experimental study, the SOD activity in the brains of infected mice ( $3 \pm 0.2$  nmol/min/ml) was significantly reduced compared to healthy mice (control) ( $5.7$  nmol/min/ml) ( $p=0.035$ ). Evaluation of NO accumulation in the brain tissue of the infected group ( $9.0 \pm 0.04$  mU/mg) was significantly increased compared to the healthy group ( $9.04 \pm 0.03$  mU/mg) ( $p=0.025$ ). Furthermore, the expression level of NF-κB in the brain of the mice infected with rabies virus was one tenth of the expression of this gene in the brain of healthy mice.

**CONCLUSION:** The results showed that rabies virus decreased the activity of catalase and SOD enzymes and increased nitric oxide. Furthermore, NF-κB expression decreased in the brain of mice infected with rabies virus, which may be due to the effect of the virus on the cellular signaling pathway.

**KEY WORDS:** Rabies Virus, Oxidative Stress, Message Transmission.

### Please cite this article as follows:

Shirghasemi Alalan F, Hajhosseini R, Rasooli A, Fazeli M. Evaluation of Changes in Biomarkers of Oxidative Stress Response in the Brain of Mice Infected with Street Rabies Virus. J Babol Univ Med Sci. 2021; 23: 38-45.

\*Corresponding Author: M. Fazeli (PhD)

Address: Department of Medical Virology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, I.R.Iran

Tel: +98 81 38381939

E-mail: m\_fazeli@pasteur.ac.ir

## References

1. Reardon TR, Murray AJ, Turi GF, Wirblich C, Croce KR, Schnell MJ, et al. Rabies virus CVS-N2cΔG strain enhances retrograde synaptic transfer and neuronal viability. *Neuron*. 2016;89(4):711-24.
2. Park C-H, Kondo M, Inoue S, Noguchi A, Oyamada T, Yoshikawa H, et al. The histopathogenesis of paralytic rabies in six-week-old C57BL/6J mice following inoculation of the CVS-11 strain into the right triceps surae muscle. *J Vet Med Sci*. 2006;68(6):589-95.
3. Rahpeyma M, Farahtaj F, Fazeli M, Sheikh-o-leslami F, Bashar R, Howaizi N, et al. Epidemiological Study of Rabies Infection in Specimens Sent to Pasteur Institute of Iran in 2015. *J Babol Univ Med Sci*. 2015;17(12):65-70. [In Persian]
4. Tanikawa K, Torimura T. Studies on oxidative stress in liver diseases: important future trends in liver research. *Med Mol Morphol*. 2006;39(1):22-7.
5. Glorieux C, Calderon PB. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol Chem*. 2017;398(10):1095-108.
6. Hayyan M, Hashim MA, AlNashef IM. Superoxide ion: generation and chemical implications. *Chem Rev*. 2016;116(5):3029-85.
7. Ytterberg SR. The relationship of infectious agents to inflammatory myositis. *Rheum Dis Clin North Am*. 1994;20(4):995-1015.
8. Dacheux L, Larrous F, Lavenir R, Lepelletier A, Faouzi A, Troupin C, et al. Dual combined real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for the diagnosis of lyssavirus infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(7):e0004812.
9. Cliquet F, Aubert M, Sagne L. Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *J Immunol Methods*. 1998;212(1):79-87.
10. Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H. Laboratory techniques in rabies, 4<sup>th</sup> ed. Geneva: World Health Organization; 1996. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/38286>
11. Bej AK, Mahbubani MH, Atlas RM. Amplification of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) and other methods and their applications. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1991;26(3-4):301-34.
12. Ferencik M, Stvrtinova V. Endogenous control and modulation of inflammation. *Folia Biol (Praha)*. 1996;42(1-2):47-55.
13. Ceribelli A, De Santis M, Isailovic N, Gershwin ME, Selmi C. The immune response and the pathogenesis of idiopathic inflammatory myositis: a critical review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2017;52(1):58-70.
14. Domingueti CP, Dusse LMSA, das Graças Carvalho M, de Sousa LP, Gomes KB, Fernandes AP. Diabetes mellitus: the linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular complications. *J Diabetes Complications*. 2016;30(4):738-45.
15. Irshad M, Chaudhuri PS. Oxidant-antioxidant system: role and significance in human body. *Indian J Exp Biol*. 2002;40(11):1233-9.
16. Mills KH. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection?. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(11):841-55.
17. Schneider LG. Spread of virus from the central nervous system. In: Baer GM, editor. *The Natural History of Rabies*, 2<sup>nd</sup> ed. Routledge; 2017.p. 149-60. Available from: [https://www.amazon.com/Natural-History-Rabies-George-Baer-ebook/dp/B08QYZKBL/ref=sr\\_1\\_2?dchild=1&keywords=The+Natural+History+of+Rabies&qid=1609310833&s=b&sr=1-2](https://www.amazon.com/Natural-History-Rabies-George-Baer-ebook/dp/B08QYZKBL/ref=sr_1_2?dchild=1&keywords=The+Natural+History+of+Rabies&qid=1609310833&s=b&sr=1-2)
18. Marques CP, Cheeran MC-J, Palmquist JM, Hu S, Lokensgard JR. Microglia are the major cellular source of inducible nitric oxide synthase during experimental herpes encephalitis. *J Neurovirol*. 2008;14(3):229-38.
19. Shivers CM, Krizova K, Lee GK. Types of strain among family members of individuals with autism spectrum disorder across the lifespan. *Res Dev Disabil*. 2017;68:42-51.

20. Valcour V, Shiramizu B. HIV-associated dementia, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress. *Mitochondrion*. 2004;4(2-3):119-29.
21. Jackson AC, Kammouni W, Zhrebetskaya E, Fernyhough P. Role of oxidative stress in rabies virus infection of adult mouse dorsal root ganglion neurons. *J Virol*. 2010;84(9):4697-705.
22. Ubol S, Sukwattanapan C, Maneerat Y. Inducible nitric oxide synthase inhibition delays death of rabies virus-infected mice. *J Med Microbiol*. 2001;50(3):238-42.
23. Van Dam AM, Bauer J, Man-A-Hing WK, Marquette C, Tilders FJ, Berkenbosch F. Appearance of inducible nitric oxide synthase in the rat central nervous system after rabies virus infection and during experimental allergic encephalomyelitis but not after peripheral administration of endotoxin. *J Neurosci Res*. 1995;40(2):251-60.
24. Connelly L, Jacobs AT, Palacios-Callender M, Moncada S, Hobbs AJ. Macrophage endothelial nitric-oxide synthase autoregulates cellular activation and pro-inflammatory protein expression. *J Biol Chem*. 2003;278(29):26480-7.
25. Merrill JE, Ignarro LJ, Sherman MP, Melinek J, Lane TE. Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide. *J Immunol*. 1993;151(4):2132-41.
26. Jackson AC, Kammouni W, Fernyhough P. Role of oxidative stress in rabies virus infection. *Adv Virus Res*. 2011;79:127-38.
27. Scandalios JG. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol*. 1993;101(1):7-12.
28. Alscher RG, Erturk N, Heath LS. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot*. 2002;53(372):1331-41.
29. Zaffagnini M, Fermani S, Marchand CH, Costa A, Sparla F, Rouhier N, et al. Redox homeostasis in photosynthetic organisms: novel and established thiol-based molecular mechanisms. *Antioxid Redox Signal*. 2019;31(3):155-210.
30. Kikuchi Y, Sunada K, Iyoda T, Hashimoto K, Fujishima A. Photocatalytic bactericidal effect of TiO<sub>2</sub> thin films: dynamic view of the active oxygen species responsible for the effect. *J Photochem Photobiol A: Chem*. 1997;106(1-3):51-6.
31. Massilamany C, Gangaplara A, Kim H, Stanford C, Rathnaiah G, Steffen D, et al. Copper–zinc superoxide dismutase-deficient mice show increased susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis induced with myelin oligodendrocyte glycoprotein 35-55. *J Neuroimmunol*. 2013;256(1-2):19-27.
32. Habjan M, Andersson I, Klingström J, Schumann M, Martin A, Zimmermann P, et al. Processing of genome 5' termini as a strategy of negative-strand RNA viruses to avoid RIG-I-dependent interferon induction. *PLoS One*. 2008;3(4):e2032.
33. Kammouni W, Hasan L, Saleh A, Wood H, Fernyhough P, Jackson AC. Role of nuclear factor- $\kappa$ B in oxidative stress associated with rabies virus infection of adult rat dorsal root ganglion neurons. *J Virol*. 2012;86(15):8139-46.
34. Luco S, Delmas O, Vidalain P-O, Tangy F, Weil R, Bourhy H. RelA $\mu$ 43, a member of the NF- $\kappa$ B family involved in innate immune response against Lyssavirus infection. *PLoS Pathog*. 2012;8(12):e1003060.