مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
سال ۶۵، شماره ۳
مرداد-شهریور۱۴۰۱، صفحه، صفحه ۱۴۰۰-۱۳۸۷

www.mums.ac.ir
Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol 65, No.3, P: 1387-1400
Jul -Sep2022

مقاله اصلی

ارزیابی فعالیت ضد پارکینسونی آستاگزانتین در شرایط برون تنی ودرون تنی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۰۲- تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۰۸

مهین مافی اسماعیلی[۱]
مریم خسروی[۲*]
محمدحسین اسماعیلی[۳]
مریم بنانج[۴]
جلال صولتی[۵]

[۱] دانشجوی فیزیولوژی جانوری گروه زیستشناسی، دانشکده علومزیستی، دانشگاه آزاد اسلامیواحد تهران شمال، تهران، ایران
[۲] استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامیواحد تهران شمال، تهران، ایران (نویسنده مسئول)
[۳] دانشیار گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
[۴] استادیار گروه زیستشناسی، دانشکده علومزیستی، دانشگاه آزاد اسلامیواحد تهران شمال، تهران، ایران
[۵] استادیار گروه زیست شناسی دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامیواحد کرج، کرج ایران

Email:
Maryam -Khosravi@iau-tnb.ac.ir

خلاصه

مقدمه: التهاب و استرس اکسیداتیو در پاتوژنز بیماری پارکینسون نقش دارند. آستاگزانتی ندارای اثرات آنتی اکسیدانی، ضد التهابی است و ممکن است برای درمان بیماری پارکینسون مفید باشد. در مطالعه حاضر، ما اثرات مفیدآستاگزانتین را در برابر سمیت ۶-هیدروکسی دپامیندر مدل‌های حیوانی و سلولی بررسی کردیم.

روش کار: از موش نژاد NMRI استفاده شد.پارکینسون با تزریق۶-هیدروکسی دوپامینبه داخل جسم مخطط چپ ایجاد شد. موش‌های پارکینسونی به گروه شاهد و درمانی تقسیم شدند.گروه درمانی به مدت ۲۸ روز آب یا آستاگزانتین (۲۰،۱۰و ۳۰ میلی گرم برکیلوگرم) را به صورت خوراکی دریافت کردند. فعالیت‌های رفتاری موش‌ها با آزمون چرخشی ناشی از آپومورفین تعیین شد. سلول‌های دوپامینرژیکSH-SY5Y به مدت ۴۸ ساعت با آستاگزانتین(۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰و ۲۰ میکرومول) در حضور یا عدم حضور۶-هیدروکسی دوپامین کشت داده شدند. نقش محافظتی آستاگزانتین با روش شمارش سلولی آبی تریپان ارزیابی شد.میزان زنده ماندن سلول‌های SH-SY5Y با استفاده از روش MTT تعیین شد.

نتایج: نتایج نشان داد که اختلالات رفتاری ناشی از ۶-هیدروکسی دوپامین در موش‌ها توسط آستاگزانتین بهبود یافته است. انکوباسیون با آستاگزانتین آپوپتوز و نکروز سلول‌های SH-SY5Y ناشی از ۶-هیدروکسی دوپامینرا مهار کرد. همچنین اختلال زنده ماندن سلول‌های SH-SY5Y توسط پیش درمانیبا آستاگزانتین ترمیم شد.

نتیجه‌گیری: نتایج ما نشان داد که درمان با آستاگزانتین می‌تواند از سلول‌های SH-SY5Y و نورون‌های دوپامینرژیک جسم سیاه در مقابل سمیت ناشی از ۶-هیدروکسی دوپامینبه صورت وابسته به دوز محافظت کند.

کلمات کلیدی: بیماری پارکینسون، ۶-هیدروکسی دوپامین، آستاگزانتین، آزمون رفتار چرخشی ناشی از آپومورفین

مقدمه

بیماری پارکینسون دومین اختلال نورودژنراتیو شایع است که در درجه اول با علائم مختلف حرکتی و غیر حرکتی از جمله آکینزی، برادی کینزی و لرزش در حالت استراحت، سفتی و بی ثباتی وضعیتی مشخص می‌شود.بیماران پارکینسونی علائم مختلف غیر حرکتی مانند افسردگی، زوال عقل و روان پریشی را نیز تجربه می‌کنند(۱و۲). این علائم حرکتی عمدتاً به دلیل از دست دادن نورون‌های دوپامینرژیک در سیستم نیگرواستریاتال است(۳). علل و پاتوژنز بیماری پارکینسون به طور کامل مشخص نیست، هرچند التهاب عصبی و استرس اکسیداتیو و آپوپتوز در پاتوژنز بیماری‌های نورودژنراتیو از قبیل بیماری آلزایمروپارکینسون نقش دارند. (۴-۶). جسم سیاه رادیکال‌های آزاد اکسیژن (reactive oxygen species) زیادی تولید می‌کند در حالی که سطح گلوتاتیون آن کم می‌باشد که هر دو به آسیب اکسیداتیو و در نتیجه استرس سلولی در این منطقه کمک می‌کنند(۷). غلظت رادیکال‌های آزاد اکسیژن تحت شرایط تنش و استرس به طور چشمگیری افزایش می‌یابد، بالا رفتن غلظت رادیکال‌های آزاد اکسیژن باعث آسیب به ساختار سلول می‌شود. با افزایش سن سطح استرس‌های اکسیداتیوافزایش می‌یابد که خود عامل اصلی ابتلا به بیماری‌های نورودژنراتیو، در پیری است. تجمع آمیلوئیدهای بتا(amyloid-β)، پروتئین‌های تائو فسفوریله وسینوکلئین الفا با بیماری‌های نورودژنراتیو در ارتباط است.تجمع این پروتئین‌های ناجورتا خورده می‌تواند باعث تکه تکه شدن میتوکندری‌ها و اختلال در عملکرد میتوکندری شود که به نوبه خود منجر به افزایش سطحرادیکال‌های آزاد اکسیژنمی‌شود.استرس‌های اکسیداتیو ناشی ازبالا رفتن غلظت رادیکال‌های آزاد اکسیژننقش مهمی‌در تولید و تجمعآمیلوئیدهای بتادر مغز دارد.آمیلوئیدهای بتا از طریق فعال کردن میکروگلیاهای مغز باعث التهاب عصبی می‌شود، که منجر به بیان سیتوکین‌های پیش التهابی مانند اینترلوکین‌ها و فاکتور نکروز تومورالفا (TNF-α) می‌گردد و متعاقباً باعث مرگ نورون‌ها می‌شود(۸). فاکتور هسته ای (Nuclear factor-kB (NF-kBکه نقشی مهمی در تنظیم التهاب و آپوپتوز دارد، در برنامه ریزی پیری سیستمیک، در مغز و همچنین در پاتوژنز بیماری‌های نورودژنراتیو دخالت دارد (۹). اکنون مشخص شده است که فاکتور هسته‌ای NFκB ضمن کنترل نورون زایی (نوروژنز) در مغز بزرگسالان در تمایز و تکامل سلول‌های شوان و میلین دار شدن آکسون نورون‌های محیطی نیز اهمیت زیادی دارد(۱۰).

فاکتور هسته‌ای NFκB به عنوان یک فاکتور رونویسی از روی DNA با افزایش تولید برخی از سیتوکین‌های پیش التهابی و رادیکال‌های آزاد اکسیژن در مغز باعث التهاب نورونی می‌شود. در سیتوپلاسم سلول‌های ماکروفاژ، فاکتور هسته‌ایNFκB - به پروتئین بازدارنده آن (inhibitor protein, IκB)، یعنی IκB متصل می‌گردد.التهاب مغزباعث جدا شدن فاکتور هسته ایNFκB از مهارگرش (IκB) در سیتوپلاسم می‌شود وپس از ازادشدن از مهارگر وارد هسته سلول می‌گردد تا بیان واسطه‌های پیش التهابی را القا کند(۱۱و۱۲).

از طرف دیگر فاکتور هسته ای **E2**مرتبط با مسیر فاکتور ۲ (nuclear factor E2-related factor 2(NRF2) با تحریک تولید آنزیم‌های آنتی اکسیدان نقش مهمی در جلوگیری از تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژنو استرس‌های اکسیداتیو دارد (۱۳) NRF2.می‌تواند پاسخ‌های التهابی مرتبط با فاکتور هسته‌ای NFκB را در مغز مهار کند(۱۴).کاهش سطح رادیکال‌های آزاد اکسیژن داخل سلولی می‌تواند سیگنال‌های پیش التهابی را در مغز مهار کند(۴). پیشنهاد شده است که هر ترکیب فعال زیستی که خاصیت آنتی اکسیدانی داشته و بتواند مسیر NRF2 را فعال کند، ممکن است دارای پتانسیل‌های درمانی برای جلوگیری از پیشرفت بیماری‌های مرتبط با التهاب مانندبیماری پارکینسون باشد.NRF2.

فعال سازی NRF2 با تنظیم مسیر دفاع آنتی اکسیدانی، مهار التهاب و حفظ هموستاز پروتئین، بدن ما را از فشارهای مضر محافظت می‌نماید (۱۵).

NRF2 به عنوان یک هدف درمانی جدید در بیماری پارکینسون پدیدار شده است. در واقع، مطالعات اخیر نشان داده

که فعال کننده‌های NRF2اثرات درمانی هم در مدل‌های حیوانی بیماری پارکینسون و هم در محیط کشت سلول‌های انسانی که نشانه‌های پاتولوژیک این بیماری را نشان می‌دهند دارند. درمان فعلی بیماری پارکینسون شامل داروهایی است که با جایگزینی دوپامین عمل می‌کنند و یا از تخریب دوپامین در مغز جلوگیری مینمایند.اگرچه این داروها (لوودوپا) برای درمان بیماری پارکینسون موثر هستند ،ولی هیچ دارویی موثری وجود ندارد که بتواند نورون‌ها را محافظت کند و پیشرفت بیماری را به تأخیر بیندازد (۱۶).

انواع مختلف ترکیبات فعال زیستی طبیعی مانندآستاگزانتین که دارای عملکرد محافظت نورونی هستند پیشنهاد شده است و تصور می‌شود که می‌توانند کیفیت زندگی افراد مبتلا به بیماری‌های نورودژنراتیو را بهبود بخشند و ممکن است برای درمان بیماری پارکینسون مفید باشند. آستاگزانتین یک کاروتنوئید گزانتوفیل است که دارای خواص ضد التهابی و آنتی اکسیدانی می‌باشد(۱۷).

Lin Zhao وهمکاران درسال ۲۰۲۱ درنتایج آزمایش‌های رفتاری خود نقش امیدوارکننده AST را در اثر ضد درد در موش‌های SNL نشان دادند AST. فعال‌سازی عصبی و غیر عصبی، سطح واسطه‌های سیگنال‌دهی التهابی p38 MAPK) و NF-κB p65)و بیان سیتوکین‌های التهابی (اینترلوکین1-IL] ، IL-17، (IL-6 را کاهش داد. این نتایج نشان می‌دهد که AST یک کاندید امیدوارکننده برای کاهش حساسیت بیش از حد درد است (۱۸). همچنین نشان داده شده است که مکمل آستاگزانتین می‌تواند نورون موش‌های جوان و پیر را دربرابر سمیتMPTP، با حفظ بیان تیروزین هیدروکسیلاز در ناحیه نیگروستریاتال، کاهش فعال سازی میکروگلیال و افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی در موش‌های تحت درمان با آستاگزانتین محافظت نماید (۱۹). علاوه بر این، نشان داده شد که مکمل غذایی آستاگزانتین نورونهای قشر مغز را در برابر آسیب ناشی از ضربه مغزی محفاظت می‌کند و نقایص رفتاری بعدی ناشی از ضربه مغزی را کاهش می‌دهد(۲۰). به همین ترتیب، درمان با آستاگزانتین از مرگ نورون‌ها در مدل خونریزی زیر عنکبوتیه جلوگیری می‌کند (۲۱). آزمایشات اخیر بیشتر از اثربخشی آستاگزانتین در داخل بدن پشتیبانی می‌کند و از مفهوم استراتژی‌های درمانی مبتنی برآستاگزانتین در شرایط نورولوژیک نیز پشتیبانی می‌نمایند(۲۱-۲۳). نشان داده شده است که مکمل غذایی آستاگزانتینمی‌تواند سمیت نورونی MPTPرا کاهش دهد (۲۴). علاوه بر این، لیو و همکاران نشان دادند که پیش درمانی با آستاگزانتین از طریق پتانسیل آنتی اکسیدانی و از طریق مسدود کردن فسفوریلاسیون p38 MAPK و کاهش کاسپاز و- ADP ریبوز پلیمراز باعث مهار آپوپتوز، تولید و تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژندرون سلولی و اختلالات عملکرد میتوکندری در سلولهای SH-SY5Y ناشی از سم ۶-هیدروکسی دوپامین می‌شود(۲۵،۲۶). برخی مطالعات نشان داده‌اند که آستاگزانتین عملکرد ضد التهابی خود را با کاهش بیان سیتوکین‌های پیش التهابی، اعمال می‌کند (۲۷). در حالی کهNFκB می‌تواند باعث تولید سیتوکین‌های پیش التهابی در ماکروفاژها شود NRF2.با افزایش توان دفاع آنتی اکسیدانی درون‌زای بدن با اثرات NFκB مقابله می‌نماید(۳،۵،۳۸). بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که آستاگزانتین اثرات ضد التهابی خود را از طریق کاهش تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژندر لنفوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها اعمال می‌کند (۲۷-۳۰). همچنین باعث کاهش تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژندر ماکروفاژهای تحریک شده با لیپوپلی ساکارید (LPS) می‌شود(۲۷). بعلاوه نشان داده شده است که آستاگزانتین از طریق تنظیم مسیر Nrf2-ARE از سلولهایARPE-19 در برابر استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند (۳۱،۳۲). در این راستا نشان داده شده است که آستاگزانتین با مهار انتقالNFκB p65 به هسته، بیان سیتوکین‌های التهابی ناشی ازلیپوپلی ساکارید را به طور معنی داری کاهش می‌دهد.همچنینآستاگزانتینبا افزایش انتقال NRF2 به هسته، تجمعرادیکال‌های آزاد اکسیژنناشی ازلیپوپلی ساکارید را در ماکروفاژها کاهش داد (۳۳).

آستاگزانتین با مهار انتقال NFκB p65 به هسته و جلوگیری از تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژندر مکانیسم‌های وابسته و

مستقل از **NRF2**، اثر ضد التهابی خود را اعمال می‌کند. با این حال، اگرچه اثرات ضد التهابی و آنتی اکسیدانی آستاگزانتینبه خوبی شناخته شده است، اما مکانیسم‌های اساسی آن هنوز مشخص نشده است. به ویژه، عمل تعدیل کننده آستاگزانتین در تعامل NRF2 وNFκB برای اعمال اثر ضد التهابی و آنتی اکسیدانی آن در سلول‌ها و موش‌های پارکینسونی، مدل۶-هیدروکسی دوپامین ناشناخته است. بنابراین، مطالعه حاضر برای ارزیابی اثرآستاگزانتینبر پارکینسونیسم ناشی ازسم ۶-هیدروکسی دوپامین در موش‌ها و مسمومیت نورونی ناشی ازسم ۶-هیدروکسی دوپامیندر سلول‌های SH-SY5Y طراحی شده است.

روش کار

مدل حیوانی و تجویز سم ٦-هیدروکسی دوپامین

آزمایشات روی موشهای کوچک آزمایشگاهی نربالغ نژاد NMRIجوان بالغ (۳۰-۲۵ گرم) خریداری شده از انستیتو پاستور انجام شد حیوانات در طول آزمایش تحت شرایط استاندارد مراقبت از حیوانات در یک چرخه شبانه روزی ۱۲ ساعته و دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. همه پروتکل‌ها مطابق با دستورالعمل‌های کنونی ایران بوده و توسط کمیته اخلاق (IR.QUMS.REC.1398.053) تأیید شده‌اند. حیوانات (۱۰ راس در هرگروه) به دو گروه کنترل و پارکینسونی تقسیم شدند.پارکینسون با تزریق سم ۶-هیدروکسی دوپامین(۵میکروگرم / ۱ میکرولیتر درمحلول اسید اسکوربیک سالین۲٪) به جسم مخطط سمت چپ ایجاد شد. درگروه کنترل یک میکرولیتر سرم نمکی حاوی ۲٪ اسیداسکوربیک به عنوان حلال سم ۶-هیدروکسی دوپامین به جسم مخطط سمت چپ تزریق شد. گروه پارکینسونی به طور تصادفی به دو گروه کنترل و درمان تقسیم شدند.گروه‌های درمانی استاگزانتین (۱۰و۲۰و۳۰ میلی گرم در کیلوگرم) را روزانه به صورت خوراکی به مدت ۲۸ روز دریافت گردند. گروه کنترل،آب مقطر حلال استاگزانتینرا دریافت کردند(۱۴و۳۵).

مرحله اول: ایجاد مدل حیوانی پارکینسون

۱- گروه کنترل این گروه سالین حاوی ۲٪ اسید اسکوربیک) حلال ۶ (HDOP-را به درون استرایاتوم سمت چپ مغز دریافت کردند (۱۰ سر).

2- موش‌های پارکینسونی این گروه با تزریق سم۶-هیدروکسی دوپامین(۵ میکروگرم/میکرولیتر محلول سالین-اسید اسکوربیک ۲٪) به درون استرایاتوم سمت چپ مغز پارکینسونی شدند (۴۰سر).

مرحله دوم: بررسی اثرات آستاگزانتین بر روی موش‌های پارکینسونی

1- گروه کنترل که فقط آب مقطر حلال آستاگزانتین را به صورت گاواژ دریافت کردند (۱۰ سر)

2- گروه‌های تیماری با آستاگزانتین، آستاگزانتین را با دوزهای) ۱۰ ,۲۰ , ۳۰ (mg/kg را به صورت گاواژ دریافت کردند (۳۰ سر) .

جراحی استریوتاکسی و ایجاد مدل حیوانی پارکینسون

برای ایجاد مدل پارکینسونی یک طرفه سم۶-هیدروکسیدوپامین(۵ میکروگرم/میکرولیتر محلول سالین- اسید اسکوربیک ۲٪) با جراحی استرئوتاکسیک به هسته استریاتوم طرف چپ تزریق شد. دراین جراحی ابتدا حیوانات با استفاده از (کتامین / زایلازین) ۶/۶۰میلی گرم بر کیلوگرم بیهوش و سپس در دستگاه استرئوتاکس قرار داده شدند. در پوست سر یک برش طولی به اندازه ۲ سانتیمتر ایجاد و سطح استخوان آشکار شد. سپس نقطه برگما مشخص شد و با استفاده از دستگاه استرئوتاکسو به کمک اطلس پاکسینوزمحل مدنظر تزریق نشانه گذاری شد(+ ۰/ ۴)نسبت به برگما و (+۰,۱۸) نسبت به خط وسط (-۰,۳۵) نسبت به سختشامه، سپس سطح جمجمه با مته دندانپزشکی سوراخ شد وبا استفاده از سرنگ هامیلتون تزریق سم ۶ –هیدروکسیدوپامین به درون ناحیه مدنظر به آهستگی صورت گرفت. درگروه آزمایش به جای سم ۶ – هیدروکسیدوپامین، حلال آن یعنی محلول سالین- اسید اسکوربیک ۲٪) به درون هسته استریاتوم طرف چپ تزریق شد. جهت بررسی محل دقیق تزریق برای تعدادی از موش‌ها رنگ

متیلن بلو تزریق شده و سپس با برش بافتی محل دقیق تزریق مشخص شد(۳۵).

چرخش ناشی از تزریق آپومورفین:یک هفته بعد از ایجاد مدل پارکینسونی، آپومورفین هیدروکلراید با دوز mg/kg0.5 داخل صفاقی تزریق شد. حیوانات از ۱۰ دقیقه قبل از شروع آزمایش به یک محفظه استوانه‌ای مدرج بر حسب زاویه از جنس پلکسی گلاس به قطر ۳۳ و ارتفاع ۳۵ سانتی متر منتقل گردیدند. یک دقیقه پس از تزریق دارو، تعداد چرخش در فواصل زمانی ۱۰ دقیقه ای به مدت ۶۰ دقیقه تحت شرایط آرام توسط یک شمارش گر دستی اندازه گیری شد. با توجه به ناحیه‌ی آسیب دیده، تعداد چرخش ایپسیلترال (چرخش به سمت چپ) به عنوان عدد منفی و تعداد چرخش کنترالترال (چرخش به سمت راست) به عنوان عدد مثبت در نظر گرفته شده و تعداد خالص چرخش به صورت تفاضل چرخش‌ها در دو جهت محاسبه گردید(۹۸).

آزمونهای رفتاری چرخش القا شده با اپومرفین

این آزمون در مرحله اول آزمایش جهت تایید ایجاد مدل پارکینسون و ۲۸ روز سم ۶ -هیدروکسی دوپامین و در مرحله دوم آزمایش ۲۸ روز تزریق آستاگزانتین این آزمون انجام شد. برای این منظور حیوانات از ۱۰ دقیقه قبل از شروع آزمایش به یک محفظه استوانه‌ای مدرج بر حسب زاویه از جنس پلکسی گلاس به قطر ۳۳ و ارتفاع ۳۵ سانتی متر منتقل شدند. ۵ دقیقه به حیوانات زمان داده شد با محیط جدید مانوس شوند و سپس هیدروکلراید آپومورفین (سیگما، ۰/۵میلی گرم بر کیلوگرم) به صورت داخل صفاقی تزریق شد. پس از یک دقیقه، تعداد چرخش‌های کامل در مدت ۶۰ دقیقه تحت شرایط آرام توسط یک شمارش گر دستی اندازه گیری و ثبت شد. تعدادچرخش‌ها به طرف محل تزریق سم(عدد منفی) یا خلاف آن (عدد مثبت) ثبت گردید. تعداد خالص چرخش‌ها با کسر نمرات منفی از نمرات مثبت محاسبه شد. اعداد بالای چرخش‌های خالص به طرف مقابل نشان می‌دهد که حیوان به خوبی پارکینسونی شده است.

داروها و مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایش سم ۶-هیدروکسی دوپامین از شرکت توکریس آمریکا خریداری شد و بصورت درون مغزی تزریق گردید. آستاگزانتین (۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی گرم در کیلوگرم) از شرکت Narayana آلمان خریداری و به صورت خوراکی به مدت ۲۸ روزتجویز شد. آب مقطر حلال آستاگزانتین بود(۳۴).

کشت سلولی و درمان

سلول‌های دوپامینرژیک تهیه شده از انستیتوپاستور-SH) (SY5Yبا تقلید از مدل بیماری پارکینسون در شرایط آزمایشگاهی با سم ۶-هیدروکسی دوپامین تحت درمان قرار گرفتند. سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت با غلظت‌های مختلف آستاگزانتین(۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰ میکرومول در لیتر) در حضور یا عدم حضور سم ۶-هیدروکسی دوپامین کشت داده شدند. زنده ماندن سلول‌ها با استفاده از روش trypan blue اندازه گیری شد. سلول‌های دوپامینرژیک SH-SY5Y در صفحات کشت بافتی ۱۰۰ میلی متری در DMEM با گلوکز بالا و ۱۰٪ (v / v)سرم جنین گوساله غیرفعال شده با حرارت و ۱۰۰ واحد در میلی لیتر پنی سیلین / استرپتومایسین کشت داده شدند. سلول‌ها دردمای ۳۷ درجه و هوا ی مرطوب با ۵درصد CO2و ۹۵درصد هوا در دستگاه کشت سلولی نگهداری شدند. همه آزمایشات ۴۸ ساعت پس از کشت سلول‌ها انجام شد. سلول‌های دوپامینرژیک SH-SY5Y به مدت ۴۸ ساعت با۶-هیدروکسی دوپامین در حضور یا عدم حضور سم آستاگزانتین کشت داده شدند. در طی مطالعات اثر سم ۶-هیدروکسی دوپامین بر محیط کشت، محیط رشد سلول‌ها با ۱ میلی مولارسم ۶-هیدروکسی دوپامین، با غلظت‌های مختلف آستاگزانتین(۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰ میکرومول در لیتر) تکمیل شد.

سنجش توان حیاتی سلول ها

یکی از موارد مهم در بحث زیست شناسی سلول تعیین بقای سلول است. از جمله آزمایش‌هایی که در این زمینه از اهمیت خاصی برخوردار است سنجش توان حیاتی سلول‌ها یا همان

تست MTT است. برای ارزیابی سلول‌های زنده از پودر MTT استفاده می‌شود MTT .توسط سلول‌ها جذب شده و سپس توسط دهیدروژناز میتوکندری به فورمازان تبدیل می‌شود. تجمع فورمازان منعکس کننده فعالیت میتوکندری به طور مستقیم و زنده ماندن سلول به طور غیر مستقیم است. در این تست محلول زرد رنگ تهیه شده از پودرMTT، توسط سلول‌های زنده و فعال از نظر متابولیکی در طی مدت تقریبی ۴ ساعت به بلورهای ارغوانی رنگ فورمازان تبدیل می‌شود. کریستال‌های فورمازان ساخته شده به کمک حلال DMSO حل شده و جذب نوری محلول ارغوانی رنگ به وسیله الایزا ریدر در طول موج 570 nm خوانده می‌شود.

-بررسی اثرات داروها

برای انجام این تست ابتدا سوسپانسیون سلولی تهیه شده و شمارش سلولی صورت گرفت. سپس سلول‌ها به تعداد ۵۰۰۰ در هر چاهک به پلیت ۹۶ خانه ته صاف با محیط کشت کامل منتقل شده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتورCO2 انکوبه شدند. پس از ۲۴ ساعت محیط کشت قبلی سلول‌ها با محیط کشت تازه که تیمارها در آن صورت گرفته است تعویض گردید.

تیمارها به این شکل انجام شد: غلظت‌های مختلف از ۶-هیدروکسی دوپامین و آستاگزانتین تهیه شده و ۱ ماکرولیتر از هر یک از غلظت‌های تهیه شده برداشته و با محیط کشت کامل به حجم ۲۰۰ماکرولیتر رسانده و به داخل چاهک ریخته شد. سپس پلیت‌ها به انکوباتور برگردانده. غلظت نهایی ترکیبات در داخل چاهک برای۶-هیدروکسی ۲۵، ۵۰، ۷۵و برای آستاگزانتین ۰/۲۵، ۰/۱، ۰/۰۱ بود.

هر تیمار در هر پلیت ۵ بار تکرارد شد و در هر پلیت چند چاهک به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. پس از ۴۸ ساعت پلیت از انکوباتور خارج شده و محیط کشت حاوی تیمارها تخلیه شده و ۲۰۰ ماکرولیتر محلول MTT به هر چاهک اضافه گردید با غلظت نهایی.(mg/ml 5/0 اضافه کردن محلول MTT به چاهک‌ها در تاریکی و دور از نور مستقیم انجام گرفت. سپس پلیت با فویل پوشیده شده و به مدت ۴ ساعت انکوبه گردید. بعد از ۴ ساعت انکوباسیون بلورهای فورمازان ظاهر شد و به هر چاهک ۲۰۰ ماکرولیتر DMSO اضافه گردید و بلورهای ارغوانی فورمازان حل شده و جذب نمونه‌ها در nm570 با دستگاه الایزا اندازگیری شد و درصد سایتوتوکسیسیتی ۶-هیدروکسی و dose-responseداروها محاسبه گردید.

محاسبه درصد سلول هایزنده در تست سمیت سلولی

درصد سلول‌های زنده یا میزان بقای سلولی در بررسی سمیت سلولی، بر اساس رابطه زیر محاسبه می گردد:

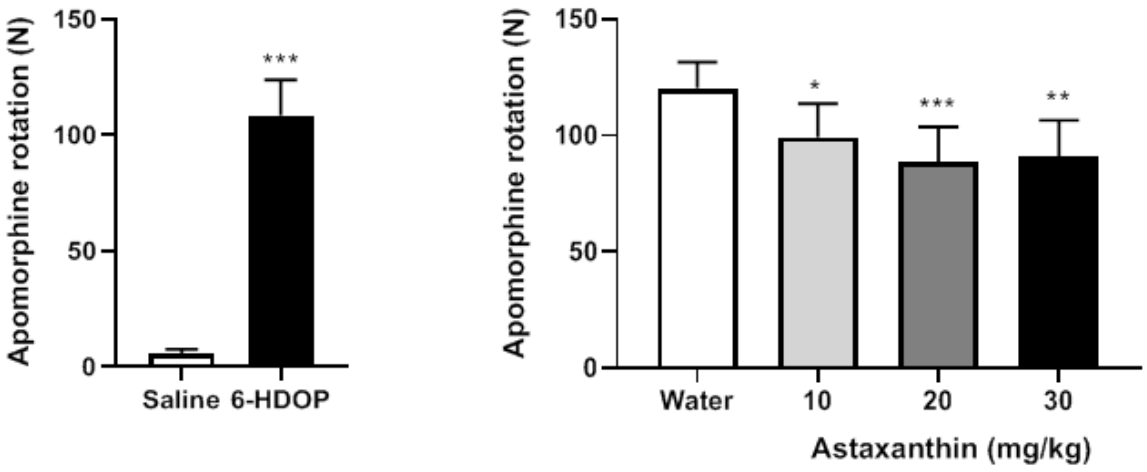
۱۰۰ × جذب متوسط نمونه‌های کنترل / جذب متوسط نمونه‌های تیمار شده = درصد سلول‌های زنده

نتایج

آزمون‌های رفتاری

آزمون رفتاری چرخش القاء شده با اپومرفین به منظور اطمینان از ایجاد مدل و همچنین ارزیابی شدت پارکینسونیسم در موش‌های تحت درمان با ۶-هیدروکسی دوپامین انجام شد. نمودارهای سمت چپ در شکل ۱ نتایج آزمایش‌های چرخشی ناشی از آپومورفین را در دو گروه شاهد و پارکینسونی نشان می‌دهد. هیچ یک از موش‌های گروه شاهد رفتار چرخشی قابل توجهی از خود نشان ندادند. فقط موش‌های متعلق به گروه ۶-هیدروکسی دوپامین چرخش‌های جانبی معنی داری به سمت چپ داشتند ($p<۰/۰۰۱$). نمودارهای سمت راست در شکل ۱ نتایج آزمایش‌های چرخشی ناشی از آپومورفین در موش‌های پارکینسونی تیمار شده با آب مقطر (حلال آستاگزانتین) و استاگزانتین خوراکی به مدت ۲۸ روز را نشان می‌دهد.

همانطور که در شکل دیده می‌شود سم ۶-هیدروکسی دوپامین چرخش‌های جانبی معنی داری به سمت چپ ایجاد کرد و درمان موش‌های پارکینسونی با آستاگزانتین چرخش القاء شده با اپومرفین موش‌ها را به صورت وابسته به دوز کاهش داد. براساس نتایج کدگذاری ثانویه پژوهش، شاخص‌های مشارکت زنان در امر قانون گذاری سازمانی، تغییر در نگرش سیستم ارتقاء شغلی، حمایت مسئولین دولتی، پر رنگ نمودن نقش زنان در سیاست‌گذاری سازمانی، بازنگری قوانین و مقررات موجود به نفع زنان به عنوان مقوله‌های زمینه‌ای در طراحی الگوی توانمندسازی و ارتقاء جایگاه مدیریتی زنان در آموزش‌وپرورش شمال شرق کشور انتخاب شدند.



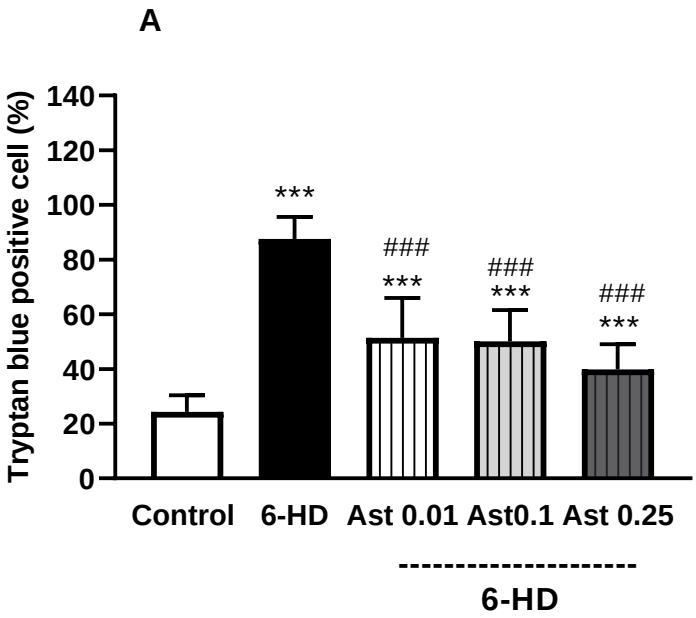
شکل(۱)مقایسه یافته‌های آزمون چرخشی ناشی از آپومورفین در بین گروه‌های مورد آزمایش.سمت چپ در بین گروه‌های سالین و ۶-هیدروکسی دوپامین. سمت راست در بین گروه‌های پارکینسونی تیمار شده با آب مقطر و استاگزانتین**p<0.05*** و **p<0.01**** و **p<0.001***** اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل.

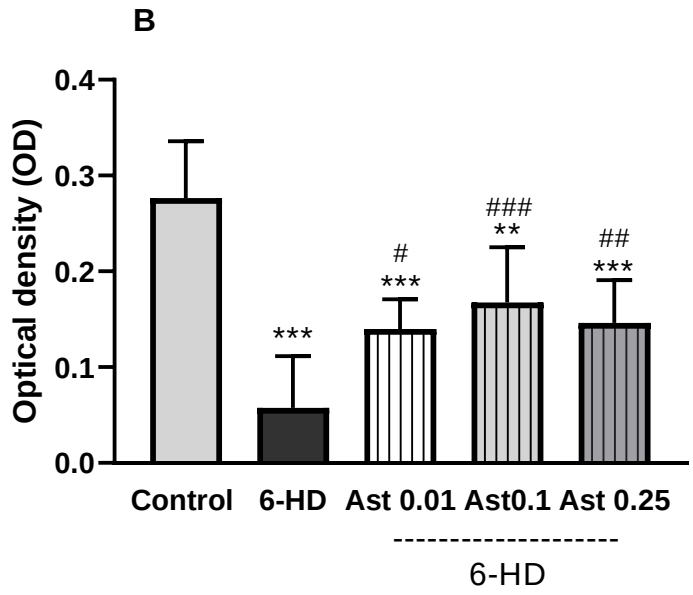
سنجش میزان زنده ماندن سلول‌ها

برای ارزیابی دوام سلول‌های SH-SY5Yدوپامینرژیک پس از قرار گرفتن در معرض نوروتوکسین ۶-هیدروکسی دوپامین، محیط کشت سلول‌های SH-SY5Yبا سم ۶-هیدروکسی دوپامین۱ میلی مولار به مدت ۴۸ ساعت تحت درمان قرار گرفتند. درمان با سم ۶-هیدروکسی دوپامین بقای سلول‌ها را به طور قابل توجهی کاهش داد شکل (۲)A,B- .سپس ما اثرات محافظت از نورون غلظت‌های مختلف آستاگزانتین (۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰ میکرومول در لیتر) را بررسی کردیم. آستاگزانتین به صورت وابسته به دوز از خود اثر محافظتی نشان داد و غلظت‌های مختلف آستاگزانتین بطور قابل توجهی بقای سلول را به روش وابسته به دوز در مقایسه با ۶-هیدروکسی دوپامین به تنهایی افزایش داد (شکل ۲ .A,B-)

فعالیت متابولیک سلولهای زنده با آزمایش زنده ماندن سلول با رنگ تریپان آبی و به دنبال آن کمی‌سازی چگالی نوری ارزیابی شد. همانطور که شکل ۲ A-نشان می‌دهد آلوده کردن محیط کشت سلول‌های دوپامینرژیک SH-SY5Y به سم ۶-هیدروکسی دوپامین باعث کاهش معنی دار درصدسلولهای سلول‌های تریپتان آبی مثبت نسبت به گروه کنترل شد. در حالی که اضافه کردن آستاگزانتین(۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰ میکرومول در لیتر) به محیط کشت سلول‌های آسیب دیده از سم۶-هیدروکسی دوپامین باعث افزایش وابسته به دوز درصد سلول‌های تریپتان آبی مثبت (زنده مانده) نسبت به گروه۶-هیدروکسی دوپامین شد.

همانطور که شکل۲-B نشان می‌دهد سنجش شدت چگالی نوری محیط کشت سلول‌های دوپامینرژیک SH-SY5Y نیز نشان داد که آلوده کردن محیط کشت این سلول‌ها شدت چگالی نوری را کاهش می‌دهد (این بدان معنی است که سم ۶-هیدروکسی دوپامین باعث کاهش معنی دار درصدسلولهای زنده مانده شده است) و برعکس اضافه کردن آستاگزانتین به محیط کشت سلول‌های آسیب دیده از سم۶-هیدروکسی دوپامین باعث افزایش وابسته به دوز شدت چگالی نوری می‌شود (این بدان معنی است که تیمار سلول‌های آسیب دیده از سم۶-هیدروکسی دوپامین باعث افزایش وابسته به دوز درصدسلول‌های زنده مانده شده است).





شکل (۲) اثرات آستاگزانتین بر زنده ماندن سلول‌ها پس از سمیت ناشی از ۶-هیدروکسی دوپامیندر سلول‌های SH-SY5Y مقایسه درصدسلولهای زنده در تست سمیت سلولی با نوروتوکسین ۶-هیدروکسی دوپامین به کمک سنجش درصدسلول‌های تریپتان آبی مثبت (A) و سنجش شدت چگالی نوری(B) محیط کشت سلول‌های دوپامینرژیک SH-SY5Y.

آلوده کردن محیط کشت سلول‌های دوپامینرژیک SH-SY5Y به سم ۶-هیدروکسی دوپامین درصدسلول‌های تریپان آبی مثبت افزایش و شدت چگالی نوری محیط کشت سلولی را به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل کاهش داد در حالی که اضافه کردن آستاگزانتین به محیط کشت سلول‌های آسیب دیده از سم۶-هیدروکسی دوپامین باعث افزایش وابسته به دوز تعداد سلولهای زنده نسبت به گروه ۶-هیدروکسی دوپامین شد. $p<0.01$ ** و $p<0.001$ *** اختلاف معنی دار نسبت به گروهکنترل. $p<0.05$ # و $p<0.01$ ## و $p<0.001$ ### اختلاف معنی دار نسبت به گروه۶-هیدروکسی دوپامین.

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعات قبلی نشان داده است که استرس اکسیداتیو و التهاب در سیستم عصبی عوامل اصلی در پاتوژنز بیماریهای نورودژنراتیو هستند(۳۵). بنابراین تولید داروهای موثر برای درمان بیماری‌های نورودژنراتیو در آینده بر پیش گیری از آسیب اکسیداتیو و التهاب در طی توسعه و پیشرفت بیماری‌های نورودژنراتیو تمرکز خواهد کرد.سم ۶-هیدروکسی دوپامین، یک نوروتوکسین دوپامینرژیک انتخابی با ساختاری شبیه به دوپامین، یک ترکیب آلی مصنوعی است که به طور گسترده در ایجاد مدل‌های حیوانی و آزمایشگاهی (in vivo) و (in vitro) بیماری پارکینسون استفاده می‌شود(۳۶). سم ۶-هیدروکسی دوپامین باعث تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود که باعث فعال شدن مسیر سیگنالینگ NF kB می‌شوند فعال شدن مسیرسیگنالینگ NF kB باعث التهاب و آپوپتوز بیشتر نورون‌های مغزمی‌شود و باعث بروز بیماری پارکینسون می‌شودNF κB. در شکل غیر فعال آن، به پروتئین‌های مهارگرخودش (IκB) در سیتوپلاسم متصل است. در شرایط غیر التهابیNF – kB به دلیل اتصال به مهارگر خود در سیتوپلاسم غیر فعال است. جدایی NF kB از مهارگرش توسط آنزیم(IKK) IκB kinase باعث فعال شدن – NF kBمی‌شود IKK .باعث فسفریله شدن و تخریب مهارگرونتیجتا باعث رها شدن NF – kB می‌شود (۱۰،۱۱).

Sergio Davinelli وهمکاران درسال ۲۰۲۲مکانیسم‌های مولکولی زیربنایی را بررسی کردندکه توسط آن AST دو فاکتور رونویسی حساس به اکسیداسیون و کاهش مرتبط را تنظیم می‌کند، مانند فاکتور هسته‌ای اریتروئید ۲ مربوط به فاکتور ۲ (Nrf2) و فاکتور هسته‌ای. (NF-κB) κB به این ترتیب، NF-kBبه عنوان واسطه استرس سلولی عمل می‌کند و باعث بیان ژن‌های مختلف التهابی، از جمله ژن‌های کدکننده سیتوکین‌ها، کموکاین‌ها و مولکول‌های چسبندگی می‌شود.

تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن توسط سم ۶-هیدروکسی دوپامین باعث فعال شدن IKK می‌شود، IKKفعال، مهارگررا فسفریله می‌کند و NF kB را آزاد و فعال می‌کند NF-kB. فعال شده متعاقباً از سیتوزول به هسته جابجا می‌شود، جایی که به ژن‌های سیتوکین‌های التهابی متصل می‌شود و رونویسی آنها را فعال می‌کند و باعث ترشح سیتوکین‌های پیش التهابی مختلف، از جمله اینترلوکین‌ها و فاکتور نکروز تومورالفا (TNF α) می‌شود. علاوه بر این، سیتوکین‌های التهابی متعاقباً با ایجاد یک حلقه فیدبک مثبت مسیر انتقال سیگنال را تحریک می‌کنند تا NF kBبیشتری فعال شود (۱۱،۱۲). سطح متوسطرادیکال‌های آزاد اکسیژن مسیر سیگنالینگ Nrf2 را فعال می‌کند(۸). فعال سازی مسیر سیگنالینگ Nrf2 با فعال کردن آبشارهای آنتی اکسیدانی از سلول‌ها در برابر التهاب محافظت می‌کند Nrf2. فعال شده از سیتوپلاسم به هسته جابجا می‌شود، جایی که با عنصر پاسخ آنتی اکسیدانی antioxidant response element (ARE),ترکیب می‌شود، که منجر به یک واکنش تطبیقی محافظ سلولی می‌شود (۱۶). ژن‌های اصلی هدف Nrf2ژن‌های آنتی اکسیدانی هستند که به از بین بردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن اضافی کمک می‌کنند تا استرس اکسیداتیو و پاسخ التهابی را کاهش دهند. در حالی که، مقادیر بیش از حدرادیکال‌های آزاد اکسیژنمسیر سیگنالینگ Nrf2 را غیرفعال کرده و مسیر انتقال سیگنال Nrf2 / ARE را مسدود می‌کند، که نتیجتاً فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی کاهش یافته و به سیستم دفاع آنتی اکسیدان آسیب می‌رسد(۱۹). مطالعات قبلی نشان می‌دهد که آستاگزانتین دارای فعالیت‌های آنتی

اکسیدانی و ضد التهابی بالقوه است و می‌تواند تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن را کاهش دهد، اما مکانیسم‌های اساسی مرتبط هنوز ناشناخته است. هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیرات و مکانیسم‌های اساسی عملکردآستاگزانتین بر روی سمیت سلولی ناشی از سم ۶-هیدروکسی دوپامیندر سلولهای دوپامینرژیکSH-SY5Y و نورون‌های دوپامینرژیک جسم سیاه در مدل سلولی و حیوانی بیماری پارکینسون بود. یافته‌های ما نشان داد که تزریق سم ۶-هیدروکسی دوپامین به داخل جسم مخطط به منظور ایجاد مدل حیوانی بیماری پارکینسون چرخش القاء شده با اپومرفین موش‌ها را به طور معنی داری نسبت به گروه شاهد افزایش داد و درمان موش‌های پارکینسونی با آستاگزانتین چرخش القاء شده با اپومرفین موش‌ها را به صورت وابسته به دوز کاهش داد. در حالی که تزریق سم ۶-هیدروکسی دوپامین به داخل جسم مخطط باعث کاهش بیان NRF2 مغز شد، درمان موش‌های پارکینسونی با آستاگزانتین باعث افزایش بیان NRF2 در مغز آنها شد) طبق نتایج مادرمقاله ای که درتاریخ ۲۰-۵-۲۰۲۱درمجلهFOLIA BIOLOGICA پذیرفته شده. (نتایج مرحله کشت سلولی نیز نشان دادکه آلوده کردن محیط کشت سلول‌های دوپامینرژیک SH-SY5Y به سم ۶-هیدروکسی دوپامین به منظور ایجاد مدل سلولی بیماری پارکینسون باعث افزایش آپوپتوز و نکروز و کاهش معنی دار درصدسلول‌های تریپان آبی مثبت (زنده مانده) نسبت به گروه کنترل می‌شود. در حالی که اضافه کردن آستاگزانتین(۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰ میکرومول در لیتر) به محیط کشت، سلول‌های آسیب دیده از سم۶-هیدروکسی دوپامین باعث مهار آپوپتوز و نکروز و افزایش وابسته به دوز درصدسلول‌های تریپان آبی مثبت (زنده مانده) نسبت به گروه۶-هیدروکسی دوپامین می‌شود این یافته‌ها نشان می‌دهد که آستاگزانتین از اثر محافظت نورونی قابل توجهی برخوردار است. آستاگزانتین با افزایش بیان ژن NRF2 در برابر سمیت ناشی از ۶-هیدروکسی دوپامین در سلول‌های دوپامینرژیک محافظت ایجاد می‌کند. در مجموع نتایج تحقیق ما نشان داد که آستاگزانتین با اثرات ضد التهابی و ضد اکسیدانی خود از طریق فعال کردن و افزایش بیان ژن، NRF2نورون‌های جسم سیاه مغز و سلول‌های دوپامینرژیک SH-SY5Yرا در مقابل سمیت ۶-هیدروکسی دوپامین محافظت می‌کند و بنابر این تجویز آن برای بیمارانی که بیماری نورودژنراتیو مثل پارکینسون دارند مفید خواهد بود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ۶-هیدروکسی دوپامین می‌تواند باعث آپوپتوز و نکروز سلول SH-SY5Y شود.با این حال، پیش درمانی با آستاگزانتین به طور قابل توجهی سمیت سلولی ناشی از ۶-هیدروکسی دوپامینو مرگ و میر سلول‌ها را کاهش می‌دهد، و بیان ژن Nrf2 را در هسته افزایش و متعاقباً ترشح سیتوکین‌های پیش التهابی و آپوپتوزرا کاهش می‌دهد. مسیر Nrf2 یک مسیر مهم آنتی اکسیدانی و ضد التهابی است که در سمیت سلولی ناشی از ۶-هیدروکسی دوپامین نقش دارد.

نشان داده شده است که آندروگرافولید با افزایش فعال سازی Nrf2و میزان بیان ژن‌های پایین دستNrf2 ، چه در داخل بدن و چه در شرایط آزمایشگاهی، به طور قابل توجهی آسیب استرس اکسیداتیو را سرکوب می‌کند(۳۷). همچنین نشان داده شده است که درمان با سولفات سدیم آندروگرافولید می‌تواند با فعال کردن مسیر keap1 / Nrf2 و مهار مسیر NF kB در سلول هایHaCaT، آسیب ناشی از اشعه ماورا بنفش را کاهش دهد(۳۸،۳۹). در مطالعه حاضر، افزایش بیان ژن Nrf2 مغز پس از درمان آستاگزانتین موش‌های پارکینسونی شده مشاهده شد، این نتایج نشان داد کهآستاگزانتینمی‌تواند سیگنالینگ Nrf2 را برای سرکوب سمیت سلولی ناشی از ۶-هیدروکسی دوپامین فعال کند. در این راستا مطالعات قبلی نشان داده‌اند که تعادل دینامیکی بالقوه‌ای بین مسیرهای Nrf2 وNF κB وجود دارد. به عنوان مثال نشان داده شده است که NF kB به طور رقابتی Nrf2را از پروتئین اتصال دهنده CREB جدا و آن را غیرفعال می‌کند و مهار بیان Nrf2 باعث فعال شدن NF-kB می‌شود. به همین خاطر عدم وجود Nrf2 باعث افزایش التهاب وابسته بهNF-κB به دنبال آسیب خراش می‌شود(۴۰-۴۲). از طرف دیگر سولفورافان، به عنوان یک فعال کننده Nrf2 ، انتقال هسته‌ای NF-kB را مهار و غیرفعال می‌کند(۴۳). مطالعات قبلی

نشان داده‌اند که مسیرهای Nrf2 وNF κB دارای نقاط تاثیر گذار و تنظیم کننده مشترکی هستند که این نقاط می‌تواند به وسیله رادیکال‌های آزاد اکسیژنهمزمان فعال شوند(۳۸).بنابراین، به احتمال زیاد یک تعادل پویا بین مسیرهای سیگنالینگ-NF κBو Nrf2 در سلول SH-SY5Y وجود دارد. مطالعه حاضر نشان داد که آستاگزانتین با غیر فعال کردن مسیر NF kB و فعال سازی مسیر Nrf2 سمیت سلولی ناشی از ۶-هیدروکسی دوپامینرا مهار می‌کند. استراتژی امیدوار کننده برای جلوگیری از سمیت سلولی ناشی از ۶-هیدروکسی دوپامین در نظر گرفته شود.در مدل‌های سمیت سلولی ناشی از۶-هیدروکسی دوپامین، عملکردهای بیولوژیکی و تغییرات ژنتیکی بین سلول-SH SY5Yو نورون‌های دوپامینرژیک طبیعی انسان متفاوت است، که ممکن است پاسخ‌های سلولی به ۶-هیدروکسی دوپامین را تحت تأثیر قرار دهد .بنابراین، از نورون‌های دوپامینرژیک طبیعی انسان باید در تحقیقات آینده استفاده شود.

نتایج مرحله کشت سلولی نشان دادکه آلوده کردن محیط کشت سلول‌های دوپامینرژیک SH-SY5Y به سم ۶-هیدروکسی دوپامین باعث کاهش معنی دار درصد سلول‌های تریپان آبی مثبت (زنده مانده) نسبت به گروه کنترل می‌شود. در حالی که اضافه کردن آستاگزانتین(۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰ میکرومول در لیتر) به محیط کشت سلول‌های آسیب دیده از سم۶-هیدروکسی دوپامین باعث افزایش وابسته به دوز درصدسلول‌های تریپان آبی مثبت (زنده مانده) نسبت به گروه۶-هیدروکسی دوپامین می‌شوداین یافته‌ها نشان می‌دهد که آستاگزانتین از اثر محافظتی قابل توجهی در برابر مرگ سلولی ناشی از سم ۶-هیدروکسی دوپامین برخوردار است .

آستاگزانتین در برابر سمیت ناشی از ۶-هیدروکسی دوپامین در سلول‌های دوپامینرژیک محافظت ایجاد می‌کند. و این بدان معنی است که آستاگزانتین به صورت وابسته به دوز از خود اثر محافظت نورونی نشان داده است و می‌تواند نورون‌های دوپامینرژیک را به کمک خاصیت ضد التهابی و ضد اکسیدانی خود محافظت نمایدو بنابر این تجویز آن برای بیماران نورودژنراتیو مفید خواهد بود.

نتیجه گیری

درمان موش‌های پارکینسونی با آستاگزانتین از طریق افزایش بیان ژن NRF2 در مغزچرخش القاء شده با اپومرفین موش‌ها را به صورت وابسته به دوز کاهش داد. پیش درمانی باآستاگزانتین از طریق افزایش بیان ژنNrf2 سمیت ۶-هیدروکسی دوپامین را کاهش می‌دهد و به طور قابل توجهی زنده ماندن سلول‌های دوپامینرژیک SH-SY5Y و جسم سیاه را افزایش می‌دهد واز این طریق چرخش القاء شده با اپومرفین موش‌های پارکینسونی را کاهش می‌دهد

تشکر و قدردانی

از همه اساتیدگرانقدر که در اجرای این مطالعه به ما یاری رساندند سپاسگزاری می‌شود.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

References

1. G. DeMaagd, A. Philip, Parkinson’s disease and its management: part 1: disease entity, risk factors, pathophysiology, Clin. Present. Diagnosis P T 40 (2015) 504–532.
2. Nagatsu T, Sawada M. Biochemistry of postmortem brains in Parkinson's disease: historical overview and future prospects. J Neural TransmSuppl 2007(72):113-20.
3. T.R. Mhyre, J.T. Boyd, R.W. Hamill, K.A. Maguire-Zeiss, Parkinson’s disease, Subcell. Biochem. 65 (2012) 389–455
4. Zhang H, Tsao R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. CurrOpin Food Sci 2016; 8: 33–42.
5. Lai PKK, Chan JYW, Wu SB, Cheng L, Ho GKW, Lau CP, et al. Anti-inflammatory activities of an active fraction isolated from the root of AXT ragalusmembranaceus in RAW 264.7 macrophages. Phytother Res 2014;28: 395–404.
6. W. Olanow, A. Schapira, J. Obeso, Parkinson’s disease and other movement disorders, in: D. Longo, D. Kasper, J. Jameson, A. Fauci, S. Hauser, J. Loscalzo (Eds.), Harrison’s Principles of Internal Medicine, 19th ed., McGraw-Hill Medical, New York, 2015, pp. 2609–2625.
7. Sofic E, Lange KW, Jellinger K, Riederer P. Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson’s disease. NeurosciLett. 1992; 142:128–30.
8. Smith, J. A., Das, A., Ray, S. K., &Banik, N. L. (2012). Role of proinflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. Brain Research Bulletin, 87(1), 10–20.
9. Lanzillotta, A., Porrini, V., Bellucci, A., Benarese, M., Branca, C., Parrella, E., et al. (2015). NF-kappaB in innate neuroprotection and age-related neurodegenerative diseases. Front. Neurol. 6:98. doi: 10.3389/fneur.2015.00098
10. Koo, J. W., Russo, S. J., Ferguson, D., Nestler, E. J., and Duman, R. S. (2010). Nuclear factor-kappaB is a critical mediator of stress-impaired neurogenesis and depressive behavior. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107, 2669–2674.
11. Mo C, Wang L, Zhang J, Numazawa S, Tang H, Tang X, et al. The crosstalk between Nrf2 and AMPK signal pathways is important for the anti-inflammatory effect of berberine in LPS-stimulated macrophages and endotoxin-shocked mice. Antioxid Redox Signal 2014; 20:574–88.
12. Sergio Davinelli , Luciano Saso , Floriana D'Angeli , Vittorio Calabrese , Mariano Intrieri , Giovanni Scapagnini . Astaxanthin as a Modulator of Nrf2, NF-κB, and Their Crosstalk: Molecular Mechanisms and Possible Clinical Applications. 2022 Jan 14;27(2):502. doi: 10.3390/molecules27020502.
13. Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. Nat Rev Drug Discov 2013;12: 931–47.
14. Park J-H, Choi JW, Ju EJ, Pae AN, Park KD. Antioxidant and anti-inflammatory activities of a natural compound, Shizukahenriol, through Nrf2 activation.Molecules 2015;20:15989–6003.
15. Bahn G, Jo DG. Therapeutic Approaches to Alzheimer's Disease Through Modulation of NRF2. Neuromolecular Med. 2019 Mar; 21(1):1-11.
16. D. Standeart, E. Roberson, Treatment of central nervous system degenerative disorders, in: L. Brunton, B. Chabner, B. Knollmann (Eds.), Goodman & Gilman’s: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 12th ed., Mcgraw Hill Medical, New York, 2012, pp. 609–628.
17. Yang Y, Kim B, Lee J-Y. AXTaxanthin structure, metabolism, and health benefits. J Hum Nutr Food Sci 2013;1:1–1003.
18. Lin Zhao , Xueshu Tao , Tao Song .Astaxanthin alleviates neuropathic pain by inhibiting the MAPKs and NF-κB pathways. . 2021 Dec 5;912:174575. doi: 10.1016/j.ejphar.2021.174575. Epub 2021 Oct 18.
19. Beth Grimmig, Lauren Daly, MeenaSubbarayan, Ched Hudson, Robert Williamson, Kevin Nash, Paula C. Bickford. AXTaxanthin is neuroprotective in an aged mouse model of Parkinson’s disease. Oncotarget, 2018, Vol. 9, (No. 12), pp: 10388-10401
20. Ji X, Peng D, Zhang Y, Zhang J, Wang Y, Gao Y, Lu N, Tang P. AXTaxanthin improves cognitive performance in mice following mild traumatic brain injury. Brain Research. 2017; 1659:88–95.
21. Zhang XS, Zhang X, Zhou ML, Zhou XM, Li N, Li W, Cong ZX, Sun Q, Zhuang Z, Wang CX, Shi JX. Amelioration of oxidative stress and protection against early brain injury by AXTaxanthin after experimental subarachnoid hemorrhage. J Neurosurg. 2014; 121:42–54.
22. Al-Amin MM, Reza HM, Saadi HM, Mahmud W, Ibrahim AA, Alam MM, Kabir N, Saifullah AR, Tropa ST, Quddus AH. AXTaxanthin ameliorates aluminum chloride-induced spatial memory impairment and neuronal oxidative stress in mice. Eur J Pharmacol. 2016; 777:60–9.

23. Lu Y, Xie T, He XX, Mao ZF, Jia LJ, Wang WP, Zhen JL, Liu LM. AXTaxanthin rescues neuron loss and attenuates oxidative stress induced by amygdala kindling in adult rat hippocampus. Neuroscience Letters. 2015; 597:49–53.
24. Lee, D.-H.; Kim, C.-S.; Lee, Y.J. AXTaxanthin protects against MPTP/MPP+-induced mitochondrial dysfunction and ROS production in vivo and in vitro. Food Chem. Toxicol. 2011, 49, 271–280.
25. Liu, X.; Shibata, T.; Hisaka, S.; Osawa, T. AXTaxanthin inhibits reactive oxygen species-mediated cellular toxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells via mitochondria-targeted protective mechanism. Brain Res. 2009, 1254, 18–27.
26. Ikeda, Y.; Tsuji, S.; Satoh, A.; Ishikura, M.; Shirasawa, T.; Shimizu, T. Protective e_ects of AXTaxanthin on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in human neuroblAXToma SH-SY5Y cells. J. Neurochem. 2008, 107,1730–1740.
27. Lee SJ, Bai SK, Lee KS, Namkoong S, Na HJ, Ha KS, et al. AXTaxanthin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing I(kappa)B kinase-dependent NF-kappaB activation. Mol Cells 2003;16:97–105.
28. Campoio TR, Oliveira FA,Otton R. Oxidative stress in human lymphocytes treated with fatty acid mixture: role of carotenoid AXTaxanthin. Toxicol In Vitro 2011;25: 1448–56.
29. Santos SD, Cahu TB, Firmino GO, de CAXTro CC, Carvalho Jr LB, Bezerra RS, et al. Shrimp wAXTe extract and AXTaxanthin: rat alveolar macrophage, oxidative stressand inflammation. J Food Sci 2012; 7:H141–6.
30. Barros MP, Marin DP, Bolin AP, de Cassia Santos Macedo R, Campoio TR, Fineto Jr C, et al. Combined AXTaxanthin and fish oil supplementation improves glutathione based redox balance in rat plasma and neutrophils. Chem Biol Interact 2012;197:58–67.
31. [31] Saw CLL, Yang AY, Guo Y, Kong A-NT. AXTaxanthin and omega-3 fatty acids individually and in combination protect against oxidative stress via the Nrf2–ARE pathway. Food Chem Toxicol2013;62:869–75.
32. Li Z, Dong X, Liu H, Chen X, Shi H, Fan Y, et al. AXTaxanthin protects ARPE-19 cells from oxidative stress via upregulation of Nrf2-regulated phase II enzymes through activation of PI3K/Akt. Mol Vis 2013;19:1656–66.
33. Callie Farruggiaa, Mi-Bo Kima, MinkyungBaea, YoojinLeea, Tho X. Phama, Yue Yanga, MyungJooHanb,Young-Ki Parka, Ji-Young Lee.AXTaxanthin exerts anti-inflammatory and antioxidant effects in macrophages in NRF2-dependent and independent manners. Journal of Nutritional Biochemistry 62 (2018) 202–209.
34. R.M. Abdelsalam, M.M. Safar, Neuroprotective effects of vildagliptin in rat rotenone Parkinson's disease model: role of RAGE-NFκB and Nrf2-antioxidant signaling pathways, J. Neurochem. 133 (2015) 700–707.
35. G. DeMaagd, A. Philip, Parkinson's disease and its management: part 1: disease entity, risk factors, pathophysiology, Clin. Present. Diagnosis P T 40 (2015) 504–532.
36. Silva J, Alves C, Pinteus S, Mendes S, PedrosaR.Silva J, et al. Neuroprotective effects of seaweeds against 6-hydroxidopamine-induced cell death on an in vitro human neuroblastoma model. BMC Complement Altern Med. 2018 Feb 14;18(1):58.
37. Yan H, Huang Z, Bai Q, Sheng Y, Hao Z, Wang Z and Ji L: Natural product andrographolide alleviated APAP-induced liver fibrosis by activating Nrf2 antioxidant pathway. Toxicology 396-397:1-12, 2018.
38. Mei-Ling Wang , Qing-Yuan Zhong , Bao-Qin Lin 2 , Yu-Hong Liu , Yan-Feng Huang , Yang Chen , Jie Yuan, Zi-Ren Su, Janis Ya-Xian Zhan . Andrographolide sodium bisulfate attenuates UV-induced photo-damage by activating the keap1/Nrf2 pathway and downregulating the NF-κB pathway in HaCaT keratinocytes. International journal of molecular medicine 45: 343-352, 2020.
39. Herpers B, Wink S, Fredriksson L, Di Z, Hendriks G, Vrieling H, de Bont H and van de Water B: Activation of the Nrf2 response by intrinsic hepatotoxic drugs correlates with suppression of NF-κB activation and sensitizes toward TNF α -induced cytotoxicity. Arch Toxicol 90: 1163-1179, 2016.
40. Chiou YS, Huang QR, Ho CT, Wang YJ and Pan MH: Directly interact with Keap1 and LPS is involved in the anti-inflammatory mechanisms of (-)-epicatechin-3-gallate in LPS-induced macrophages and endotoxemia. Free RadicBiol Med 94: 1-16, 2016.
41. Liu GH, Qu J and Shen X: NF-kappaB/p65 antagonizes Nrf2-ARE pathway by depriving CBP from Nrf2 and facilitating recruitment of HDAC3 to MafK. BiochimBiophysActa 1783: 713-727, 2008.
42. Pan H, Wang H, Wang X, Zhu L and Mao L: The absence of Nrf2 enhances NF-κB-dependent inflammation following scratch injury in mouse primary cultured astrocytes. Mediators Inflamm 2012: 217580, 2012.
43. Cheung KL and Kong AN: Molecular targets of dietary phenethylisothiocyanate and sulforaphane for cancer chemoprevention.AAPS J 12: 87-97, 2010.

Original Article

Evaluation of antiparkinsonian activity of astaxanthin in vitro and in vivo

Received: 23/05/2022 - Accepted: 29/06/2022

Mahin mafyEsmaeili[1]
Maryam Khosravi[2*]
Mohammad HosseinEsmaeili[3]
Maryam Bananej[4]
Jalal Solati[5]

[1] Student of animal physiology, Biology Department, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2] Assistant professor of physiology Biology Department, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (Corresponding Author)
[3] Professor of physiology, Department of Physiology , Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.
[4] Assistant professor of physiology Biology Department , Faculty of Biological Sciences, , North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[5] Assistant professor of physiology Biology Department , Faculty of Biological Sciences, , North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Email:

Maryam -Khosravi@iau-tnb.ac.ir

Abstract

Introduction: nflammation and oxidative stress play a role in the pathogenesis of Parkinson's disease. Astaxanthin has antioxidant, anti-inflammatory effects and may be useful for the treatment of Parkinson's disease. In the present study, we investigated the beneficial effects of astaxanthin against 6-hydroxydopamine toxicity in animal and cellular models.

Methods: NMRI mice were used. Parkinson's disease was induced by injecting 6-hydroxydopamine into the left striatum. Parkinsonian rats were divided into control and treatment groups. The treatment group received water or astaxanthin (20, 10, and 30 mg/kg) orally for 28 days. Behavioral activities of mice were determined by apomorphine-induced rotation test. SH-SY5Y dopaminergic cells were cultured for 48 hours with astaxanthin (1.25, 2.5, 5, 10 and 20 μmol) in the presence or absence of 6-hydroxydopamine. The protective role of astaxanthin was evaluated by trypan blue cell counting method. The survival rate of SH-SY5Y cells was determined by MTT method.

Results: The results showed that behavioral disorders caused by 6-hydroxydopamine in mice were improved by astaxanthin. Incubation with astaxanthin inhibited apoptosis and necrosis of SH-SY5Y cells caused by 6-hydroxydopamine. Also, the viability disorder of SH-SY5Y cells was restored by pretreatment with astaxanthin.

Conclusion: Our results showed that treatment with astaxanthin can protect SH-SY5Y cells and substantia nigra dopaminergic neurons against toxicity caused by 6-hydroxydopamine in a dose-dependent manner.

Keywords: Parkinson's disease, 6-hydroxydopamine, Astaxanthin, Apomorphine-induced turning behavior test