Archive of SID

IranJPP
Iranian Journal of
Physiology and Pharmacology

مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران

سال ۱۳۹۸ ، دوره ۳، شماره ۱، پیاپی ۹، صفحه ۷۳-۶۳

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 10:09 +0330 on Saturday March 13th 2021

مقاله پژوهشی

اثر هورمون گرلین بر میزان عامل نکروز تومور آلفا و میزان بیان ژن‌های سیتوکروم b و اینترلوکین ۱۰ در جسم سیاه در یک مدل موشی بیماری پارکینسون

ندا نیکوکلام نظیف[۱]، مریم خسروی[۱*]، رامش احمدی[۲]، مریم بنانج[۱]، احمد مجد[۱]

۱. دانشکده علوم‌زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. گروه فیزیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران

دریافت: ۱۲ تیر ۱۳۹۸ پذیرش: ۱۴ مرداد ۱۳۹۸

چکیده

زمینه و هدف: مسیرهای التهابی نقش مهمی‌در بروز و پیشرفت بیماری پارکینسون دارند. گرلین دارای اثرات ضدالتهابی و آنتی‌آکسیدانی بوده و با مهار تولید سایتوکاین‌های موثر در التهاب مثل فاکتورنکروزکننده تومورآلفا اثرات ضدالتهابی خود را اعمال می‌کند. هدف از این تحقیق بررسی اثرهورمون گرلین بر میزان عامل نکروز تومورآلفا و میزان بیان ژن‌های سیتوکروم b و اینترلوکین۱۰ در مدل بیماری پارکینسون القاشده با ۱متیل-۴-فنیل-۱،۲،۳،۶ تتراهیدروپیریدین در موش‌های سوری نر بوده است.

روش‌ها: سی سر موش نر نژاد NMRI، به‌طور تصادفی به ۵ گروه شش‌تایی شامل کنترل، سالین، هورمون‌گرلین، پارکینسون، و پارکینسون + هورمون‌گرلین تقسیم شدند. بیماری پارکینسون به‌وسیله تزریق داخل صفاقی ۱-متیل۴-فنیل ۱،۲،۳،۶ تتراهیدروپیریدین به مدت ۴روز (۲۵mg/kg) القاء گردید. کاتالپسی توسط آزمون میله در روزهای ۱، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ ارزیابی شد. گرلین به مدت ۲۸ روز (۰/۴ µg/kg) تزریق داخل صفاقی شد. در روز ۲۹ میزان عامل نکروز تومور آلفا توسط تکنیک الایزا و میزان بیان ژن‌های سیتوکروم b و اینترلوکین ۱۰ با روش واکنش زنجیره ای پلیمراز در نواحی جسم سیاه و جسم مخطط مغز سنجش شد.

یافته‌ها: درگروه پارکینسون،کاتالپسی و سطح عامل نکروز تومور آلفا به‌طورمعنی‌داری افزایش یافت و بیان ژن‌های سیتوکروم b و اینترلوکین ۱۰ کاهش یافت ($p < ۰/۰۰۱$) ولی در موش‌های تحت درمان با هورمون گرلین کاتالپسی و سطح عامل نکروز تومورآلفا به‌طور معنی‌داری‌کاهش یافت و بیان ژن‌های سیتوکروم b و اینترلوکین ۱۰ افزایش معنی‌داری را نشان داد ($p <۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: به‌نظر می‌رسد که هورمون گرلین از طریق مهار مسیرهای التهابی درگیر در بیماری پارکینسون سبب بهبود کاتالپسی و کاهش سطح عامل نکروز تومورآلفا و افزایش بیان ژن‌های سیتوکروم b، اینترلوکین۱۰ شده است.

واژه‌های کلیدی: پارکینسون، کاتالپسی، گرلین، ۱-متیل-۴-فنیل-۱،۲،۳،۶ تتراهیدروپیریدین

مقدمه

بیماری پارکینسون[۱] یک بیماری نورودژنراتیو است‌که پس ازآلزایمر[۲] شایع‌ترین اختلال نورودژنراتیو مرتبط با سن می‌باشد و باعث فعال‌شدن میکروگلیا وآستروگلیوزیس واکنشی درنواحی مغزی متأثر از این بیماری می‌گردد. مشخصه بارز بیماری از نظر پاتولوژی دژنراسیون آهسته وتدریجی نورون‌های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه[۳] می‌باشدکه منجر به کاهش‌سطح

[1] Parkinson's disease (PD)
[2] Alzheimer's disease (AD)
[3] Substantia nigra (SNc)

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: maryam-khosravi@iau-tnb.ac.ir (ORCID ID: 0000-0001-8210-9066)

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 10:09 +0330 on Saturday March 13th 2021

دوپامین در استریاتوم (هسته‌های دمدار[4] و پوتامن[5]) می‌گردد [۱]. علائم این بیماری ارتعاش و یا لرزش دست و پا، برادی‌کینزیا[6] که ضعف و کندی حرکات ارادی و آکینزیا[7] که فقدان حرکت و یا سختی حرکت می‌باشد که سبب خشک‌شدن دست و پا یا کل بدن می‌گردد [۲]. در حال حاضر، درمان شناخته‌شده‌ای برای بیماری پارکینسون وجود ندارد فقط علائم آن می‌تواند به‌وسیله درمان‌های دارویی‌کنترل شود. درمان در صورت لزوم جهت برقرارساختن تعادل دوپامین استیل‌کولین در استریاتوم توسط مهار اثرات استیل‌کولین با داروهای آنتی‌کولینرژیک یا تقویت اثرات دوپامین صورت می‌گیرد و درمان توسط محافظت‌کننده عصبی[8] تأثیرات مثبت در بهبود عملکرد حرکتی بیماری دارند [۳]. دو عامل مهمی که در روند پیشرفت اکثر بیماری‌های مخرب‌عصبی دیده می‌شوند؛ استرس اکسیداتیو که ناشی از تولید گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن و التهاب عصبی‌که ناشی از فعالیت بیش‌ازحد سلول‌های میکروگلیا و آستروگلیا در سیستم عصبی مرکزی (CNS)[9] می‌باشند. از میان‌گلیال‌ها، آستروسیت‌ها و میکروگلیاها در پارکینسون نقش دارند. میکروگلیاها بسیارحساس‌تر هستند به‌طوری‌که با کوچک‌ترین اختلال در همئوستاز CNS در بیماری‌های انحطاط نورونی مانند پارکینسون به‌شدت فعال می‌شوند که نتیجه آن افزایش عوامل نوروتروفیک و سمیت عصبی و سایتوکین التهابی است [۴].

در سال ۱۹۹۹، کوجی‌ما[10] و همکارانش پپتیدی از عصاره مخاط معده موش صحرایی جدا کردند، نام آن را گرلین[11] نهادند [۵]. گرلین هورمون معده است که باعث تحریک ترشح هورمون رشد (GH)[12] و مصرف مواد غذایی برای تنظیم هموستاز انرژی و وزن بدن ازطریق اتصال به گیرنده‌اش (GHSR1 a)[13] می‌شود. امروزه شواهد نقش فیزیولوژیکی گستردهٔ گرلین را در محافظت نورونی نشان می‌دهد. یافته‌های اخیر نشان از اثر بالقوهٔ گرلین به عنوان یک عامل درمانی نوآورانه در بیماری‌های عصبی از جمله آلزایمر و بیماری پارکینسون دارد [۶]. درسال ۲۰۱۸، مورگان و همکاران[14] مطرح کردند در بیماران مبتلا به پارکینسون سطوح پلاسمایی گرلین کاهش می‌یابد واکنش گرلین به غذا در این بیماران دچار اختلال می‌شود [۷]. در پژوهشی که توسط زنده‌دل و همکاران انجام شده مصرف آگونیست گرلین[15] و GH دارای اثر محافظتی در التهاب مغزی ناشی‌از لیپوساکارید (LPS)[16] از طریق مهار عامل نکروز تومور آلفا (TNF- α)[17] و اینترلوکین ۶[18] بوده است [۸]. در سال ۲۰۱۰، مون و همکاران[19] بیان نمودند درمان با گرلین می‌تواند بر روی نورون‌های دوپامینرژیک جسم سیاه تاثیرگذار باشد و باعث افزایش غلظت تیروزین هیدروکسیلاز در مغز میانی شود و از کاهش نورون‌های دوپامینرژیک در بخش دورسال استریاتوم جلوگیری می‌کند و همچنین مانع فعال‌شدن میکروگلیا ناشی از ۱متیل-۴-فنیل۱،۲،۳،۶ تتراهیدروپیریدین (MPTP)[20] در جسم سیاه واستریاتوم شده است [۹].

سیتوکروم‌ها دسته‌ای از پروتئین‌های مرکب هستند که این پروتئین‌ها در سال ۱۸۸۶ به نام رنگدانه‌های سلولی و در سال ۱۹۲۶ به عنوان ترکیباتی که نقش اصلی در تنفس سلولی را دارند. سیتوکروم‌ها در همه بافت‌های زنده یافت شده و به سه نوع اصلی c و b، a تقسیم‌بندی می‌شوند. سیتوکروم b[21] پروتئین غشایی که از ۸ آلفا هلیکس تشکیل شده و حاوی هر دو مرکز Qi و Qo می‌باشد. سیتوکروم b زیر واحد کاتالیک مرکزی هیدروکینون بوده و یکی از بهترین پروتئین‌های شناخته‌شده برای ساخت کمپلکس III سیستم فسفریلاسیون بوده و فقط به وسیله ژنوم میتوکندری کد می‌شود [۱۰]. اهمیت میتوکندری دردهه‌ی گذشته به وسیله‌ی شواهدی تأیید شده که تغییرات پروتئین‌های میتوکندری می‌تواند باعث ایجاد تعدادی بیماری‌های انسانی شود. این تغییرات پروتئین‌ها می‌تواند منجر به عدم کار سلولی و بافتی مهم شوند که باعث بیماری‌های مثل آلزایمر، پارکینسون و هانگتینتون[22] و سندرم‌های عصبی و عضلانی می‌باشد [۱۱]. در این مطالعه اثر هورمون گرلین بر میزان عامل نکروز تومور آلفا و

[4] Caudate nucleus
[5] Putamen nucleus
[6] Bradykinesia
[7] Akinesia
[8] Neuroprotective
[9] Central Nervous System (CNS)
[10] Kojima
[11] Ghrelin
[12] Growth hormone (GH)
[13] Growth hormone secretagogue receptor (GHSR1a)
[14] Morgan
[15] Growth Hormone Releasing Peptide -2 (GHRP-2)
[16] Lipopolysaccharide (LPS)
[17] Tumor Necrosis Factor alpha (TNF-α)
[18] Interleukin-6 (IL-6)
[19] Moon
[20] 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine Hydrochloride (MPTP)
[21] Cytochrome b
[22] Huntington Disease (HD)

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 10:09 +0330 on Saturday March 13th 2021

میـزان بیـان ژن‌هـای سـیتوکروم b و اینترلـوکین۱۰[23] در مـدل بیماری پارکینسون القا شده باMPTP در موش هـای سـوری نـر مورد بررسی قرارگرفت.

مواد و روش‌ها

حیوانات مورد آزمایش

این مطالعه تجربی برروی سـی سـر مـوش سـوری نـر نـژاد NMRI در آزمایشگاه فیزیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحـد قـم انجام شـد. حیوانـات درمحـدودهٔ وزنـی ۵ ± ۳۰ گـرم از انسـتیتو پاستور کرج خریداری شد. حیوانـات در محـدودهٔ دمـایی ۲۴ °C– ۲۰، رطوبـت ۴۵– ۴۰ درصـد و در شـرایط نـوری ۱۲ سـاعت روشنایی و ۱۲ ساعت تـاریکی و دسترسـی آزاد بـه آب و غـذا در قفس‌های پلاستیکی پوشیده شده بـا خـاک ارّه در اتـاق حیوانـات نگهداری شـدند. انجـام ایـن آزمایشـات مطـابق بـا دسـتورالعمل مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی (چاپ مؤسسـه سـلامت ملی آمریکا، شماره ۲۳–۸۵ بازنگری شـده در سـال۱۹۸۵) بـود و توسط کمیته اخلاق دانشـگاه آزاد واحـد علـوم تحقیقـات بـا کـد IR.IAU.SRB.REC۱۳۹۷/۱۷۶ در تاریخ۲۱ /۱۲/ ۱۳۹۷ مورد تأیید قرار گرفت.

ایجاد بیماری پارکینسون

برای القـاء بیمـاری پارکینسـون، از داروی MPTP (شـرکت Sigma، سازنده آمریکا) با دوز ۲۵ میلی‌گرم بـه ازاء هـر کیلـوگرم وزن بدن (۲۵میلی گرم + ۵ سی‌سی نرمال سالین) در طـی چهـار روز متوالی به صورت داخل صفاقی[24] (یکبار در روز در فواصل ۲۴ ساعته) تزریق شد [۱۲].

روش آماده‌سازی داروی گرلین

ابتدا ۰/۵ میلی‌گرم دارو گرلین (شرکت Alfa Aesar، آمریکـا) در ۵۰ سـی‌سـی محلـول (۵ سـی‌سـی دی متیـل سولفوکسـاید (DMSO) [25] (شـرکت Merck، آلمـان) + ۴۵سـی‌سـی نرمـال سالین) حل شد سپس به هر حیوان میزان۴ / ۰میکروگـرم بـه ازاء هر کیلوگرم از محلول تهیه شده به صـورت داخـل صـفاقی و بـه مدت ۲۸ روز متوالی (یکبار در روز در فواصـل ۲۴ساعته) تزریـق شد [۱۳].

گروه‌های آزمایشی

موش‌های سوری نر نژاد NMRI به طور تصادفی به ۵ گروه شش‌تایی تقسیم شدند: ۱) گروه کنترل (سـالم)، ۲) گـروه سـالین (شاهد–دریافـت کننـده سـالین (۱۰ میکرولیتـر) یکبـار در روز در فواصـل ۲۴سـاعته درطـی ۲۸روز)، ۳) گـروه هورمـون گـرلین (۰/۴ میکروگـرم بـه ازاء هـر کیلـوگرم، یکبـار در روز در فواصـل ۲۴ساعته درطـی ۲۸ روز)، ۴) گـروه پارکینسـون (دریافـت‌کننـده MPTP– ۲۵ mg/kg درطـی ۴ روز در فواصـل ۲۴ سـاعته)، ۵) گروه پارکینسون + هورمون‌گرلین.

آزمون میله

برای ارزیابی جمود عضـلات (کاتالپسـی)[26] از آزمـون میلـه[27] استفاده شد. ایـن آزمـون در جونـدگانی کـه در آن‌هـا پارکینسـون تجربی توسط هالوپریدول، متی روزین و رزرپین و MPTP ایجاد شده است، برای ارزیـابی جمـود عضـلات بـه‌کـار مـی‌رود [۱۴]. وسیله مورد اسـتفاده در ایـن آزمـون، یـک بـارفیکس دارای یـک سکوی چوبی بود. ارتفاع بارفیکس از سـکو ۹ سـانتی‌متـر و قطـر میله ۰/۹ سانتی‌متر است. بـرای انجـام آزمـایش، حیـوان بـر روی سکو قرار داده شد و دو دست آن بـه آرامـی روی میلـه بـارفیکس قرار داده شد مدت زمـان مانـدن حیـوان در ایـن وضـعیت (ثابـت ماندن، بدون حرکت) ثبت شد. زمان قطع آزمون مـوقعی بـود کـه حیوان یک و یا هر دو دست خود را از روی میله برمی‌داشـت و یـا سر خود را به صورت جستجوگرایانه حرکت مـی‌داد بـدیهی اسـت هر چه جمود عضلات حیوان شدیدتر بود مدت زمـان بیشـتری در وضعیت اتصال سپری می‌شد. آزمون میله یک روز پـس از ایجـاد بیماری (روز اول) و روزهـای هفـتم، چهـاردهم، بیسـت و یکـم و بیست و هشتم انجام شد.

سنجش کمی سطح TNF-α توسط روش الایزا

در روز ۲۹، بـرای سـنجش کمـی سـطح TNF-α و بیـان ژن‌های سیتوکروم b، اینترلـوکین ۱۰ و بافـت‌شناسـی بـا رعایـت اصول اخلاقی موش‌ها را ابتدا با تزریـق درون صـفاقی ترکیبـی از

[23] Interleukin-10 (IL-10)
[24] Intraperitoneal (i.p.)
[25] Dimethyl sulfoxide (DMSO)
[26] Catalepsy
[27] Bar Test

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 10:09 +0330 on Saturday March 13th 2021

کتامین و زایلازین (شرکت Sigma، آمریکا) بیهوش نموده و سر آن‌ها با کمک قیچی مخصوص جدا کرده و کل بافت مغز را از جمجمه خارج نمودیم. بافت مغز را در میکروتوم یخچال‌دار قرار داده و سپس در ژل فیکساسیون مخصوص بافت فیکس نموده و برش‌هایی با ضخامت ۲۰ میکرون گرفتیم تا به نزدیکی ناحیه مورد نظر (جسم مخطط و جسم سیاه) برسیم. سپس با استفاده از اطلس پاکسینوس از پیاز بویایی به ابتدای جسم سیاه رسیده؛ برش‌زدن را متوقف نموده و پانچر مخصوص (به قطر ۱/۵ میلی‌متر) را داخل بافت مغز فرو برده و ابتدا جسم مخطط را خارج نمودیم و برای بار دوم پانچر را داخل بافت مغز فرو بردیم و جسم سیاه را از بافت مغز خارج نمودیم. نمونه ها را جداگانه در داخل میکروتیوب استریل درداخل تانک ازت قرار داده و به دنبال آن نمونه‌ها هوموژنیزه و سانتریفیوژ شده و با استفاده از تکنیک برادفورد و سپس با استفاده از کیت الایزا Mouse TNF alpha (ab۱۰۸۸۷۰) محصول شرکت abcam (آلمان) میزان پروتئین TNF-α اندازه‌گیری شد.

روش اندازه گیری سطح mRNA ژن‌های سیتوکروم b و اینترلوکین ۱۰ از بافت مغز

میزان RNA بافت مغز موش‌ها طبق دستور العمل کیت (شرکت Gene All، کره جنوبی) استخراج شد. با استفاده از نانودراپ مقدار RNA استخراج شده و خلوص آن مشخص شد. با استفاده از کیت HyperScript ™ RT premix with Random hexamer شرکت Gene All، cDNA سنتز شد. برای آن که مشخص شود cDNA به درستی استخراج شده است با استفاده از پرایمرهای طراحی شده برای سیتوکروم b و اینترلوکین ۱۰ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[28] انجام گرفت (جدول ۱).

cDNA سنتز شده در گروه‌های مختلف با استفاده از مسترمیکس (شرکت آمپلیکون، دانمارک) در حضور پرایمر اختصاصی های سیتوکروم b و اینترلوکین۱۰ تحت واکنش Real-Time PCR قرار گرفت.

واکنش Real-Time PCR به شرح زیر انجام گرفت. دناتوراسیون در دمای ۹۵ °C به مدت ۱۰ دقیقه، در هر سیکل دناتوراسیون ۹۳ °C ۲۰ ثانیه، دمای اتصال و سنتز برای پرایمر GAPDH ۵۸ °C و زمان ۵۵ ثانیه، برای پرایمرسیتوکروم b و اینترلوکین ۱۰، ۵۹ °C و ۶۵ ثانیه و ۴۰ سیکل تکرار گردید. همراه با واکنش Real-Time PCR منحنی ذوب نیز جهت تشخیص قطعه هدف رسم شد. در این مطالعه برای سنجش بیان ژن‌ها از تکنیک Real-Time PCR از نوع سنجش کمی به روش SYBER GREEN استفاده شد و جهت محاسبه بیان ژن هدف نسبت به رفرنس، از روش کمیت سنجی نسبی و متد ΔΔCT استفاده شد. همچنین ژن GAPDH [29] به‌عنوان ژن کنترل داخلی انتخاب شد.

رنگ آمیزی تیروزین هیدروکسیلاز

کل بافت مغز موش‌های ازگروه‌های مختلف خارج شد. به منظور تأیید تخریب نورون‌های‌دوپامینی بخش متراکم جسم سیاه در اثر آسیب با نوروتوکسین، از آنتی بادی‌آنتی تیروزین هیدروکسیلاز (TH)[30] استفاده شد. به منظور انجام این تکنیک بافت‌های مغز پس از استخراج ۲۴ ساعت درفرمالین-سالین قرارداده شد. سپس مراحل آبگیری و پردازش روی آن‌ها انجام گرفت. بافت‌ها در پارافین مذاب قالب‌گیری شد.۲۴ ساعت پس از قالب‌گیری و سرد شدن کامل، قالب‌ها آماده‌ی برش‌گیری شد. برش‌گیری با استفاده از دستگاه میکروتوم و با ضخامت ۱۰ میکرون انجام شد. برش‌ها پس از عبور از حمام آب گرم، زمانیکه کاملاً بدون چروک بافتی بودند بر روی لام‌هایی که قبلا آغشته به چسب شده‌اند قرار گرفت. با توجه به متعدد بودن مراحل شست و شو از چسب آلبومین استفاده شد که کاملا سطح لام با آن آغشته شد. پس از قرار دادن لام‌ها در دمای ۶۰ °C به مدت یک ساعت، سلول‌ها با پارافرمالدئید ۴٪ به مدت نیم ساعت تثبیت شد. سپس با اسیدکلریدریک ۲ نرمال به مدت یک ساعت و به‌دنبال آن با بافر بورات ۰/۱ مولار (pH ۸/۵) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ °C انکوبه شد سپس به مدت ۳۰ دقیقه در معرض ۰/۳ درصد تریتون X-۱۰۰ و سرم بز ۱۰٪ قرار داده شد. سپس با آنتی‌بادی مونوکلونال ضد تیروزین هیدروکسیلاز (Abcam، آلمان) (۱:۱۰۰) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ °C قرار داده شد. پس از شستشو با بافر فسفات با آنتی بادی ثانویه DAbI (Abcam، آلمان) (۱:۱۰۰) به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ °C و تاریکی قرار داده شد.

[28] Real-Time PCR

[29] Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

[30] Thyrosine hydroxylase (TH)

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 10:09 +0330 on Saturday March 13th 2021

رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین[31]

کل بافت مغز در فرمالین ۱۰ درصد منتقل شد. سپس مراحل آبگیری، شفاف‌سازی، حمام پارافین و قالب‌گیری انجام شد و در مرحله بعد به وسیله میکروتوم برش‌هایی به ضخامت ۷ میکرون تهیه شد. پس از رنگ‌آمیزی با تیروزین هیدروکسیلاز و هماتوکسیلین-ائوزین (شرکت Merck، آلمان) وضعیت بافتی و تعداد نورون‌های دوپامینرژیک جسم سیاه شمارش شد. مقاطع با میکروسکوپ Medacm n۱۰۷ و دوربین Dino Lite camera و نرم افزار Dino Capture ۲/۰ بررسی و عکسبرداری شد. با استفاده از نرم‌افزار Image Pro Plus (V. ۶)، نقاط با سایز بزرگتر از ۷ میکرومتر (سطح ۵۰۰ میکرومتر و با ۵ بار تکرار) به عنوان هسته نورون‌های عصبی در نظر گرفته شد.

آنالیز آماری داده‌ها

آنالیز داده‌های حاصل با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ صورت گرفت. مقایسه گروه‌ها توسط آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و سطح معنی‌داری بین گروه ها توسط آزمون تعقیبی توکی مشخص شد. داده ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش و مقادیر p <۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه، اختلاف میانگین در زمان آزمون میله بین گروه‌های کنترل، شاهد (سالین) و هورمون گرلین در روزهای اول، هفتم، چهاردهم، بیست و یکم و بیست و هشتم معنادار است. گروه هورمون گرلین نسبت به دو گروه کنترل و شاهد (سالین) افزایش معناداری در زمان آزمون میله داشته است (p < ۰/۰۱). اختلاف میانگین در زمان آزمون میله بین گروه پارکینسون و گروه‌های کنترل، شاهد (سالین)، هورمون گرلین و پارکینسون + هورمون‌گرلین معنادار است و کاتالپسی درگروه پارکینسون افزایش معناداری داشته است (p <۰/۰۰۱) .

هورمون‌گرلین درگروه پارکینسون + هورمون گرلین موجب کاهش معناداری در زمان آزمون میله نسبت به گروه پارکینسون گردید (p < ۰/۰۰۱). میانگین مشاهده شده بین گروه‌های کنترل، شاهد (سالین) تفاوت معناداری نداشت (p > ۰/۰۵). اثر هورمون گرلین در زمان آزمون میله نسبت به گروه کنترل بیشتر بوده وکاهش معناداری درمقایسه با گروه پارکینسون دارد. اختلاف میانگین در زمان آزمون میله بین گروه پارکینسون + هورمون گرلین با گروه‌های کنترل، شاهد (سالین) و هورمون گرلین و پارکینسون معنادار است (p < ۰/۰۰۱).

در یک نگاه کلی به نمودار ۱، هورمون‌گرلین در زمان آزمون میله در گروه پارکینسون + هورمون‌گرلین موجب کاهش کاتالپسی ناشی از MPTP در مقایسه با گروه پارکینسون می‌شود.

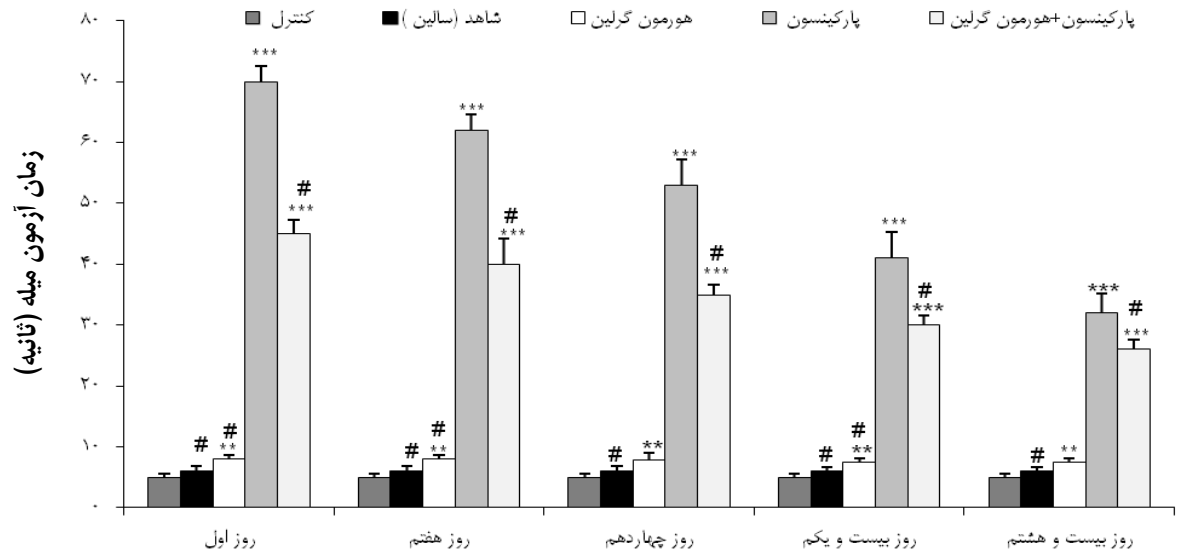
در این مطالعه، سطح TNF-α در جسم سیاه در گروه‌های پارکینسون و گروه پارکینسون + هورمون‌گرلین نسبت به گروه کنترل دارای افزایش معناداری می‌باشد (p < ۰/۰۰۱). سطح TNF-α در جسم سیاه در گروه پارکینسون + هورمون گرلین نسبت به گروه پارکینسون کاهش معنادار نشان می‌دهد

[31] Hematoxylin and Eosin (H & E)

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 10:09 +0330 on Saturday March 13th 2021



نمودار ۱– اثر هورمون گرلین بر زمان آزمون میله در طی روزهای اول، هفتم، چهاردهم، بیست و یکم و بیست و هشتم بین گروه‌های پارکینسون و پارکینسون تیمارشده. داده‌ها به صورت انحراف معیار ± میانگین نشان داده شده است. **: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل با $p < ۰/۰۱$ ***: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل با $p < ۰/۰۰۱$ ، #: اختلاف معنی دار با گروه پارکینسون با $p < ۰/۰۰۱$.

($p < ۰/۰۰۱$) و هورمون گرلین باعث کاهش سطح TNF-α شده است (نمودار ۲ سمت چپ). و همچنین سطح TNF-α در جسم مخطط درگروه‌های پارکینسون و گروه پارکینسون + هورمون گرلین نسبت به گروه کنترل دارای افزایش معناداری می‌باشد ($p < ۰/۰۰۱$) و MPTP باعث افزایش میزان التهاب در نورون‌های دوپامینرژیک درناحیه جسم مخطط در مدل حیوانی شده است. سطح TNF-α در جسم مخطط درگروه پارکینسون + هورمون گرلین نسبت به گروه پارکینسون کاهش معنادار ($p < ۰/۰۰۱$) دارد و هورمون گرلین باعث کاهش سطح TNF-α شده است (نمودار۲ سمت راست). سطح TNF-α درجسم مخطط نسبت به جسم سیاه کمتر می‌باشد و اختلاف بین آن‌ها در بین تمامی گروه ها معنادار می‌باشد ($p < ۰/۰۰۱$).

با توجه به نتایج Real-Time PCR بیان ژن اینترلوکین ۱۰ درگروه پارکینسون نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری را نشان می‌دهد ($p < ۰/۰۰۱$) که به عنوان یک فاکتور ضدالتهاب محسوب می‌شود و در گروه پارکینسون + هورمون‌گرلین نسبت به گروه کنترل افزایش معنادار نشان دارد ($p < ۰/۰۰۱$) و گروه کنترل با گروه‌های شاهد (سالین)، و هورمون گرلین اختلاف معناداری نداشته است ($p > ۰/۰۵$) (نمودار ۳ سمت چپ). همچنین بیان ژن *سیتوکروم b* در گروه پارکینسون نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری داشته است ($p < ۰/۰۰۱$). بیان ژن سیتوکروم b در گروه‌های هورمون گرلین و پارکینسون + هورمون‌گرلین نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری را نشان داده است ($p < ۰/۰۰۱$) ولی گروه کنترل با گروه شاهد (سالین) اختلاف معناداری نداشته است (نمودار ۳ سمت راست).

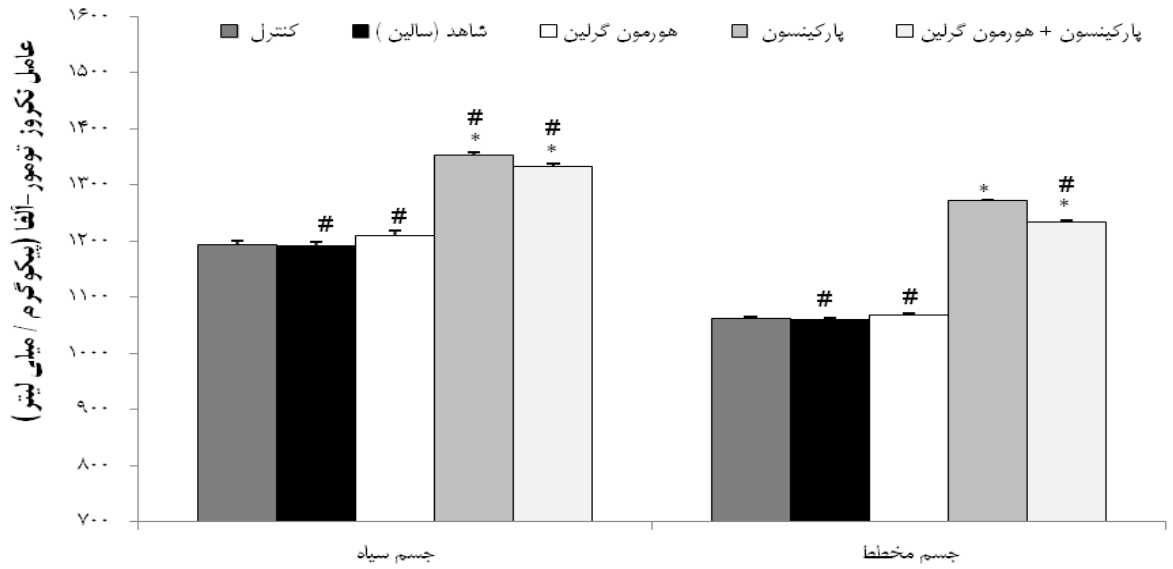
همانطوری‌که در نمودار ۴ مشاهده می‌شود در تایید مدل پارکینسونی از رنگ‌آمیزی تیروزین هیدروکسیلاز (تخصصی) و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (عمومی)، شمارش نورونی دوپامینرژیک در بخش جسم سیاه درگروه پارکینسون نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری داشته است ($p < ۰/۰۰۱$) اما بعد از درمان با هورمون‌گرلین شمارش نورونی دوپامینرژیک در بخش جسم سیاه افزایش یافته است به گونه‌ای که درتمامی حالات افزایش معناداری نسبت به گروه پارکینسون مشاهده می‌شود ($p < ۰/۰۰۱$). اختلاف مشاهده شده بین گروه پارکینسون و سایر گروه‌ها معنادار است ($p < ۰/۰۰۱$).

همانطوری‌که در شکل ۱ مشاهده می‌شود برش‌های تهیه‌شده از ناحیه جسم سیاه نیز مورد بررسی قرار گرفت. که در گروه پارکینسونی نورون‌های دوپامینرژیک جسم سیاه در مقایسه با گروه کنترل دچار تخریب شدند. در حالی که مصرف هورمون گرلین به مدت ۲۸ روز از کاهش نورون‌های

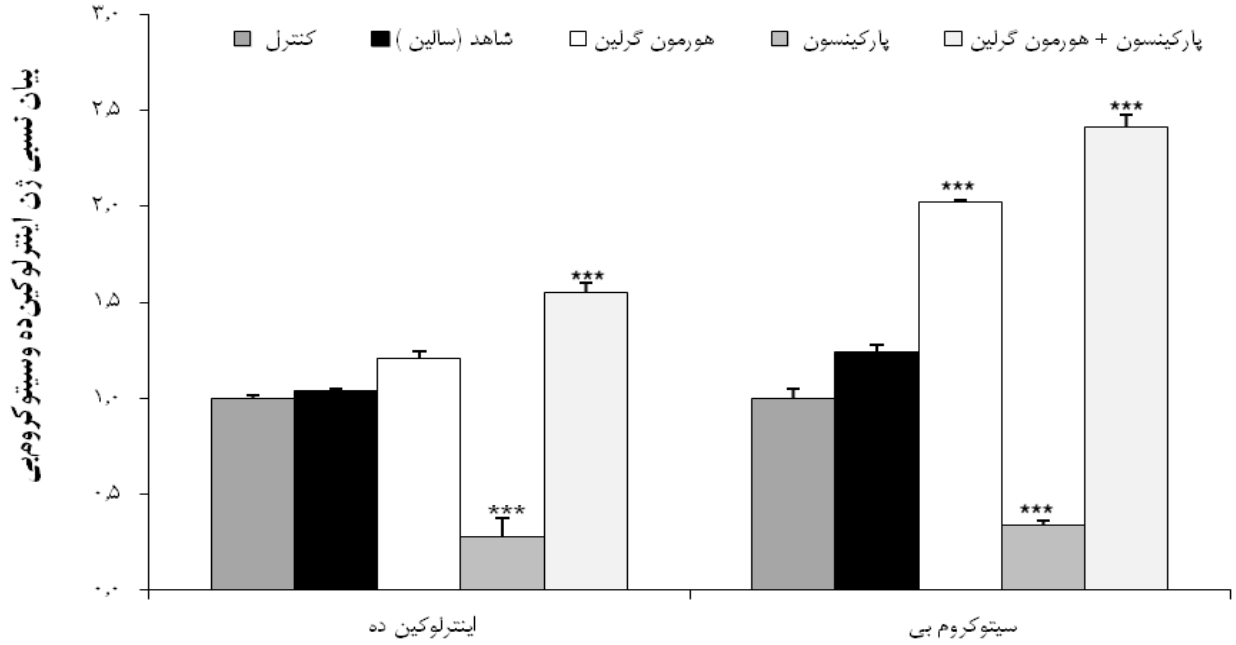
www.SID.ir

Archive of SID

دوپامینرژیک جسم سیاه جلوگیری می‌کنند.



نمودار ۲- سطح پروتئین TNF-α در ناحیه جسم سیاه و جسم مخطط بین گروه‌های پارکینسون و پارکینسون تیمارشده. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین نشان داده شده است. *: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل با $p < ۰/۰۰۱$، #: اختلاف معنی‌دار با گروه پارکینسون با $p < ۰/۰۰۱$.



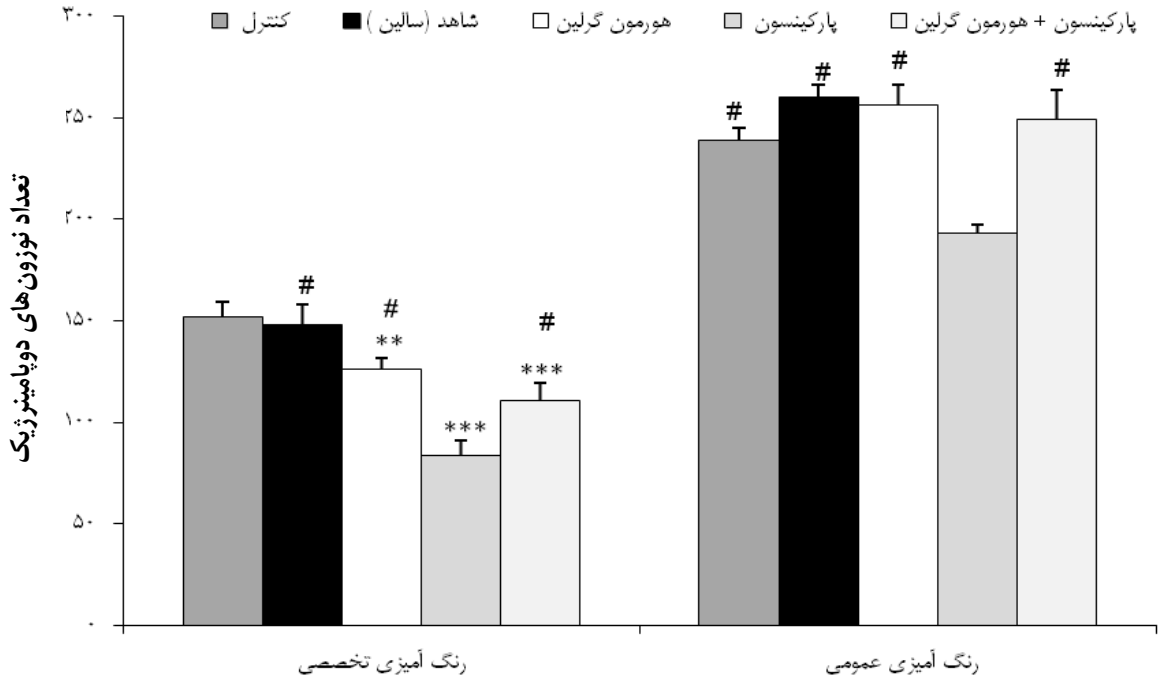
نمودار ۳ – میزان بیان ژن اینترلوکین ۱۰ و سیتوکروم b در کل بافت مغز بین گروه‌های پارکینسون و پارکینسون تیمارشده. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین نشان داده شده است. ***: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل $p < ۰/۰۰۱$.

www.SID.ir

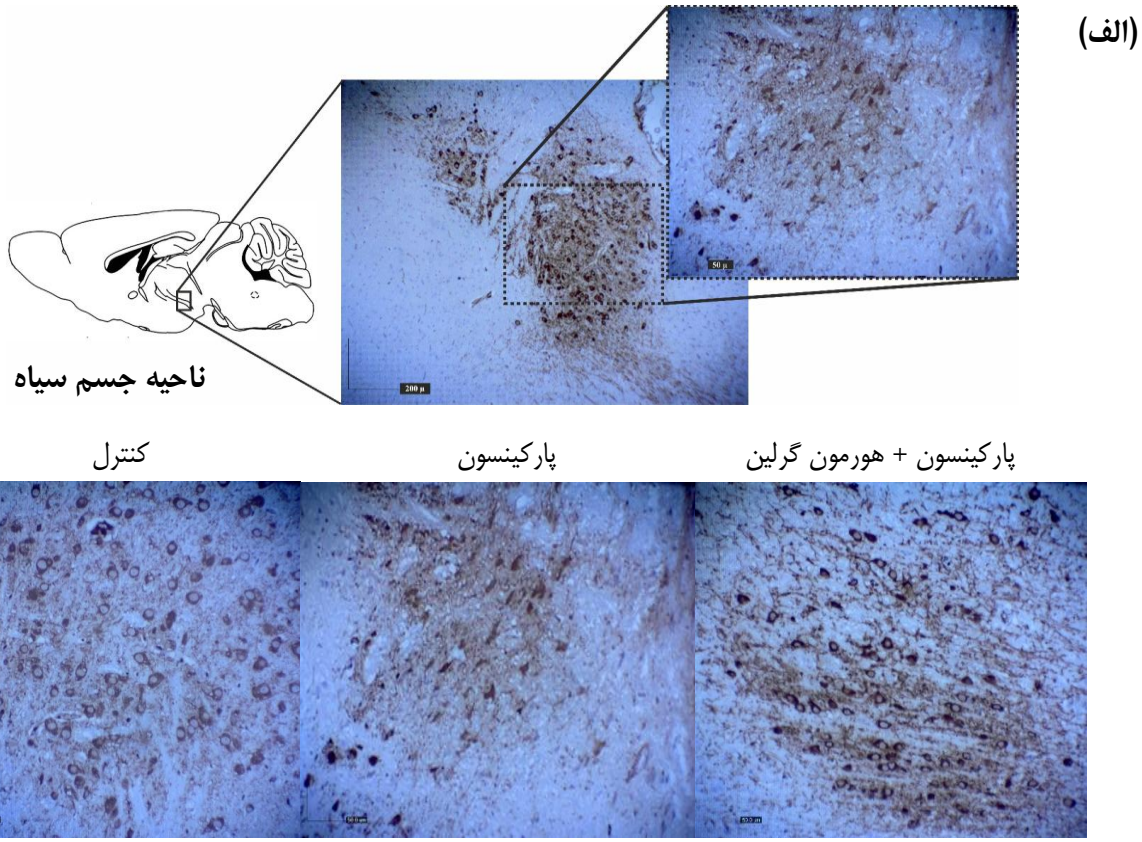
Downloaded from ijpp.phypha.ir at 10:09 +0330 on Saturday March 13th 2021

Archive of SID

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 10:09 +0330 on Saturday March 13th 2021



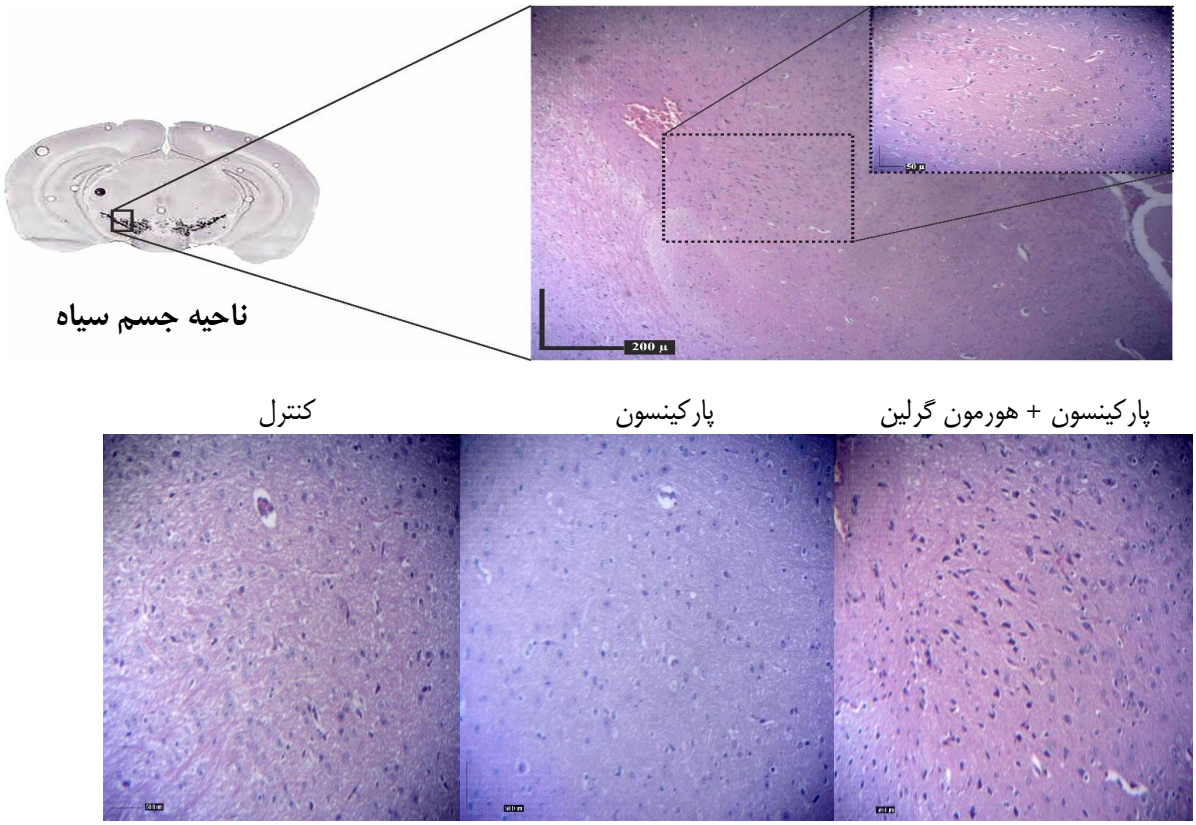
نمودار ٤- تعداد نورون‌های دوپامینرژیک در برش‌های ناحیه‌ی جسم سیاه بین گروه‌های پارکینسون و پارکینسون تیمارشده با استفاده از رنگ‌آمیزی تیروزین هیدروکسیلاز (تخصصی) و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (عمومی). داده‌ها به صورت انحراف معیار ± میانگین نشان داده شده است. **: نماد اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل با $p < ۰/۰۱$، ***: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل با $p < ۰/۰۰۱$، #: اختلاف معنی‌دار با گروه پارکینسون با $p <۰/۰۰۱$



www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 10:09 +0330 on Saturday March 13th 2021



شکل ۱– تصاویر میکروسکوپی تهیه شده از برش عرضی در ناحیه جسم سیاه در موش‌های سوری نر با استفاده از رنگ‌آمیزی تیروزین هیدروکسیلاز (تخصصی) (الف) و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین–ائوزین (عمومی) (ب) با بزرگ نمایی ۱۰۰ و ۱۰، نوار مقیاس۵۰۰ میکرومتر. نقاط با قطر بزرگتر از ۷ میکرومتر به عنوان هسته نورون‌های عصبی در نظر گرفته شد.

بحث

در این پژوهش تاثیر هورمون گرلین بر میزان TNF-α و میزان بیان ژن‌های سیتوکروم b، اینترلوکین ۱۰ در مدل پارکینسون القاء شده با MPTP بررسی شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تجویز هورمون گرلین با دوز ۰/۴میکروگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۲۸ روز موجب کاهش معنادار زمان آزمون میله و بهبود کاتالپسی و کاهش سطح پروتئین TNF-α در ناحیه‌های جسم سیاه و جسم مخطط مغز و افزایش بیان ژن‌های سیتوکروم b و اینترلوکین ۱۰ درگروه‌های دریافت‌کننده MPTP می‌شود.

هورمون گرلین ممکن است به صورت مجزا باعث مهار تبدیل MPTP به متابولیت فعال خود یعنی۱–متیل– ۴- فنیل پیریدینیوم[۳۲] گردد. یکی از عوامل شیمیایی موثر در ایجاد بیماری پارکینسون، MPTP است. MPTP بعد از تزریق قادر به عبور از سد خونی مغزی می‌باشد و در آستروسیت‌ها متابولیزه شده و توسط منو آمین اکسیداز B[۳۳] تبدیل به متابولیت فعال خود یعنی MPP^+ می‌گردد. MPP^+ به طور انتخابی‌تر، از طریق انتقال‌دهنده‌های دوپامینی وارد نورون‌های دوپامینرژیک می‌شود. این ماده که توسط سلول‌های جسم سیاه مهار می‌شود، با مهارکمپلکس I میتوکندریایی مانع از فسفوریلاسیون اکسیداتیو می‌گردد و در نهایت مرگ سلولی رخ می‌دهد. به دنبال این امر تخلیه دوپامین از استریاتوم صورت می‌گیرد و بیماری پارکینسون ایجاد می‌شود. MPTP فعالیت کمپلکس I میتوکندری را فقط در سلول‌های غیر فعال کننده ناقل دوپامین مهار می‌نماید [۱۲]. نتایج حاصل از مطالعه ما نشان دادکه تعداد نورون‌های دوپامینرژیک در جسم سیاه موش‌های پارکینسونی کاهش یافته است. درحالی‌که مصرف هورمون گرلین به مدت ۲۸روز باعث افزایش تعداد نورون‌های دوپامینرژیک درجسم سیاه شده است. قاسمی و همکاران در سال ۱۳۹۶، با استفاده از رنگ‌آمیزی کرزیل‌ویله نشان دادند که ۶ هیدروکسی دوپامین تعداد نورون‌های دوپامینرژیک را کاهش داده است

[32] 1- methyl- 4- phenylpyridinium (MPP^+)

[33] Monoamine oxidase B (MAO-B)

www.SID.ir

Archive of SID

[۱۵]. نتایج این مطالعه نشان داد که سطح TNF-α در جسم مخطط نسبت به جسم سیاه کمتر می‌باشد. به علاوه به نظر می‌رسد که اختلاف گروه کنترل با سایر گروه‌های آزمایشی از لحاظ سطح TNF-α در ناحیه جسم سیاه بیش‌تر از ناحیه جسم مخطط است. این امر احتمالاً به علت تجمع بیشتر اعصاب دوپامینرژیک در جسم سیاه در مقایسه با جسم مخطط است و می‌تواند نشانه‌ی این باشد که عمده تغییرات TNF-α مربوط به نورون‌های دوپامینرژیک این نواحی است [۱۶]. بررسی کاتالپسی به عنوان یک پارامتر مهم برای تعیین آسیب حرکتی در مدل‌های حیوانی پارکینسون استفاده می‌شود. برای ارزیابی کاتالپسی از آزمون میله استفاده شد [۱۴]. یافته‌ها نشان می‌دهد که گرلین نقش مهمی در حفاظت نورون‌های جسم مخطط در برابرکاهش دوپامین در بیماران پارکینسون به عمل می‌آورد [۱۷]. شواهد نشان می‌دهدکه تولید گرلین در بیماران پارکینسونی کاهش می‌یابد [۱۸]. گرلین با اتصال به گیرنده خود سبب تغییر شکل فضایی واحدهای G پروتئین شده که آن نیز به نوبه خود سبب تحریک فسفولیپاز C (PLC)[۳۴] در درون سلول شده و از این طریق با افزایش اینوزیتول تری فسفات (IP3)[۳۵] درون سلول سبب افزایش کلیسم درون سلولی می‌شود [۱۹].

مطالعات دیگرنشان می‌دهدکه گرلین به واسطهٔ خاصیت حفاظتی ممکن است به کاهش آسیب پذیری نورون‌های دوپامینرژیک کمک کند. گرلین همچنین می تواند آپوپتوز نورونی هیپوتالاموس و هیپوکامپ را مهار کند و با کاهش میکروگلیاها، خواص محافظت نورونی ایجاد می‌کند [۶].

نتیجه‌گیری

هورمون گرلین به واسطه اثر ضدالتهابی و نقش حفاظتی از طریق‌جلوگیری از آسیب پذیری نورون‌های دوپامینرژیک مغز میانی می‌توانند باعث بهبود بیماری پارکینسون ناشی از MPTP در موش‌ها شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه دوره دکتری خانم ندا نیکوکلام نظیف می‌باشد که توسط معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال تایید شده است. نویسندگان بدینوسیله از کلیه عزیزانی که در انجام این تحقیق همکاری صمیمانه داشته‌اند، تشکر و قدردانی می نمایند.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

نقش نویسندگان

ن.ن: انجام مطالعه و آنالیز آماری؛ م.خ: ایده، طراحی، نظارت بر حسن انجام مطالعه ونگارش مقاله؛ ر.ا: طراحی، نظارت بر حسن انجام مطالعه ونگارش مقاله؛ م.ب: کمک در طراحی مطالعه و نگارش مقاله؛ ا.م: کمک در طراحی مطالعه و نگارش مقاله.

[34] Phospholipase C
[35] Inositol trisphosphate (IP3)

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 10:09 +0330 on Saturday March 13th 2021

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 10:09 +0330 on Saturday March 13th 2021

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 10:09 +0330 on Saturday March 13th 2021

فهرست منابع

[1] Balarajah S, Cavanna AE, The pathophysiology of impulse control disorders in Parkinson disease. ***Behav Neurol*** 26 (2013) 237-244.

[2] Levin J, Kurz A, Arzberger T, Giese A, Höglinger GU, The differential diagnosis and treatment of atypical parkinsonism. ***Dtsch Arztebl Int*** 113 (2016) 61-69.

[3] Kang MJ, Lee SS, Koh HC, Prooxidant properties of ascorbic acid in the nigrostriatal dopaminergic system of C57BL/6 mice. ***Toxicology*** 294 (2012) 1-8.

[4] Taylor JM, Main BS, Crack PJ, Neuroinflammation and oxidative stress: co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease. ***Neurochem Int*** 62 (2013) 803-819.

[5] Craig WJ, Health-promoting properties of common herbs. ***Am J Clin Nutr*** 70 (1999) 491-499.

[6] W dos Santos V, Rodrigues S, Lúcia A, C De Lima T, R de Barioglio S, Raisman-Vozari R, Prediger RD, Ghrelin as a neuroprotective and palliative agent in Alzheimer's and Parkinson's disease. ***Curr Pharm Des*** 19 (2013) 6773-6790.

[7] Morgan AH, Rees DJ, Andrews ZB, Davies JS, Ghrelin mediated neuroprotection-A possible therapy for Parkinson's disease***?*** ***Neuropharmacology*** 136 (2018) 317-326.

[8] Zendehdel M, Allahdini P, Safarpour E, Abrehdari Z, Pourrahimi M, Mazaheri Nezhad Fard R, Effects of co-administration of ghrelin agonist (GHRP-2) and GH on TNF-α, IL-6 and iNOS gene expression induced by LPS in the mouse brain. ***Iran J Vet Res*** 14 (2013) 341-344.

[9] Moon M, Kim HG, Hwang L, Seo J-H, Kim S, Hwang S, Kim S, Lee D, Chung H, Oh MS,Lee KT, Park S, Neuroprotective effect of ghrelin in the 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease by blocking microglial activation**.** ***Neurotox Res*** 15 (2009) 332-347.

[10] Prusak B, Grzybowski T, Non-random base composition in codons of mitochondrial cytochrome b gene in vertebrates. ***Acta Biochim Pol*** 51 (2004) 897-905.

[11] Blanco FJ, Rego I, Ruiz-Romero C, The role of mitochondria in osteoarthritis. ***Nat Rev Rheumatol*** 7 (2011) 161-163.

[12] Hantraye P, Brouillet E, Ferrante R, Palfi S, Dolan R, Matthews RT, Beal MF, Inhibition of neuronal nitric oxide synthase prevents MPTP–induced parkinsonism in baboons. ***Nat Med*** 2 (1996) 1017-1019.

[13] Ahmadi R, Sohrabian L, The effect of ghrelin agonist, exercise, and nicotine on catalepsy in an animal model of parkinson's disease.***Shefaye Khatam J*** 5 (2017) 28-34.

[14] Toy WA, Petzinger GM, Leyshon BJ, Akopian GK, Walsh JP, Hoffman MV, Vučković MG, Jakowec MW, Treadmill exercise reverses dendritic spine loss in direct and indirect striatal medium spiny neurons in the 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) mouse model of Parkinson's disease. ***Neurobiol Dis*** 63 (2014) 201-209.

[15] Ghasemi Z, Kiasalari Z, Ebrahimi F, Ansari F, Sharayeli M, Roghani M, Neuroprotective effect of diosgenin in 6-hydroxydopamine-induced model of Parkinson's disease in the rat. ***Sci Res J Shahed Univ*** 129 (2017) 87-98.

[16] Nicola SM, Surmeier DJ, Malenka RC, Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens**.** ***Ann Rev Neurosci*** 23 (2000) 185-215.

[17] Andrews ZB, The extra-hypothalamic actions of ghrelin on neuronal function. ***Trends Neurosci*** 34 (2011) 31-40.

[18] Bayliss JA, Lemus M, Santos VV, Deo M, Elsworth JD, Andrews ZB, Acylated but not des-acyl ghrelin is neuroprotective in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. ***J Neurochem*** 137 (2016) 460-471.

[19] Grinspoon S, Miller KK, Herzog DB, Grieco KA, Klibanski A, Effects of estrogen and recombinant human insulin-like growth factor-I on ghrelin secretion in severe undernutrition. ***J Clin Endocrinol Metabol*** 89 (2004) 3988-3993.

Research paper

The effect of ghrelin hormone on level of tumor necrosis factor alpha and gene expression of cytochrome b and interleukin 10 in s*ubstantia nigra* in an animal model of Parkinson's disease

www.SID.ir

Archive of SID

Neda Nikokalam Nazif[1], Maryam Khosravi[1*], Ramesh Ahmadi[2], Maryam Bananej[1], Ahmad Majd[1]

1. Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, North-Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Physiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran

Received: 3 July 2019 Accepted: 5 August 2019

Downloaded from ijpp.phypha.ir at 10:09 +0330 on Saturday March 13th 2021

Abstract

Background and aims: Inflammatory pathways play an important role in incidence and progression of Parkinson's disease (PD). Ghrelin has anti-inflammatory and antioxidant effects and inhibits the release of inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF-α). This study has aimed to investigate the effect of ghrelin hormone on amount of TNF-α, and gene expression of cytochrome b and interleukin10 in Parkinson's disease induced by1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in male mice.

Methods: Thirty male NMRI mice were randomly divided to 5 groups (six mice in each) including control, saline, ghrelin hormone, Parkinson, and Parkinson + ghrelin hormone. Parkinson's disease was induced by intraperitoneal (i.p.) injection of 25mg/kg MPTP for 4 days. Ghrelin was injected for 28 days (0.4µg/kg, i.p.). Catalepsy was evaluated by bar test at the 1st, 7th, 14th, 21th, and 28th day after injection of MPTP. TNF-α level and gene expression of cytochrome b, and interleukin10 were measured in *Substantia nigra* and *Corpus striatum* by ELISA and Real time PCR techniques at the 29th day.

Results: Catalepsy and TNF-α level significantly increased in s*ubstantia nigra* and *corpus striatum* of the Parkinson group, whereas gene expression of cytochrome b, and interleukin10 decreased ($p < 0.001$). On the other hand, ghrelin hormone significantly decreased catalepsy and TNF-α level while increased gene expression of cytochrome b, and interleukin10 ($p < 0.001$).

Conclusion: It seems that ghrelin hormone improves catalepsy, decreases TNF-α level, and increases gene expression of cytochrome b, and interleukin10 by inhibiting inflammatory pathways involved in PD.

Keywords: Parkinson, Catalepsy, Ghrelin, 1-Methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine

Please cite this article as follows:
Nikokalam Nazif N, Khosravi M, Ahmadi R, Bananej M, Majd A, The effect of ghrelin hormone on level of tumor necrosis factor alpha and gene expression of cytochrome b and interleukin 10 in s*ubstantia nigra* in an animal model of Parkinson's disease. ***Iran J Physiol Pharmacol*** 3 (2019) 63-73.

*Corresponding author: maryam-khosravi@iau-tnb.ac.ir (ORCID ID: 0000-0001-8210-9066)

www.SID.ir