Archive of SID

فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۴۷، جلد ۱۲، شماره۴، پائیز ۹۸، صفحه ۷۵ تا ۹۳
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۱۷۳۵-۹۸۸۰

اثر کوآنزیم کیو ۱۰ بر محافظت عصبی درمدل سلولی و حیوانی بیماری پارکینسون القاء شده با ۶ – هیدروکسی دوپامین

مهدیه آذرشب[۱]، **مهدی رهنما** [۲]، رامین حاجی خانی[۱]، جلال صولتی [۳]، محمدرضابیگدلی[۴]

۱ – گروه زیست شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲ – گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحدزنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران.meh_rahnema@yahoo.com

۳– گروه زیست شناسی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج ، ایران.

٤– گروه زیست شناسی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت:۹۸/٦/۱٦ تاریخ پذیرش: ۹۸/۷/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: بیماری پارکینسون یکی از شایع ترین انواع بیماری های نورودژنراتیو است. علت اصلی بیماری ، تخریب نورون‌های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه در مغز میانی و کاهش غلظت دوپامین در پایانه های جسم مخطط است. این مطالعه، به منظور بررسی اثر کوانزیم کیو۱۰ بر مدل سلولی (PD) القاء شده با سم ٦ – هیدروکسی دوپامین با کاهش التهاب انجام شد.

روش کار: برای شمارش سلول های زنده از دو روشMTT و BT استفاده شد. برای ایجاد مدل سلولی پارکینسون ازسم ٦ – هیدروکسی دوپامین استفاده گردید. بعدازگذشت٤٨ساعت، درصد سایتوتوکسیسیتی سم واثردارومشخص شد. یک هفته بعد از جراحی کوآنزیم کیو ۱۰ با دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم برحسب وزن موش، به صورت گاواژ به مدت دو هفته مورد درمان و سپس مورد ارزیابی آزمون های رفتاری قرار گرفتند.

یافته ها: در مدل جانوری دوز ۲۵ میلی گرم کوآنزیم کیو ۱۰ اثر قابل ملاحظه ایی بر بهبود علائم رفتاری نداشت. اما دوز۵۰ میلی گرم کوآنزیم کیو ۱۰ اثر قابل ملاحظه ایی بر بهبود علائم رفتاری داشت. در مدل سلولی دوز ۲۰ میکروگرم کوآنزیم کیو ۱۰ اثرقابل ملاحظه ایی بربهبود سلول های مبتلا نداشت. اما؛ دوز۲۵ میکروگرم کوآنزیم کیو ۱۰ اثر قابل ملاحظه ایی بربهبود سلول های مبتلا داشت.

نتیجه گیری: درمان با کوآنزیم کیو۱۰ به جهت ضد التهابی و آنتی اکسیدانی می تواند مرگ سلول های دوپامینرژیک دربخش جانوری و سلول های اولیه کاتکول آمینرژیک دربخش سلولی راتوسط سم ٦ – هیدروکسی دوپامین کاهش دهد.

واژه های کلیدی: سلول کاتکول آمینرژیک ، ۶ – هیدروکسی دوپامین ، پارکینسون ، کوانزیم کیو۱۰.

مقدمه

بیماری پارکینسون Parkinson's disease (PD) یک اختلال مزمن پیشرونده و تخریب کننده‌ی عصبی است که به عنوان دومین بیماری تخریب کننده ی عصبی رایج در بین افراد پس از بیماری آلزایمر می باشد. میزان شیوع این بیماری در افراد بالای ۵۰ سال تقریباً ۲ درصد گزارش شده است(۲۰،۷). پارکینسون ثانویه در اثر مسمومیت با منگنز ، مسمومیت با مونوکسید کربن ، ضربه ی مزمن و مداوم به سر و برخی مواد مخدر تزریقی ممکن است

www.SID.ir

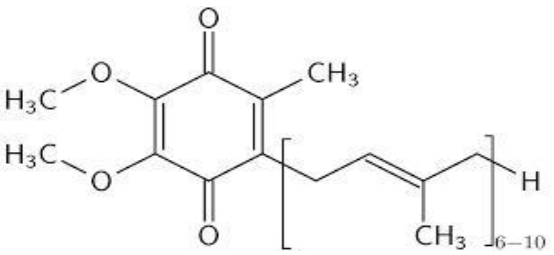
Archive of SID

ایجاد گردد که علائمی مشابه با پارکینسون را دارد. در سال ۱۸۱۷ دانشمند بریتانیایی دکتر جیمز پارکینسون اولین گزارش های مربوط به بیماری پارکینسون را ارائه داد(۱۷). بیماری پارکینسون همراه با اختلالات حرکتی می باشد که می توان به سفتی عضلانی ، لرزش در حال استراحت ، آکینزی، برادیکینزی، مشکل در شروع حرکات ، ضعف در حفظ تعادل و تغییر حالت چهره به هنگام صحبت کردن اشاره کرد(۱۷). در اثر این بیماری ۵۰ تا ۷۰ درصد نورون‌های دوپامینرژیک ناحیه متراکم جسم سیاه Substantia Nigra(SN) تخریب می شوند(۶). علاوه بر نورون های دوپامینرژیک سایر جمعیت های نورونی نیز که شامل بخش هایی از لوکوس سرلئوس، هسته‌های رافه ای و هسته حرکتی پشتی واگ، قشرسینگولیت Cingulate و پیاز بویایی هم تخریب می شوند(۱۶، ۹). این بیماری ناشی از یک عدم تعادل بین تحریک و مهار در هسته های قاعده ای است(پوتامن، هسته دم دار، جسم سیاه، هسته زیر تالاموسی، گلو بوس پالیدوس) که با افزایش استیل کولین نسبت به دوپامین و مهار دوپامینی پوتامن می باشد(۱۱). ۶ – هیدروکسی دوپامین یک آنالوگ هیدروکسیله شده از انتقال دهندهٔ عصبی دوپامین است. این ترکیب توسط Senob در سال ۱۹۵۹ ایزوله شد. آثار بیولوژیکی آن اولین بار توسط Porter و همکارانش بررسی شد. آن ها نشان دادند که ۶ – هیدروکسی دوپامین قادر به القاء کاهش نورآدرنالین در سیستم عصبی خودمختار و قلب است. همچنین این سم قادر به تخریب پایانه‌های نورونی در سیستم سمپاتیک می‌باشد(۱۹). نورون های دوپامینرژیک حاوی سطوح معنی داری از دوپامین، هیدروژن پراکسید و آهن آزاد می باشند که یک واکنش غیر آنزیمی بین این عناصر ممکن است منجر به شکل گیری ۶ – هیدروکسی دوپامین گردد. ۶ – هیدروکسی دوپامین آسیب به نورون های دوپامینرژیک جسم مخططی – جسم سیاه را از طریق تولید هیدروژن پراکسید و رادیکال های هیدروکسیل القاء می کند(۳). یک ترکیب بنزوکینون محلول در چربی آندروژن است که به طور طبیعی در بیشتر بافت‌های بدن یافت می شود. از مهم‌ترین مواد مورد نیاز جهت سلامتی و حیات سلول ها است که جهت تولید انرژی داخل سلولی ضروری است(۱). کوآنزیم Q10 در تولید ATP در سلول نقش دارد و در زنجیره ی انتقال الکترون در چرخه ی تنفسی باعث انتقال الکترون‌ها از مولکول های احیاءکننده به پذیرنده های الکترون در میتوکندری می شود و بیشترین مقدار آن نیز در غشای داخلی میتوکندری موجود است. کوآنزیم Q10 هم‌چنین دارای خاصیت ثابت شده ی آنتی اکسیدانی و ضد رادیکال آزاد می‌باشد که این خاصیت حدود ۵۰ برابر بیشتر از ویتامین E است و در نتیجه از آسیب اکسیداتیو و پراکسیداسیون چربی های غشاء و هم‌چنین آسیب های ژنوم در سلول جلوگیری می کند. امروزه از کوآنزیم Q10 در درمان بیماری های نارسایی قلبی ، بیماری‌های اعصاب مثل آلزایمر و پارکینسون، اختلالات باروری، نارسایی ایمنی، بیماری‌های پوست، بیماری های چشم و دیابت استفاده می شود. هم‌چنین ثابت شده است که عوارض جانبی کوآنزیم Q10 بسیار اندک و ناچیز است. این ترکیب در داخل بدن به طور طبیعی سنتز شده ولی میزان آن با افزایش سن، کاهش می یابد(۴). کوآنزیم Q10 یک مولکول لیپوفیلیک است. وجود آن در واکنش های آنزیمی فسفریلاسیون اکسیداتیو لازم

www.SID.ir

Archive of SID

است. کوآنزیم Q ۱۰ ، علاوه بر انتقال الکترون‌ها در زنجیره تنفسی میتوکندریایی، در برخی از اعمال اصلی سلول از قبیل انتقال الکترون در غشا پلاسمایی و لیزوزومی، تعدیل آپوپتوز، انتقال پروتون، مهار پراکسیداسیون لیپیدی و در مواردی به عنوان عامل پرواکسیدان مطرح است(۱۴). هم‌چنین، در موش های فاقد آپولیپوپروتئین E، کوآنزیم Q10 مانع وقوع آتروسکلروز می شود(۸). از طرف دیگر، شواهد بیان‌گر نقش حفاظتی کوآنزیم Q10 در سلول‌های عصبی است. چنان که در شرایط ایسکمی و توکسیسیتی، کوآنزیم Q10 با مهار استرس اکسیداتیو مانع آسیب رسیدن به نورون ها می-شود(۱۳). به علاوه، در موش صحرایی، کوآنزیم Q10 با اثر بر اسیدوز منتج از لاکتات و تولید ATP و تعدیل نسبت فرم اکسید و احیا شده گلوتاتیون و فعالیت سوپراکسید دیسموتاز اثر حفاظتی خود را در مدل ایسکمی القا شده از طریق آندوتلین اعمال می-کند. از آن‌جایی که کوآنزیم Q10 به عنوان یک جمع کننده رادیکال های آزاد دارای اثرات آنتی اکسیدانی است، در اختلالات منتج از ایسکمی-رپرفیوژن مغز که به دنبال تجمع رادیکال های آزاد اکسیژنی و متابولیسم غیرطبیعی انرژی حادث می شود، می تواند نقش حفاظتی خود را از طریق بهبود متابولیسم انرژی مغز ایفا نماید(۲۱).



کوآنزیم Q10

مواد و روش ها

مدل جانوری پارکینسون:

۴۵ سرموش کوچک آزمایشگاهی نر بالغ نژاد NMRI با محدوده وزنی ۳۰ گرم از انستیتو پاستور ایران تهیه و در قفس های ۴ تایی و تحت شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و محدوده دمایی ۲۲-۲۵ درجه ی سانتی‌گراد نگهداری می شوند. همه ی جانوران دسترسی آزاد به آب و غذای استاندارد را داشته و حداقل ۱۰ روز پس از آداپتاسیون به محیط مورد استفاده قرار می گیرند.

گروه بندی جهت ایجاد مدل جانوری پارکینسون :

در این مرحله موش ها به صورت تصادفی به گروه های زیر تقسیم می شوند :

۱ – گروه کنترل : این گروه حلال سالین حاوی ۱٪ اسید اسکوربیک را به صورت تزریقی به درون استرایاتوم سمت چپ مغزخود دریافت خواهند کرد (۱۰ سر).

۲ – گروه تیمار : موش های گروه تیمار ۵ μg/μl از حلال 6 - HDOP حاوی ۱٪ اسید اسکوربیک را به صورت تزریقی به درون استرایاتوم سمت چپ مغز خود دریافت خواهند کرد (۴۰ سر).

گروه بندی جهت درمان مدل جانوری پارکینسون

در این مرحله در واقع **۴۰** سر موشی که پارکینسون در آن ها ایجاد شده گروه بندی و سپس با دارو ها درمان تیمار گردیدند

۱ – گروه کنترل که فقط آب مقطرحلال Q10 رابه صورت گاواژدریافت می نمایند(۱۰ سر).

۲ – گروه تیماری با Q10 با دوزهای (۲۵ , ۵۰ , ۱۰۰ mg/kg) را به صورت گاواژ دریافت می نمایند (۳۰سر).

حدود ۱٪ اسید اسکوربیک (ویتامین C) به محلول گروه کنترل و نوروتوکسین گروه های تیمار در مرحله ایجاد مدل جانوری اضافه می گردید تا در فاصله زمانی چند دقیقه انتقال به سلول های دوپامینرژیک نیگرا، از

www.SID.ir

Archive of SID

اکسیده شدن HDOP – 6 جلوگیری نماید. چون دوپامین و مشتقات آن در محیط مایع سریع اکسیده می شوند. در ضمن خود ویتامینC هم ناپایدار است که باید زودتر مصرف شود.

تکنیک اجرایی ایجاد مدل جانوری پارکینسون :

ایجاد مدل جانوری با روش استریوتاکسی :

استریوتاکسی : Stereotaxy روشی با کم‌ترین تهاجم و دقت بیشتر، برای جراحی مغز و اعصاب است که در آن مختصات سه بعدی نقطه مورد نظر بررسی و محل دقیق تزریق مشخص می شود. در این پژوهش به منظور تزریق ۶ – هیدروکسی دوپامین درون استرایاتوم، کانول که از سر سوزن شماره ۲۱ ساخته شده است، با روش جراحی استریوتاکسی درناحیه مغز موش قرار داده می شود. بدین منظور موش ها پس از بی هوشی به وسیله مخلوط کتامین با دوز ۱۰۰ mg/kg و زایلازین با دوز ۱۰ mg/kg به صورت تزریق داخل صفاقی تحت عمل جراحی قرار خواهند گرفت. سر حیوان توسط میله جلویی مهار و میله های کناری داخل هر دو گوش قرار گرفته و حیوان در دستگاه استریوتاکس ثابت و بی حرکت می ماند. موهای ناحیه پشتی جمجمه تراشیده شده وبا پنبه و الکل پوست سر ضدعفونی می شود. یک برش نیم سانتی در ناحیه ایجاد کرده و باپنبه الکلی چربی های محل را پاک نموده تا نقطه برگما(محل اتصال استخوان های آهیانه وپیشانی) و لامبدا(محل اتصال استخوان های آهیانه وپس سری) در یک امتداد به طورواضح دیده شود. نشان‌گر دستگاه روی نقطه برگما و سپس لامبدا قرارمی گیرد. به کمک دستگاه استریوتاکسی Stoelting, USA و طبق اطلس آموزشی(Watson and Paxinos) مختصات مغز موش برای ناحیه AP: +0.04 cm , ML: ±0.18 cm , DV: −0.35 cm پیدا شده و کانول جای گذاری می شود(ML محور میانی – جانبی، DV محور پشتی – شکمی، AP محور قدامی – خلفی). جهت بررسی محل دقیق کانول برای تعدادی از موش‌ها مرکب و یا رنگ متیلن بلو تزریق شده و سپس با برش بافتی محل دقیق قرار گیری کانول و تزریق ۶ – هیدروکسی دوپامین(۶-OHDA)، مشخص می‌شود. بر اساس مدل تعریف شده در مطالعات(تمرینی قبلی و تجربی) برای پارکینسون، کانول گذاری و تخریب استرایاتوم فقط یک‌طرفه و در نیمکره چپ انجام می-شود. پس از سوراخ کردن محل مورد نظر به کمک دریل دندانپزشکی، ۵ میکروگرم نوروتوکسین ۶ - OHDA در یک درصد اسید اسکوربیک به صورت یک طرفه درون SNc با استفاده از سرنگ هامیلتون ۵ میکرولیتری تزریق شد. به منظور جلوگیری از بازگشت محلول محتوی OHDA -6 به درون سرنگ و برای انتشار بهتر محلول در منطقه یSNc ، سرسوزن به مدت ۱ دقیقه پس از تزریق در جای خود ثابت ماند.

تهیه محلول نوروتوکسینOHDA -6 :

نوروتوکسینOHDA -6 ازشرکت TOCRIS آمریکایی خریداری شد. برای این منظور می توان نوروتوکسین را در دوز ۶ میکروگرم در ۲ میکرولیتر محلول نمکی ۰/۹ ٪ و یک درصد ویتامین C حل کرد.

تست های تاییدی مدل پارکینسون :

الف) تست های رفتاری :

۱ – چرخش ناشی از تزریق آپومورفین: یک هفته بعد از ایجاد مدل پارکینسونی، آپومورفین هیدروکلراید با دوز mg/kg ۰/۵. وزن موش به صورت داخل صفاقی تزریق خواهد شد. حیوانات از ۱۰ دقیقه قبل از شروع آزمایش به یک محفظه استوانه ای مدرج بر حسب زاویه از جنس پلکسی گلاس به قطر ۳۳ و ارتفاع ۳۵ سانتی متر منتقل می شوند. یک دقیقه پس از تزریق

www.SID.ir

Archive of SID

آپومورفین، تعداد چرخش در فواصل زمانی ۱۰ دقیقه-ای به مدت کل ۶۰ دقیقه تحت شرایط آرام توسط یک شمارش گر دستی اندازه گیری خواهد شد. با توجه به ناحیه ی 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 چرخش ها در دو جهت محاسبه می شود. این آزمون طبق روش شرح داده شده توسط Cesario و همکارانش در سال ۱۹۹۵ صورت می گیرد. در این آزمون موش های پارکینسونی بیش از ۳۰ چرخش در یک ساعت بر خلاف جهت تزریق نوروتوکسین را نشان می دهند. تعداد این چرخش ها در واحد زمان نشان دهنده شدت تخریب نورونی در جسم سیاه و شدت بیماری است.

تکنیک اجرایی ایجاد مدل سلولی پارکینسون:

کشت سلول

۱ – تهیه محیط کشت

محیط کشت مورد استفاده در این مطالعه DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) است که به صورت پودر خریداری شد. برای تهیه ۱۰۰میلی لیتر محیط کشت به مقدار ۱/۰۴ گرم پودر RPMI و ۰/۲گرم پودر بی کربنات وزن کرده باآب دیونیزه شده به حجم ۱۰۰میلی لیتر رسانده می شود. برای تهیه محیط کامل ، به محیط کشت تهیه شده به مقدار ۱۰ میلی لیتر۱۰٪ FBS(Fetal bovine serum) و ۱ میلی لیتر مخلوط آنتی بیوتیک های پنی سیلین و استرپتومایسین(۱٪) در شرایط استریل اضافه می شود و بعد از تهیه ، داخل یخچال ۴ ^{o}C نگهداری می گردد .

۲ – دِفریز یا ذوب کردن سلول ها

از آن‌جایی که سلول ها به صورت منجمد در فریزر$-80^{o}C$ برای کوتاه مدت و تانک ازت $-196\ ^{o}C$ برای طولانی مدت نگهداری شدند، اولین اقدام برای مطالعه و استفاده از این سلول ها دفریز کردن است که باید بسیار سریع صورت گیرد. میکروویال حاوی استوک سلولی خارج شده از فریزر یا تانک ازت ، در تماس با دست با حرارت ۳۷ ^{o}C بدن تحت تاثیر قرار می گیرد . درب میکروویال به آرامی باز شده وآن مقدار از سلول که ذوب شده به فالکون منتقل می شود . این عمل تا ذوب شدن کامل و خالی شدن استوک سلولی،به آهستگی پیپتاژ می شود. فالکون حاوی سلول به مدت ۶ دقیقه و با سرعت rpm ۲۰۰۰ سانتریفوژ سوسپانسیون سلولی تهیه گردید.

۳– شمارش سلولی با رنگ تریپان بلو

برای شمارش سلول ها با این روش از یک قطره رنگ تریپان بلو و لام نئوبار استفاده شد. در این روش تعداد سلول ها در یک سطح معین با عمق مشخص شمارش شده و غلظت سلولی محاسبه و مقدار محیط برای محاسبات تعداد سلول در نظر گرفته می‌گردد. برای شمارش سلولی حجم برابری از رنگ تریپان بلو و سوسپانسیون سلولی تهیه شده ، با هم مخلوط می شوند .۱۰ ماکرولیتر تریپان بلو و ۱۰ ماکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با هم مخلوط شده و ۱۰ ماکرولیتر از این مخلوط روی لام نئوبار به زیر میکروسکوپ منتقل می شود . سلول ها در میکروسکوپ نوری معمولی invert با بزرگنمایی10 X شمارش می شوند . تعداد سلول های زنده در هر ۵ بخش لام شمارش شده و میانگین گرفته می شود

۴- تعویض محیط کشت سلول ها

بسته به سرعت رشد و متابولیسم و نوع سلول‌ها ، بعد از مدت زمان مشخصی سلول‌ها به تعویض محیط کشت نیاز دارند . رشد سلول ها با افت pH از ۷ به ۶/۵

www.SID.ir

Archive of SID

متوقف شده و در محدوده pH ۶/۵ تا ۶ آغاز می شود . تغییر PH ۰/۱ در یک روز تغییر چندانی در رشد سلول‌ها ایجاد نمی‌کند ولی تغییر ۰/۴ در اسیدیته نشان دهنده‌ی این است که در فاصله ۲۴ تا ۴۸ ساعت باید مواد غذایی به محیط کشت اضافه شود . اگر سلول‌ها سریع تکثیر شوند و رشد کنند ، مواد غذایی محیط کشت زودتر و بیشتر استفاده می‌شود .اگر محیط کشت داخل فلاسک تغییر رنگ داده باشد نشان دهنده‌ی تغییر pH است . اگر رنگ محیط از قرمز به زرد تغییر کند نشان‌گر زمان تعویض محیط است. بنابراین محیط سلول ها بسته به نوع سلول باید هر ۴۸ –۲۴ ساعت تعویض شود . تعویض به این صورت است که فلاسک حاوی سلول ازدستگاه انکوباتور خارج شده و بعد از مشاهده میکروسکوپی ، محیط قبلی داخل فلاسک را دورریز و محیط کشت کامل تازه که دمای آن به ^{o}C ۳۷ رسیده را با پیپت داخل فلاسک می ریزیم .

۵- پاساژ دادن سلول ها

زمانی که سلول ها تکثیر پیدا کند و تراکم سلولی در کف فلاسک به ۸۰٪ برسد ، موجب کمبود فضای کافی برای رشد و تکثیر سلول ها می شود . بنابراین سلول ها نیازمند فضای بیشتر بوده در این حالت سلول‌ها باید به دو یا چند فلاسک مورد نیاز پاساژ داده شوند .

مراحل پاساژ سلول های چسبنده به ترتیب زیر انجام می شود :

۱ – فلاسک حاوی سلول را بعد از بررسی میکروسکوپی و اطمینان از عدم آلودگی به زیر هود لامینار منتقل کرده، و برای حذف باقی مانده سرم جنین گاوی (FBS)، سلول ها ۲ مرتبه با بافر phosphate-buffered saline شسته می شوند . ۲ – بافر PBS را از فلاسک خارج نموده ، برای جدا کردن سلول‌ها از کف فلاسک از (Trypsin-EDTA)1X استفاده می‌شود. Trypsin دارای خاصیت آنزیمی است و موجب کنده شدن سلول ها از ته فلاسک می شود که با EDTA ترکیب شده Trypsin - EDTA به صورت منجمد در میکروویال‌های ۱/۵ یا ۲ میلی لیتری در فریزر $-۲۰^{o}C$ نگهداری می‌شود . به میزان ۰/۱ میلی لیتر به ازای هر سانتی متر مربع از سطح ظرف ، Trypsin - EDTA در فلاسک ریخته می شو .

۳ – بعد از گذشت ۳ تا ۵ دقیقه ، سلول ها از کف ظرف کنده شده و شناور می شوند . پس از مشاهده سلول ها در زیر میکروسکوپ و حصول اطمینان از جدا شدن آن ها ، برای جلوگیری از اثر تخریبی تریپسین بر سلول ها ، به محیط کشت ۱۰٪ FBS اضافه می شود تا اثر هضم کنندگی تریپسین بر سلول را خنثی کند . محتویات فلاسک بعد از چند بار پیپتاژ ، با پیپت جمع‌آوری شده وداخل یک فالکون ۱۵ ریخته می‌شودوسلول ها به مدت ۶ دقیقه با دور ۲۰۰۰سانتریفوژ می شود . سپس، محلول حاوی آنزیم تریپسین دورریز می شود وته فالکون پلاک سلولی تشکیل می گردد که با محیط کامل تازه ، به فلاسک های جدید منتقل می شود .

۶ – ذخیره و منجمد کردن سلول ها

به دلیل نگه داری سلول ها برای مطالعات بعدی ، جلوگیری از پیری سلول ها و کاهش تغییرات ژنتیکی و مورفولوژی آن ها ، ذخیره کردن سلول ها به صورت منجمد ، بهترین روش می باشد . در این روش سوسپانسیون سلولی باید با غلظت زیاد و در حضور یک cryoprotective مانند DMSO فریز شود.cryoprotective با کاهش نقطه انجماد باعث کاهش سرعت فریز شدن سلول ها می گردد . این انجمادتدریجی، ریسک تشکیل بلورهای یخ و در نتیجه آسیب سلولی را کاهش می دهد . برای تهیه ذخیره سلولی و فریز کردن ، ابتدا پس از تهیه سوسپانسیون سلولی سلول ها سانتریفوژ می شوند . برای تهیه

www.SID.ir

Archive of SID

استوکی (Stock) به حجم ۱میلی لیتر۹۰۰ ماکرولیترسرم FBS به پلاک سلولی داخل فالکون اضافه شده و پیپتاژ انجام می شود . سپس سوسپانسیون سلولی به میکروویال منتقل شده و ۱۰۰ ماکرولیتر DMSO به آن اضافه می شود . به سرعت میکروویال حاوی سلول به مدت ۱ تا ۲ ساعت در فریزر ^{o}C ۲۰ – قرار داده می شود .بعدبه فریزر ^{o}C ۷۰– منتقل می شود.در صورت نیاز برای نگه داری طولانی مدت بعد از ۲۴ ساعت به تانک ازت ^{o}C ۱۹۶– منتقل می گردد و مشخصات کامل سلولها ثبت می گردد .

۷– سنجش توان حیاتی سلول ها

یکی از موارد مهم در بحث زیست شناسی سلولی تعیین بقای سلول است . از جمله آزمایش هایی که در این زمینه از اهمیت خاصی برخوردار است سنجش توان حیاتی سلول ها(Cell Viability) تست MTT است . در این تست محلول زرد رنگ تهیه شده از پودر-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) ، توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز سلول های زنده و فعال از نظر متابولیکی ، در مدت ۴ ساعت در انکوباتور ، به بلورهای ارغوانی رنگ فورمازان تبدیل می شود .کریستال های فورمازان ساخته شده در آب غیر محلول است و به کمک حلال DMSO حل شده و جذب نوری محلول ارغوانی رنگ به وسیله دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومترخوانده می شود . در نهایت به کمک منحنی استاندارد تعداد سلول های زنده محاسبه می شود . برای هر رده سلولی ارتباط خطی بین تعداد سلول ها و جذب نوری محلول نهایی وجود دارد.

۸- ایجاد مدل سلولی پارکینسون :

در این مطالعه نیز نوروتوکسین ۶ – هیدروکسی دوپامین به همراه کوآنزیم کیو۱۰در حلال سالین با اضافه کردن ۱٪ اسید اسکوربیک به عنوان محافظ ۶ – هیدروکسی دوپامین از اکسیده شدن استفاده می شود . سلول های مورد استفاده محیط کشت از سلول ها ی کاتکولامینرژیک هستند . شبیه سلول های دوپامینی مغز بوده و در حقیقت سلول اولیه سلول های دوپامینی می باشند . در این مدل خود سلول های دوپامینی به دلیل سمیت استفاده نمی شوند .غلظت های استفاده شده برای محلول ۶ – هیدروکسی ۵۰ و محلول های کوآنزیم کیو۱۰بادوزهای۲۰ ، ۲۵ ، ۳۰ میکروگرم بود که با فیلتر سرنگی استرلیزه شده و با سمپلر به محیط کشت اضافه می شود.

محیط کشت یک : فقط محیط کشت سلول ها ی کاتکولامینرژیک.

محیط کشت دو : فقط حلال DMSO .

محیط کشت سه : ۶ – هیدروکسی دوپامین به همراه کیو۱۰.

محیط کشت چهار : حلال DMSO به همراه ۶ – هیدروکسی دوپامین

محیط کشت پنج : فقط ۶– هیدروکسی دوپامین

محیط کشت شش : حلال DMSO + محلول MTT

بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون به تمام محیط ها محلول MTT اضافه شد.

۹ – بررسی اثرات داروها

برای انجام این تست ابتدا سوسپانسیون سلولی تهیه و شمارش سلولی انجام شد که مشخص شود چه تعداد از سلول ها زنده مانده اند . سپس سلول ها به تعداد ۵۰۰۰ در هر چاهک به پلیت ۹۶ خانه ته صاف با محیط کشت کامل منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور CO_2 با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری وپس از ۲۴ ساعت محیط کشت قبلی سلول ها با محیط کشت تازه که تیمارها در آن صورت گرفته بود تعویض شد.

غلظت های مختلف از ۶ – هیدروکسی دوپامین و کوآنزیم کیو۱۰ تهیه شده و ۱ ماکرولیتر از هر یک از

www.SID.ir

Archive of SID

غلظت های تهیه شده برداشته و با محیط کشت کامل به حجم ۲۰۰ ماکرولیتر رسانده و سپس به داخل چاهک ریخته می شود در ضمن هر تیمار برای خود دارای پنج چاهک است . و بعد پلیت ها به انکوباتور برگردانده می شود . غلظت نهایی ترکیبات برای زمان ۴۸ ساعت تیمار در داخل چاهک برای ۶ – هیدروکسی دوپامین ۵۰ ، و برای کوآنزیم کیو ۱۰ دوز۲۵و۳۰ میکروگرم خواهد بود . درهرپلیت پنج چندچاهک به عنوان کنترل درنظرگرفته می شود.پس از ۴۸ ساعت پلیت از انکوباتور خارج و محیط کشت حاوی تیمارها تخلیه شده و ۲۰۰ ماکرولیتر محلول MTT به هر چاهک اضافه می شود (با غلظت نهایی ۰/۵ mg/ml) . اضافه کردن محلول MTT به چاهک ها باید در تاریکی و دور از نور مستقیم انجام شود. سپس، پلیت رابا فوئل پوشانده و به مدت ۴ ساعت انکوبه می شود . بعد از ۴ ساعت ، بلورهای فورمازان ظاهر شده و به هر چاهک ۲۰۰ ماکرولیتر DMSO اضافه می شود و بلورهای ارغوانی فورمازان حل شده و جذب نمونه ها در ۵۷۰nm با دستگاه الایزا اندازگیری می گردد و درصد سایتوتوکسیسیتی ۶ – هیدروکسی دوپامین و dose-response دارو محاسبه می شود که کوانزیم کیو۱۰ تا چه حد توانسته از سلول های کاتکولامینرژیک در مقابل نوروتوکسین محافظت کند .

نتایج

بررسی یافته ها و نتایج در بخش جانوری

بر اساس تجزیه و تحلیل آماری مشخص شد که در این پژوهش تفاوت معناداری در گروه تیماری با کوآنزیم کیو۱۰ نسبت به موش‌های گروه کنترل وجود دارد. یافته های این تحقیق نشان دهنده اثرات نوروتوکسین۶ – هیدروکسی دوپامین برجسم سیاه برای ایجاد بیماری پارکینسون با تخریب نورون های دوپامینرژیک است و نیز در این پژوهش به این نتیجه رسیده شد که مصرف داروی کوآنزیم Q10 به علت داشتن خاصیت آنتی اکسیدانتی می تواند از پیشرفت بیماری پارکینسون جلوگیری کند. نتایج حاصل از این پژوهش در دو بخش بررسی می شود.

الف) ایجاد و تایید بیماری پارکینسون :

تزریق آپومورفین باعث افزایش معناداری در چرخش موش های پارکینسونی در مقایسه با گروه کنترل شده است($p<۰/۰۰۱$)(نمودار۱). افزایش معنی دار کاتالپسی در گروه های تیماری که به بیماری پارکینسون مبتلا شده اند مشاهده می گردد(نمودار ۲).

نمودار۳ : بعد از تزریق ۶ – هیدروکسی دوپامین به گروه تیمار کاهش معنی داری در تعداد نورون های هسته سابستانتیکا نیگرا نسبت به نورون های گروه کنترل مشاهده می شود(نمودار ۳).

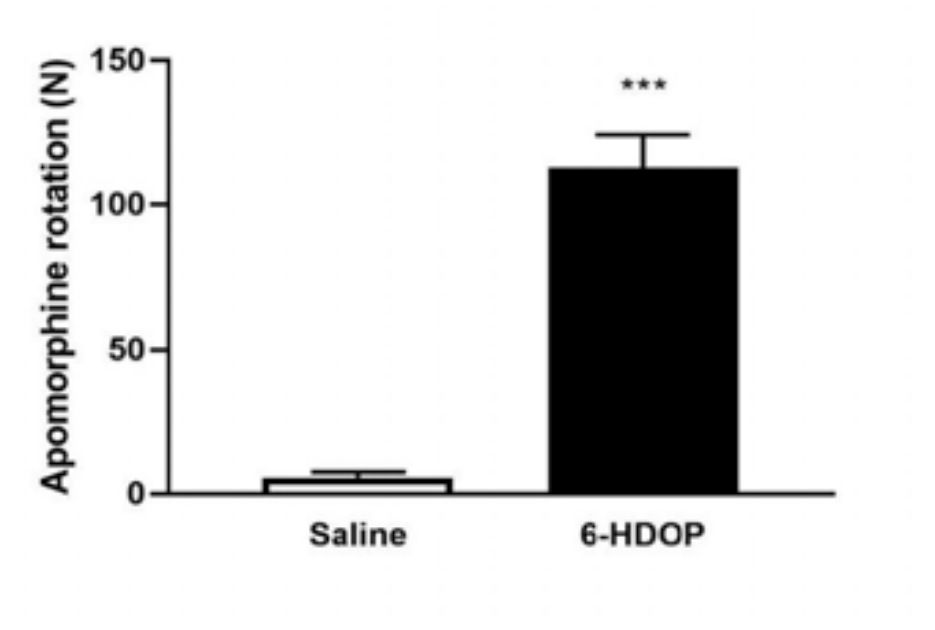
ب) اثرات دوزهای کوآنزیم Q10 بر روی موش های پارکینسونی شده:

تعداد چرخش های ناشی از تزریق آپومورفین به گروه کنترل(آب) و تیمار دریافت کننده دوزهای ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ کوآنزیم Q10 در نمودار ۴ نشان داده است. نتایج به دست آمده نشان می دهد که هر سه دوز Q10 به طور معنی داری تعداد چرخش های ناشی از آپومورفین، نسبت به گروه کنترل دریافت کننده آب، را کاهش داده اند($p<۰/۰۱$). در خصوص زمان کاتالپسی و مدت زمان بی حرکتی در آزمون تست شنای اجباری دوز Q10۵۰ کاهش معنی داری نشان داد(نمودار ۵ و ۶). در خصوص تعداد دفعات ورود موش به بازوی بازوبسته ماز، برای ارزیابی آزمون اضطراب درگروه کنترل دریافت کننده آب و تیمار دریافت کننده دوزهای ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ کوآنزیم Q10 است و این تعداد درگروه تیمار با دوز ۵۰ بیشتر شد که نشانه کاهش اضطراب و بهبود بیماری پارکینسون است(نمودار۷). در خصوص درصد زمان گذرانده در

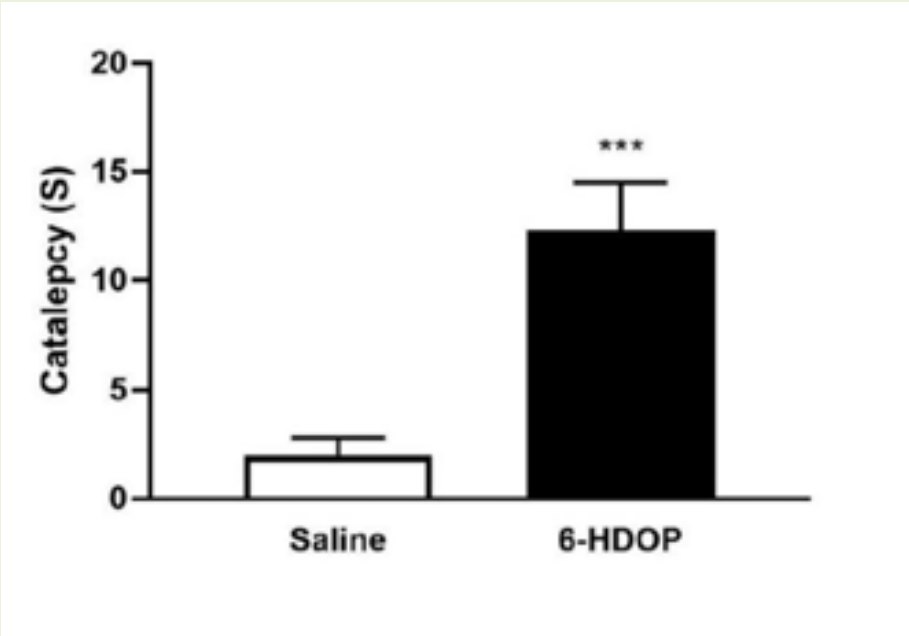
www.SID.ir

Archive of SID

بازوی باز ماز گروه کنترل دریافت کننده آب و تیمار دریافت کننده دوزهای ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ کوآنزیم Q10 است و درصد این فعالیت درگروه تیمار با دوز ۱۰۰ افزایش معنی داری دارد(نمودار۸).در خصوص بررسی تعداد نورون ها در هسته سابستنتیا نیگرای گروه کنترل و پارکینسونی تیمار شده با دوزهای ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ کوآنزیم Q10 برحسب mg/kg وزن بدن موش است. که تعداد نورون ها با دوز ۱۰۰ محافظت بیشتری داشت(نمودار۹).



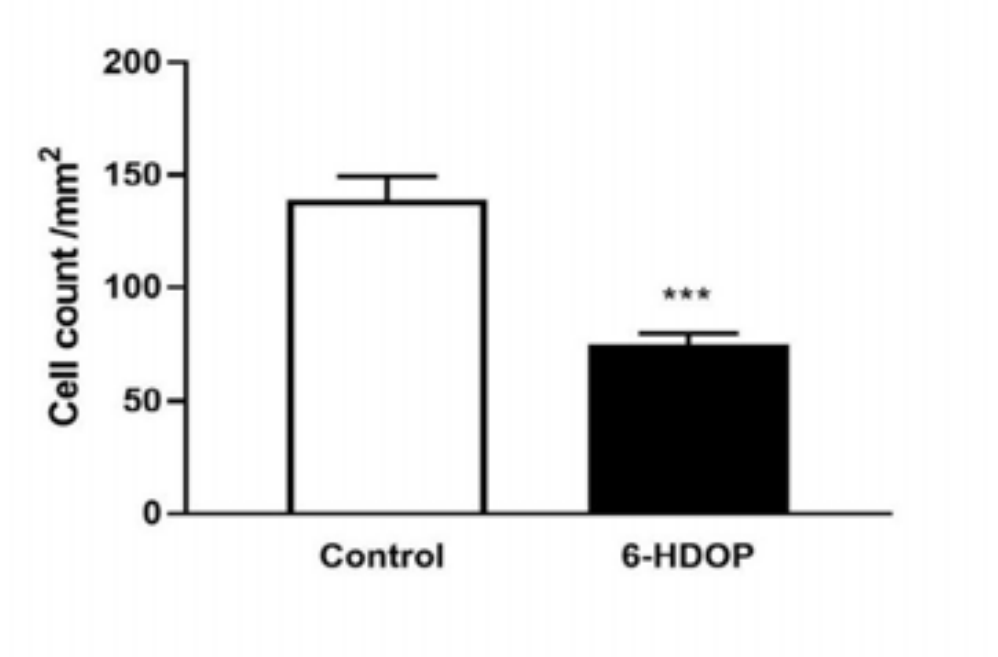
نمودار ۱- مقایسه چرخش ناشی از تزریق آپومورفین درگروه کنترل و گروه پارکینسونی شده با 6-HDOP.



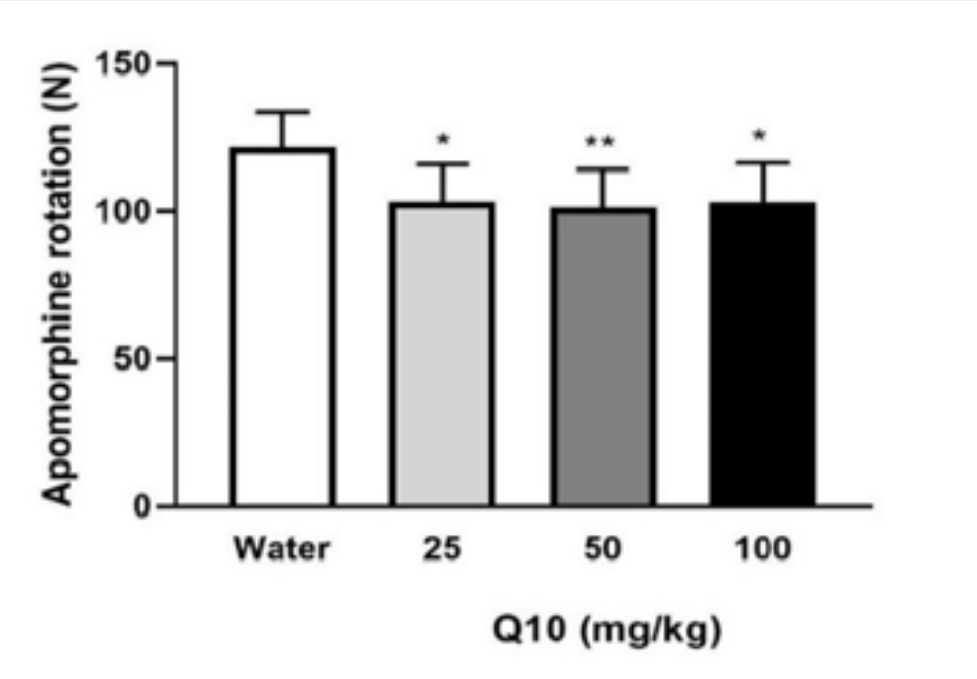
نمودار ۲- نتایج تزریق سالین به گروه کنترل و تزریق ٦ – هیدروکسی دوپامین به گروه های تیماری و افزایش کاتالپسی در گروه های تیماری که نشان دهنده آن است که به بیماری پارکینسون مبتلا شدند.

www.SID.ir

Archive of SID



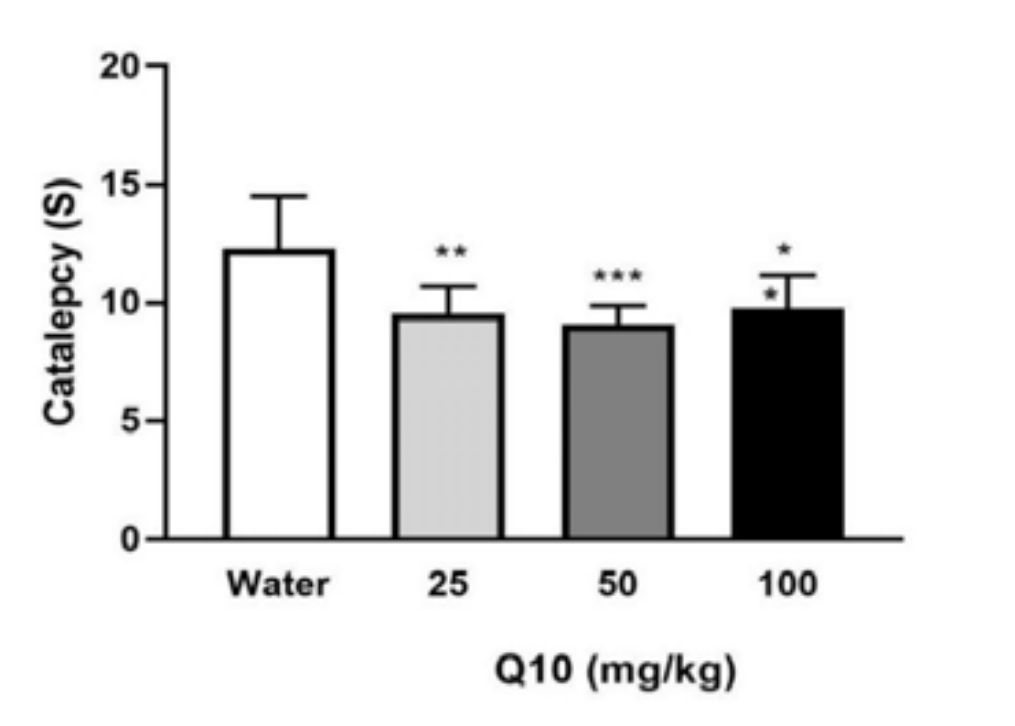
نمودار۳ – نتایج شمارش تعداد نورون ها در هسته سابستانتیکا نیگرا بعد از تزریق ٦ – هیدروکسی دوپامین به گروه های تیماری است که نشان می دهد موش های تیمار به بیماری پارکینسون مبتلا شدند. هر ستون نشان دهنده Mean±SEM و ***P<0.001



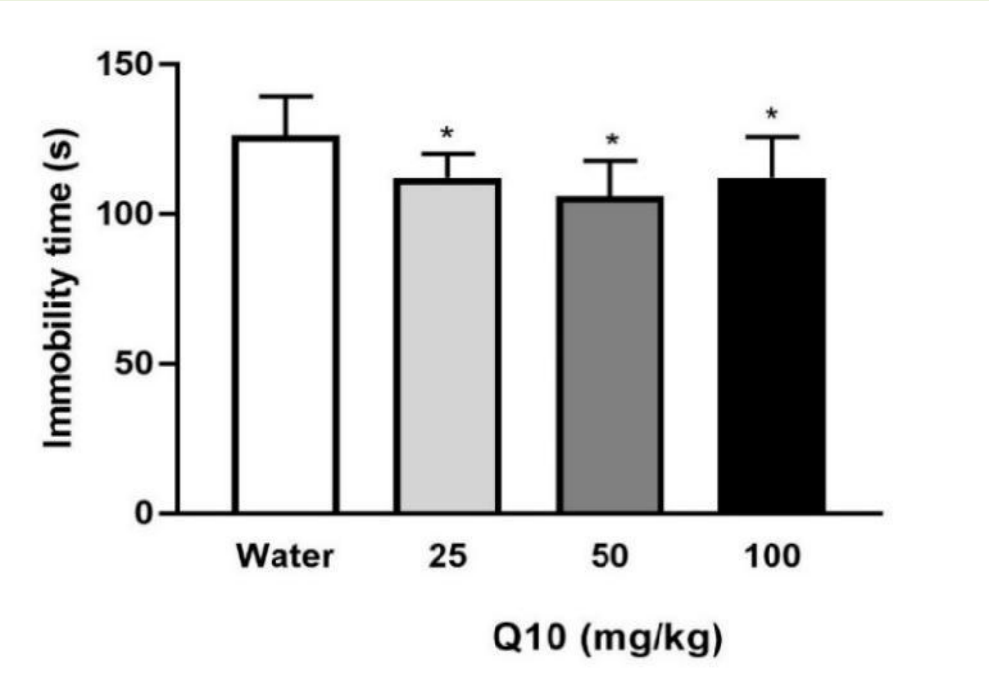
نمودار٤- چرخش ناشی از تزریق آپومورفین در موش های پارکینسونی تیمار شده با آب ودوزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم کوآنزیم Q10 هر ستون نشان دهنده Mean±SEM p<0.05 * و p<0.01 **

www.SID.ir

Archive of SID



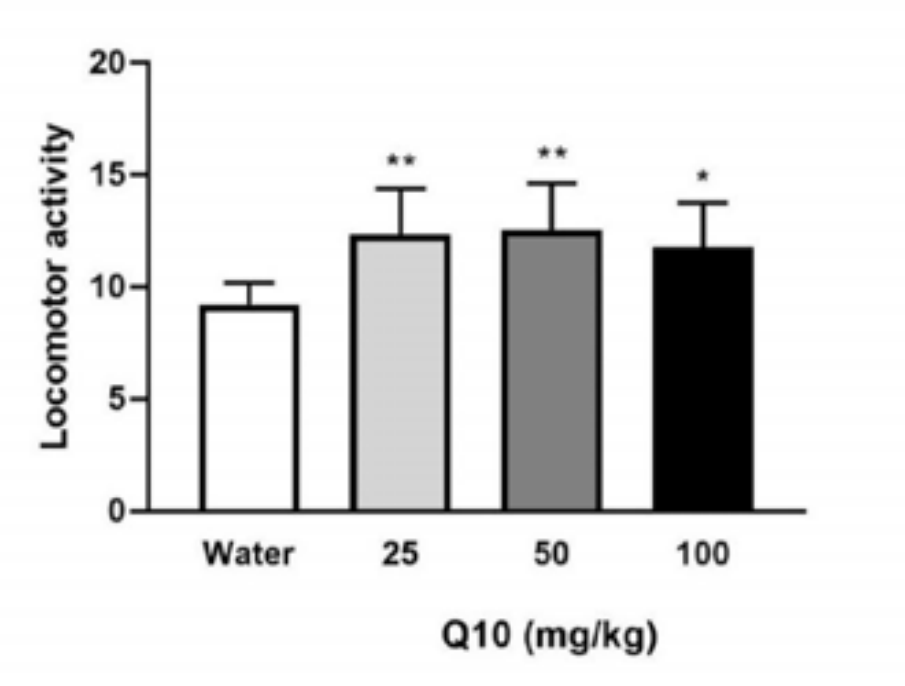
نمودار۵ ـ نتایج حاصل از بررسی رفتارکاتالپسی در گروه کنترل و پارکینسونی تیمار شده با دوزهای ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ کوآنزیم Q10 برحسب mg/kg وزن بدن موش هر ستون نشان دهنده Mean±SEM و P<0.001*** و p<0.01 **



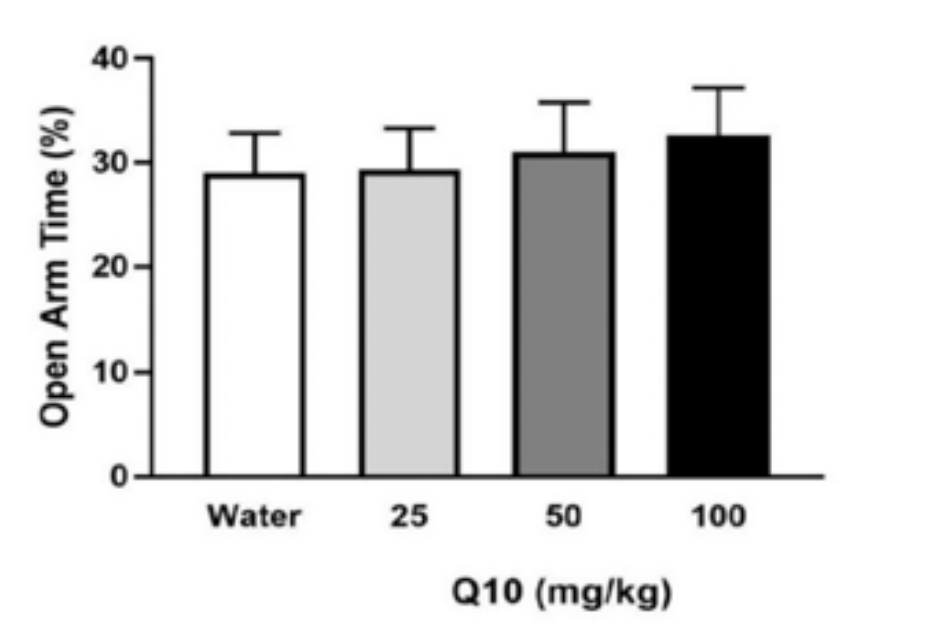
نمودار۶-نتایج حاصل از بررسی زمان بی حرکتی درشنای اجباری برای تست افسردگی در گروه کنترل و پارکینسونی تیمار شده با دوزهای کوآنزیم Q10 برحسب mg/kg وزن بدن موش. هر ستون نشان دهنده Mean±SEM و p<0.05 *

www.SID.ir

Archive of SID



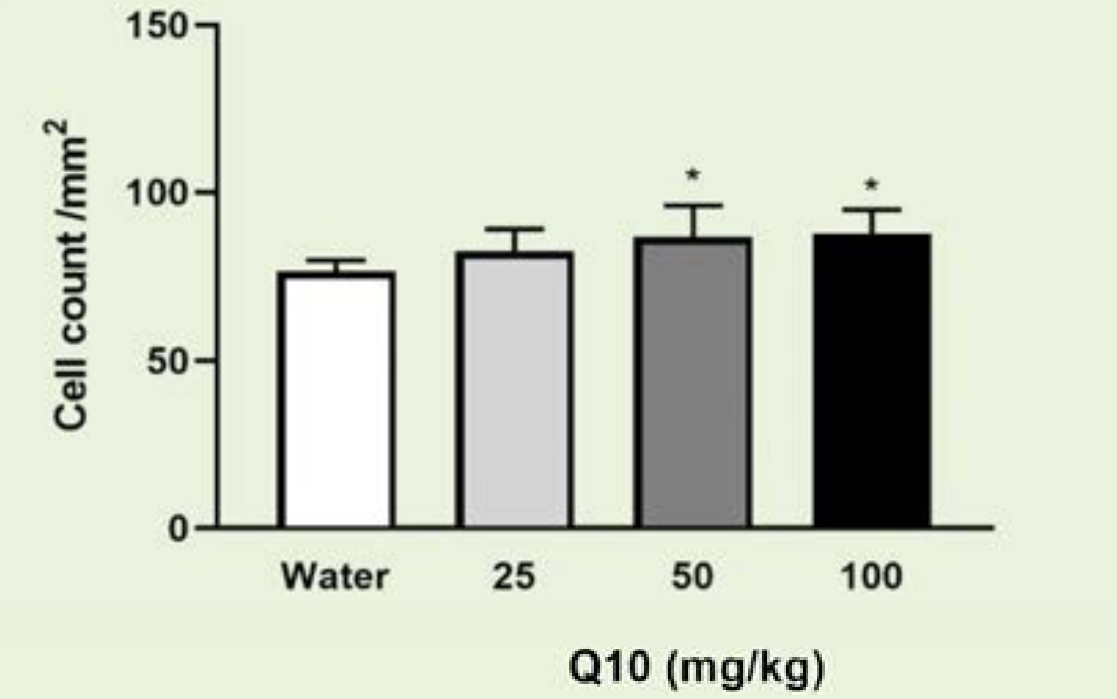
نمودار۷- نتایج حاصل از بررسی زمان رفتارفعالیت حرکتی در ماز برای تست اضطراب در گروه کنترل و پارکینسونی تیمار شده با دوزهای ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ کوآنزیم Q10 برحسب mg/kg وزن بدن موش هر ستون نشان دهنده Mean±SEM $p<0.05$ * و ** $p<0.01$



نمودار۸-نتایج حاصل از بررسی زمان رفتارحضور موش در بازوی باز ماز در گروه کنترل و پارکینسونی تیمار شده با دوزهای ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ کوآنزیم Q10 برحسب mg/kg وزن بدن موش Mean±SEM
* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $P<0.001$ و

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار۹- نتایج حاصل از بررسی تعداد نورونها در هسته سابستنتیا نیگرای گروه کنترل و پارکینسونی تیمار شده با دوزهای ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ کوآنزیم Q10 برحسب mg/kg وزن بدن موش هر ستون نشان دهنده Mean±SEM و $p<0.05$ *

بر اساس تجزیه و تحلیل آماری مشخص شد که در این پژوهش تفاوت معناداری در گروه تیماری با کوآنزیم کیو۱۰ نسبت به سلول های گروه کنترل وجود دارد. یافته های این تحقیق نشان دهنده اثرات نوروتوکسین ۶ - هیدروکسی دوپامین، برسلول های اولیه کاتکول آمینرژیک برای ایجاد بیماری پارکینسون با تخریب نورون های کاتکول آمینرژیک است و نیز در این پژوهش به این نتیجه رسیده شده است که مصرف داروی کوآنزیم Q10 به علت داشتن خاصیت آنتی اکسیدانتی می تواند از پیشرفت تخریب نورون-های کاتکول آمینرژیک وبیماری پارکینسون جلوگیری کند.

آزمونMTT:

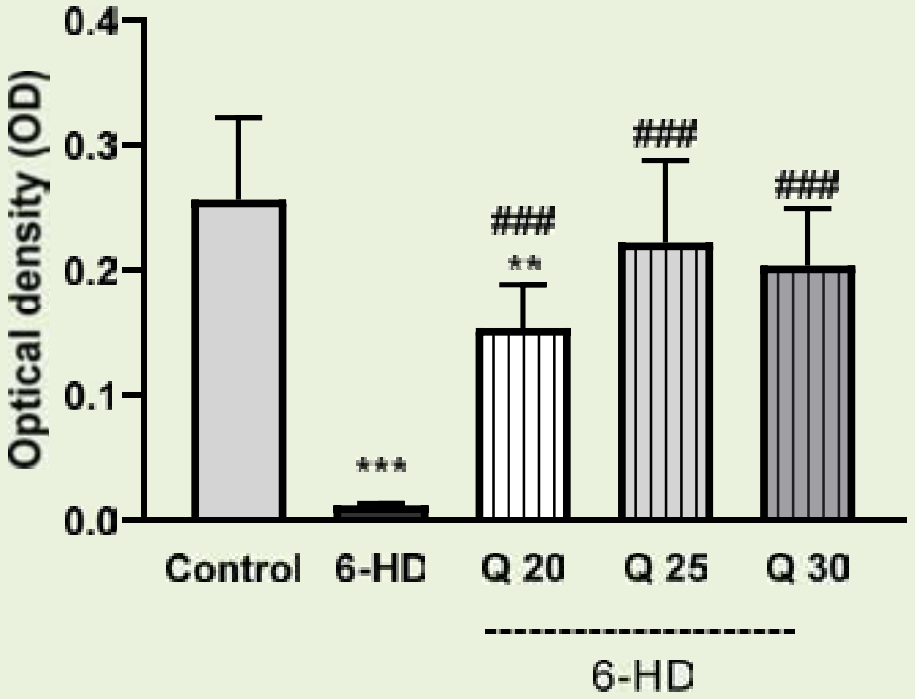
در آزمون MTT این تغییررنگ نشان دهنده فعالیت آنزیمی سوکسینات دهیدروژناز میتوکندیایی سلول های زنده است که مشخص کننده تعداد سلول های زنده می باشد و هر چقدر رنگ حاصل بیشترباشد، واکنش و تعدادسلول های زنده نیزبیشتراست(نمودار۱۰ وشکل۱).

آزمون تریپان بلوBT :

این آزمون نشان دهنده تعدادسلول های زنده ومرده پس ازتزریق سم ۶-OHDA می باشد.این ترکیب به دلیل مقاومت سلول‌های زنده، به درون سلول های زنده نفوذ نمی کند ودیواره سلول ها زیرمیکروسکوپ شفاف دیده می شوند. در حالی که سلول های مرده رنگ راجذب کرده ودیواره آن‌ها زیرمیکروسکوپ به رنگ تیره دیده می شود(نمودار ۱۱ و شکل ۱).

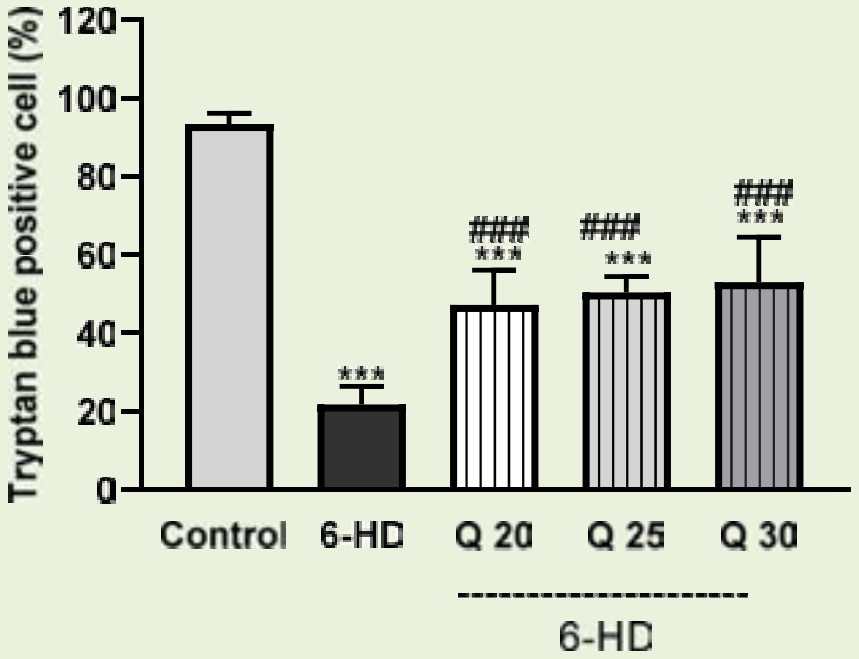
www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۱۰- نتایج حاصل ازبررسی تغییررنگ درتست MTT .

مقایسه گروه سلولی کنترل که دارو و HD-۶ دریافت نکردند، گروه سلولی دریافت کننده فقط HD -۶ و گروه های تیماری دریافت کننده HD-۶ و کوآنزیم کیو ۱۰با دوزهای۲۵، ۲۰و۳۰ میلی گرم.Mean±SEM P<0.001*** و p<0.01 **

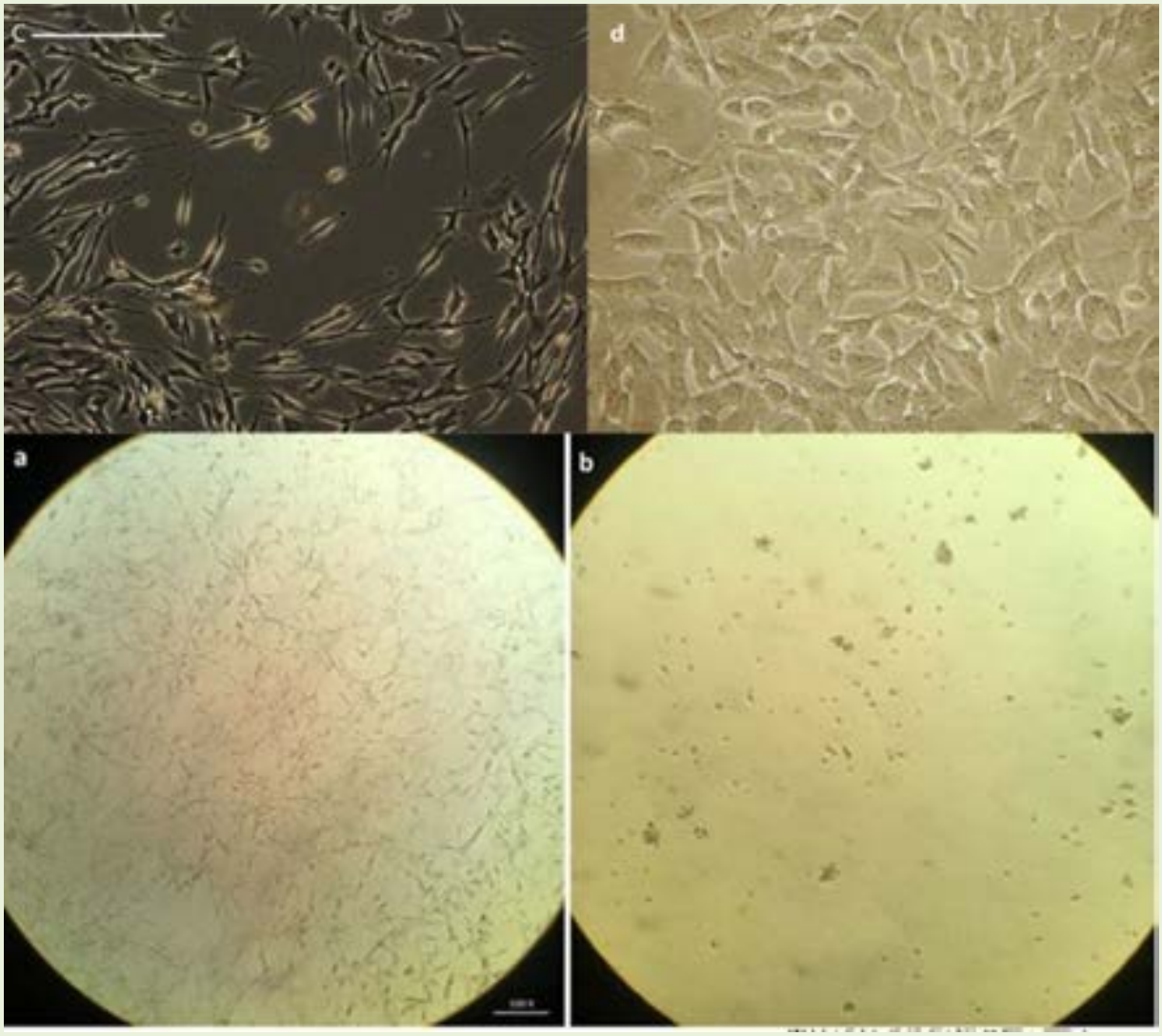


نمودار۱۲-نتایج حاصل ازبررسی تعداد نورون های زنده درمحیط کشت سلولی بارنگ آمیزی تریپان آبی TB.

مقایسه گروه سلولی کنترل که داروو HD-۶ دریافت نکردند، گروه سلولی دریافت کننده فقط HD -۶ و گروه های تیماری دریافت کننده HD-۶ وکوآنزیم کیو۱۰بادوزهای ۲۵،۲۰و۳۰ میلی گرم Mean±SEM P<0.001***

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- **نتایج حاصل ازبررسی تعداد نورون های زنده و مرده درمحیط کشت سلولی بارنگ آمیزی تریپان آبی BT و تستMTT**
d :سلول های مرده در روش BT، c : سلول های زنده در روش BT، a: سلول های زنده در روش MTT، b: سلول های مرده در روش MTT

بحث و نتیجه گیری

درآزمون آپومورفین موش های پارکینسونی بیش از ۳۰ چرخش در یک ساعت بر خلاف جهت تزریق نوروتوکسین را نشان دادند. تعداد این چرخش ها در واحد زمان نشان دهنده شدت تخریب نورونی در جسم سیاه و شدت بیماری است(۳۹). درتست میله برای سنجش کاتالپسی اگردر مدت زمان کمتری، دست موش از روی میله بردارد، یعنی؛ هنوز به طور شدید به بیماری پارکینسون مبتلا نشده است و این زمان هر چه بیشتر باشد، بیشتر پارکینسونی شده است(۹۲). در تست اضطراب افزایش مدت زمان حضور جانور در بازوی باز به عنوان معیاری برای کاهش اضطراب و کاهش حضور آن به عنوان افزایش اضطراب در نظر گرفته می شود. در تست شنا افزایش زمان بی حرکتی Immobility را معادل افسردگی و کاهش آن به عنوان اثر بخشی درمان ضد افسردگی ارزیابی می شود. نتایج این تحقیق نشان می دهد که تیمار با Q10

www.SID.ir

Archive of SID

بصورت معنی داری باعث کاهش زمان بی حرکتی و کاتالپسی، افزایش فعالیت های حرکتی و کاهش چرخش ناشی از آپومورفین شده است که نشان دهنده اثرات محافظتی کوآنزیمQ10 در برابر آسیب های ناشی از بیماری پارکینسون می باشد. سلول های پارکینسونی بعد از درمان با Q10 محافظت شدند. علت اصلی بیماری، تخریب نورون های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه در مغز میانی و کاهش غلظت دوپامین در پایانه های جسم مخطط است. ازآن‌جا که افزایش مصرف اکسیژن با استرس اکسیداتیو همراه خواهد بود، مغز بافتی است که به علت نیاز زیاد به اکسیژن ، بیشتر در معرض آسیب های ناشی از استرس اکسیداتیو قرار می گیرد. استرس اکسیداتیو یکی از عواملی است که در تخریب نورون های دوپامینرژیک در بیماری پارکینسون نقش دارد. هم‌چنین مطالعات آزمایشگاهی نشان دادند که سرم و مایع مغزی – نخاعی بیماران پارکینسونی سطوح بالاتری از IL-12 ، TNF-α، IL-1β را دارا می باشد(۱۹). از طرفی نورون-های دوپامینرژیک جسم سیاه به عوامل پیش برنده التهابی و میانجی های اکسیداتیوحساسیت بیشتری دارند . چون غلظت گلوتاتیون داخل سلولی در این نورون ها نسبت به سایر سلول ها کمتر است(۴). مطالعات نشان داده است که صدمات ناشی از استرس اکسیداتیو و رادیکال های آزاد نقش مهمی در تخریب نورون های جسم سیاه دارد . برای پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری ها از جمله پارکینسون مصرف آنتی اکسیدانت ها موجب کاهش خطر ابتلا می شود. کوآنزیم Q10 دارای خاصیت ثابت شده ی آنتی اکسیدانی و ضد رادیکال آزاد می باشد. دربخش سلولی بعد از ایجاد پارکینسون، برای سنجش مقداردرمان بیماری دونوع آزمون برای مشخص شدن بقای سلول های اولیه محیط کشت انجام گرفت.

کوآنزیم Q10 یکی از ناقل های انتقال الکترون در زنجیره تنفسی می باشد و می تواند با افزایش توان آنتی اکسیدانی و تولید آنزیم های آنتی اکسیدانی نقش به سزایی در حفاظت از غشاهای سلولی در مقابل رادیکال های آزاد داشته باشد . درمان با Q10 از آسیب نورودژنراتیو ناشی از رادیکال های آزاد تولید شده در مغز ، پیشگیری می کند (۱۰). مصرف مکمل های Q10 به عنوان آنتی اکسیدانت در بهبود اثرات بیماری پارکینسون ، آلزایمر، آتاکسی فردریش و بیماری هانتینگتون و کاهش ریسک ابتلا به بیماری کرونر قلب موثر می باشد . و همچنین باعث کاهش استرس اکسیداتیو و التهاب ناشی از رژیم غذایی ایجاد کننده چاقی در کبد موش شده است (۱۸). در مطالعه تجربی Ogura نشان داده شده است که مصرف کوآنزیمQ10 در آسیب کبد سگ ها با سیستئامین ، می تواند باعث جلوگیری از تولید رادیکال های آزاد و افزایش بقای حیوان شود(۱۲) .مطالعات Beal و همکارانش نشان می‌دهد که تیمار روزانه موش ها با دوز ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن از کوآنزیم Q10 ، باعث افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی در مغز شده و اثرات محافظتی برای نورون ها را دارد(۲). Palmira و همکارانش در سال ۲۰۰۱ نشان دادند که کوآنزیم Q10 میتوکندریایی می تواند باعث افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی بدن و کاهش آسیب های اکسیداتیو در رت های دیابتی گردد(۵). Juan و همکارانش در سال ۲۰۰۹ گزارش دادند که کوآنزیم Q10 باعث کاهش ایسکمی و آپوپتوزیز و آسیب های عصبی در مثانه خرگوش می-شود(۱۵). نتایج مطالعه حاضر نشان داد مصرف کوآنزیم Q10 می تواند منجر به افزایش فعالیت و توان آنتی اکسیدانی گردد و در پی آن موجب محافظت سلول از آسیب ناشی از بنیان های فعال اکسیژن می-گردد. نتایج این پژوهش پیشنهاد می کند مصرف

www.SID.ir

Archive of SID

کوآنزیم Q10 می تواند نقش محافظتی در برابر بیماری پارکینسون و بیماری های عصبی تحلیل برنده را داشته باشد. هم چنین در این مدل سلولی با کاهش آسیب حاصل از رادیکال های آزاد وکاهش مرگ نورون های عصبی ، اثرات محافظتی و ضد التهابی Q10مشخص شد.

منابع

1.Aly, N. (2012). Reno-protective efficiency of coenzyme Q10 on adriamycin-induced nephro toxicity in rats. J Appl Sci Res, 8; 589.

2.Beal, MF., Matthews, RT., Tieleman, A., Shults, CW. (1998). Coenzyme Q10 attenuates the 1-methyl - 4- phenyl -1,2,3,6- tetra hydropyridine(MPTP) induced loss of striatal dopamine and dopaminergic axons in aged mice. Brain Res, doi:10.1016/S0006-8993(97)01192-X.

3.Blum, D., Torch, S., Lambeng, N., Nissou, M.-F., Benabid, A.-L., Sadoul, R. (2001). Molecular pathways involved in the neuro toxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. Progress in neurobiology, 65; 135-172.

4.Crane, F.L. (2001). Biochemical functions of coenzyme Q10. Journal of the American College of Nutrition, 20; 591-598.

5.De Luca, C., Kharaeva, Z., Raskovic, D., Pastore, P., Luci, A. (2012). Coenzyme Q10, vitamin E, selenium, and methionine in the treatment of chronic recurrent viral muco cutaneous infections. Nutrition, 28; 509-514.

6.Elbaz, A., Bower, J.H., Maraganore, D.M., McDonnell, S.K., Peterson, B.J., Ahlskog, J.E., Schaid, D.J. (2002). Risk tables for parkinsonism and Parkinson's disease. Journal of clinical epidemiology, 55; 25-31.

7.Hubble, J.P., Cao, T., Hassanein, R., Neuberger, J., Roller, W. (1993). Risk factors for Parkinson's disease. Neurology, 43; 1693-1693.

8.Lenaz, G., Fato, R., Castelluccio, C., Genova, M., Bovina, C., Estornell, E. (1993). The function of coenzyme Q10 in mito chondria. The clinical investigator, 71; S66-S70.

9.Lin, T. K., Liou, C. W., Chen, S. D., Chuang, Y. C., Tiao, M. M., Wang, P. W. (2009). Mito chondrial dysfunction and biogenesis in the pathogenesis of Parkinson’s disease. Chang Gung Med J, 32; 589-599.

10. Mc Carthy, S., Somayajulu, M., Sikorska, M., Borowy-Borowski, H., Pandey, S. (2004). Paraquat induces oxidative stress and neuronal cell death; neuroprotection by water-soluble coenzyme Q10. Toxicol Appl Pharmacol, 201(1); 21-31.

11. McGeer, P.L., Mc Geer, E.G. (2004). Inflammation and neuro degeneration in Parkinson's disease. Parkinsonism & Related Disorders, 10; S3-S7.

12. Ogura, Y., Takagi, K., Kawarada, Y., Mizumoto, R. (1996). Patho physiological effect of hepatic ischemia and reperfusion after hepatectomy in dogs with obstructive jaundice, focusing on the effect of coenzyme Q10 and styrene-co-maleic acid superoxide dismutase. J. Gastroenterol, 31(3); 379-86.

13. Ostrowski, R., Piotrowski, P., Pańkowska, T., Smiałek, M. (1998). Evaluation of morphological changes after treatment with coenzyme Q10 (CoQ10) in endothelin-1 induced experimental ischemia in the rat. Folia neuropathologica, 36; 185-188.

14. Overvad, K., Diamant, B., Holm, L., Hølmer, G., Mortensen, S., Stender, S. (1999). Coenzyme Q 10 in health and disease. European Journal of Clinical Nutrition, 53; 764.

15. PubMed – NCBI NeurouroL Urodyn. 2009, 28 (4); 339 – 42. doi : 10.1002/nau.20662

16. Savica, R., Rocca, W.A., Ahlskog, J.E. (2010). When does Parkinson disease start? Archives of neurology, 67; 798-801.

17. Schapira, A.H. (2009). Neurobiology and treatment of Parkinson's disease. Trends in pharmacological sciences, 30; 41-47.

18. Sohet, FM., Neyrinck, AM., Pachikian, BD.,de Backer, FC., Bindels, LB., Niklowitz, P.(2009). Coenzyme Q10 supplementation lowers hepatic oxidative stress and inflammation associated with diet-induced obesity in mice. Biochem Pharmacol, 78(11); 1391-400.

19. Thoenen, H., Tranzer, J. (1968). Chemical sympathectomy by selective destruction of adrenergic nerve endings with 6-hydroxy dopamine. Naunyn-Schmiedebergs Archiv für Pharmakologie und Experimentelle Pathologie, 261; 271-288.

20. Veldman, B., Wijn, A., Knoers, N., Praamstra, P., Horstink, M. (1998). Genetic and environmental risk factors in Parkinson’s

www.SID.ir

Archive of SID

disease. Clinical neurology and neurosurgery 100; 15-26.

21. Zhen, R., Wenxiang, D., Zhaokang, S., Xinling, G., Huiming, H., Jingfeng, L. (1994). Mechanisms of brain injury with deep hypothermic circulatory arrest and protective effects of coenzyme Q10. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, 108; 126-133.

www.SID.ir

Evaluation of the Effects of Q10 on Neural Protection and Behavioral Disorders in Cell Culture and Mice Models of Parkinson's Disease

M.Aazarshab[1]; **M.Rahnema[2]** ,R. Hajikhani[1]; J. Solati[3]; M.R.Bigdeli[4]

1.Department of Biology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2.Department of Biology, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran

4.Department of Biology, Faculty of Biological Science, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

3.Department of Biology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

Received:2019.23.9 **Accepted: 2019.22.10**

Abstract

Inroduction & Objective: Oxidative stress which is responsible for pathophysiology of hypertension, causes decrease in total antioxidant capacity. PON 1 is an antioxidant enzyme present on the surface of HDL also which is responsible for prevention of HTN and it's complications. The aim of this study was to investigate the Effect of Isosorbide and Garlic Supplementation on Protein levels and Gene expression of PON1 at the Heart tissue in Female rats with hypertension After a period of aerobic training.

Materials and Methods: In the experimental study, 30 female Wistar rats weighing 180-220 g were randomly divided into 8 groups: healthy control, sham, blood pressure induction (Hyper), garlic, endurance training, endurance training -garlic. The rats suffered from hypertension of 6 days a week for 8 weeks after dietary period and 10 mg/kg body weight L_NAME injection. Experimental groups received 50 mg/kg body weight garlic supplement for six weeks. The endurance training program was performed at speeds of 20-30 m/min and 20 to 35 minutes, 5 sessions per week for 6 weeks. Protein levels and expression of PON1 heart tissue were measured using ELISA kit and Real Time PCR. Data were analyzed by t-test, One-way ANOVA and post hoc tokey at the significant level P<0.05.

Results: The results showed that there was no significant difference between the mean protein and the expression of paraoxonase-1 in the heart tissue of the female rats with hypertension in the different groups of the study (P> 0.05). Also, there was no difference between the levels of protein paraoxonase-1 heart tissue in different groups than the group of blood pressure induction (P> 0.05).

Conclusion: According to the findings, it seems to that the inadequacy of the training period (frequency and intensity of exercise) and the dose rate of Garlic Supplementation can be one of the possible causes of ineffectiveness in the present study.

Keywords: *Exercise, Garlic, Hypertension, PON1, Female rats.*

www.SID.ir