

ORIGINAL RESEARCH

Evaluation of Effects of Benzoic Acid on the I-KB/NF-Kb Complex and Expression of Caspase-8 and -9 in Animal Model of Multiple Sclerosis

Nima Sanadgol^{1, 2*} , Mohammad Sharifzadeh² , Parisa Maleki³ 

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran.

2. Pharmaceutical Science Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3. Department of Biology, Faculty of Sciences, Arak University, Arak, Iran.

ARTICLE INFORMATION

Article history

Received: 19 February 2019

Accepted: 19 June 2019

Published online: 18 August 2019

Keywords

Apoptosis

Benzoic acid

Cuprizone

Inflammation

Multiple Sclerosis

* Corresponding Author:

Nima Sanadgol, P.O. Box 98616-73831,
Department of Biology, Faculty of
Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran.

Fax: +98 54 3123 2187

Email: n.sanadgol@uoz.ac.ir

ABSTRACT

Background and Aim: Regarding the importance of new treatments to control and treat multiple sclerosis (MS), in this study we investigated the role of Benzoic acid (BA) on the neuro-inflammation and apoptosis processes in the cuprizone (cup)-induced animal model of MS.

Materials and Methods: In this experimental study, 35 males C57BL/6 mice were divided into five groups. The study groups were included, control: received six weeks of normal powdered food beside intraperitoneal (i.p.) injection of BA solvent (100 μ L per day PBS) for the last two weeks, cup: received six weeks of powdered food contains 0.2% cup beside i.p. injection of BA solvent for the last two weeks and cup-treatment: received six weeks of powdered food contains 0.2% cup beside i.p. injection of 20, 40 and 80 mg/kg BA for the last two weeks. Eventually, the medial corpus callosum area of the animal's brain was evaluated via western blot and Real-Time PCR methods.

Ethical Considerations: Ethical points were observed according to the declaration of Helsinki and relevant code of ethics, regarding minimizing harms during animal experimentation (UOZ-GR-9517-13).

Findings: Molecular studies have shown that BA-80 decreased mRNA ($p < 0.01$) and protein expression of NF-KB and consequently increased I-KB/NF-KB ratio ($p < 0.05$) and decreased inflammation in compare to cup group. Moreover, BA-80 decreased caspase-9 mRNA ($p < 0.01$) and caspase-8 mRNA ($p < 0.05$) and subsequently increased caspase-8/caspase-9 ratio ($p < 0.01$) and decreased apoptosis in compare to cup group.

Conclusion: The dose of 80 mg/ml BA via decreasing cup-induced neuro-inflammation and neuro-apoptosis has protective effects in this model.

© Copyright (2019) Arak University of Medical Sciences

Use your device to scan and
read this article online:



Sanadgol N., Sharifzadeh M., Maleki P. Evaluation of Effects of Benzoic Acid on the I-Kb/NF-Kb Complex and Expression of Caspase-8 And -9 in Animal Model of Multiple Sclerosis. J Arak Uni Med Sci. 2019; 22(3): 95-106.



JAMS

مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک

دوره بیست و دو، شماره سه، مرداد و شهریور ۱۳۹۸

journal homepage: <http://jams.arakmu.ac.ir>



مقاله پژوهشی

ارزیابی اثرات بنزوآریک اسید بر کمپلکس مهارکننده کاپا بی / فاکتور هسته‌ای کاپا بی و بیان

کاسپازهای ۸ و ۹ در مدل حیوانی مالتیپل اسکروزیس

نیما سندگل^{۱،۲}، محمد شریف زاده^۲، پرینسا مالکی^۳

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

۲. مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۳. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک، اراک، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به اهمیت معرفی ترکیبات جدید جهت کنترل و یا درمان بیماری ام اس، در این پژوهش اثرات ترکیب طبیعی بنزوآریک اسید (BA) بر التهاب و آپوپتوز سلول‌های مغزی در مدل حیوانی ام اس ایجاد شده توسط کوپریزون بررسی گردید.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر، تعداد ۳۵ سر موش بالغ نر نژاد C57BL/6 به پنج گروه تقسیم شدند شامل: کنترل) با مصرف شش هفته غذای معمولی پودر شده به همراه تزریق داخل صفاقی روزانه ۱۰۰ میکرولیتر حلال بنزوآریک اسید (بافر فسفات نمکی) در دو هفته آخر، کوپریزون) با مصرف شش هفته غذای پودر شده حاوی ۰/۲ درصد کوپریزون به همراه تزریق داخل صفاقی حلال بنزوآریک اسید در دو هفته آخر و کوپریزون درمان) سه گروه کوپریزون که در دو هفته آخر بنزوآریک اسید با دوزهای ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم را دریافت کردند. در نهایت، ناحیه مدیال کورپوس کالوزوم مغز حیوانات توسط آزمایشات وسترن بلات و روش مولکولی ریل تایم پی سی ار مورد ارزیابی قرار گرفت.

ملاحظات اخلاقی: رعایت نکات اخلاقی با توجه به موازین کمیته اخلاق و منطبق با منشور اخلاقی هلسینکی در مورد کلیه حیوانات جهت به حداقل رساندن آزار به حیوانات صورت گرفت (UOZ-GR-9517-13).

یافته‌ها: تجزیه و تحلیل‌های مولکولی نشان داد بنزوآریک اسید ۸۰ با کاهش بیان mRNA ($p < 0/01$) و پروتئین مولکول التهابی فاکتور هسته‌ای کاپابی، باعث افزایش نسبت پروتئینی مهارکننده کاپابی به فاکتور هسته‌ای کاپابی ($p < 0/05$) در مقایسه با گروه کوپریزون و کاهش التهاب می‌گردد. همچنین، بنزوآریک اسید ۸۰ با کاهش بیان mRNA کاسپاز ۹ ($p < 0/01$) و کاسپاز ۸ ($p < 0/05$) نسبت پروتئین کاسپاز ۸ به کاسپاز ۹ را در مقایسه با گروه کوپریزون افزایش داده ($p < 0/01$) و باعث کاهش القای آپوپتوز می‌گردد.

نتیجه‌گیری: دوز ۸۰ میلی گرم بر میلی لیتر بنزوآریک اسید با کاهش التهاب و آپوپتوز القاشده توسط کوپریزون دارای اثرات حفاظتی است.

اطلاعات مقاله

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۱/۳۰

تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۳/۲۹

تاریخ انتشار: ۹۸/۰۵/۲۷

واژگان کلیدی

التهاب

ام اس

بنزوآریک اسید

کوپریزون

مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی

* نویسنده مسئول:

نیما سندگل

آدرس پستی: ایران، زابل، دانشگاه زابل، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی.

کد پستی: ۹۸۶۱۶-۷۳۸۳۱

نمابر: +98 54 3123 2187

E-mail:

n.sanadgol@uoz.ac.ir

۱. مقدمه

بیماری ام اس (Multiple sclerosis) بیماری التهابی مزمن از بین برنده میلین در سیستم عصبی مرکزی می‌باشد که با التهاب مغز و آپوپتوز سلول‌های عصبی همراه است (۱). این بیماری با تظاهرات خودایمنی همراه بوده که به دلایل نامشخص سیستم ایمنی فرد بیمار تحریک شده و لنفوسیت‌های اختصاصی علیه غلاف میلین فعال می‌شوند. ورود این سلول‌ها به مغز در ایمونوپاتولوژی بیماری و تشدید واکنش‌های التهابی در مغز نقش دارد. بیش‌ترین شیوع این بیماری در سنین ۲۰ تا ۴۰ سالگی است (۲). سازمان بهداشت و خدمات مردمی آمریکا، مرگ ناشی از این بیماری را در سال ۱۹۹۲ رقمی حدود هزار و نهصد شهروند آمریکایی (حدود ۰/۷ درصد هزار نفر) اعلام نمود (۳). طبق اطلاعات انجمن ام اس ایران پنجاه هزار نفر مبتلا به ام اس در ایران وجود دارد و میزان شیوع آن تقریباً ۹ در هر یکصد هزار نفر می‌باشد (۴). مهم‌ترین علایم این بیماری فلج حرکتی، تخریب حسی به ویژه اختلالات بینایی و نقایص شناختی می‌باشند (۵). تاکنون درمان قطعی برای ام اس پیدا نشده و تنها برخی داروها جهت بهبود علایم و کند نمودن سیر بیماری در دسترس هستند (۶). در بیماری ام اس التهاب حاد که با تخریب میلین همراه است به عنوان محرک قوی برای بسیج الیگودندروسیت‌های پیش‌ساز عمل می‌کند. سرکوب پاسخ‌های التهابی می‌تواند باعث نقص در پدیده ترمیم شود. شاید یک دلیل نقص در ترمیم میلین در بیماران این باشد که با داروهای ضدالتهابی مثل کورتیکواستروئیدها درمان می‌شوند. در این شرایط التهاب سرکوب شده، ترمیم میلین ناتمام مانده و تخریب میلین مزمن می‌شود (۷). مغز بالغ در شرایط طبیعی اجازه مهاجرت طولانی و بقای سلول‌های بنیادی عصبی را نمی‌دهد، ولی مغز ملتهب مهاجرت و هماهنگی این سلول‌ها را تحریک می‌کند (۸).

عامل رونویسی فاکتور هسته‌ای کاپا بی (NF-kB) و مهارکننده آن (I-kB) بازیگران اصلی در بیماری‌های التهابی مخصوصاً ام اس هستند و شواهد زیادی در مورد نقش آن‌ها در پیشرفت بیماری وجود دارد. هرچند اثرات التهابی و تحریک‌کننده

سیستم ایمنی در اثر افزایش بیان و آزاد شدن NF-kB از مهارکننده آن به صورت وسیعی مورد تایید است، اما برخی مطالعات نشان داده‌اند مهار کامل التهاب القاشده توسط NF-kB نه تنها سودمند نیست، بلکه در برخی شرایط روند بهبودی را به تاخیر نیز می‌اندازد (۹، ۱۰). هرچند اغلب ترکیبات دارویی برای درمان ام اس التهاب مغز را هدف قرار داده و به طور مستقیم و یا غیرمستقیم باعث مهار فعالیت NF-kB می‌شوند، ولی هم‌چنان بحث بر سر نقش‌های مفید التهاب و برتری کنترل آن نسبت به مهار کلی مکانیسم‌های التهابی داغ است (۱۱، ۱۲). به‌رحال یافتن ترکیبات جدید ضدالتهابی و مشخص شدن مسیرهای مولکولی اثر آن‌ها مخصوصاً در ارتباط با کمپلکس I-kB/NF-kB می‌تواند گام بزرگی در معرفی درمان‌های جدید بوده و راه را برای مطالعات انسانی هموار سازد.

مدل استفاده‌شده در این تحقیق مدل کوپریزون است. کوپریزون یک شلاتور مس بوده که استفاده از آن موجب مرگ اختصاصی (آپوپتوز) الیگودندروسیت‌ها و تخریب میلین ثانویه با قابلیت برگشت‌پذیری شده که پس از برداشت سم از غذای حیوان، ترمیم میلین خود به خودی صورت می‌گیرد (۱۳). آپوپتوز مرگ فیزیولوژیک سلولی است که در شرایط طبیعی سبب حذف سلول‌های پیر، آسیب دیده، اضافی و مضر می‌شود و برای تکامل و هموستاز بافتی ضروری است. آپوپتوز خود در ترمیم و نوسازی بافتی و نیز حذف سلول‌های واکنش‌گر نقش دارد (۱۴). عوامل شروع‌کننده آپوپتوز به‌طور غیر مستقیم از طریق تأثیر بر میتوکندری‌ها و آزاد شدن سیتوکروم c (از فضای بین دو لایه غشاء آن‌ها) و یا به‌طور مستقیم با تغییر کاتپسین‌ها (سیستئین پروتئازهای لیزوزومی) و تبدیل آن‌ها به آنزیم‌های کاسپاز (Caspase) باعث بروز تغییرات ساختمانی و فرآیند مرگ برنامه‌ریزی‌شده می‌شوند (۱۵). خانواده کاسپازی که طی فرآیند آپوپتوزیس فعال می‌شوند، به دو گروه کاسپازهای آغازگر (Initiator) و کاسپازهای عمل‌کننده (Effector) تقسیم می‌گردند. انواع آغازگر نظیر کاسپازهای ۲، ۸، ۹ و ۱۰ با دریافت سیگنال‌های آپوپتوتیک فعال می‌شوند و سپس انواع عمل‌کننده نظیر کاسپازهای ۳، ۶ و ۷ را فعال می‌کنند. کاسپازهای

۲. مواد و روش‌ها

ایجاد مدل

در ابتدا جهت ایجاد مدل توسط کوپریزون، غذای حیوانات به اندازه آرد پودر شد تا پودر کوپریزون هنگام مخلوط شدن با غذا توسط حیوان تشخیص داده نشود. جهت قراردادن غذای پودر شده در قفس حیوانات، ظروف مخصوصی خریداری شد که علاوه بر گنجایش کافی، از وزن بالایی برخوردار بوده که توسط حیوان واژگون نگردد. در این مطالعه تجربی، تعداد ۳۵ موش C57BL/6 بالغ نر ۸ تا ۹ هفته در محدوده وزنی ۱۸ تا ۲۳ گرم از انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. سپس موش‌ها به پنج گروه مساوی به صورت هفت‌تایی تقسیم و در قفس قرار گرفتند. قفس‌ها به منظور سمی نکردن فضای حیوان‌خانه (به خاطر ماهیت غذا به شکل پودر) در فضای جداگانه‌ای در زیر هود نگهداری شدند و در حیوان‌خانه با دمای 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد و دوره تاریکی-روشنایی ۱۲ ساعته نگهداری شدند. آب و غذا به صورت آزاد در اختیار حیوانات قرار گرفت. جهت ایجاد مدل، غذای حاوی کوپریزون ۰/۲ درصد (مرک آلمان) به مدت شش هفته به حیوانات داده شد و در دو هفته آخر مداخلات دارویی به صورت تزریق داخل صفاقی و روزانه به مدت ۱۴ روز صورت گرفت. لازم به ذکر است که تزریقات در ساعات معینی هنگام ظهر انجام می‌شد (۲۱).

گروه‌های مورد آزمایش

گروه‌ها شامل موارد ذیل بودند:

کنترل: با مصرف شش هفته غذای معمولی پودر شده به همراه تزریق داخل صفاقی روزانه حلال BA (بافر فسفات نمکی) در دو هفته آخر؛

کوپریزون: با مصرف شش هفته غذای پودر شده حاوی ۰/۲ درصد کوپریزون به همراه تزریق داخل صفاقی حلال BA در دو هفته آخر؛

کوپریزون-درمان: سه گروه کوپریزون با دوزهای ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (۲۲) که در دو هفته آخر BA را دریافت کردند.

عمل‌کننده بیش از صد پروتئین مختلف را در درون سلول هضم می‌کنند (۱۵).

سیستم عصبی مرکزی (CNS) شامل نورون‌ها و سلول‌های گلیال است. نورون‌ها در حدود نیمی از حجم CNS و سلول‌های گلیال مابقی حجم CNS را تشکیل می‌دهند (۱۶). سه نوع از سلول‌های پشتیبان CNS شامل آستروسیت‌ها، الیگودندروسیت‌ها و میکروگلیاها هستند. الیگودندروسیت‌ها در تولید میلین دخالت دارند و در هر لحظه قطعات صفحات میلینی نورون‌های متعددی را تشکیل می‌دهند. در طی این فرآیند، الیگودندروسیت‌ها خودشان را پیرامون بخش‌های مجاور آکسون‌ها می‌تابانند، به طوری که در هر مرحله که سلول در پیرامون آکسون می‌تابد، لایه‌های میلین شکل می‌گیرند (۱۷). در مدل کوپریزون از میان نواحی مختلف مغز، بیشتر تحقیقات بر روی کورپوس کالوزوم (Corpus callosum) و پایک‌های مخچه‌ای فوقانی (Superior cerebellar peduncles) به عنوان ماده سفید مغز انجام می‌شود. کوپریزون هم‌چنین باعث ایجاد تخریب میلین در ساختارهای ماده خاکستری مغز به ویژه در مخ و مخچه می‌شود. زمان ایجاد تخریب میلین در ماده سفید و خاکستری متفاوت بوده که بیان‌گر واکنش‌های متفاوت بافتی می‌باشد (۱۸).

بنزواریک اسید یا الایژیک اسید (C14H6O8) یک ترکیب فنلی و آنتی‌اکسیدانی طبیعی است که اخیراً خواص ضدالتهابی و اثرات مهارکنندگی آن در ایجاد بیماری‌های متعدد از جمله سرطان و دیابت از طریق کاهش استرس‌های اکسیداتیو مشخص شده است (۱۹). به گفته پژوهشگران آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند با اختلال در مهاجرت سلول‌های ایمنی خصوصاً لنفوسیت‌های T به دستگاه عصبی مرکزی و مهار آنزیم‌های اکسیدکننده در درمان بیماری ام اس موثر باشند (۲۰). هدف از این تحقیق، بررسی نقش بنزواریک اسید به عنوان یک ترکیب فنلی و آنتی‌اکسیدان طبیعی بر التهاب مغز و آپوپتوز الیگودندروسیت‌های بالغ در سیستم عصبی مرکزی در مدل حیوانی ام اس ایجاد شده توسط کوپریزون می‌باشد.

وسترن بلات

در پایان هفته شش، تعداد سه سر موش به صورت تصادفی از هر گروه انتخاب، توسط کتامین و زایلازین بیهوش و سپس توسط بافر فسفات نمکی پرفیوز شدند. سپس پوست سر برداشته شده و مغز حیوان از استخوان جمجمه درآورده شد و بخش کورپوس کالوزوم مغز خارج گردید و جهت انجام آزمایشات مولکولی در فریزر -80°C درجه نگهداری شد. کورپوس کالوزوم‌های جدا شده با بافر لیزکننده مخلوط، هموژن شده و پس از سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 4°C درجه، محلول رویی برای مراحل بعد جدا شده و در دمای 20°C درجه نگهداری شد (۲۳). پس از تعیین غلظت پروتئین به روش برادفورد، نمونه‌ها در ژل پلی آکریل آمید (۱۲/۵ درصد) الکتروفورز شده و به غشاء نیتروسولولز منتقل گردید. غشا به طور جداگانه به مدت ۱۲ ساعت در روی شیکر در دمای 4°C درجه در معرض آنتی بادی‌های اولیه موشی (شرکت Santa Cruz با غلظت ۱:۵۰۰) علیه پروتئین‌های $\alpha\text{-tubulin}$ ، $\text{I-}\kappa\text{B}$ ، $\text{NF-}\kappa\text{B}$ یا Caspase-8 یا Caspase-9 قرار گرفت. روز بعد غشا سه بار با بافر فسفات نمکی شستشو شد و سپس به مدت ۶ ساعت در روی شیکر در دمای اتاق در معرض آنتی بادی ثانویه اختصاصی ضد موش متصل به HRP (شرکت Santa Cruz با غلظت ۱:۱۰۰۰) قرار گرفت. پس از اتمام وسترن بلات، باندهای مشاهده شده اسکن و توسط نرم افزار Image J مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

ریل تایم پی سی ار

آماده سازی نمونه: در پایان هفته شش، تعداد سه سر موش به صورت تصادفی از هر گروه انتخاب، توسط کتامین و زایلازین بیهوش و سپس توسط بافر فسفات نمکی پرفیوز شدند. سپس پوست سر برداشته شده، مغز حیوان از استخوان جمجمه درآورده شد، بخش کورپوس کالوزوم مغز خارج گردید و جهت انجام آزمایشات مولکولی در فریزر -80°C درجه نگهداری شد. استخراج RNA توسط کیت تهیه شده از شرکت Acuzol کره جنوبی انجام گردید. با اندازه‌گیری غلظت RNAهای استخراج شده، در هر نمونه، حجمی از آن که معادل ۱۰۰۰ نانوگرم RNA است برای سنتز cDNA برداشته شد. سپس سنتز cDNA توسط کیت شرکت Thermo SCIENTIFIC انجام شد. واکنش ریل تایم پی سی ار در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر در دستگاه کوربت ۳۰۰ انجام گردید (۲۲). ژن رفرنس بتا اکتین انتخاب شد. توالی پرایمرهای به کاررفته در آزمایش و برنامه داده شده به دستگاه در جدول ۱ آمده است. پس از انجام ریل تایم پی سی ار، CT مخصوص هر ژن از دستگاه استخراج و آنالیزهای بیان ژن‌ها به روش $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ انجام گرفت.

جدول ۱. اطلاعات مربوط به پرایمرها و برنامه آزمون ریل تایم پی سی ار

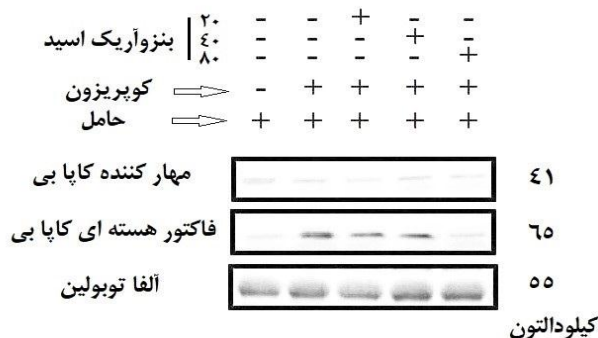
نام مولکول	توالی پرایمرها	برنامه تکثیر
Caspase-9	F: 5'-CAAGAAGAGGCAGCAATGGAG-3' R: 5'-CAGGAGGATCGTAGGCACAAG-3'	95°C for 10 min, 95°C for 20 s, 58°C for 45 s followed by 40 amplification cycles at 95°C for 30 s.
Caspase-8	F: 5'-CAAGAAGAGGCAGCAATGGAG-3' R: 5'-CAGGAGGATCGTAGGCACAAG-3'	
NF- κ B	F: 5'-CAAGAAGAGGCAGCAATGGAG-3' R: 5'-CAGGAGGATCGTAGGCACAAG-3'	
I- κ B	F: 5'-CAAGAAGAGGCAGCAATGGAG-3' R: 5'-CAGGAGGATCGTAGGCACAAG-3'	
-actin β	F: 5'-TGAAGATCAAGATCATTGCTCCTC-3' R: 5'-TCAGTAACAGTCCGCCTAGAAG-3'	

تحلیل آماری

واریانس یک‌طرفه یا در صورت لزوم دوطرفه به همراه آزمون مقایسه‌های چندگانه یا تست تعقیبی توکی از نوع Bonferroni بود. $p < 0.05$ به عنوان معیار معنی‌دار بودن اختلاف در نظر

جهت انجام محاسبات آماری داده‌ها، از نرم افزار Graphpad Prism 6 استفاده شد. آزمون آماری مورد استفاده، آنالیز

ارزیابی قرار گرفتند و نسبت پروتئین‌های فاکتور هسته‌ای کاپا بی/مهارکننده کاپا بی در آن‌ها اندازه‌گیری شد (شکل ۱). تفاوت معنی‌داری بین گروه کوپریزون با گروه کنترل ($p < 0.001$) و گروه بنزوآریک اسید با دوز ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و کوپریزون ($p < 0.05$) مشاهده شد (شکل ۱). کوپریزون با افزایش بیان فاکتور هسته‌ای کاپا بی نسبت فوق را کاهش و در مقابل بنزوآریک اسید با کاهش بیان فاکتور هسته‌ای کاپا بی نسبت فوق را افزایش می‌دهد. البته این افزایش تنها زمانی معنی‌دار بود که از غلظت بالای بنزوآریک اسید (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) استفاده گردید. نه کوپریزون به تنهایی و نه بنزوآریک اسید به همراه کوپریزون اثر قابل توجهی بر میزان بیان پروتئین مهار کننده کاپا بی نداشتند.



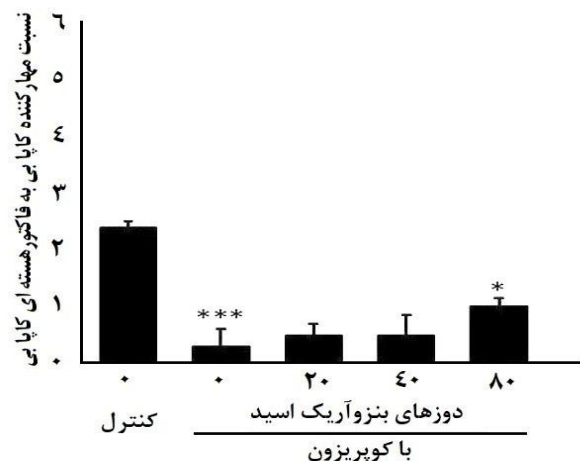
گرفته شد. داده‌ها براساس میانگین \pm انحراف معیار گزارش گردید (۲۱).

۳. ملاحظات اخلاقی

رعایت نکات اخلاقی با توجه به موازین کمیته اخلاق و منطبق با منشور اخلاقی هلسینکی در مورد کلیه حیوانات جهت به حداقل رساندن آزار به حیوانات صورت گرفت (UOZ-GR-9517-13).

۴. یافته‌ها

اثر بنزوآریک اسید بر بیان پروتئین فاکتور التهابی NF-kB و مهارکننده آن I-kB جهت بررسی مولکولی التهاب، ناحیه مدیال کورپوس کالوزوم حیوانات در گروه‌های مختلف در آزمایش وسترن بلات مورد



شکل ۱. بررسی میزان التهاب توسط اندازه‌گیری بیان پروتئین‌های فاکتور التهابی NF-kB و مهارکننده آن I-kB به روش وسترن بلات در گروه‌های کنترل، کوپریزون و بنزوآریک اسید (دوزهای مختلف). تفاوت معنی‌داری بین دوز ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بنزوآریک اسید و افزایش نسبت I-kB/NF-kB در مقایسه با گروه کوپریزون مشاهده شد که ناشی از کاهش بیان NF-kB می‌باشد. داده‌ها براساس میانگین \pm انحراف معیار گزارش گردید. علامت ستاره تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل را نشان می‌دهد ($p < 0.001$) (***)، $p < 0.05$ (*).

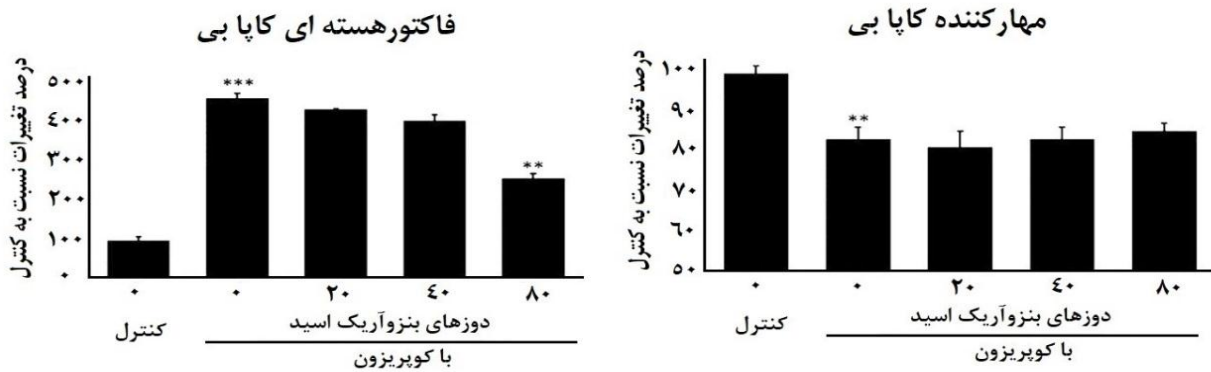
رونوشت‌های فاکتور هسته‌ای کاپا بی و مهارکننده کاپا بی در آن‌ها اندازه‌گیری شد (شکل ۲). تفاوت معنی‌داری بین گروه کوپریزون با گروه کنترل ($p < 0.001$) و گروه بنزوآریک اسید با دوز ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و کوپریزون ($p < 0.001$) در بیان فاکتور هسته‌ای کاپا بی مشاهده شد (شکل ۲). همچنین تفاوت معنی‌داری بین گروه کوپریزون با گروه کنترل

اثر بنزوآریک اسید بر بیان mRNA فاکتور التهابی NF-kB و مهارکننده آن I-kB

جهت راستی آزمایشی نتایج وسترن بلات، mRNA فاکتور التهابی NF-kB و مهارکننده آن I-kB نیز در ناحیه مدیال کورپوس کالوزوم حیوانات در گروه‌های مختلف در آزمایش ریل تایم پی سی ار مورد ارزیابی قرار گرفتند و میزان بیان

در دوز ۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم باعث کاهش بیان فاکتور هسته‌ای کاپا بی شده و تأثیری بر بیان مهارکننده کاپا بی نداشت (شکل ۲).

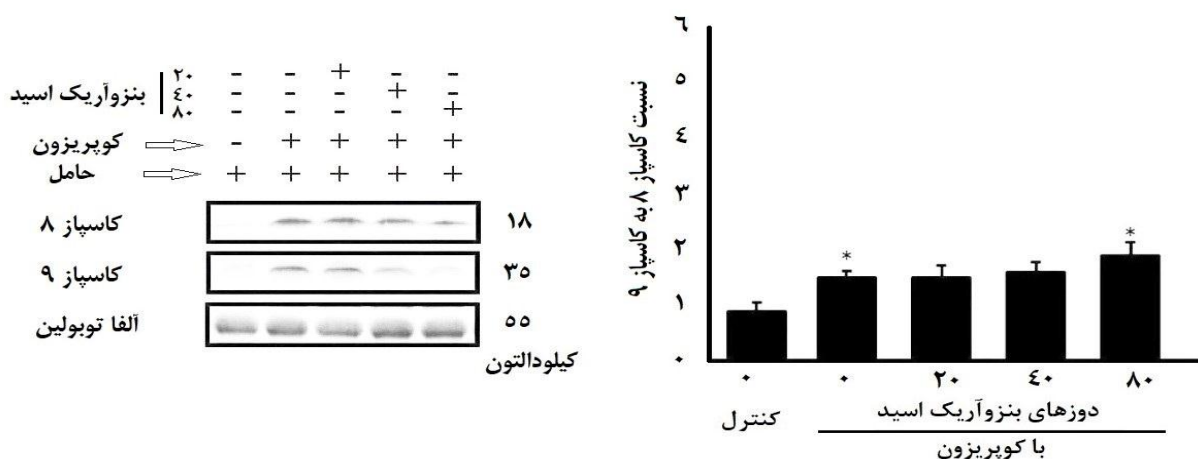
($p < 0.001$) در بیان مهارکننده کاپا بی مشاهده شد (شکل ۲). کوپریزون باعث افزایش بیان فاکتور هسته‌ای کاپا بی و کاهش بیان مهارکننده کاپا بی گردید و در مقابل بنزوآریک اسید تنها



شکل ۲. بررسی میزان بیان mRNA فاکتور التهابی NF-kB و مهارکننده آن I-kB به روش ریل تایم پی سی ار در گروه‌های کنترل، کوپریزون و بنزوآریک اسید (دوزهای مختلف). تنها تفاوت معنی‌داری بین دوز ۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم بنزوآریک اسید و کاهش بیان NF-kB مشاهده گردید و هیچ یک از دوزها بیان I-kB را تغییر ندادند. داده‌ها براساس میانگین \pm انحراف معیار گزارش گردید. علامت ستاره تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل را نشان می‌دهد ($p < 0.001$ ، $***$ ؛ $p < 0.01$ ، $**$).

دوز ۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم و کوپریزون ($p < 0.05$) مشاهده شد (شکل ۳). کوپریزون با افزایش بیان هر دو کاسپاز نسبت فوق را افزایش و در مقابل بنزوآریک اسید با کاهش کاسپاز ۹ نسبت فوق را افزایش می‌دهد. البته این افزایش تنها زمانی معنی‌دار بود که از غلظت ۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم بنزوآریک اسید استفاده گردید (شکل ۳).

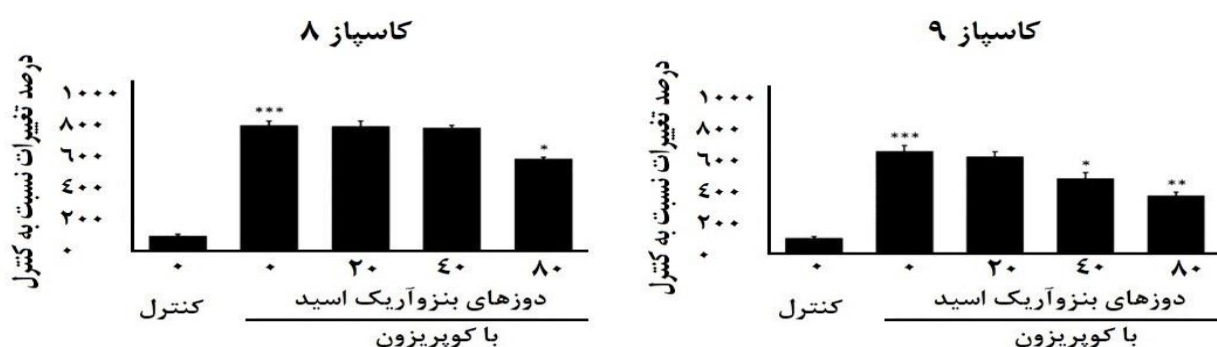
اثر بنزوآریک اسید بر بیان پروتئین کاسپاز ۸ و کاسپاز ۹ جهت بررسی مولکولی آپوپتوز، ناحیه مدیال کورپوس کالوزوم حیوانات در گروه‌های مختلف در آزمایش وسترن بلات مورد ارزیابی قرار گرفتند و نسبت پروتئین‌های کاسپاز ۹/کاسپاز ۸ در آن‌ها اندازه‌گیری شد (شکل ۳). تفاوت معنی‌داری بین گروه کوپریزون با گروه کنترل ($p < 0.05$) و گروه بنزوآریک اسید با



شکل ۳. بررسی مسیر آپوپتوز توسط اندازه‌گیری بیان پروتئین فاکتورهای مسیر داخلی کاسپاز ۹ و خارجی کاسپاز ۸ به روش وسترن بلات در گروه‌های کنترل، کوپریزون و بنزوآریک اسید (دوزهای مختلف). تفاوت معنی‌داری بین دوز ۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم بنزوآریک اسید و افزایش نسبت Caspase-8/Caspase-9 در مقایسه با گروه کوپریزون مشاهده شد. داده‌ها براساس میانگین \pm انحراف معیار گزارش گردید. علامت ستاره تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل را نشان می‌دهد ($p < 0.05$ ، $*$).

کوپریزون با گروه کنترل ($p < 0.001$) و گروه بنزوآریک اسید با دوز ۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم و کوپریزون ($p < 0.001$) در بیان کاسپاز ۹ مشاهده (شکل ۲). کوپریزون باعث افزایش بیان هر دو کاسپاز گردید و در مقابل بنزوآریک اسید هم در دوز متوسط و هم در دوز ۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم باعث کاهش بیان کاسپاز ۹ و تنها در دوز ۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم باعث کاهش بیان کاسپاز ۸ گردید (شکل ۲).

اثر بنزوآریک اسید بر بیان mRNA کاسپاز ۸ و کاسپاز ۹ جهت راستی آزمایی نتایج وسترن بلات، mRNA کاسپاز ۹ و کاسپاز ۸ نیز در ناحیه مدیال کورپوس کالوزوم حیوانات در گروه‌های مختلف در آزمایش ریل تایم پی سی آر مورد ارزیابی قرار گرفتند (شکل ۴). تفاوت معنی داری بین گروه کوپریزون با گروه کنترل ($p < 0.001$) و گروه بنزوآریک اسید با دوز ۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم و کوپریزون ($p < 0.05$) در بیان کاسپاز ۸ مشاهده شد (شکل ۳). هم‌چنین تفاوت معنی داری بین گروه



شکل ۴. بررسی مسیر آپوپتوز توسط اندازه‌گیری بیان mRNA فاکتورهای مسیر داخلی کاسپاز ۹ و خارجی کاسپاز ۸ به روش ریل تایم پی سی آر در گروه‌های کنترل، کوپریزون و بنزوآریک اسید (دوزهای مختلف). تفاوت معنی داری بین دوز ۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم بنزوآریک اسید و کاهش بیان ژن هر دو کاسپاز ۹ و کاسپاز ۸ با گروه کوپریزون مشاهده شد. داده‌ها براساس میانگین \pm انحراف معیار گزارش گردید. علامت ستاره تفاوت معنی دار با گروه کنترل را نشان می‌دهد ($p < 0.001$ ، $***$ ، $p < 0.05$ ، $*$ ، $p < 0.01$ ، $**$).

۵. بحث

یکی از معضلات جامعه امروز، تخصیص درصد بالایی از بودجه خدمات درمانی کشورها به درمان و توانبخشی بیماران مبتلا به ام اس است. از آنجایی که درمان‌های رایج این بیماری بهبود کامل را به دنبال نداشته و قطعی نیستند، بنابراین مطالعات همه‌جانبه و دقیق‌تر در زمینه طراحی و بررسی استراتژی‌های درمانی مناسب ضروری است. لازمه دستیابی به روش‌های درمانی جامع و قطعی، شناخت و شناسایی مکانیسم‌های دخیل در روند بیماری است (۲۴).

بنزوآریک اسید یک مشتق طبیعی تانیک اسید است و مشخص شده این ترکیب سرنوشت سلول را از طریق خواص آنتی اکسیدانی، ضدافسردگی و ضدالتهابی خود تغییر می‌دهد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند بنزوآریک اسید پاسخ‌های التهابی را در بسیاری از بیماری‌های مرتبط با التهاب حاد کاهش می‌دهد

(۲۵، ۲۶). هم‌چنین مشخص شده بنزوآریک اسید اثر ضدالتهابی موثری بر تومورزایی کولون در مدل حیوانی از طریق مهار NF- κ B و تنظیم کاهشی iNOS، COX-2، IL-6 و TNF- α دارد (۲۷). سلول‌های میکروگلیال نقش‌های تنظیمی متعددی در هموستازی CNS دارند و تصور می‌شود فعال شدن آن‌ها نقش کلیدی در علت‌شناسی بیماری‌های التهابی مغز و هم‌چنین بیماری‌های اتوایمن ایفا می‌نماید. در مدل کوپریزون، آپوپتوزیس اختصاصی الیگودندروسیت‌ها به‌طور عمده در طی سه هفته اول و در پی فعالیت آستروسیت‌ها و میکروگلیال‌ها/ماکروفاژها اتفاق می‌افتد و اوج آن در هفته سوم-چهارم می‌باشد. هر چند ماکروفاژها و میکروگلیال‌ها اغلب از نظر فنوتیپی شباهت‌های بسیاری دارند، در منابع مختلف به ندرت تفاوت‌ها و تمایزهایی بین این دو گروه سلولی عنوان شده و ما نیز جهت سهولت فهم از این پس هر دو گروه را به عنوان

عمده‌ای در مرگ سلول‌های گلیال و به‌طور عمده الیگودندروسیت‌ها ایفا می‌نمایند و به‌صورت مشخص سیگنال‌های مسیر خارجی ناشی از التهاب حاد در مدل مورد مطالعه قدرت و تاثیر بیشتری دارند. هر چند بنزوآریک اسید به‌صورت وابسته به دوز باعث کاهش آپوپتوز در هر دو مسیر می‌گردد، ولی تنها غلظت بالای بنزوآریک اسید (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) باعث کاهش معنادار آپوپتوز از طریق کاهش نسبت کاسپاز ۸ به کاسپاز ۹ می‌گردد که نشان‌دهنده بهبود بیشتر فعالیت میتوکندری و مهار مسیر داخلی آپوپتوز است. مسیر پیام‌رسانی پروتئین کیناز C منجر به فعال‌سازی تعدادی از پروتئین‌های پایین دست از طریق فعال‌سازی فاکتور رونویسی NF-κB می‌شود و مشخص شده است بنزوآریک اسید توانایی تنظیم کاهشی بیان ایزومرهای کلاسیک پروتئین کیناز C، کاهش بیان NF-κB و در نهایت افزایش بیان آنزیم‌های آنتی اکسیدان سلول را در مدل حیوانی لمفوما دارد که با نتایج این مطالعه مشابهت دارد (۲۹). مطالعات در مدل حیوانی لمفوما هم‌چنین نشان داد بنزوآریک اسید باعث القای آپوپتوز از طریق افزایش فعالیت ایزوآنزیم غیرتیبیک پروتئین کیناز C، افزایش بیان کاسپاز ۳ و کاهش بیان آنزیم لاکتات دهیدروژناز می‌گردد که با نتایج این مطالعه مغایرت دارد. دلیل این تناقضات می‌تواند استفاده از مدل‌های متفاوت بیماری و بررسی سلول‌های هدف مختلف باشد.

فرضیات متعددی مانند تولید زیاد رادیکال‌های آزاد، فعالیت آنزیم‌های پیش التهابی و آزادسازی سایتوکاین‌های پیش التهابی وجود دارد که فرآیند التهاب حاد را توصیف می‌نماید. مشخص شده بنزوآریک اسید باعث کاهش شکل‌گیری مالون‌آلدئید (MAD)، نیتریک اکساید (NO) و تقویت بیان گلوکوتائون (GSH) و سایتوکان ضدالتهابی IL-10 در مدل التهابی حاد القاشده توسط کاراجان می‌گردد. هم‌چنین در این مدل بنزوآریک اسید اثرات وسیع ضدالتهابی خود را توسط کاهش بیان مولکول‌های التهابی و فاکتور رونویسی NF-κB اعمال می‌نماید (۳۰) که با نتایج این مطالعه مشابهت دارد.

میکروگلیال‌ها نام می‌بریم. التهاب حاد یکی از عوامل تشدید و گسترش آسیب در مدل کوپریزون است و از آن‌جایی که فاکتور رونویسی NF-κB یکی از کلیدی‌ترین فاکتورهای رونویسی برای بیان واسطه‌های التهابی و به خدمت‌گیری بیشتر سلول‌های ایمنی است، میزان بیان این فاکتور نقش کلیدی در تنظیم التهاب مغز دارد. از آن‌جایی که فعالیت این فاکتور توسط مولکول I-κB و اتصال آن به NF-κB مهار می‌گردد، نسبت این دو پروتئین، پیش‌بینی‌کننده افزایش یا کاهش بیان میانجی‌های التهابی در سلول است. افزایش التهاب علی‌رغم این‌که مکانیسمی طبیعی برای حذف لاشه‌های سلول‌های مرده و پاک‌سازی محل آسیب از طریق فراخواندن ماکروفاژها می‌باشد در صورت تداوم و ایجاد التهاب مزمن می‌تواند مانع اصلی به‌کارگیری مکانیسم‌های حفاظتی و ترمیم عارضه گردد (۲۸).

کوپریزون به دلیل آسیب به سیستم انتقال الکترون میتوکندری و مهار فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز وابسته به مس باعث اختلال در تولید ATP شده و هم‌چنین منجر به ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو در سلول می‌گردد (۱۴). این موضوع که چرا کوپریزون به‌طور اختصاصی الیگودندروسیت‌ها را دچار آسیب می‌نماید هنوز مشخص نشده، ولی گمان می‌رود شرایط خاص متابولیکی این سلول‌ها آن‌ها را نسبت به این سم حساس‌تر می‌نماید. با توجه به مکانیسم اثر کوپریزون مهم‌ترین عامل مرگ الیگودندروسیت‌ها آزاد شدن سیتوکروم C به داخل سیتوزول، به راه افتادن مسیر داخلی آپوپتوز و فعال شدن کاسپاز ۹ و در نهایت آپوپتوز این سلول‌ها است (۱۳). هر چند به‌دلیل ایجاد التهاب حاد و ترشح واسطه‌های التهابی از قبیل TNF-α و IL-1 در نهایت مسیر خارجی القاکننده آپوپتوز از طریق گیرنده‌های مرگ و فعال شدن کاسپاز ۸ منجر به مرگ بیشتر سلول‌های الیگودندروسیتی می‌گردد.

نتایج این مطالعه تاییدکننده اثرات ضدالتهابی بنزوآریک اسید و کنترل التهاب حاد، ناشی از کوپریزون توسط این ترکیب بوده و به این واسطه نقش حفاظتی بنزوآریک اسید را بر جلوگیری از تخریب میلین توجیه می‌نمایند. همان‌طور که پیش‌بینی می‌شد هر دو مسیر القاکننده آپوپتوز در مدل مورد مطالعه نقش

۶. نتیجه‌گیری

بنزوآریک اسید باعث کاهش فعالیت فاکتور رونویسی NF- κ B و بیان کاسپازهای ۸ و ۹ شده، در نهایت باعث کاهش آسیب‌های مغزی می‌گردد. در نتیجه بنزوآریک اسید در تعدیل آسیب‌های القاشده توسط کوپریزون در ناحیه کورپوس کولوزوم، حداقل با کاهش موضعی التهاب و آپوپتوز نقش دارد. از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به عدم استفاده از آزمون‌های هیستوشیمی برای تایید التهاب و آپوپتوز در بافت مغز اشاره نمود که به دلیل کمبود بودجه و امکانات صورت نگرفت. مطالعات تکمیلی از جمله استفاده از آزمون‌های ایمونوهیستوشیمی و میکروسکوپ الکترونی می‌تواند به تایید اثرات مفید بنزوآریک اسید بر بیماری‌های التهابی مغز کمک نماید.

۷. تقدیر و تشکر

نویسندگان از حمایت مالی دانشگاه زابل در انجام این پروژه کمال تشکر و قدردانی را ابراز می‌نمایند.

۸. سهم نویسندگان

تمامی نویسندگان معیارهای استاندارد نویسندگی بر اساس پیشنهادات کمیته بین المللی ناشران مجلات پزشکی را دارا بودند.

۹. تضاد منافع

بدین‌وسیله نویسندگان تصریح می‌نمایند که هیچ‌گونه تضاد منافی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

References

1. Cudrici C, Niculescu T, Niculescu F, Shin ML, et al. Oligodendrocyte cell death in pathogenesis of multiple sclerosis: Protection of oligodendrocytes from apoptosis by complement. *J Rehabil Res Dev*. 2006; 43(1): 123-32.
2. Loren A, Rolak MD. Multiple Sclerosis: It's Not The Disease You Thought It Was. *Clin Med Res*. 2003; 1(1): 57-60.
3. Sanchooli J, Ramroodi N, Sanadgol N, Sarabandi V, Ravan H, Saebi-Rad R. Relationship between metalloproteinase 2 and 9 concentrations and soluble CD154 expression in Iranian patients with multiple sclerosis. *The Kaohsiung journal of medical sciences*. 2014; 30 (5), 235-242.
4. Azami M, YektaKooshali MH, Shohani M, Khorshidi A, Mahmudi L. Correction: Epidemiology of multiple sclerosis in Iran: A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE*. 2019; 14(7): e0219466.
5. McQualter JL, Bernard CC. Multiple sclerosis: a battle between destruction and repair. *J Neurochem*. 2007; 100(2): 295-306.
6. Joannides AJ, Chandran S. Human embryonic stem cells: an experimental and therapeutic resource for neurological disease. *J Neurol Sci*. 2008; 265(1-2): 84-8.
7. Franklin RJ. Why does remyelination fail in multiple sclerosis? *Nat Rev Neurosci*. 2002; 3(9): 705-14.
8. Battista D, Rutishauser U. Removal of polysialic acid triggers dispersion of subventricularly derived neuroblasts into surrounding CNS tissues. *J Neurosci*. 2010; 30(11): 3995-4003.
9. Karaky M, Fedetz M, Potenciano V, Andrés-León E, Codina AE, Barrionuevo C, Alcina A, Matesanz F. SP140 regulates the expression of immune-related genes associated with multiple sclerosis and other autoimmune diseases by NF- κ B inhibition. *Hum Mol Genet*. 2018; 27(23):4012-4023.
10. Stone S, Jamison S, Yue Y, Durose W, Schmidt-Ullrich R, Lin W. NF- κ B Activation Protects Oligodendrocytes against Inflammation. *J Neurosci*. 2017; 37(38): 9332-9344.
11. Poorebrahim M, Asghari M, Abazari MF, Askari H, Sadeghi S, Taheri-Kafrani A, Nasr-Esfahani MH, Ghoraieian P, Aleagha MN, Arab SS, Kennedy D, Montaseri A, Mehranfar M, Sanadgol N. Immunomodulatory effects of a rationally designed peptide mimetic of human IFN β in EAE model of multiple sclerosis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2018; 82: 49-61.
12. Ramroodi N, Khani M, Ganjali Z, Javan MR, Sanadgol N, Khalseh R, Ravan H, Sanadgol E, Abdollahi M. Prophylactic Effect of BIO-1211 Small-Molecule Antagonist of VLA-4 in the EAE Mouse Model of Multiple Sclerosis. *Immunol Invest*. 2015; 44(7):694-712.
13. Sanadgol N, Maleki P. Study of the Effects of Ellagic Acid on Population and Activity of Central Nervous System Neuroglia Cells in the Cuprizone-induced Multiple Sclerosis. *J Arak Uni Med Sci*. 2018; 21 (6):34-46
14. Lockshin RA, Zakeri Z. Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36: 2405-19.
15. Crawford ED, Wells JA. Caspase substrates and cellular remodeling. *Annu. Rev. Biochem*. 2011; 80: 1055-1087.
16. Kreutzberg G W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*. 1996; 19: 312-318.
17. Barres BA, Hart IK, Coles HS, Burne JF, et al. Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell*. 1992; 70: 31-46.
18. Skripuletz T, Gudi V, Hackstette D, Stangel M. De- and remyelination in the CNS white and grey matter induced by cuprizone: the old, the new, and the unexpected. *Histology and histopathology*. 2011; 26(12): 1585-97.
19. Derosa G, Maffioli P, Sahebkar A. Ellagic Acid and Its Role in Chronic Diseases. *Adv Exp Med Biol*. 2016; 928: 473-479.
20. Lepka K, Berndt C, Hartung HP, Aktas O. Redox Events as Modulators of Pathology and Therapy of Neuroinflammatory Diseases. *Front Cell Dev Biol*. 2016; 4: 63.
21. Sanadgol N, Golab F, Mostafaie A, et al. Low, but not high, dose triptolide controls neuroinflammation and improves behavioral deficits in toxic model of multiple sclerosis by dampening of NF- κ B activation and acceleration of intrinsic myelin repair. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2018; 342: 86-98.
22. Sanadgol N, Golab F, Mostafaie A, Mehdizadeh M, et al. Ellagic acid ameliorates cuprizone-induced acute CNS inflammation via restriction of microgliosis and down-regulation of CCL2 and CCL3 pro-inflammatory chemokines. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2016; 62(12): 24-30.

23. Sanadgol N, Golab F, Askari H, Moradi F, et al. Alpha-lipoic acid mitigates toxic-induced demyelination in the corpus callosum by lessening of oxidative stress and stimulation of polydendrocytes proliferation. *Metab Brain Dis.* 2018; 33(1): 27-37.
24. Sanadgol N, Zahedani SS, Sharifzadeh M, Khalseh R, et al. Recent Updates in Imperative Natural Compounds for Healthy Brain and Nerve Function: A Systematic Review of Implications for Multiple Sclerosis. *Curr Drug Targets.* 2017; 18(13): 1499-1517.
25. Dalvi LT, Moreira DC, Andrade R Jr, Ginani J, et al. Ellagic acid inhibits iron-mediated free radical formation. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2016; 173: 910-917.
26. Sanadgol N, Golab F, Tashakkor Z, et al. Neuroprotective effects of ellagic acid on cuprizone-induced acute demyelination through limitation of microgliosis, adjustment of CXCL12/IL-17/IL-11 axis and restriction of mature oligodendrocytes apoptosis, *Pharmaceutical Biology.* 2017; 55: 1679-1687.
27. Umesalma S, Sudhandiran G. Differential inhibitory effects of the polyphenol ellagic acid on inflammatory mediators NF- κ B, iNOS, COX-2, TNF- α , and IL-6 in 1, 2-dimethylhydrazine-induced rat colon. *Clinical Pharmacology & Toxicology.* 2010; 107: 650-655.
28. Skripuletz T, Hackstette D, Bauer K, Gudi V, et al. Astrocytes regulate myelin clearance through recruitment of microglia during cuprizone-induced demyelination. *Brain.* 2013; 136: 147-67.
29. Mishra S, Vinayak M. Ellagic acid checks lymphoma promotion via regulation of PKC signaling pathway. *Mol Biol Rep.* 2013; 40(2): 1417-28.
30. El-Shitany NA, El-Bastawissy EA, El-Desoky K. Ellagic acid protects against carrageenan-induced acute inflammation through inhibition of nuclear factor kappa B, inducible cyclooxygenase and proinflammatory cytokines and enhancement of IL-10 via an antioxidant mechanism. *Int Immunopharmacol.* 2014; 19(2): 290-9.