اثر داروی گیاهی آیمود برتولید نیتریک اکساید در سلولهای میکروگلیای ملتهب

بنفشه امیر اصلانی[۱و۲]، فرزانه صابونی*[۱]، شاه صنم عباسی[۱]، مولود میررضوی[۱و۲]، حبیب الله ناظم[۲]، حمیدرضا خرم خورشید[۳] و محمدصادق ثابت[۴]

[۱] تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

[۲] تهران، دانشگاه پیام نور مرکز

[۳] تهران، دانشگاه علوم توانبخشی و خدمات اجتماعی، مرکز تحقیقات ژنتیک

[۴] تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

تاریخ دریافت: ۸۹/۴/۷ تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۲۶

چکیده

سلولهای میکروگلیا، کوچکترین گلیال سلها در سیستم عصبی مرکزی هستند که به عنوان ماکروفاژهای مغزی نقش مهمی در تنظیم ایمنی ذاتی دارند. تغییر شکل سریع این سلولها ازحالت استراحت به فنوتیپ فعال وترشح فاکتورهای قابل نفوذ، توانایی منحصر به فرد آنها را در پاسخ به محرکهای التهابی نشان می دهد. نیتریک اکساید (NO)، یک رادیکال آزاد و از جمله موادی است که توسط سلولهای میکروگلیای ملتهب تولید شده و در پیشرفت بیماریهای نورودژنراتیو از قبیل پارکینسون (PD) و آلزایمر(AD) نقش اساسی دارد. لذا مهار فعالیت میکروگلیا یک استراتژی مهم در کاهش آسیبهای نوروتوکسیک وارده به سیستم عصبی مرکزی است. در این پروژه توانایی «آیمود، IMOD» به عنوان یک داروی گیاهی تعدیل کننده ایمنی، در کاهش نیتریک اکساید القاء شده توسط لیپوپلی ساکارید(LPS) باکتریایی، با استفاده از مغز نوزاد موشهای صحرایی، مورد ارزیابی قرار گرفته است. جهت سنجش نیتریک اکساید تولید شده، از تست گریس و برای تخمین میزان بقای سلولی از تست MTT استفاده گردید. نتایج این پروژه نشان می دهد رقتهای بالای داروی آیمود دارای اثرات ضد التهابی بر سلولهای میکروگلیا بوده و قادر است میزان نیتریک اکساید تولیدی را در سلولهای مذکور کاهش دهد. با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق و با انجام تحقیقات تکمیلی می توان با استفاده از این دارو به کاهش آسیبهای نورونی ناشی از فعالیت شدید میکروگلیا در بیماریهای نورودژنراتیو کمک شایانی نمود.

واژه های کلیدی : میکروگلیا، نیتریک اکساید، LPS، نورودژنراتیو، آیمود

* نویسنده مسئول، تلفن: ۴۴۵۸۰۳۷۴-۰۲۱، پست الکترونیکی: Sabouni@nigeb.ac.ir

مقدمه

سلولهای میکروگلیا، سلولهای ایمنی مستقر در سیستم عصبی مرکزی هستند که وظیفه تنظیم ایمنی طبیعی و دخالت در پاسخهای ایمنی سیستم عصبی مرکزی را بر عهده دارند. در مغز بالغ سالم میکروگلیا در حالت استراحت دیده می شود که با خصوصیاتی چون جسم سلولی کوچک، استطاله های منشعب وبیان کم آنتی ژنهای سطحی همراه است. در پاسخ به آسیب مغز، ایسکمی و محرکهای التهابی چون سیگنالهای میکروبی، پروتئینهای پاتولوژیکی، ATP خارج سلولی و فاکتورهای سرمی، سلوهای میکروگلیا فنوتیپ فعال به خود گرفته، قادر به تکثیر، سنتز نیتریک اکساید(NO)، مهاجرت به محل آسیب دیده، فاگوسیتوز بقایای سلولی و ترشح فاکتورهای قابل

Archive of SID
www.SID.ir

انتشار همچون سیتوکین ها، کموکاین ها، فاکتورهای تروفیک و میانجیگرهای التهابی اسید چرب مثل آراشیدونیک اسید، پروستاگلاندین های D2، E2 و F2α، فاکتور فعال کننده پلاکتها، ترومبوکسان B2 و لوکوتری ان B4 می باشند (۳).

بسیاری از عوامل محرک سلولهای میکروگلیا و همچنین دسته وسیعی از آسیبهای نورولوژیکی و بیماریها با القای iNOS و تولید NO مرتبط است(۳). القای iNOS درسلولهای میکروگلیا، توسط اندوتوکسین LPS مشتق شده از دیواره باکتریهای گرم منفی که به عنوان اولین عامل محرک قوی سلولهای میکروگلیا در مقالات علمی مطرح شد و نیزتوسط سیتوکین های معینی همچون اینترفرون گاما(INF-γ)، فاکتور نکروز تومور آلفا(TNF-α) یا اینترلوکین یک آلفا (IL-1α) که از طریق گیرنده های مشخصی در غشای پلاسمایی عمل می کنند، صورت می پذیرد (۳ و ۴). همچون سایر سلوهای میلوئید، سلولهای میکروگلیا با آزاد کردن مقدار زیادی از سیتوکین ها، کموکاین ها، گونه های فعال اکسیژن(ROS)، پروتئازها و نیتریک اکساید(NO) به LPS پاسخ می دهند. این اثرات از طریق رسپتورهای TLR4، عضوی از خانواده TLR میانجیگری می شود (۳ و ۹). به نظر می رسد آنزیم iNOS که وظیفه سنتز NO در سلولهای میکروگلیا را عهده دار است، طی پاسخهای التهابی توسط فاکتور نسخه برداری NF-κB تنظیم می شود. اتصال LPS به رسپتور خود منجر به تخریب و آزاد شدن سریع مهار کننده این فاکتور یعنی IκB شده، و انتقال NF-κB به داخل هسته منجر به تنظیم بیان بسیاری از ژنهای درگیر در فرایند التهاب از جمله iNOS می شود. نیتریک اکساید سنتز شده در نتیجه فعالیت این آنزیم به عنوان یک رادیکال آزاد قوی و با عملکرد یک پیامبر ثانویه مهم باعث پیشبرد وقایع التهابی می شود(۸). نیتریک اکساید ضمن اینکه به عنوان یک گشاد کننده عروق و نیز یک نوروترانسمیتر می باشد، در غلظتهای بالاتر با تشکیل پراکسی نیتریت و نیتروزیل دار کردن پیامبر های سیگنال سلولی در تنظیم روند التهاب مؤثر است (۷). بنابراین ضمن اینکه NO دارای نقش فیزیولوژیکی در سیگنال سلولی نورونی است، اماسنتز بیش از حد آن باعث ایجاد بیماریهای نورودژنراتیو می شود (۱۴).

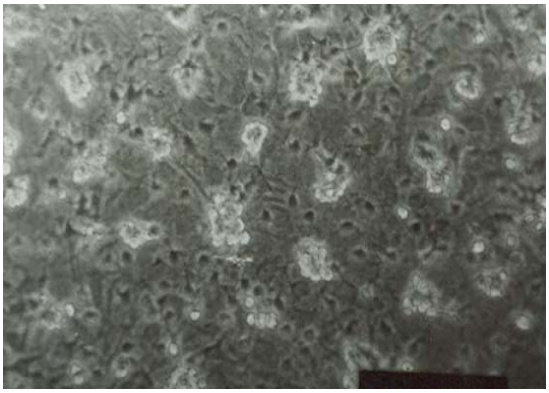
داروی نوظهور آیمود با منشاء گیاهی، ترکیبی از سلنیوم، کاروتن و فلاونوئیدهاست. با توجه به اثرات این دارو در کاهش میزان فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF-α)، اینترفرون گاما (INF-γ) و اینترلوکین ۲(IL-2) (۲ و ۱۱)، بررسی اثرات این دارو در کنترل میزان نیتریک اکساید تولید شده توسط سلولهای ملتهب میکروگلیا، می تواند نتایج رضایت بخشی به همراه داشته باشد.

مواد و روشها

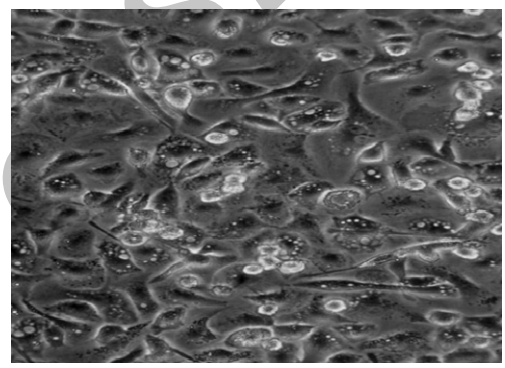
کشت سلولهای میکروگلیا: در کشت سلولهای میکروگلیا از روش Giulian & Baker (۵) استفاده گردید. کشت پرایمری سلولهای میکروگلیا با استفاده ازمغز موشهای صحرایی نوزاد ۱ تا ۴ روزه نژاد wistar انجام گردید. ابتدا پرده مننژ ازبافت کورتکس جدا شد و پس از خرد کردن سلولها به روش مکانیکی، سوسپانسیون سلولی حاصل به نسبت یک نیمکره در هر فلاسک (فلاسکهای ۲۵cm2، Nunc)، داخل محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) حاوی ۱۰ درصد FCS (Fetal Calf Serum) قرار داده شد. سپس فلاسکها به مدت دو هفته در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و رطوبت مناسب و نیز میزان ۵ درصد CO2 قرار گرفتند. در فواصل ۵ روز، محیط رویی سلولها حذف و توسط محیط کشت سرم دار جدید جایگزین گردید. پس از گذشت حدود ۱۰تا ۱۴ روز از زمان کشت، انواع مختلفی از سلولهای عصبی شامل نورونها و گلیاها (آستروسیت ها، الیگودندروسیت ها و میکروگلیا) درسطح فلاسک قابل رویت بودند (۱)(شکل ۱).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- سلولهای میکروگلیا با جسم سلولی گرد و شفاف که بر سطح سلولهای آستروسیت نوع اول قرار گرفته اند. (میکروسکوپ فاز کنتراست، بزرگنمایی ۲۰۰)



شکل۲- سلولهای میکروگلیا یک هفته پس از کشت میکروسکوپ فاز کنتراست، بزرگنمایی ۲۰۰

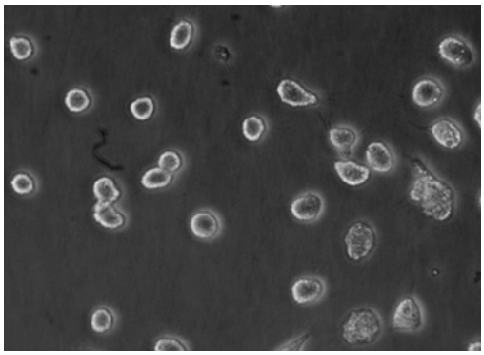
خالص سازی سلولهای میکروگلیا: جداسازی این سلولها بر اساس قدرت چسبندگی به سطح بستر است. با توجه به اینکه از میان سلولهای گلیا، سلولهای میکروگلیا دارای قدرت چسبندگی بالاتری هستند(۱۶)، لذا در مواجهه با تریپسین همچنان متصل به کف بستر باقی می مانند در صورتی که سایر سلولهای گلیا (آستروسیت ها و الیگودندروسیت ها) به صورت یک صفحه جدا می گردند. در این روش ابتدا سطح فلاسک توسط بافر هنکس شستشو داده شد و سپس به نسبت ۱ به ۴ محیط کشت DMEM و تریپسین ۰/۲۵ درصد (۱۶) استریل به فلاسکها اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد.

پس از این مدت سلولهای دیگر به شکل ورقه ای از کف فلاسک جدا می گردند که این ورقه سلولی حاوی آستروسیت ها و الیگودندروسیت ها می باشد. در حالی که سلولهای میکروگلیا همچنان به سطح فلاسک چسبیده باقی می مانند(۱). برای جدا کردن سلولهای میکروگلیا از سطح فلاسک، از Cell scrapper استفاده گردید. پس از رنگ آمیزی و شمارش (حدود ۱۰۰۰۰ سلول در هر ول)، سلولهای میکروگلیا داخل پلیتهای ۹۶ تایی کشت داده شده و به مدت ۲۴ساعت داخل انکوباتور انکوبه شدند.

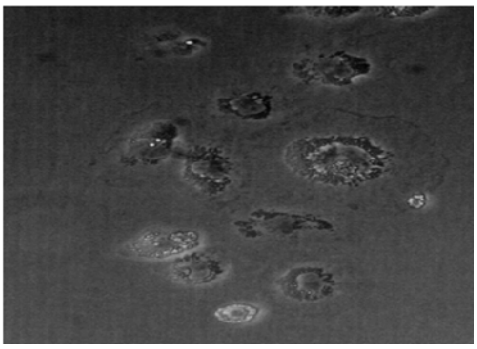
تیمار سلولها توسط LPS و داروی آیمود: برای تیمار سلولها از محلول LPS (تهیه شده از شرکت دارویی سیگما) با غلظت 1µg / ml در محیط کشت DMEM استفاده گردید. پس از تهیه رقتهای مورد نیاز (۱/۲۰۰۰ – ۱/۵۰) از داروی آیمود (با استفاده از آیمود و محیط کشت DMEM)، جهت فعال سازی سلولها ازLPS استفاده گردید و سپس تیمارآنها توسط داروی آیمود صورت گرفت.

اندازه گیری میزان نیتریک اکساید: پلیتهای ۹۶ تایی حاوی سلولهای میکروگلیا پس از تیمار به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند و پس از گذشت این مدت، از انکوباتور خارج گردیده، ابتدا حدود ۶۰ ماکرولیتر از سوپ سلولی از پلیتهای مذکور خارج و به ویالهای ۱/۵ml منتقل گردید و پس از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه و دور ۱۵۰۰RPM، حدود ۵۰µl از آن داخل پلیتهای ۹۶ تایی دیگری انتقال داده شدند. سپس حدود µl ۵۰ معرف Griss (تهیه شده از شرکت دارویی سیگما) به هر ول اضافه گردید و میزان جذب توسط دستگاه الایزا ریدر(Microplate reader labsystem multiscan) و در طول موج ۵۴۰ nm (۱۶) مورد بررسی قرار گرفت.

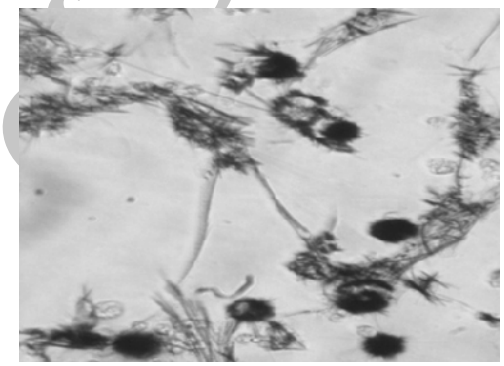
Archive of SID
www.SID.ir



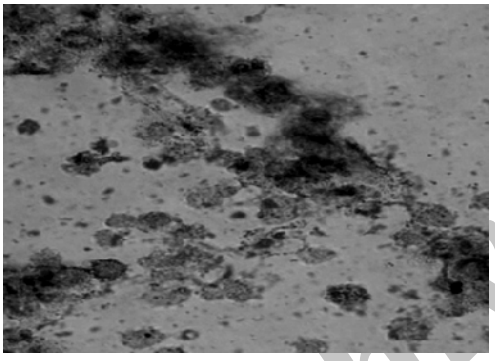
شکل۳- سلولهای میکروگلیا پس از حذف سایر سلولها
با استفاده از روش آتریمی
میکروسکوپ فاز کنتراست، بزرگنمایی ۲۰۰



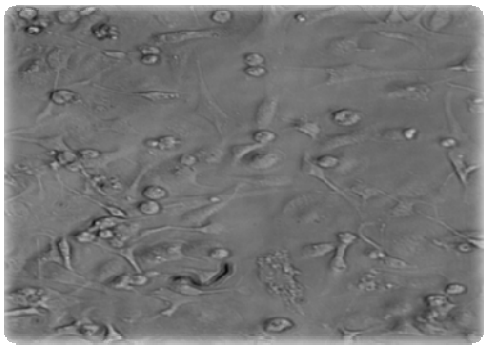
شکل۴- اثر LPS(1µg / ml) بر سلولهای میکروگلیا
میکروسکوپ فاز کنتراست، بزرگنمایی ۲۰۰



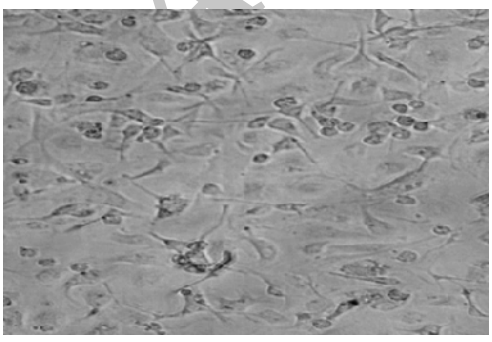
شکل۵- تست MTT سلولهای میکروگلیا در حضور LPS و
محیط کشت DMEM پس از ۴۸ ساعت
میکروسکوپ فاز کنتراست، بزرگنمایی ۲۰۰



شکل۶- سلولهای میکروگلیا تیمار شده
با LPS و رقت۱/۵۰ آیمود
میکروسکوپ فاز کنتراست، بزرگنمایی ۲۰۰

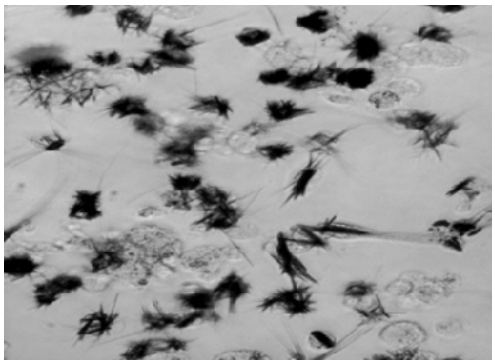


شکل ۷- سلولهای میکروگلیا تیمار شده
باLPS و رقت ۱/۱۵۰۰ آیمود پس از ۴۸ ساعت
میکروسکوپ فاز کنتراست، بزرگنمایی ۲۰۰

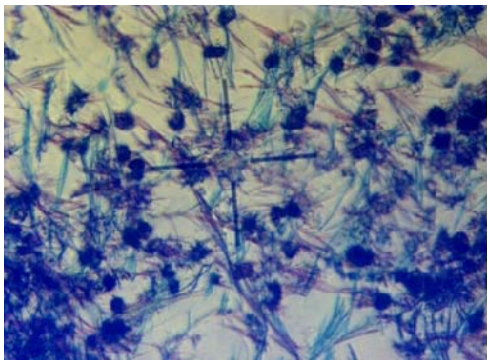


شکل ۸- سلولهای میکروگلیا تیمار شده
با LPS ورقت ۱/۲۰۰۰ آیمود پس از ۴۸ ساعت
میکروسکوپ فاز کنتراست، بزرگنمایی ۲۰۰

Archive of SID
www.SID.ir

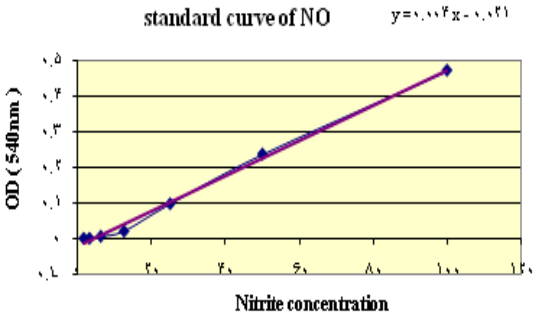


شکل ۹- تست MTT سلولهای میکروگلیا در حضورLPS
و رقت ۱/۲۰۰۰ آیمود پس از ۴۸ ساعت
میکروسکوپ فاز کنتراست، بزرگنمایی ۲۰۰



شکل ۱۰- تست MTT سلولهای میکروگلیا در محیط
کشت DMEM و FCS پس از ۴۸ ساعت
میکروسکوپ فاز کنتراست، بزرگنمایی ۲۰۰

معرف گریس یک آزمایش طیف سنجی است و بر اساس یک واکنش دیازوتیزاسیون است. برای سنجش میزان NO آزاد شده توسط نمونه های تیمار شده، از منحنی استاندارد NO استفاده می گردد. در این روش از ماده $NaNO_2$ جهت تهیه غلظتهای NO_2^- استفاده می شود. (نمودار ۱).



نمودار ۱ – منحنی استاندارد نیتریک اکساید (NO)

بررسی میزان بقای سلولهای میکروگلیا: این بررسی با استفاده از تست MTT انجام شد. در این روش به سوپ سلولی باقی مانده درهر ول در پلیت ۹۶ تایی، حدود ۱۰µl از کیت MTT اضافه گردید و به مدت ۴ ساعت انکوبه شد پس از گذشت این مدت زمان از مصرف MTT توسط سلولها، سوپ سلولی خارج گردید و به هر ول حدود ۱۰۰ µl از DMSO اضافه شد. لازم به ذکر است، سلولهایی که از لحاظ متابولیکی فعال باشند نمک زرد رنگ تترازولیوم MTT را به کریستالهای بنفش رنگ فارمازون تبدیل می کنند. در نهایت جذب با استفاده از دستگاه الایزا ریدر(Microplate reader labsystem multiscan) و در طول موج ۵۸۰ nm مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت (۱۲).

آنالیز آماری: تجزیه واریانس (ANOVA) داده ها با نرم افزار SPSS (version 18) به صورت آزمایش فاکتوریل با دو عامل زمان (۲ سطح) و غلظت (۷ سطح) در غالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. مقایسه میانگین بین سطوح فاکتورهای معنی دار با آزمون دانکن در سطح احتمال ۹۵ درصد صورت گرفت. مقادیر دارای $P<0/05$ معنی دار در نظر گرفته شدند (نمودار ۱).

نتایج

نتایج میکروسکوپی به دست آمده از تأثیر تیمارهای LPS و داروی آیمود (هدیه از شرکت فارس روس) بر کشت سلولهای میکروگلیا: مطالعات انجام شده نشان می دهند سلولهایی که LPS به همراه رقت ۱/۵۰ داروی آیمود دریافت کرده بودند، قادر به بقاء نبودند (شکل۶)، همین امر در مورد سلولهایی که با رقتهای ۱/۱۰۰ و ۱/۵۰۰ دارو

Archive of SID
www.SID.ir

تیمار شده بودند نیز مشاهده گردید. به نظر می رسد در رقتهای بالاتر از ۱/۵۰۰(۱/۸۰۰، ۱/۱۰۰۰،۱/۱۵۰۰ و ۱/۲۰۰۰) دریافت دارو دارای اثر سویی بر سلولها نبوده و میزان بقای سلولها تقریباً مشابه با گروه کنترل می باشد (شکلهای ۴-۲ و ۸-۶).

نتایج حاصل از سنجش میزان نیتریک اکساید: همان طور که در نمودار ۲ نشان داده شده است، میزان NO آزاد شده از سلولهای میکروگلیای ملتهب، در رقتهای ۱/۵۰،۱/۱۰۰ و۱/۵۰۰ در حد صفر بوده است. با بررسی میزان بقای سلولها (نمودار۳)، به نظر می رسد در رقتهای ذکر شده، اثر توکسیک داروی آیمود منجر به از بین رفتن سلولها شده، از این رو تولید نیتریک اکساید القاء شده با LPS صورت نگرفته است. مطالعات نشان می دهد که در رقتهای بالاتردارو، سلولها قادر به حفظ بقای خود بوده و در پاسخ به LPS نیتریک اکساید آزاد نموده اند، اما میزان NO آزاد شده در مقایسه با گروه کنترل (DMEM+LPS)، کاهش قابل توجهی را نشان می دهد. این امر مؤید آن است که سلولهایی که رقتهای بالاتری از داروی آیمود را دریافت کرده اند، میزان NO کمتری را نسبت به گروه کنترل که فقط توسط LPS فعال شده اند، آزاد نموده اند.

با مقایسه میزان تولید NO در زمانهای ۲۴ و ۴۸ ساعت، به نظر می رسد پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان تیمار مقدار کمی NO توسط سلولهای میکروگلیای ملتهب آزاد شده است و بیشترین میزان NO تولید شده پس از گذشت ۴۸ ساعت از زمان تیمار بوده است، به طوری که تفاوت قابل ملاحظه ای بین میزان NO آزاد شده در این دو زمان دیده می شود (نمودار ۲).

نتایج حاصل از سنجش فعالیت متابولیکی سلولها: با توجه به نمودار ۳، به نظر می رسد که در رقتهای پایین(۱/۱،۱۰۰/۵۰و۱/۵۰۰)، میزان بقای سلولها در کمترین حد خود بوده و دارای تفاوت قابل ملاحظه ای با گروه کنترل می باشد. بررسی نتایج میکروسکوپی نیز گویای این واقعیت است که در رقتهای پایین، تشکیل کریستالهای فارمازون بسیار ناچیز و در مواردی در حد صفر گزارش شده است. با افزایش رقت دارو (از ۱/۸۰۰ تا۱/۲۰۰۰) یک سیر صعودی در میزان بقای سلولها مشاهده شده و مقدار فعالیت متابولیکی سلولها تقریباً مشابه با گروه کنترل می باشد. تشکیل کریستالهای فارمازون توسط سلولهای فعال نیز مؤید این مطلب است. همچنین مقایسه میزان بقای سلولها در رقتهای پایین و رقتهای بالا نیز به وضوح تفاوت قابل ملاحظه ای را در نمودار نشان می دهد.

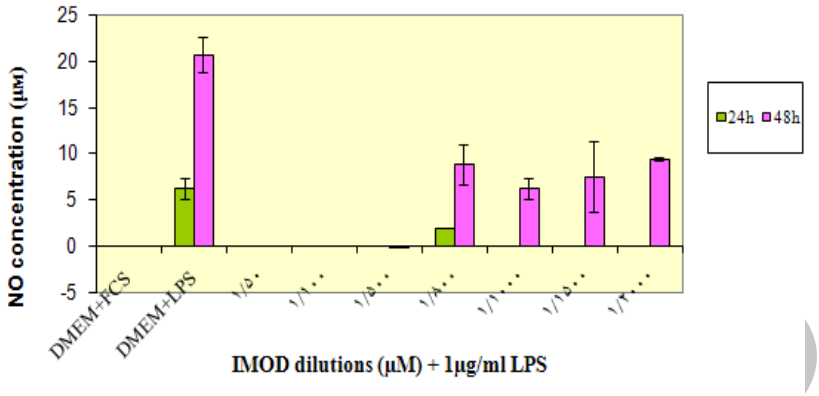
بحث

در این سری از آزمایشات، داروی IMOD به عنوان مهارکننده دیگری برای ژن iNOS مطرح می شود. چرا که بر اساس نتایج به دست آمده، این دارو در رقتهای ۱/۸۰۰ تا ۱/۲۰۰۰ دارای خاصیت ضد التهابی بوده و میزان نیتریک اکساید تولید شده توسط سلولهای میکروگلیای ملتهب را در مقایسه با گروه کنترل (DMEM + LPS) کاهش داده است. در رقتهای بالاتر (محدوده ۱/۸۰۰ تا ۱/۲۰۰۰)، توانایی داروی آیمود در کاهش میزان NO القاء شده با LPS کاملاً مشهود بوده و با گروه کنترل قابل مقایسه می باشد. بررسی فعالیت متابولیکی سلولها در رقتهای بالاتر نیز حاکی از آن است که سلولها قادر به حفظ بقای خود بوده که این مسئله با مطالعه کریستالهای تشکیل شده توسط سلولها اثبات می گردد به نحوی که در رقتهای بالاتر، میزان بقای سلولها تقریباً مشابه با گروه کنترل می باشد. ذکر این نکته لازم است که هر دارویی دارای دُز مؤثر مشخصی است، بنابراین به نظر می رسد دُز مؤثر داروی آیمود برای کاهش میزان نیتریک اکساید، در محدوده رقتی ۱/۸۰۰ تا ۱/۲۰۰۰ می باشد. نکته دیگر این است که در رقتهای پایین تر داروی آیمود (۱/۵۰۰-۱/۵۰)، نه تنها خاصیت ضد التهابی دیده نشد بلکه به نظر می رسد این رقتها دارای اثر توکسیک بر سلولهای میکروگلیا بوده، به طوری که در این رقتها میزان بقای سلولها حداقل بوده است و تشکیل

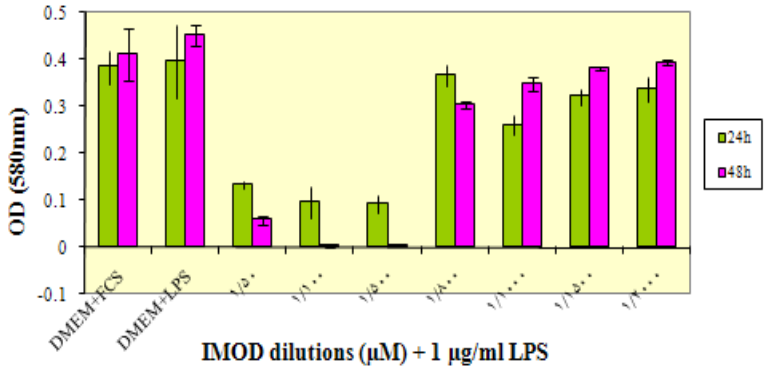
Archive of SID

www.SID.ir

کریستالهای فارمازون منفی و یا بسیار کم گزارش شده است (نمودار۳).



نمودار۲- سنجش میزان نیتریک اکساید تولید شده توسط سلولهای میکروگلیا تیمار شده با LPS و داروی آیمود، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار. آنالیز آماری با استفاده از ANOVA جهت مقایسه بین نمونه LPS دار و نمونه های تیمار شده با آیمود انجام گرفت.(*P<0/05*)



نمودار ۳ – سنجش فعالیت متابولیکی سلولهای میکروگلیا تیمار شده با LPS و داروی آیمود توسط تست MTT ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار. آنالیز آماری با استفاده از ANOVA جهت مقایسه بین نمونه LPS دار و نمونه های تیمار شده با آیمود انجام گرفت.(*P<0/05*)

مطالعات مختلف محققان نشان داده است که محصولات باکتریایی و ویروسی قادر به تحریک سلولهای میکروگلیا می باشند به طوری که منجر به تغییر شکل این سلولها از حالت استراحت به شکل فعال شده (۱۵) که این مسئله با استفاده از لیپو پلی ساکارید باکتریایی در این پروژه نیز اثبات شد که تأیید کننده نتایج به دست آمده از مطالعات سایر دانشمندان می باشد. بررسیها نشان داده است که یکی از مهم ترین عوامل دخیل در پاسخهای التهابی، فاکتور هسته ای NF-κB است که در تنظیم بیان ژن iNOS دخیل می باشد و بسیاری ازعوامل تحریک کننده سلولهای میکروگلیا همچون LPS با راه اندازی آبشار سیگنالی MAPKs و تأثیر بر فاکتور هسته ای NF-κB ، منجر به راه اندازی پاسخهای التهابی می شوند(۶ و ۱۷). فرضیه در این تحقیق این است که احتمالاً داروی آیمود با مهار این مسیر سیگنالی، خصوصاً فاکتور NF-κB ، از بیان ژن iNOS و در نتیجه تولید نیتریک اکساید جلوگیری می نماید.

www.SID.ir

با توجه به گسترش روز افزون استفاده ازداروهای ضد التهاب سنتتیک و عوارض بی شمار ناشی از مصرف آنها، جایگزین کردن داروهای گیاهی که بتواند التهاب را از بین برده یا به حداقل کاهش دهد ، هدف درمانی موثری با حداقل اثرات جانبی سوء خواهد بود. تحقیقات انجام شده نشان می دهد آیمود به عنوان یک داروی گیاهی ضد التهاب(۱۰ و ۱۳)، می تواند هم در افراد سالم و هم در افراد مبتلا به ویروس ایدز استفاده شود. بنابراین با توجه به نتایج سایر محققان ونیز پروژه انجام شده، به نظر می رسد استفاده از داروی آیمود به عنوان یک داروی گیاهی ضد التهاب می تواند در جهت کنترل بیماریهای نورودژنراتیو موثر واقع گردد.

تشکر و قدردانی

باسپاس از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری که بودجه لازم برای انجام این پروژه را از محل طرح ۳۱۳ تأمین نمودند.

منابع

۱ – علیزاده، مریم و همکاران، ۱۳۸۸. تاثیر شیکونین، داروی گیاهی مورد استفاده در آسیای شرق، بر فعالیت و آپوپتوز سلولهای ملتهب میکروگلیا در in vitro. مجله زیست شناسی ایران، جلد ۲۲، صفحات ۳۱۱-۳۰۰

2. Azonov JA. Et al, (2008). Protective effects of setarud (IMODTM) on development of diet-induced hypercholesterolemia in rabbits. DARU Vol. 16, No. 4, p. 218-222.
3. Garden, G. and T. Möller, 2006. *Microglia Biology in Health and Disease.* Journal of Neuroimmune Pharmacology, **1**(2): p. 127-137.
4. Gibbons, H.M. and M. Dragunow, 2006. *Microglia induce neural cell death via a proximity-dependent mechanism involving nitric oxide.* Brain Research, 1084(1): p. 1-15.
5. Giulian, D. and T.J. Baker, 1986. *Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain*. The journal of neuroscience Vol. 6. 2163-2178.
6. Glezer, I., A.R. Simard, and S. Rivest, 2007. *Neuroprotective role of the innate immune system by microglia.* Neuroscience, 147(4): p. 867-883.
7. Harry, G.J. and A.D. Kraft, 2008. *Neuroinflammation and microglia: considerations and approaches for neurotoxicity assessment.* Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, 4(10): p. 1265-1277.
8. Jones, E., et al. 2007. *Modulation of LPS stimulated NF-kappaB mediated Nitric Oxide production by PKCε and JAK2 in RAW macrophages.* Journal of Inflammation, 4(1): p. 1-9.
9. Kaneko, Y.S., et al. 2009. *Lipopolysaccharide extends the lifespan of mouse primary-cultured microglia.* Brain Research, 1279: p. 9-20.
10. Khairandish P., Mohraz M., Farzamfar B., Abdollahi M., Shahhosseiny MH., Madani H., Sadeghi B., Heshmat R., Gharibdoust F., Khorram-Khorshid HR. 2009. Preclinical and phase 1 clinical safety of Setarud (IMOD™), a novel immunomodulator1. DARU Vol. 17, No. 3.p. 148-156.
11. Mahmoodpoor A. Et al. 2010.Examination of Setarud (IMOD™) in the management of patients with severe sepsis**.** DARU Vol. 18, No. 1, p. 23-28.
12. Mayo, L., et al. 2008. *Dual Role of CD38 in Microglial Activation and Activation- Induced Cell Death.* The Journal of Immunology, 181(1): p. 92-103.
13. Mohraz M., Khairandish P., Kazerooni PA., Davarpanah MA., Shahhosseiny MH., Mahdavian B., Vaziry S., Shahriary S., Kamali K., Khorram Khorshid HR., Heshmat R., Farhadi M., Gharibdoust F. 2009. A clinical trial on the efficacy of IMOD in AIDS patients. DARU Vol. 17, No. 4.p. 277-284.
14. Moncada, S. and J.P. Bolaños, 2006. *Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration.* Journal of Neurochemistry, 97(6): p. 1676-1689.
15. Pålsson-McDermott, E.M. and L.A.J. O'Neill, 2004. *Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4.* Immunology, 113 :(۲)p. 153-162.
16. Saura, J., J.M. Tusell, and J. Serratosa, 2003. *High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization.* Glia, 44(3): p. 183-189.
17. Tak, P.P. and G.S. Firestein, 2001. *NF-κB: a key role in inflammatory diseases.* The Journal of Clinical Investigation, 107(1): p. 7-11.

Archive of SID
www.SID.ir

The effect of herbal drug (IMOD) on the amount of nitric oxide production in activated microglial cells

Amiraslani B.[1,2], Sabouni F.[1], Abbasi Sh.S.[1], Mirrazavi M.[1,2], Nazem H.[2], Khoramkhorshid H.[3] and Sabet M.[4]

[1] National Institute of Genetic Engineering & Biotechnology.Tehran, I.R. of Iran

[2] Payam e Noor University, Tehran, I.R. of Iran

[3] Genetic Research Center, Social Welfare and Rehabilitation Sciences University, Tehran, I.R. of Iran

[4] Plant Breeding and Agronomy Dept., Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, I.R. of Iran

Abstract

Microglial cells are the smallest glial cells in the central nervous system (CNS) which, as brain macrophages have an important role in regulation of innate immunity. Quick phenotypic changes of these cells from quiescent state to activated shape and secretion of diffusible factors, show their unique ability in response to inflammatory stimuli. Nitric oxide (NO), a free radical, is one of the molecules which produce by activated microglial cells and have a pivotal role in progression of neurodegenerative disorders like Parkinson Disease (PD) and Alzheimer Disease (AD). Therefore, Restrain the overactivation of microglial cells, is a chief strategy to decrease neurotoxic damages which threat central nervous system. In this research we investigate the ability of "IMOD" as an herbal drug, to decrease the bacterial lipopolysaccharide (LPS) - induced NO production in newborn rat brains. The production of NO was assessed by Griess assay whilst the cell viability was determined by MTT assay. Results show that high dilutions of this drug have an anti-inflammatory effect on microglial cells, which is able to decrease the amount of produced NO in these cells. With these results we can use IMOD to decrease neurological damages in neurodegenerative disorders due to microglial activation.

Keywords: Microglia, Nitric oxide, LPS, Neurodegenerative disorders, IMOD

Archive of SID

www.SID.ir