

بررسی اثر محافظتی توپیرامات بر مرگ عصبی ناشی از ۶- هیدروکسی دوپامین در مدل سلولی بیماری پارکینسون

فهیمة فلاح^{۲،۱} (M.Sc)، آزاده امین زاده^{۳،۲*} (Ph.D)

۱- کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

۲- گروه فارماکولوژی و سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

۳- مرکز تحقیقات فارماسوتیکس، پژوهشکده نوروفارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۴-۳۱۳۲۵۲۴۲ a.aminzadeh@kmu.ac.ir تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۲/۱۴

چکیده

هدف: بیماری پارکینسون یک اختلال نورودژنراتیو شایع است که با اختلال عملکرد پیش رونده عصبی مشخص می شود. شواهد زیادی نشان می دهند که استرس اکسیداتیو نقش مهمی در پاتوژنز بیماری پارکینسون دارد. در مطالعه حاضر اثر محافظتی توپیرامات بر استرس اکسیداتیو و آپوپتوز ناشی از ۶- هیدروکسی دوپامین در سلول های PC12 بررسی شده است.

مواد و روش ها: سلول های PC12 به مدت ۲۴ ساعت با توپیرامات درمان شدند. سپس سلول ها به مدت ۲۴ ساعت در معرض ۶- هیدروکسی دوپامین با غلظت ۷۵ میکرومولار قرار گرفتند. زنده ماندی سلولی توسط ۳- (۴،۵) - دی متیل ۲- تیا زولیل) ۵،۲ دی فنیل ۲- تترازولیوم (تست MTT) مورد بررسی قرار گرفت. سطح گروه های فعال اکسیژن (ROS) با ۲،۷ دی کلو دی هیدروفلورسین دی استات (DCF-DA) ارزیابی شد. میزان پراکسیداسیون لیپیدی و قدرت آنتی اکسیدانی تام نیز اندازه گیری شد.

یافته ها: توپیرامات در غلظت ۸ میکرومولار زنده ماندی سلول هایی که در معرض ۶- هیدروکسی دوپامین قرار گرفتند افزایش داد. در مقایسه با گروه کنترل، ۶- هیدروکسی دوپامین سبب کاهش حیات سلولی شد و این اثر توسط توپیرامات معکوس شد. توپیرامات هم چنین باعث کاهش میزان ROS و پراکسیداسیون لیپیدی شد. علاوه بر این، توپیرامات به طور قابل توجهی قدرت آنتی اکسیدانی تام را در سلول های درمان شده با ۶- هیدروکسی دوپامین افزایش داد.

نتیجه گیری: یافته های این مطالعه نشان داد که توپیرامات از طریق فعالیت آنتی اکسیدانی، سلول های PC12 را از سمیت عصبی ناشی از ۶- هیدروکسی دوپامین محافظت می کند.

واژه های کلیدی: ۶- هیدروکسی دوپامین، استرس اکسیداتیو، بیماری پارکینسون، توپیرامات، سلول های PC12

مقدمه

شناخت داروهای جدید و درمان هایی به منظور جلوگیری و درمان بیماری پارکینسون بسیار اهمیت دارد [۲]. در مدل های سلولی و حیوانی، به منظور شناسایی پاتوژنز بیماری پارکینسون عمدتاً از نوروتوکسین ها استفاده می شود [۳]. ۶- هیدروکسی دوپامین یکی از نوروتوکسین هایی است که معمولاً در تحقیقات استفاده می شود. ۶- هیدروکسی دوپامین که با دوپامین و نوراپی نفرین شباهت ساختاری دارد به صورت انتخابی توسط نورون های کاتکولامینرژیک برداشت می شود و باعث آسیب و مرگ آن ها می شود [۴].

۶- هیدروکسی دوپامین از دو مسیر سبب سمیت عصبی می شود که عبارتند از تولید رادیکال های آزاد و یا مسدود کردن زنجیره تنفسی میتوکندریایی [۵]. هر دو مسیر منجر به شکل گیری

بیماری پارکینسون یک اختلال مزمن و پیش رونده عصبی است که با از دست دادن غیر قابل برگشت نورون های دوپامینرژیک در جسم سیاه (Substantia Nigra) مشخص می شود [۱]. شواهد زیادی نشان می دهند که افزایش استرس اکسیداتیو و پاسخ التهابی در مراحل پیشرفت بیماری رخ می دهند و این فرایندها موجب تشدید دژنراسیون نیگرواستریاتال می شوند. در حال حاضر هیچ درمان استاندارد برای توقف یا کند کردن بیماری پارکینسون وجود ندارد. امروزه درمان هایی که وجود دارند بر اساس علائم فردی هر بیمار است. درمان علامتی، از تخریب نورون های دوپامینرژیک جلوگیری نمی نماید. بنابراین

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع تجربی بوده و پس از دریافت کد اخلاق IR.KMU.REC.1396.2142 انجام شد. گروه‌های مورد آزمایش در این مطالعه عبارتند از: ۱- گروه کنترل، ۲- گروه ۶- هیدروکسی دوپامین (Sigma, USA)، ۳- گروه ۶- هیدروکسی دوپامین به علاوه توپیرامات (Sigma, USA) با غلظت $1 \mu\text{M}$ ، ۴- گروه ۶- هیدروکسی دوپامین به علاوه توپیرامات با غلظت $2 \mu\text{M}$ ، ۵- گروه ۶- هیدروکسی دوپامین به علاوه توپیرامات با غلظت $4 \mu\text{M}$ ، ۶- گروه ۶- هیدروکسی دوپامین به علاوه توپیرامات با غلظت $8 \mu\text{M}$.

سلول‌های استفاده شده در این مطالعه رده سلولی PC12 می‌باشند که از انستیتوی پاستور خریداری شدند. این سلول‌ها در محیط کشت DMEM (Gibco, USA) حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی، ۱۰٪ سرم اسبی، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵٪ CO_2 و ۹۵٪ O_2 کشت داده شدند. محیط کشت سلول‌ها هر ۴۸ ساعت تعویض می‌شد.

میزان حیات سلولی به روش MTT اندازه‌گیری شد. در این روش ابتدا تعداد ۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید سپس سلول‌ها با غلظت‌های مختلف توپیرامات (۱، ۲، ۴ و ۸ میکرومولار) به مدت ۲۴ ساعت تیمار شده و به مدت ۲۴ ساعت در معرض ۶ هیدروکسی دوپامین با غلظت ۷۵ میکرومولار قرار گرفتند. سپس ۱۰ میکرولیتر محلول MTT (Sigma, USA) به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه شد و به مدت ۲-۴ ساعت در انکوباتور 37°C قرار گرفتند. سپس محیط داخل چاهک‌ها خالی گردید و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر کدام اضافه شد و در نهایت جذب نوری آن به وسیله الیزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

برای تعیین سطح داخل سلولی ROS از ۲،۷ دی کلرو دی هیدروفلورسین دی استات (DCF-DA) استفاده شد. سلول‌ها در پلیت ۲۴ خانه‌ای کشت داده شدند. این سلول‌ها پس از چسبیدن به کف چاهک و زمانی که تراکم سلولی به ۷۰٪ رسید با توپیرامات پیرانکوبه شدند و سپس در معرض ۶- هیدروکسی دوپامین قرار گرفتند. سپس محیط داخل چاهک‌ها خالی گردید و سلول‌ها دو مرتبه با PBS شسته شدند و به مدت ۳۰ دقیقه با DCF-DA (Sigma, USA) انکوبه شدند و سپس دو مرتبه با PBS شسته شدند. اندازه‌گیری میزان فلورسینس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با استفاده از excitation 485/20 و emission 528/20 توسط الیزا ریدر انجام شد.

گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و افزایش استرس اکسیداتیو می‌شوند و در نهایت منجر به نوروکسیسیتی و از بین رفتن نورون‌های دوپامینرژیک در جسم سیاه می‌شوند [۶]. ۶- هیدروکسی دوپامین می‌تواند توسط ترانسپورترهای دوپامین وارد اعصاب شود و کمپلکس‌های I و IV زنجیره انتقال الکترون میتوکندریایی را مهار نماید و باعث آسیب عصبی ناشی از ROS شود. بنابراین ۶- هیدروکسی دوپامین سمیتی شبیه به شرایط پاتولوژیک در بیماری پارکینسون ایجاد می‌کند [۷،۸].

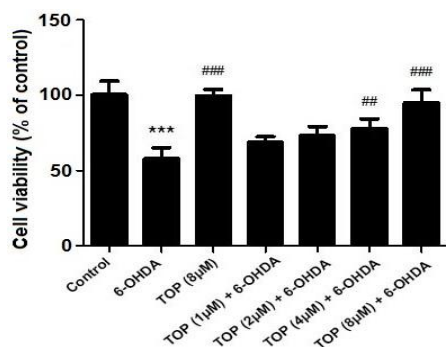
توپیرامات یک داروی ضد صرع است که امروزه به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد و انواع مختلف تشنج را کنترل می‌کند. مطالعات نشان دادند که توپیرامات اثرات نوروپروتکتیو دارد این اثرات شامل بهبود اختلالات عصبی، کاهش ادم مغزی و کاهش حجم انفارکتوس در مدل سکنه مغزی می‌باشد [۹-۱۱]. در مطالعه دیگری نشان داده شد که توپیرامات سلول‌های آستروسیت را از سمیت عصبی ناشی از گلوتامات و کینات محافظت می‌نماید [۱۲]. تحقیقات بالینی هم‌چنین نشان دادند که توپیرامات در بیماران مبتلا به صرع مزمن می‌تواند اثرات محافظتی بر عملکرد شناختی داشته باشد. توپیرامات در بیماری هیپوکسی- ایسکمی سیستم عصبی مرکزی، اثرات نوروپروتکتیو دارد و از آپوپتوز هیپوکامپ جلوگیری می‌کند [۱۳].

به علاوه، مطالعات *in vivo* و *in vitro* نشان دادند که توپیرامات سلول‌های پریسیت را از استرس اکسیداتیو و آپوپتوز ناشی از هیپرگلیسمی محافظت می‌کند [۱۴-۱۶]. هم‌چنین توپیرامات در مدل آسیب مغزی ناشی از خونریزی ساب آراکنوئید، از طریق کاهش التهاب و مرگ سلول‌های عصبی اثرات نوروپروتکتیو دارد [۱۷]. هم‌چنین مطالعه‌ای نشان داد که در موش سوری، توپیرامات مغز را از آسیب ناشی از دیابت محافظت می‌کند [۱۶].

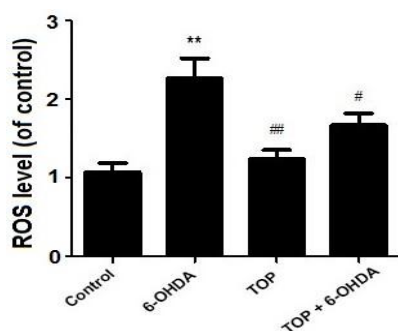
سلول‌های PC12 سوبستراهای داخل سلولی برای سنتز، متابولیسم و انتقال دوپامین دارند [۱۸]. مرگ سلولی ایجاد شده توسط ۶- هیدروکسی دوپامین در سلول‌های PC12، به عنوان یک مدل *in vitro* برای مطالعه بیماری پارکینسون استفاده شده است [۱۹].

نظر به اثرات ذکر شده فوق و با توجه به این‌که تاکنون مطالعه‌ای جهت بررسی اثر توپیرامات در مدل سلولی بیماری پارکینسون انجام نشده است، لذا در این مطالعه، اثرات نوروپروتکتیو توپیرامات بر مرگ سلولی ایجاد شده توسط ۶- هیدروکسی دوپامین در سلول‌های PC12 مورد بررسی و ارزیابی قرار می‌گیرد.

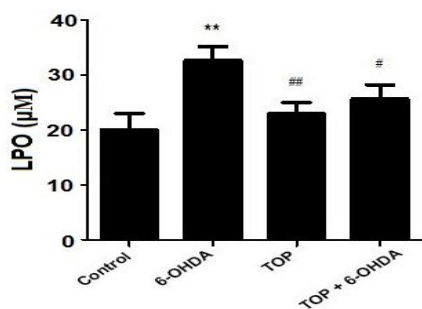
نتایج حاصل از اندازه‌گیری قدرت آنتی‌اکسیدانی تام نشان داد که در گروه ۶- هیدروکسی دوپامین در مقایسه با گروه کنترل، قدرت آنتی‌اکسیدانی تام به میزان معنی‌داری کاهش یافت. همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است توپیرامات در مقایسه با گروه ۶- هیدروکسی دوپامین به میزان معنی‌داری باعث افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانی تام شده است ($P < 0.05$).



شکل ۱. مقایسه اثرات غلظت‌های مختلف توپیرامات (۸-۱ میکرو مولار) بر سمیت عصبی ناشی از ۶- هیدروکسی دوپامین در سلول‌های PC12. زنده مانی سلولی بوسیله روش MTT اندازه‌گیری شد. نتایج بصورت $mean \pm SD$ نشان داده شده‌اند. $P < 0.001$ با گروه کنترل مقایسه شد. $P < 0.001$, $###P < 0.001$ با گروه ۶- هیدروکسی دوپامین مقایسه شدند.



شکل ۲. اثرات توپیرامات بر تولید ROS ناشی از ۶- هیدروکسی دوپامین. نتایج بصورت $mean \pm SD$ نشان داده شده‌اند. $P < 0.01$ با گروه کنترل مقایسه شد. $P < 0.05$, $#P < 0.01$ با گروه ۶- هیدروکسی دوپامین مقایسه شدند.



شکل ۳. اثرات توپیرامات بر افزایش پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از ۶- هیدروکسی دوپامین. نتایج بصورت $mean \pm SD$ نشان داده شده‌اند. $P < 0.01$ با گروه کنترل مقایسه شد. $P < 0.05$, $#P < 0.01$ با گروه ۶- هیدروکسی دوپامین مقایسه شدند.

سلول‌ها در فلاسک 25 cm^2 کشت داده شدند و بعد از گذراندن زمان ۲۴ ساعت با توپیرامات پراکسیداسیون شده و سپس در معرض ۶- هیدروکسی دوپامین قرار گرفتند. سپس مایع رویی آن‌ها برداشته شد و پس از سانتریفیوژ با دور 1200 g و به مدت ۶ دقیقه تا انجام آزمایش‌های اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپیدی و قدرت آنتی‌اکسیدانی تام در دمای 80°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

میزان مالون دی‌آلدئید به عنوان شاخصی از وضعیت استرس اکسیداتیو بر لیپیدها مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. در این روش مالون دی‌آلدئید با تیوباربیتوریک اسید در شرایط اسیدی و دمای بالا تشکیل پیوند می‌دهد و کمپلکس رنگی تشکیل می‌دهد. کمپلکس تشکیل شده در طول موج 532 نانومتر دارای حداکثر جذب است.

قدرت آنتی‌اکسیدانی تام با استفاده از روش FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) اندازه‌گیری شد. اساس این روش، توانایی احیاکنندگی یون‌های فریک و تبدیل آن‌ها به یون‌های فرو در شرایط اسیدی و در حضور ماده‌ای به نام تری‌پیریدیل تری آزین (Sigma, USA) می‌باشد. در این واکنش، کمپلکس آبی رنگ تشکیل می‌شود که در طول موج 593 نانومتر دارای حداکثر جذب است.

آنالیز آماری

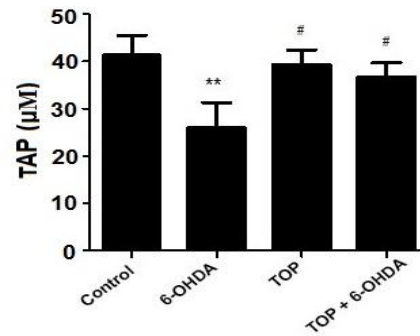
داده‌های جمع‌آوری شده به صورت $mean \pm SD$ گزارش شده‌اند و با آزمون آماری two-way ANOVA و با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شد، ۶- هیدروکسی دوپامین به طور معنی‌داری باعث القای مرگ سلولی شده است ($P < 0.001$) پراکسیداسیون با توپیرامات به صورت وابسته به غلظت، توانست از آسیب سلولی ناشی از ۶- هیدروکسی دوپامین جلوگیری نماید. غلظت ۸ میکرو مولار توپیرامات برای این مطالعه انتخاب شد ($P < 0.001$).

همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، ۶- هیدروکسی دوپامین سبب افزایش ROS شده است و توپیرامات به طور معنی‌داری از افزایش ROS جلوگیری می‌کند ($P < 0.05$).

۶- هیدروکسی دوپامین سبب افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدی شده است همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است توپیرامات در مقایسه با گروه ۶- هیدروکسی دوپامین به میزان معنی‌داری از افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدی جلوگیری می‌نماید ($P < 0.05$).



شکل ۴. اثرات توپیرامات بر کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام ناشی از ۶-هیدروکسی دوپامین. نتایج بصورت $\text{mean} \pm \text{SD}$ نشان داده شده اند. $P < 0.01$ با گروه کنترل مقایسه شد. $\#P < 0.05$ با گروه ۶-هیدروکسی دوپامین مقایسه شد.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که مواجهه سلول‌های PC12 با ۶-هیدروکسی دوپامین به طور معنی‌داری سبب کاهش زنده‌مانی سلولی، افزایش سطح داخل سلولی ROS و القا آپوپتوز شده است و درمان سلول‌ها با توپیرامات توانسته به طور معنی‌داری از این تغییرات جلوگیری نماید که پیشنهاد می‌کند توپیرامات، سلول‌های PC12 را از آپوپتوز ناشی از ۶-هیدروکسی دوپامین محافظت می‌کند.

۶-هیدروکسی دوپامین یک نوروتوکسین انتخابی است که به طور گسترده برای ایجاد مدل پارکینسون در مطالعات *in vitro* و *in vivo* استفاده شده است [۲۰-۲۲]. ۶-هیدروکسی دوپامین از طریق اتواکسیداسیون سبب تولید داخل سلولی ROS می‌شود [۲۳-۲۵]. شواهد نشان می‌دهند که اتواکسیداسیون از طریق موادی مانند پراکسید هیدروژن، رادیکال‌های ناشی از اکسیژن و کینون‌ها اتفاق می‌افتد و نقش مهمی در سمیت سلولی ناشی از ۶-هیدروکسی دوپامین ایفا می‌کند [۲۰]. ۶-هیدروکسی دوپامین از طریق مهار مستقیم کمپلکس‌های I و IV زنجیره انتقال الکترون میتوکندریایی و یا دامیناسیون آنزیمی از طریق منوآمین اکسیداز سبب تولید داخل سلولی ROS می‌شود [۲۶]. تولید داخل سلولی ROS، فسفوریلاسیون Akt را مهار می‌کند و فسفوریلاسیون p38 را افزایش می‌دهد که باعث فعال شدن کاسپاز ۹ و کاسپاز ۳ می‌شود و سرانجام منجر به آپوپتوز سلول می‌شود [۲۳، ۲۷، ۲۸]. بنابراین ROS نقش مهمی در آپوپتوز ایجاد شده توسط ۶-هیدروکسی دوپامین دارد [۲۹].

نتایج ما نشان داد برانکو باسیون با توپیرامات از مرگ سلولی ناشی از ۶-هیدروکسی دوپامین جلوگیری می‌نماید. در توافق با یافته ما در مطالعه‌ای نشان داده شد که در سلول‌های هیپوکامپ موش صحرایی، توپیرامات اثرات نوروپروتکتیو دارد و از طریق افزایش فاکتور نوروتروفیک مشتق شده از مغز (BDNF) و کیناز تنظیم شده با پیام‌های خارج سلولی (ERK)، نوروهای

هیپوکامپ را از مرگ سلولی القا شده توسط گلوتامات محافظت می‌کند [۳۰].

مطالعات نشان می‌دهد هنگامی که تعادل بین ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی و رادیکال‌های آزاد بر هم خورد، به نحوی که سبب تخلیه و کمبود ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی و یا تراکم زیاد گونه‌های فعال اکسیژن شود، استرس اکسیداتیو افزایش می‌یابد. استرس اکسیداتیو می‌تواند باعث جهش DNA، پراکسیداسیون لیپیدی و اکسیداسیون پروتئین‌ها شود [۳۱، ۳۲]. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پس از مواجهه سلول‌های PC12 با ۶-هیدروکسی دوپامین، سطح داخل سلولی ROS به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد. با این حال داروی توپیرامات توانست سطح داخل سلولی ROS را کاهش دهد. در توافق با یافته ما مطالعه‌ای نشان داد که در موش صحرایی، توپیرامات و سلنیم از طریق مهار تولید رادیکال‌های آزاد، تنظیم فرایندهای وابسته به کلسیم و تقویت سیستم ردوکس آنتی‌اکسیدانی اثرات محافظتی بر آسیب مغزی ناشی از پنتیلن ترازول دارند [۳۳]. هم‌چنین مطالعه‌ی دیگری نشان داد که در مدل آسیب ریوی ناشی از ایسکمی-رپر فیوژن در موش صحرایی، توپیرامات از طریق کاهش سطح ROS و کاهش آزادسازی سیتوکین‌های التهابی از پیشرفت آسیب ریوی جلوگیری می‌کند [۳۴].

مالون دی‌آلدئید یکی از فراورده‌های نهایی پراکسیداسیون لیپیدی محسوب می‌شود و در مطالعات به عنوان مشخصه پراکسیداسیون لیپیدی در نظر گرفته می‌شود. نتایج این مطالعه نشان داد که ۶-هیدروکسی دوپامین، میزان پراکسیداسیون لیپیدی را افزایش داده است و توپیرامات به طور معنی‌داری توانست از افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدی جلوگیری کند. این نتایج با مطالعات گذشته که نشان دادند توپیرامات اثرات نوروپروتکتیو بر نوروتوکسیسیته ناشی از متیل فنیدات در موش صحرایی دارد و پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش می‌دهد هم‌خوانی دارد [۳۵].

سیستم دفاع آنتی‌اکسیدان آنزیمی شامل گلوکاتایون پراکسیداز، سوپراکساید دیسموتاز و کاتالاز به عنوان اولین سد دفاعی سلول در برابر آسیب رادیکال‌های آزاد در شرایط استرس اکسیداتیو می‌باشند که می‌توانند رادیکال‌های آزاد را از بین برده و اثرات آن‌ها را خنثی کنند [۳۱]. نتایج این مطالعه نشان داد که توپیرامات توانسته به طور معنی‌داری ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی تام را در گروه ۶-هیدروکسی دوپامین افزایش دهد. در توافق با یافته ما در مطالعه‌ای نشان داده شد که در هیپوکامپ موش صحرایی، توپیرامات از طریق افزایش BDNF و پروتئین متصل شونده به جزء پاسخ‌دهنده به آدنوزین منوفسفات حلقوی (CREB) اثر محافظتی بر آپوپتوز و استرس اکسیداتیو ناشی از متیل فنیدات

hyperglycemia-induced oxidative damage in diabetic mice. *Endocrinology* 2012; 153: 362-372.

[15] Shah GN, Price TO, Banks WA, Morofuji Y, Kovac A, Ercal N, et al. Pharmacological inhibition of mitochondrial carbonic anhydrases protects mouse cerebral pericytes from high glucose-induced oxidative stress and apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther* 2013; 344: 637-645.

[16] Price TO, Farr SA, Niehoff ML, Ercal N, Morley JE, Shah GN. Protective effect of topiramate on hyperglycemia-induced cerebral oxidative stress, pericyte loss and learning behavior in diabetic mice. *Int Libr Diabetes Metab* 2015; 1: 6-12.

[17] Tian Y, Guo SX, Li JR, Du HG, Wang CH, Zhang JM, et al. Topiramate attenuates early brain injury following subarachnoid haemorrhage in rats via duplex protection against inflammation and neuronal cell death. *Brain Res* 2015; 1622: 174-185.

[18] Feng L, Meng H, Wu F, Cheng B, He X, Wang X, et al. Olfactory ensheathing cells conditioned medium prevented apoptosis induced by 6-OHDA in PC12 cells through modulation of intrinsic apoptotic pathways. *Int J Dev Neurosci* 2008; 26: 323-329.

[19] Walkinshaw G, Waters C. Neurotoxin-induced cell death in neuronal PC12 cells is mediated by induction of apoptosis. *Neuroscience* 1994; 63: 975-987.

[20] Saito Y, Nishio K, Ogawa Y, Kinumi T, Yoshida Y, Masuo Y, et al. Molecular mechanisms of 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity in PC12 cells: involvement of hydrogen peroxide-dependent and-independent action. *Free Radic Biol Med* 2007; 42: 675-685.

[21] Tamadoni M, Haji ghasem kashani M, Ghorbanian M, Abrari K, Arashpour R. Neuroprotective effects of carnosic acid on the hippocampus of 6-hydroxydopamine injured rats. *Koomesh* 2014; 15: 232-241. (Persian).

[22] Safari M, Badban L, Sameni H, Bandegi A, Rashidypour A, Vafaei A. Comparison the protective effects of aqueous extract of Iranian propolis in 6-hydroxydopamine-induced model of parkinsonism in male rat with L-DOPA: A behavioral and histological evaluation. *Koomesh* 2014; 15: 584-591. (Persian).

[23] Fujita H, Ogino T, Kobuchi H, Fujiwara T, Yano H, Akiyama J, et al. Cell-permeable cAMP analog suppresses 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells through the activation of the Akt pathway. *Brain Res* 2006; 1113: 10-23.

[24] Padiglia A, Medda R, Lorrain A, Biggio G, Sanna E, Floris G. Modulation of 6-hydroxydopamine oxidation by various proteins. *Biochem Pharmacol* 1997; 53: 1065-1068.

[25] Yamada K, Umegaki H, Maezawa I, Iguchi A, Kameyama T, Nabeshima T. Possible involvement of catalase in the protective effect of interleukin-6 against 6-hydroxydopamine toxicity in PC12 cells. *Brain Res Bull* 1997; 43: 573-577.

[26] Nie G, Jin C, Cao Y, Shen S, Zhao B. Distinct effects of tea catechins on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells. *Arch Biochem Biophys* 2002; 397: 84-90.

[27] Aminzadeh A, Mehrzadi S. Melatonin attenuates homocysteine-induced injury in human umbilical vein endothelial cells. *Fundam Clin Pharmacol* 2018; 32: 261-269.

[28] Aminzadeh A, Mehrzadi S. Cardioprotective effect of levosimendan against homocysteine-induced mitochondrial stress and apoptotic cell death in H9C2. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 507: 395-399.

[29] Tian LL, Wang XJ, Sun YN, Li CR, Xing YL, Zhao HB, et al. Salvianolic acid B, an antioxidant from *Salvia miltiorrhiza*, prevents 6-hydroxydopamine induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 409-422.

[30] Mao XY, Cao YG, Ji Z, Zhou HH, Liu ZQ, Sun HL. Topiramate protects against glutamate excitotoxicity via activating BDNF/TrkB-dependent ERK pathway in rodent hippocampal neurons. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 2015; 60: 11-17.

[31] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.

[32] Aminzadeh A, Salarinejad A. Citicoline protects against lead-induced oxidative injury in neuronal PC12 cells. *Biochem Cell Biol* 2019.

[33] Nazirolu M, Kutluhan S, Yilmaz M. Selenium and topiramate modulates brain microsomal oxidative stress values, Ca²⁺-ATPase activity, and EEG records in pentylenetetrazol-induced seizures in rats. *J Membr Biol* 2008; 225: 39-49.

دارد و هم‌چنین فعالیت سوپراکساید دیسموتاز و گلوکوتائون پراکسیداز را افزایش می‌دهد [۳۶].

در مجموع نتایج این مطالعه نشان داد که ۶-هیدروکسی دوپامین سبب استرس اکسیداتیو و آپوپتوز در سلول‌های PC12 شده است و توپیرامات از طریق کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدی، افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام و مهار استرس اکسیداتیو اثر محافظتی بر نوروتوکسیسیته ناشی از ۶-هیدروکسی دوپامین در این سلول‌ها دارد. البته پیشنهاد می‌شود اثرات درمانی توپیرامات در مدل‌های حیوانی بررسی شود و هم‌چنین مکانیسم‌های سلولی و مولکولی دخیل در عملکرد فارماکولوژیکی آن در مطالعات بعدی مشخص گردند.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کرمان بابت حمایت‌های مالی از این طرح، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

- [1] Dexter DT, Jenner P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radic Biol Med* 2013; 62: 132-144.
- [2] Taylor JM, Main BS, Crack PJ. Neuroinflammation and oxidative stress: co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease. *Neurochem Int* 2013; 62: 803-819.
- [3] Bové J, Prou D, Perier C, Przedborski S. Toxin-induced models of Parkinson's disease. *Neuro Rx* 2005; 2: 484-494.
- [4] Ryu EJ, Angelastro JM, Greene LA. Analysis of gene expression changes in a cellular model of Parkinson disease. *Neurobiol Dis* 2005; 18: 54-74.
- [5] Rodriguez-Pallares J, Parga J, Munoz A, Rey P, Guerra M, Labandeira-Garcia J. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity: the role of NADPH oxidase and microglial activation in 6-hydroxydopamine-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J Neurochem* 2007; 103: 145-156.
- [6] Tang SY, Whiteman M, Peng ZF, Jenner A, Yong EL, Halliwell B. Characterization of antioxidant and antiglycation properties and isolation of active ingredients from traditional Chinese medicines. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 1575-1587.
- [7] Paradies G, Petrosillo G, Paradies V, Ruggiero FM. Mitochondrial dysfunction in brain aging: role of oxidative stress and cardiolipin. *Neurochem Int* 2011; 58: 447-457.
- [8] Simola N, Morelli M, Carta AR. The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotox Res* 2007; 11: 151-167.
- [9] Liu Y, Barks JD, Xu G, Silverstein FS. Topiramate extends the therapeutic window for hypothermia-mediated neuroprotection after stroke in neonatal rats. *Stroke* 2004; 35: 1460-1465.
- [10] Edmonds HL Jr, Jiang YD, Zhang PY, Shank R. Topiramate as a neuroprotectant in a rat model of global ischemia-induced neurodegeneration. *Life Sci* 2001; 69: 2265-2277.
- [11] Lee SR, Kim SP, Kim JE. Protective effect of topiramate against hippocampal neuronal damage after global ischemia in the gerbils. *Neurosci Lett* 2000; 281: 183-186.
- [12] Angehagen M, Ben-Menachem E, Rönnbäck L, Hansson E. Topiramate protects against glutamate- and kainate-induced neurotoxicity in primary neuronal-astroglial cultures. *Epilepsy Res* 2003; 54: 63-71.
- [13] Kurul S, Yiş U, Kumral A, Tuğyan K, Cilaker S, Kolatan E, et al. Protective effects of topiramate against hyperoxic brain injury in the developing brain. *Neuropediatrics* 2009; 40: 22-27.
- [14] Price TO, Eranki V, Banks WA, Ercal N, Shah GN. Topiramate treatment protects blood-brain barrier pericytes from

[36] Motaghinejad M, Motevalian M, Babalouei F, Abdollahi M, Heidari M, Madjd Z. Possible involvement of CREB/BDNF signaling pathway in neuroprotective effects of topiramate against methylphenidate induced apoptosis, oxidative stress and inflammation in isolated hippocampus of rats: molecular, biochemical and histological evidences. *Brain Res Bull* 2017; 132: 82-98.

[34] Kurt A, Kalkan Y, Turut H, Cure MC, Tumkaya L, Cure E. Topiramate reduces aortic cross clamping-induced lung injury in male rats. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2018; 61: 144-149.

[35] Motaghinejad M, Motevalian M, Fatima S, Beiranvand T, Mozaffari S. Topiramate via NMDA, AMPA/kainate, GABAA and Alpha2 receptors and by modulation of CREB/BDNF and Akt/GSK3 signaling pathway exerts neuroprotective effects against methylphenidate-induced neurotoxicity in rats. *J Neural Transm* 2017; 9: 1-19.

Neuroprotective effect of topiramate against 6-hydroxydopamine-induced cell death in Parkinson's disease cell model

Fahimeh Fallah (M.Sc)^{1,2}, Azadeh Aminzadeh (Ph.D)*^{2,3}

1- Student Research Committee, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

2-Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

3-Pharmaceutics Research Center, Institute of Neuropharmacology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.

* Corresponding author. +98 34 31325242 a.aminzadeh@kmu.ac.ir

Received: 13 Oct 2018; Accepted: 4 May 2019

Introduction: Parkinson's disease (PD) is a common neurodegenerative disorder characterized by progressive neuronal dysfunction. Growing evidence has shown that oxidative stress plays a crucial role in the pathogenesis of Parkinson's disease. Correspondingly, the current study evaluated the protective effect of topiramate in 6-hydroxydopamine induced oxidative stress and apoptosis in PC12 cells as an *in vitro* model for PD.

Materials and Methods: PC12 cells, a cellular model of PD, were treated with topiramate for 24 h. Then they were treated with 75 μ M 6-hydroxydopamine for 24 h. Cell viability was examined by 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-tetrazolium bromide (MTT) assay. Intracellular reactive oxygen species (ROS) levels were measured using 2, 7 dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA) assay. The levels of lipid peroxidation and total antioxidant power (TAP) were also measured.

Results: Remarkably, topiramate at concentration of 8 μ M increased survival of PC12 cells exposed to 6-hydroxydopamine. Cell viability of PC12 cells on 6-hydroxydopamine was decreased compared to controls, which was reversed by topiramate. Topiramate also reduced intracellular reactive oxygen species (ROS) level and cellular lipid peroxidation. In addition, topiramate significantly increased total antioxidant power in 6-OHDA-treated cells.

Conclusion: Findings of this study showed that the topiramate protects PC12 cells against 6-OHDA-induced neurotoxicity through its potent antioxidant activity.

Keywords: 6-Hydroxydopamine, Oxidative Stress, Parkinson Disease, Topiramate, PC12 cells.