Archive of SID

The effect of allopurinol on high glucose- induced neurotoxicity in PC12 cells

Aminzadeh A., PhD[1,2]
1.Assistant Professor, Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran (Corresponding Author), Tel:+98-34-313225242, a.aminzadeh@kmu.ac.ir
2. Pharmaceutics Research Center, Institute of Neuropharmacology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.

ABSTRACT

Background and Aim: Hyperglycemia which occurs in diabetes is one of the main factors which can lead to serious complications such as diabetic neuropathy. There is evidence that allopurinol has neuroprotective effect against many types of damaging stimuli. The present study investigated the effects of allopurinol on high glucose induced neurotoxicity in PC12 cells as a suitable in-vitro model for evaluation of neuronal functions.

Material and Methods: Neurotoxicity was induced by high glucose concentration, and cells were exposed to allopurinol in the presence or absence of high glucose concentration. Cell viability was assessed by MTT assay. Biochemical markers of oxidative stress were investigated by measurement of lipid peroxidation (LPO), total thiol groups, and total antioxidant power (TAP).

Results: The present results indicated that allopurinol significantly inhibited high glucose-induced cell death in PC12 cells. Furthermore, treatment with allopurinol decreased lipid peroxidation level. It also increased the total thiol groups and TAP.

Conclusion: These findings showed protective effects of allopurinol on HG-induced cell death in PC12 cells, which may be related to its antioxidant effect and inhibition of oxidative stress.

Keywords: PC12 cells, Glucose, Neurotoxicity, Allopurinol.

Received: Apr 23, 2016 **Accepted:** Nov 26, 2016

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:09 +0430 on Wednesday June 7th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و دوم / فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۶/۱۰-۱

بررسی تاثیر آلوپورینول بر نوروتوکسیسیتی ناشی از غلظت بالای گلوکز در سلول های PC12

آزاده امین زاده [۱و۲]

۱. استادیار، گروه فارماکولوژی وسم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران (مولف مسوول) تلفن ثابت:۰۳۴-۳۱۲۲۵۲۴۲

a.aminzadeh@kmu.ac.ir

۲. مرکز تحقیقات فارماسیوتیکس، پژوهشکده نوروفارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

چکیده

زمینه و هدف: هیپرگلیسمی که در شرایط دیابت رخ می دهد، یکی از عوامل اصلی عوارض دیابت از جمله نوروپاتی دیابتی می باشد. شواهدی وجود دارد که نشان می دهد آلوپورینول اثرات نوروپروتکتیو بر بسیاری از محرک های آسیب رسان دارد. این مطالعه به منظور بررسی اثرات آلوپورینول بر نوروتوکسیسیتی ناشی از غلظت بالای گلوکز در سلول های PC12 که به عنوان یک مدل برون تنی مناسب برای مطالعه سلول های عصبی می باشند انجام شد.

روش بررسی: در سلول های PC12، نوروتوکسیسیتی توسط غلظت بالای گلوکز ایجاد شد و سلول ها در حضور و عدم حضور غلظت بالای گلوکز، در معرض آلوپورینول قرار گرفتند. زنده مانی سلولی با استفاده از روش MTT اندازه گیری شد. مارکرهای بیوشیمیایی استرس اکسیداتیو با اندازه گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدی، گروه های تیول و ظرفیت آنتی اکسیدانی تام بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که آلوپورینول به طور معنی داری، مرگ سلولی ناشی از غلظت بالای گلوکز را در سلول های PC12 مهار می کند. به علاوه، آلوپورینول میزان پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش داد. این دارو همچنین گروه های تیول و ظرفیت آنتی اکسیدانی تام را افزایش داد.

نتیجه گیری: این یافته ها نشان می دهند که آلوپورینول اثرات محافظتی بر مرگ سلولی ناشی از غلظت بالای گلوکز در سلول های PC12 دارد که ممکن است مربوط به عملکرد آنتی اکسیدانی این دارو و مهار استرس اکسیداتیو باشد.

کلید واژه ها: سلول های PC12، گلوکز، نوروتوکسیسیتی، آلوپورینول

وصول مقاله:۹۵/۲/۴ اصلاحیه نهایی:۹۵/۴/۲۷ پذیرش:۹۵/۹/۶

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:09 +0430 on Wednesday June 7th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:09 +0430 on Wednesday June 7th 2017

مقدمه

بسیاری از تحقیقات نشان داده است که غلظت بالای گلوکز باعث تولید رادیکال های آزاد و استرس اکسیداتیو در سلول های عصبی می شود (۱). استرس اکسیداتیو در نتیجه ی عدم تعادل بین تولید رادیکال های آزاد و گونه های فعال اکسیژن از یک سو و سیستم دفاع آنتی اکسیدانی از سوی دیگر ایجاد می شود. گونه های فعال اکسیژن شامل رادیکال های آزاد مشتق از O_2 مانند یون های سوپراکسید ($O_2^{\bullet-}$)، هیدروکسیل ($HO^{\bullet}$)، پروکسیل ($RO_2^{\bullet}$) و آلکوکسیل ($RO^{\bullet}$) و همچنین گونه های غیر رادیکالی مشتق از O_2 مانند پراکسید هیدروژن (H_2O_2) می باشند. در شرایط نرمال؛ گونه های فعال اکسیژن از طریق زنجیره انتقال الکترون تولید می شوند و به طور طبیعی بوسیله آنتی اکسیدان های سلولی مثل سوپراکساید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون برداشته می شوند. تولید زیاد گونه های فعال اکسیژن و بیشتر از ظرفیت آنتی اکسیدانی باعث آسیب به لیپیدها، پروتئین ها و DNA می شود. این آسیب ها در نهایت عملکرد سلولی را مختل می کنند. میتوکندری ها که جایگاه تولید گونه های فعال اکسیژن هستند بیشتر به آسیب ها حساس هستند و استرس اکسیداتیو موجب آسیب میتوکندریایی می شود (۳و۲). در دیابت غلظت بالای گلوکز باعث افزایش تولید گونه های فعال اکسیژن می شود و مکانیسم های آنتی اکسیدانی را کاهش می دهد (۴و۱). در حال حاضر کنترل قند خون و کاهش استرس اکسیداتیو، یک روش موثر برای پیشگیری و درمان عوارض دیابت مانند نوروپاتی می باشد (۵). بنابراین بررسی راهکارهایی که استرس اکسیداتیو اعصاب را کاهش دهند و از اختلال عملکرد عصبی ناشی از هیپرگلیسمی جلوگیری نمایند بسیار مهم است.

آلوپورینول در چندین دهه به عنوان درمان استاندارد بیماری نقرس و شرایط مرتبط با هیپراوریسمی استفاده شده است (۶). در سال های اخیر روی اثرات پروتکتیو آلوپورینول توجه زیادی شده است. به علت خواص پروتکتیو قابل ملاحظه آلوپورینول، مطالعات زیادی بر قابلیت اثر آن به عنوان یک درمان جدید در بیماری های مختلف در حال انجام است. اثرات محافظتی آلوپورینول بر بسیاری از انواع محرک های آسیب رسان مشاهده شده است. مطالعات نشان دادند که در موش سوری، آلوپورینول توانسته فیبروز قلبی ناشی از آنژیوتانسین II را کاهش دهد و این دارو از آسیب ایسکمی- رپرفیوژن در مثانه موش صحرایی جلوگیری می کند (۸و۷). این دارو در شرایط ایسکمی ناشی از هیپوکسی، باعث کاهش شکل گیری رادیکال های آزاد و آسیب بافتی می شود (۹). تحقیقات نشان دادند که آلوپورینول، مغز را از آسیب های ناشی از ایسکمی و رپرفیوژن محافظت می نماید (۱۰). آلوپورینول توانسته از طریق مهار آنزیم گزانتین اکسیداز، تولید گونه های فعال اکسیژن ناشی از آسیب سلول های مغزی را کاهش دهد (۱۲و۱۱). از دیگر مسیرهای نوروپروتکتیو آلوپورینول می توان به مهار مستقیم رادیکال های هیدروکسیل در شرایط برون تنی (۱۳)، مهار تجمع نوتروفیل ها (۱۴)، شلاتور یون های فلزی مانند آهن فریک (۱۵) و تسهیل انتقال الکترون از آهن فروس به آهن فریک سیتوکروم c اشاره نمود (۱۶).

سلول های PC12 (Pheochromocytoma Cell Line) به عنوان یک مدل مناسب برای مطالعه دیس فانکشن عصبی در سطوح گلوکز بالا شناسایی شده اند و با موفقیت برای بررسی استرس اکسیداتیو، سیگنالینگ فاکتور رشد عصبی (NGF) و... استفاده شده اند (۱۷). با توجه به موارد ذکر شده فوق، مطالعه حاضر در نظر دارد اثرات نوروپروتکتیو آلوپورینول را بر مرگ سلولی ناشی از غلظت بالای گلوکز در سلول های PC12 که به عنوان یک مدل مناسب برای مطالعه سلول های عصبی در سطوح بالای گلوکز می باشند، مورد بررسی قرار دهد.

روش بررسی

مطالعه حاضر از نوع تجربی بوده و گروه های مورد مطالعه در این تحقیق عبارت بودند از: ۱- گروه کنترل، ۲- گروه

www.SID.ir

Archive of SID

با گلوکز بالا، ۳- گروه با گلوکز بالا به علاوه آلوپورینول با غلظت µM ۵، ۴- گروه با گلوکز بالا به علاوه آلوپورینول با غلظت µM ۱۰، ۵- گروه با گلوکز بالا به علاوه آلوپورینول با غلظت µM ۲۰، ۶- گروه با گلوکز بالا به علاوه آلوپورینول با غلظت µM ۴۰.

سلول های PC12 از انستیتو پاستور خریداری شدند. این سلول ها در محیط کشت DMEM؛ همراه با ۵٪ سرم جنین گاوی (FBS)، ۱۰٪ سرم اسبی (HS) و ۱٪ آنتی بیوتیک (پنی سیلین + استرپتومایسین)، تحت شرایط کشت (دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، ۹۵٪ O_2 و ۵٪ CO_2) نگهداری شدند. سلول های مورد نظر، ۲۴ ساعت پس از انتقال به درون فلاسک حاوی محیط کشت به کف فلاسک چسبیده و به تدریج حالت رشته ای به خود می گیرند. این در حالی است که سلول های مرده کروی شده و در سطح محیط کشت شناور می گردند محیط کشت حاوی سلول های مرده حذف گردیدند و سلول های چسبیده به کف فلاسک با استفاده از تریپسین (TE) پاساژ داده شدند و هر ۴۸ ساعت محیط کشت آن ها تعویض شد.

اندازه گیری میزان حیات سلولی به روش MTT:

با استفاده از آزمایش MTT می‌توان پاسخ سلول‌ها به فاکتورهای خارجی مانند داروها و عوامل شیمیایی را ارزیابی نمود. مطالعات نشان دادند که در سلول های PC12، غلظت بالای گلوکز می تواند استرس اکسیداتیو ایجاد نماید و باعث مرگ سلولی و آپوپتوز شود (۲۰-۱۸).

در اجرای این روش ، به ترتیب زیر عمل شده است:

سلول ها پس از شمارش به تعداد ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک به پلیت ۹۶ خانه ای منتقل شدند. بعد از چسبیدن سلول ها به کف چاهک و رسیدن به ۷۰٪ confluency سلول ها به مدت دو ساعت با غلظت های مختلف آلوپورینول پرانکوبه شده و در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، در معرض گلوکز با غلظت ۷۵ میلی مولار قرار گرفتند و ۱۰ میکرو لیتر از محلول MTT (۵ درصد) به هر چاهک اضافه گردید و پلیت در انکوباتور ۳۷°C به مدت ۲ ساعت قرار داده شد. سپس محیط داخل چاهک‌ها خالی گردید و ۱۰۰ میکرو لیتر DMSO به رسوب اضافه شد و در نهایت میزان جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه ELISA Reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر و طول موج رفرنس ۶۳۰ نانومتر اندازه گیری گردید.

اندازه گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدی به روش MDA

استرس اکسیداتیو، باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدی اسیدهای چرب غیر اشباع می گردد و بر اثر حمله رادیکالهای آزاد به لیپیدها، یکی از موادی که تولید می شود، مالون دی آلدئید (MDA) است. جهت ارزیابی میزان پراکسیداسیون لیپیدها، مولکول مالون دی آلدئید به عنوان شاخصی از پراکسیداسیون لیپیدها بررسی می شود. در این روش با ارزیابی مواد واکنشی تیوباربیتوریک اسید (TBARs) می توان آسیب وارد شده به لیپیدها را اندازه گیری نمود. برای این منظور سلولها در فلاسک ۲۵ cm^2 کشت داده می شوند و بعد از چسبیدن سلول ها به کف فلاسک و رسیدن به ۷۰٪ confluency سلول ها با آلوپورینول پرانکوبه شده و سپس در معرض غلظت بالای گلوکز قرار گرفتند و سپس مایع رویی یا سوپرناتانت آن ها جمع آوری شده و پس از سانتریفیوژ با دور g ۱۲۰۰ و به مدت ۶ دقیقه تا انجام آزمایش های اندازه گیری پراکسیداسیون لیپیدی، گروه های تیول و ظرفیت آنتی اکسیدانی تام در دمای ۸۰- نگهداری شد. مالون دی آلدئید در شرایط اسیدی و دمای بالا با تیوباربیتوریک اسید تشکیل پیوند می دهد. کمپلکس این دو ماده در نمونه ها قابل تشخیص است و به شکل (TBA-MDA- TBA) تشکیل می گردد. کمپلکس تشکیل شده در طول موج ۵۳۲ نانومتر دارای حداکثر جذب است.

اندازه گیری گروه های تیول:

گروه های تیول به عنوان شاخص دیگری از وضعیت استرس اکسیداتیو مورد ارزیابی قرار می گیرند. گروه های تیول (-SH) نسبت به صدمات اکسیداتیو حساس هستند و کاهش آنها نشانه ی مهمی از استرس اکسیداتیو بر روی

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:09 +0430 on Wednesday June 7th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

پروتئین ها می باشد. برای ارزیابی این عوامل از روش HU و معرف ۲و ۲دی تیونیتروبنزوئیک اسید (DTNB) که به معرف المن معروف است استفاده می گردد. DTNB با این گروه ها کمپلکس زرد رنگ ایجاد می نماید که در طول موج ۴۱۲ نانومتر دارای حداکثر جذب است.

اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی تام (TAP):

برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی اکسیدان‌های تام از روش FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) استفاده می‌گردد. این روش بر اساس توانایی احیاکنندگی یون‌های فریک به فرو در حضور ماده‌ای به نام تری پیریدیل تری آزین (TPTZ) استوار است. با احیای یون های فریک وتبدیل آن به یون های فرو در PH اسیدی و با حضور معرف های اختصاصی، کمپلکس آبی رنگی ایجاد می شود که در طول موج ۵۹۳ نانومتر و بصورت اسپکتروفتومتریک قابل اندازه گیری است.

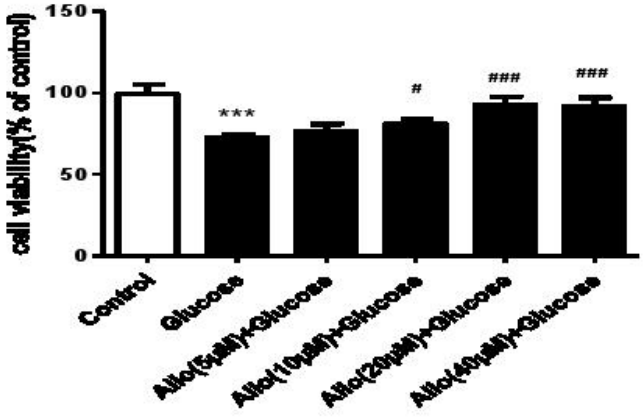
روش آماری:

تمامی اطلاعات بدست آمده به صورت mean± SEM گزارش شده اند. نتایج داده ها با استفاده از برنامه SPSS و روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. P<۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

اثر آلوپورینول بر مرگ سلولی ناشی از غلظت بالای گلوکز:

پس از اندازه گیری میزان حیات سلول ها با روش MTT، مشاهده شد که گلوکز در غلظت ۷۵ میلی مولار بعد از ۷۲ ساعت مواجهه با سلول ها، به طور معنی داری باعث القای مرگ سلولی شده است. همانطور که در نمودار ۱ نشان داده شده است پرانکوباسیون با آلوپورینول توانسته از آسیب سلولی ناشی از غلظت بالای گلوکز جلوگیری نماید. غلظت های ۲۰ و ۴۰ میکرو مولار آلوپورینول برای این مطالعه انتخاب شدند.



نمودار ۱: اثرات نوروپروتکتیو غلظت های مختلف آلوپورینول (۴۰-۵ میکرو مولار) بر نوروتوکسیسیتی ناشی از غلظت بالای گلوکز (۷۵ میلی مولار) در سلولهای PC12. حیات سلولی بوسیله روش MTT اندازه گیری شد. نتایج بصورت mean ± S.E.M نشان داده شده اند. $^{***}P < 0.001$ با گروه کنترل مقایسه شد. $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#\#}P < 0.001$ با گروه گلوکز مقایسه شدند.

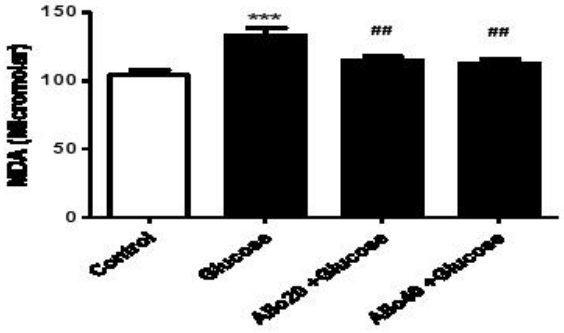
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:09 +0430 on Wednesday June 7th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

اثر آلوپورینول بر پراکسیداسیون لیپیدی:

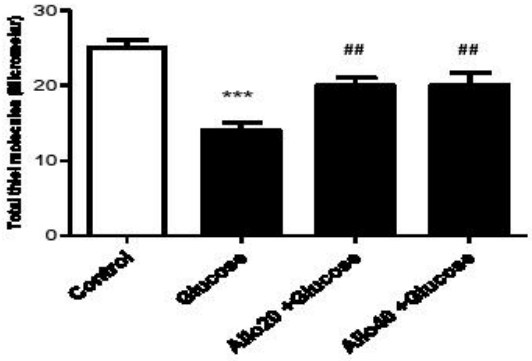
غلظت بالای گلوکز به مدت ۷۲ ساعت در مقایسه با گروه کنترل باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدی در سلول های PC12 شد. پرانکوباسیون با آلوپورینول در مقایسه با گروه گلوکز توانست به میزان چشمگیری از این افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدی جلوگیری نماید (نمودار۲).



نمودار ۲: اثرات آلوپورینول بر افزایش پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از غلظت بالای گلوکز. میزان پراکسیداسیون لیپیدی بوسیله روش TBARS اندازه گیری شد. نتایج بصورت mean ± S.E.M نشان داده شده اند. $P < 0.001$ * با گروه کنترل مقایسه شد. $P<0.01$ ## با گروه گلوکز مقایسه شد.**

اثر آلوپورینول بر گروه های تیول:

همانطور که در نمودار ۳ نشان داده شده است درمان با غلظت بالای گلوکز به مدت ۷۲ ساعت در مقایسه با گروه کنترل باعث کاهش میزان گروه های تیول در سلول های PC12 شد. پرانکوباسیون با آلوپورینول در مقایسه با گروه گلوکز توانست به میزان معناداری از این کاهش میزان گروه های تیول جلوگیری کند و میزان گروه های تیول را افزایش دهد.



نمودار ۳: اثرات آلوپورینول بر کاهش گروه های تیول ناشی از غلظت بالای گلوکز. میزان گروه های تیول بوسیله روش المن اندازه گیری شد. نتایج بصورت mean ± S.E.M نشان داده شده اند. $P < 0.001$ * با گروه کنترل مقایسه شد. $P < 0.01$ ## با گروه گلوکز مقایسه شد.**

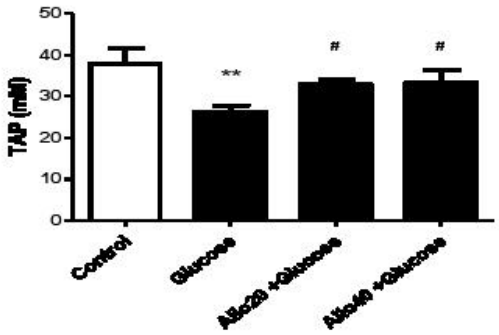
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:09 +0430 on Wednesday June 7th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

اثر آلوپورینول بر ظرفیت آنتی اکسیدانی تام:

در گروه گلوکز در مقایسه با گروه کنترل، ظرفیت آنتی اکسیدانی تام به میزان معنی داری کاهش یافت. همانطور که در نمودار ۴ نشان داده شده است پرانکوباسیون با آلوپورینول در مقایسه با گروه گلوکز به میزان معنی داری باعث افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی تام شده است.



نمودار ۴: اثرات آلوپورینول بر کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی تام ناشی از غلظت بالای گلوکز. نتایج بصورت mean ± S.E.M نشان داده شده اند. $^{**}P < 0.01$ با گروه کنترل مقایسه شد. $^{\#}P < 0.05$ با گروه گلوکز مقایسه شد.

بحث

نتایج ما نشان داد که آلوپورینول اثرات نوروپروتکتیو بر استرس اکسیداتیو و آپوپتوز ناشی از غلظت بالای گلوکز در سلول های PC12 دارد. مطالعات نشان دادند که استرس اکسیداتیو ناشی از گلوکز، نقش اساسی در پاتوژنز نوروپاتی دیابتی دارد. گرچه در پیشرفت نوروپاتی دیابتی فاکتورهای متعددی نقش دارند ولی تاکنون مکانیسم دقیق پاتولوژیک این بیماری شناسایی نشده است چندین تئوری در این مورد توصیف شده است؛ از جمله اینکه هیپرگلیسمی مسیرهای پلی ال، هگزوزآمین، پروتئین کیناز C، محصولات نهایی پیشرفته گلیکوزیلاسیون (AGEs)، استرس اکسیداتیو، نیتریک اکساید و التهاب را فعال می کند. نتایج تحقیقات نشان می دهد که استرس اکسیداتیو در همه این مسیرها نقش دارد (۲۱و۱).

آنزیم های آنتی اکسیدانی مهم مانند سوپراکساید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز و GST به عنوان اولین خط دفاعی در برابر آسیب رادیکال های آزاد در شرایط استرس اکسیداتیو می باشند. در شرایط فیزیولوژی، سوپراکساید دیسموتاز آنیون سوپراکسید (O^{2-}) را متابولیزه می کند و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) تولید می کند. به علاوه فعالیت کاتالاز در پاسخ به تولید پراکسید هیدروژن افزایش می یابد کاتالاز آنزیم مهمی در سم زدایی پراکسید هیدروژن می باشد. گلوتاتیون ترانسفرازها گروهی از آنزیم های دتوکسیفیه کننده هستند که در متابولیسم آفت کش ها و دیگر سموم نقش دارند (۲۲و۳).

آلوپورینول مهارکننده گزانتین اکسیداز می باشد و به عنوان درمان استاندارد بیماری نقرس و شرایط مرتبط با هیپراوریسمی استفاده شده است. گزانتین اکسیداز یک آنزیم سیتوزولی است که سوبستراهای زیادی از جمله بازهای پورین و پیریمیدین را اکسید می کند. در شرایط نرمال، این آنزیم در فرم دهیدروژناز قرار دارد. در شرایط پاتولوژیک، فرم دهیدروژناز آنزیم متحمل اکسیداسیون و پروتئولیز قرار گرفته و به فرم فعال آنزیم تبدیل می شود. آنزیم گزانتین اکسیداز بر گزانتین و هیپوگزانتین اثر کرده و

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:09 +0430 on Wednesday June 7th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

آن ها را به اسید اوریک تبدیل می کند و در طی این واکنش یون های سوپراکساید تولید می شوند. این دارو با مهار این آنزیم سطح اسید اوریک را کاهش می دهد. همزمان با آن، گزانتین و هیپوگزانتین که محلول تر هستند، افزایش می یابند (۲۳). نتایج ما نشان داد پرانکوباسیون با آلوپورینول توانسته از مرگ سلولی ناشی از غلظت بالای گلوکز جلوگیری نماید. این نتایج با مطالعات گذشته که نشان دادند آلوپورینول توانسته دیس فانکشن قلبی را بهبود بخشد و از آسیب میوکارد جلوگیری نماید (۲۴) و همچنین آلوپورینول در موش صحرایی به طور قابل ملاحظه remodeling را در انفارکتوس قلبی و کاردیومیوپاتی کاهش داده است، مطابقت دارد (۲۵).

مالون دی آلدئید محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدی است و به عنوان یک بیومارکر پراکسیداسیون لیپیدی اندازه گیری می شود. نتایج ما نشان داد که غلظت بالای گلوکز میزان مالون دی آلدئید را افزایش داده است. در شرایط غلظت بالای گلوکز، پرانکوباسیون با آلوپورینول به طور قابل توجهی توانست میزان مالون دی آلدئید را کاهش دهد. این موافق با مطالعات قبلی است که نشان می دهند در موش صحرایی، آلوپورینول از افزایش مالون دی آلدئید ناشی از ایزوپروترنول جلوگیری می کند و این دارو در موش سوری، افزایش مالون دی آلدئید ناشی از آنژیوتانسین II را مهار می کند (۲۶و۷). در مطالعه دیگری نشان داده شده است که در موش صحرایی، ترکیب آلوپورینول و ان استیل سیستئین نخاع را از آسیب ایسکمی- رپرفیوژن محافظت می نماید (۲۷).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که غلظت بالای گلوکز میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی را کاهش داده است. پرانکوباسیون با آلوپورینول به طور قابل توجهی توانسته از کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی جلوگیری کرده و این ظرفیت را افزایش دهد. این یافته ها در توافق با مطالعه ای است که نشان می دهد در موش صحرایی درمان با آلوپورینول موجب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز شده است و از انفارکتوس و آسیب قلبی ناشی از ایزوپروترنول جلوگیری نموده است (۲۶). به نظر می رسد بخشی از اثرات نوروپروتکتیو آلوپورینول ناشی از اثرات آنتی اکسیدانی آن در افزایش فعالیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز و کاتالاز باشد (۲۵و۲۴). بنابراین، آلوپورینول می تواند سیستم دفاع آنتی اکسیدانی طبیعی را تنظیم نماید. آلوپورینول نه تنها مهارکننده گزانتین اکسیداز می باشد بلکه دارویی است که اختلال میتوکندریایی ناشی از ایسکمی را بهبود می بخشد (۲۸و۱۰). همچنین این دارو، مستقیماً به عنوان جاذب رادیکال های آزاد سمی هیدروکسیل عمل می کند (۱۳).

مطالعات نشان داده اند که آلوپورینول میزان سیتوکین های التهابی مانند فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا (TNF-α)، اینترلوکین۱، متالوپپتیداز ماتریکسی و مولکولهای چسبندگی بین سلولی نوع یک (ICAM-1) را کاهش می دهد و فعال سازی فاکتور هسته ای کاپا B (NF-κB) را مهار می کند (۲۹). بررسی ها نشان داده است که آلوپورینول با کاهش بیان فاکتورهای پیش التهابی شامل TNF-α و ICAM-1 از مرگ عصبی ناشی از سمیت منوکسیدکربن جلوگیری می کند (۳۰).

آلوپورینول همچنین مکانیسم های نوروپروتکتیو دیگری نیز دارد این دارو از طریق مهار یون های فلزی مانند آهن فریک و مس، از اکسیداسیون لیپیدهای غشای اریتروسیت ها جلوگیری می کند بنابراین اثر پروتکتیو آلوپورینول بر آسیب ناشی از ایسکمی- رپرفیوژن ممکن است ناشی از عملکرد شلاتوری این دارو باشد (۱۵). آلوپورینول با تسهیل انتقال الکترون از آهن فروس به آهن فریک سیتوکروم c، عملکرد میوکارد را در طی آسیب ناشی از رپرفیوژن میوکارد افزایش می دهد (۱۶). در طی ایسکمی مغزی، نوتروفیل ها در عروق خونی مغز تجمع می یابند و پس از ورود به پارانشیم مغز باعث ایسکمی- رپرفیوژن می شوند. آلوپورینول از طریق کاهش تجمع نوتروفیل ها، اثر محافظتی در برابر آسیب ایسکمی مغزی دارد (۱۴).

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:09 +0430 on Wednesday June 7th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج ما نشان داد در شرایط غلظت بالای گلوکز، گروه های تیول پروتئین ها که به استرس اکسیداتیو حساسند در نتیجه این آسیب ها کاهش می یابند. در توافق با یافته ما در مطالعه ای نشان داده شده است که میزان تیول پروتئین های سرمی در هر دو نوع دیابت کاهش می یابند (۳۱). در مطالعه دیگری یافت شده است که در بیماران تیپ ۲ دیابت، مقادیر تیول سرمی کاهش یافته است (۳۲). همچنین ما نشان دادیم که آلوپورینول توانسته از کاهش گروه های تیول پروتئین ها ناشی از غلظت بالای گلوکز جلوگیری نماید.

نتیجه گیری

مطالعه حاضر نشان داد که آلوپورینول اثرات نوروپروتکتیو بر آپوپتوز ناشی از غلظت بالای گلوکز در سلول های PC12 دارد. در این مطالعه دیده شد که آلوپورینول میزان لیپید پراکسیداسیون را کاهش داده است و از کاهش گروه های تیول ناشی از غلظت بالای گلوکز جلوگیری کرده است. به علاوه این دارو توانسته ظرفیت آنتی اکسیدانی تام را افزایش دهد. در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که آلوپورینول به سبب دارا بودن ویژگی های آنتی اکسیدانت، قادر به جلوگیری از استرس اکسیداتیو و مرگ سلولی ناشی از غلظت بالای گلوکز می باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کرمان جهت حمایت مالی از این تحقیق، تشکر و قدردانی به عمل می آید.

References

1. Hosseini A, Abdollahi M. Diabetic neuropathy and oxidative stress: therapeutic perspectives. Oxid Med Cell Longev 2013; 2013: 1-15.
2. Leinninger GM, Edwards JL, Lipshaw MJ, Feldman EL. Mechanisms of disease: mitochondria as new therapeutic targets in diabetic neuropathy. Nat Clin Pract Neurol 2006; 2: 620-628.
3. 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.
4. Negi G, Kumar A, Joshi RP, Ruby P, Sharma SS. Oxidative stress and diabetic neuropathy: current status of antioxidants. IIOAB J 2011; 2: 71-78.
5. Chilelli N, Burlina S, Lapolla A. AGEs, rather than hyperglycemia, are responsible for microvascular complications in diabetes: a "glycoxidation-centric" point of view. Nutr Metab Cardiovasc Dis 2013; 23: 913-919.
6. Pacher P, Nivorozhkin A, Szabó C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. Pharmacol Rev 2006; 58: 87-114.
7. Jia N, Dong P, Ye Y, Qian C, Dai Q. Allopurinol attenuates oxidative stress and cardiac fibrosis in angiotensin II-induced cardiac diastolic dysfunction. Cardiovasc Ther 2012; 30: 117-123.
8. Shin JH, Chun KS, Na YG, Song KH, Kim SI, Kim GH. Allopurinol protects against ischemia/reperfusion-induced injury in rat urinary bladders. Oxid Med Cell Longev 2015; 2015: 1-8.
9. Marro PJ, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Effect of allopurinol on brain adenosine levels during hypoxia in newborn piglets. Brain Res 2006; 1073: 444-450.

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:09 +0430 on Wednesday June 7th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

10. Işık N, Berkman MZ, Pamir MN, Kalelioğlu M, Sav A. Effect of allopurinol in focal cerebral ischemia in rats: an experimental study. Surg Neurol 2005; 64: S5-S10.
11. Betz AL. Identification of hypoxanthine transport and xanthine oxidase activity in brain capillaries. J Neurochem 1985; 44: 574-579.
12. Phillis JW, Sen S. Oxypurinol attenuates hydroxyl radical production during ischemia/reperfusion injury of the rat cerebral cortex: an ESR study. Brain Res 1993; 628: 309-312.
13. Moorhouse PC, Grootveld M, Halliwell B, Quinlan JG, Gutteridge J. Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers. FEBS Lett 1987; 213: 23-28.
14. Hudome S, Palmer C, Roberts RL, Mauger D, Housman C. The role of neutrophils in the production of hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal rat. Pediatr Res 1997; 41: 607-616.
15. Ko KM, Godin DV. Inhibition of transition metal ion-catalysed ascorbate oxidation and lipid peroxidation by allopurinol and oxypurinol. Biochem Pharmacol 1990; 40: 803-809.
16. Peterson D, Kelly B, Gerrard J. Allopurinol can act as an electron transfer agent. Is this relevant during reperfusion injury? Biochem Biophys Res Commun 1986; 137: 76-79.
17. Hattangady NG, Rajadhyaksha MS. A brief review of in vitro models of diabetic neuropathy. Int J of Diabetes Dev Ctries 2009; 29: 143-149.
18. Sharifi AM, Mousavi SH, Farhadi M, Larijani B. Study of high glucose-induced apoptosis in PC12 cells: role of bax protein. J Pharmacol Sci 2007; 104: 258-262.
19. Lelkes E, Unsworth BR, Lelkes PI. Reactive oxygen species, apoptosis and altered NGF-induced signaling in PC12 pheochromocytoma cells cultured in elevated glucose: An in vitro cellular model for diabetic neuropathy. Neurotox Res 2001; 3: 189-203.
20. Sharifi AM, Eslami H, Larijani B, Davoodi J. Involvement of caspase-8,-9, and-3 in high glucose-induced apoptosis in PC12 cells. Neurosci Lett 2009; 459: 47-51.
21. Yagihashi S, Mizukami H, Sugimoto K. Mechanism of diabetic neuropathy: where are we now and where to go? J Diabetes Investig 2011; 2: 18-32.
22. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. Nature 2000; 404: 787-790.
23. Bernal JA, Quilis N, Andrés M, Sivera F, Pascual E. Gout: optimizing treatment to achieve a disease cure. Ther Adv Chronic Dis 2016; 7: 135-44.
24. Gao X, Xu Y, Xu B, Liu Y, Cai J, Liu HM, et al. Allopurinol attenuates left ventricular dysfunction in rats with early stages of streptozotocin-induced diabetes. Diabetes Metab Res Rev 2012; 28: 409-417.
25. Minhas KM, Saraiva RM, Schuleri KH, Lehrke S, Zheng M, Saliaris AP, et al. Xanthine oxidoreductase inhibition causes reverse remodeling in rats with dilated cardiomyopathy. Cir Res 2006; 98: 271-279.
26. Sagor MAT, Tabassum N, Potol MA, Alam MA. Xanthine oxidase inhibitor, allopurinol, prevented oxidative stress, fibrosis, and myocardial damage in isoproterenol induced aged rats. Oxid Med Cell Longev 2015; 2015: 1-9.
27. Erkut B, Onk OA. Effect of N-acetylcysteine and allopurinol combination to protect spinal cord ischemia/reperfusion injury induced by aortic cross-clamping in rat model. J Cardiothorac Surg 2015; 10: 95.
28. Canbaz S, Duran E, Ege T, Sunar H, Cikirikcioglu M. The effects of intracoronary administration of vitamin E on myocardial ischemia-reperfusion injury during coronary artery surgery. Thorac Cardiovasc Surg 2003; 51: 57-61.

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:09 +0430 on Wednesday June 7th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

29. Yamaguchi M, Okamoto K, Kusano T, Matsuda Y, Suzuki G. The effects of xanthine oxidoreductase inhibitors on oxidative stress markers following global brain ischemia reperfusion injury in C57BL/6 mice. PLoS One 2015; 10: e0133980.
30. Dong G, Ren M, Wang X, Jiang H, Yin X. Allopurinol reduces severity of delayed neurologic sequelae in experimental carbon monoxide toxicity in rats. Neurotoxicology 2015; 48: 171-179.
31. Van Campenhout A, Van Campenhout C, Lagrou AR, Abrams P, Moorkens G, Van Gaal L, et al. Impact of diabetes mellitus on the relationships between iron-, inflammatory-and oxidative stress status. Diabetes Metab Res and Rev 2006; 22: 444-454.
32. Srivatsan R, Das S, Gadde R, Manoj-Kumar K, Taduri S, Rao N, et al. Antioxidants and lipid peroxidation status in diabetic patients with and without complications. Arch Iran Med 2009; 12: 121-127.

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:09 +0430 on Wednesday June 7th 2017

www.SID.ir