

مقاله پژوهشی

اثر هورمون گرلین بر میزان عامل نکروز تومور آلفا و میزان بیان ژن‌های سیتوکروم b و اینترلوکین ۱۰ در جسم سیاه در یک مدل موشی بیماری پارکینسون

ندا نیکو کلام نظیف^۱، مریم خسروی^{۱*}، رامش احمدی^۲، مریم بنانج^۱، احمد مجد^۱

۱. دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. گروه فیزیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران

پذیرش: ۱۴ مرداد ۱۳۹۸

دریافت: ۱۲ تیر ۱۳۹۸

چکیده

زمینه و هدف: مسیرهای التهابی نقش مهمی در بروز و پیشرفت بیماری پارکینسون دارند. گرلین دارای اثرات ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی بوده و با مهار تولید سایتوکاین‌های موثر در التهاب مثل فاکتور نکروز کننده تومور آلفا اثرات ضدالتهابی خود را اعمال می‌کند. هدف از این تحقیق بررسی اثر هورمون گرلین بر میزان عامل نکروز تومور آلفا و میزان بیان ژن‌های سیتوکروم b و اینترلوکین ۱۰ در مدل بیماری پارکینسون القا شده با ۱-متیل-۴-فنیل-۱،۲،۳،۶-تتراهیدروپیریدین در موش‌های سوری نر بوده است.

روش‌ها: سی سر موش نر نژاد NMRI، به‌طور تصادفی به ۵ گروه شش‌تایی شامل کنترل، سالین، هورمون گرلین، پارکینسون، و پارکینسون + هورمون گرلین تقسیم شدند. بیماری پارکینسون به‌وسیله تزریق داخل صفاقی ۱-متیل-۴-فنیل ۱،۲،۳،۶-تتراهیدروپیریدین به مدت ۴ روز (۲۵mg/kg) القاء گردید. کاتالپسی توسط آزمون میله در روزهای ۱، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ ارزیابی شد. گرلین به مدت ۲۸ روز (۰/۴ μg/kg) تزریق داخل صفاقی شد. در روز ۲۹ میزان عامل نکروز تومور آلفا توسط تکنیک الایزا و میزان بیان ژن‌های سیتوکروم b و اینترلوکین ۱۰ با روش واکنش زنجیره ای پلیمرز در نواحی جسم سیاه و جسم مخطط مغز سنجش شد.

یافته‌ها: در گروه پارکینسون، کاتالپسی و سطح عامل نکروز تومور آلفا به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و بیان ژن‌های سیتوکروم b و اینترلوکین ۱۰ کاهش یافت ($p < 0/001$) ولی در موش‌های تحت درمان با هورمون گرلین کاتالپسی و سطح عامل نکروز تومور آلفا به‌طور معنی‌داری کاهش یافت و بیان ژن‌های سیتوکروم b و اینترلوکین ۱۰ افزایش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0/001$).

نتیجه‌گیری: به‌نظر می‌رسد که هورمون گرلین از طریق مهار مسیرهای التهابی درگیر در بیماری پارکینسون سبب بهبود کاتالپسی و کاهش سطح عامل نکروز تومور آلفا و افزایش بیان ژن‌های سیتوکروم b، اینترلوکین ۱۰ شده است.

واژه‌های کلیدی: پارکینسون، کاتالپسی، گرلین، ۱-متیل-۴-فنیل ۱،۲،۳،۶-تتراهیدروپیریدین

مقدمه

مغزی متأثر از این بیماری می‌گردد. مشخصه بارز بیماری از نظر پاتولوژی دژنراسیون آهسته و تدریجی نورون‌های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه^۳ می‌باشد که منجر به کاهش سطح

بیماری پارکینسون^۱ یک بیماری نورودژنراتیو است که پس از آلزایمر^۲ شایع‌ترین اختلال نورودژنراتیو مرتبط با سن می‌باشد و باعث فعال شدن میکروگلیا و آستروگلیوزیس واکنشی در نواحی

¹ Parkinson's disease (PD)

² Alzheimer's disease (AD)

³ Substantia nigra (SNc)

همکاران^{۱۴} مطرح کردند در بیماران مبتلا به پارکینسون سطوح پلاسمایی گرلین کاهش می‌یابد و اکشن گرلین به غذا در این بیماران دچار اختلال می‌شود [۷]. در پژوهشی که توسط زنده‌دل و همکاران انجام شده مصرف آگونیست گرلین^{۱۵} و GH دارای اثر محافظتی در التهاب مغزی ناشی از لیپوپولیساکارید (LPS)^{۱۶} از طریق مهار عامل نکروز تومور آلفا (TNF- α)^{۱۷} و اینترلوکین^{۱۸} بوده است [۸]. در سال ۲۰۱۰، مون و همکاران^{۱۹} بیان نمودند درمان با گرلین می‌تواند بر روی نوروهای دوپامینرژیک جسم سیاه تاثیرگذار باشد و باعث افزایش غلظت تیروزین هیدروکسیلاز در مغز میانی شود و از کاهش نوروهای دوپامینرژیک در بخش دورسال استریاتوم جلوگیری می‌کند و همچنین مانع فعال شدن میکروگلیا ناشی از ۱ متیل-۴-فنیل-۳،۶-تتراهیدروپیریدین (MPTP)^{۲۰} در جسم سیاه و استریاتوم شده است [۹].

سیتوکروم‌ها دسته‌ای از پروتئین‌های مرکب هستند که این پروتئین‌ها در سال ۱۸۸۶ به نام رنگدانه‌های سلولی و در سال ۱۹۲۶ به عنوان ترکیباتی که نقش اصلی در تنفس سلولی را دارند. سیتوکروم‌ها در همه بافت‌های زنده یافت شده و به سه نوع اصلی a، b و c تقسیم‌بندی می‌شوند. سیتوکروم b^{۲۱} پروتئین غشایی که از ۸ آلفا هلیکس تشکیل شده و حاوی هر دو مرکز Qi و Qo می‌باشد. سیتوکروم b زیر واحد کاتالیک مرکزی هیدروکینون بوده و یکی از بهترین پروتئین‌های شناخته‌شده برای ساخت کمپلکس III سیستم فسفوریلاسیون بوده و فقط به وسیله ژنوم میتوکندری کد می‌شود [۱۰]. اهمیت میتوکندری درده‌های گذشته به وسیله‌ی شواهدی تأیید شده که تغییرات پروتئین‌های میتوکندری می‌تواند باعث ایجاد تعدادی بیماری‌های انسانی شود. این تغییرات پروتئین‌ها می‌تواند منجر به عدم کار سلولی و بافتی مهم شوند که باعث بیماری‌های مثل آلزایمر، پارکینسون و هانگتینتون^{۲۲} و سندرم‌های عصبی و عضلانی می‌باشد [۱۱]. در این مطالعه اثر هورمون گرلین بر میزان عامل نکروز تومور آلفا و

دوپامین در استریاتوم (هسته‌های دمدار^۴ و پوتامن^۵) می‌گردد [۱]. علائم این بیماری ارتعاش و یا لرزش دست و پا، برادی‌کینزی^۶ که ضعف و کندی حرکات ارادی و آکینزی^۷ که فقدان حرکت و یا سختی حرکت می‌باشد که سبب خشک شدن دست و پا یا کل بدن می‌گردد [۲]. در حال حاضر، درمان شناخته‌شده‌ای برای بیماری پارکینسون وجود ندارد فقط علائم آن می‌تواند به‌وسیله درمان‌های دارویی کنترل شود. درمان در صورت لزوم جهت برقرار ساختن تعادل دوپامین استیل‌کولین در استریاتوم توسط مهار اثرات استیل‌کولین با داروهای آنتی‌کولینرژیک یا تقویت اثرات دوپامین صورت می‌گیرد و درمان توسط محافظت‌کننده عصبی^۸ تأثیرات مثبت در بهبود عملکرد حرکتی بیماری دارند [۳]. دو عامل مهمی که در روند پیشرفت اکثر بیماری‌های مخرب عصبی دیده می‌شوند؛ استرس اکسیداتیو که ناشی از تولید گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن و التهاب عصبی که ناشی از فعالیت بیش از حد سلول‌های میکروگلیا و آستروگلیا در سیستم عصبی مرکزی (CNS)^۹ می‌باشند. از میان گلیال‌ها، آستروسیت‌ها و میکروگلیاها در پارکینسون نقش دارند. میکروگلیاها بسیار حساس‌تر هستند به‌طوری‌که با کوچک‌ترین اختلال در همئوستاز CNS در بیماری‌های انحطاط نورونی مانند پارکینسون به‌شدت فعال می‌شوند که نتیجه آن افزایش عوامل نوروטרופیک و سمیت عصبی و سایتوکین التهابی است [۴].

در سال ۱۹۹۹، کوچی‌ما^{۱۰} و همکارانش پیتیدی از عصاره مخاط معده موش صحرایی جدا کردند، نام آن را گرلین^{۱۱} نهادند [۵]. گرلین هورمون معده است که باعث تحریک ترشح هورمون رشد (GH)^{۱۲} و مصرف مواد غذایی برای تنظیم هموستاز انرژی و وزن بدن از طریق اتصال به گیرنده‌اش (GHSR1 a)^{۱۳} می‌شود. امروزه شواهد نقش فیزیولوژیکی گسترده گرلین را در محافظت نورونی نشان می‌دهد. یافته‌های اخیر نشان از اثر بالقوه گرلین به عنوان یک عامل درمانی نوآورانه در بیماری‌های عصبی از جمله آلزایمر و بیماری پارکینسون دارد [۶]. در سال ۲۰۱۸، مورگان و

¹⁴ Morgan¹⁵ Growth Hormone Releasing Peptide -2 (GHRP-2)¹⁶ Lipopolysaccharide (LPS)¹⁷ Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α)¹⁸ Interleukin-6 (IL-6)¹⁹ Moon²⁰ 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

Hydrochloride (MPTP)

²¹ Cytochrome b²² Huntington Disease (HD)⁴ Caudate nucleus⁵ Putamen nucleus⁶ Bradykinesia⁷ Akinesia⁸ Neuroprotective⁹ Central Nervous System (CNS)¹⁰ Kojima¹¹ Ghrelin¹² Growth hormone (GH)¹³ Growth hormone secretagogue receptor (GHSR1a)

مدت ۲۸ روز متوالی (یکبار در روز در فواصل ۲۴ ساعته) تزریق شد [۱۳].

گروه‌های آزمایشی

موش‌های سوری نر نژاد NMRI به طور تصادفی به ۵ گروه شش‌تایی تقسیم شدند: (۱) گروه کنترل (سالن)، (۲) گروه سالین (شاهد-دریافت کننده سالین (۱۰ میکرولیتر) یکبار در روز در فواصل ۲۴ ساعته در طی ۲۸ روز)، (۳) گروه هورمون گرلین (۰/۴ میکروگرم به ازاء هر کیلوگرم، یکبار در روز در فواصل ۲۴ ساعته در طی ۲۸ روز)، (۴) گروه پارکینسون (دریافت کننده MPTP - ۲۵ mg/kg در طی ۴ روز در فواصل ۲۴ ساعته)، (۵) گروه پارکینسون + هورمون گرلین.

آزمون میله

برای ارزیابی جمود عضلات (کاتالپسی) از آزمون میله^{۲۶} استفاده شد. این آزمون در جوندگانی که در آن‌ها پارکینسون تجربی توسط هالوپریدول، متی‌روزین و رزپین و MPTP ایجاد شده است، برای ارزیابی جمود عضلات به کار می‌رود [۱۴]. وسیله مورد استفاده در این آزمون، یک بارفیکس دارای یک سکوی چوبی بود. ارتفاع بارفیکس از سکو ۹ سانتی‌متر و قطر میله ۰/۹ سانتی‌متر است. برای انجام آزمایش، حیوان بر روی سکو قرار داده شد و دو دست آن به آرامی روی میله بارفیکس قرار داده شد مدت زمان ماندن حیوان در این وضعیت (ثابت ماندن، بدون حرکت) ثبت شد. زمان قطع آزمون موقعی بود که حیوان یک و یا هر دو دست خود را از روی میله برمی‌داشت و یا سر خود را به صورت جستجوگرانه حرکت می‌داد بدیهی است هر چه جمود عضلات حیوان شدیدتر بود مدت زمان بیشتری در وضعیت اتصال سپری می‌شد. آزمون میله یک روز پس از ایجاد بیماری (روز اول) و روزهای هفتم، چهاردهم، بیست و یکم و بیست و هشتم انجام شد.

سنجش کمی سطح TNF- α توسط روش الایزا

در روز ۲۹، برای سنجش کمی سطح TNF- α و بیان ژن‌های سیتوکروم b، اینترلوکین ۱۰ و بافت‌شناسی با رعایت اصول اخلاقی موش‌ها را ابتدا با تزریق درون صفاقی ترکیبی از

میزان بیان ژن‌های سیتوکروم b و اینترلوکین ۱۰ در مدل بیماری پارکینسون القا شده با MPTP در موش‌های سوری نر مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

حیوانات مورد آزمایش

این مطالعه تجربی بر روی سی سر موش سوری نر نژاد NMRI در آزمایشگاه فیزیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم انجام شد. حیوانات در محدوده وزنی 5 ± 30 گرم از انستیتو پاستور کرج خریداری شد. حیوانات در محدوده دمایی 24°C - ۲۰، رطوبت ۴۵ - ۴۰ درصد و در شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دسترسی آزاد به آب و غذا در قفس‌های پلاستیکی پوشیده شده با خاک اره در اتاق حیوانات نگهداری شدند. انجام این آزمایشات مطابق با دستورالعمل مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی (چاپ مؤسسه سلامت ملی آمریکا، شماره ۲۳-۸۵ بازنگری شده در سال ۱۹۸۵) بود و توسط کمیته اخلاق دانشگاه آزاد واحد علوم تحقیقات با کد IR.IAU.SRB.REC ۱۳۹۷/۱۷۶ در تاریخ ۲۱/۱۲/۱۳۹۷ مورد تأیید قرار گرفت.

ایجاد بیماری پارکینسون

برای القاء بیماری پارکینسون، از داروی MPTP (شرکت Sigma، سازنده آمریکا) با دوز ۲۵ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن (۲۵ میلی‌گرم + ۵ سی‌سی نرمال سالین) در طی چهار روز متوالی به صورت داخل صفاقی^{۲۴} (یکبار در روز در فواصل ۲۴ ساعته) تزریق شد [۱۲].

روش آماده‌سازی داروی گرلین

ابتدا ۰/۵ میلی‌گرم دارو گرلین (شرکت Alfa Aesar، آمریکا) در ۵۰ سی‌سی محلول (۵ سی‌سی دی‌متیل سولفوکساید (DMSO)^{۲۵} (شرکت Merck، آلمان) + ۴۵ سی‌سی نرمال سالین) حل شد سپس به هر حیوان میزان ۰/۴ میکروگرم به ازاء هر کیلوگرم از محلول تهیه شده به صورت داخل صفاقی و به

^{۲۳} Interleukin-10 (IL-10)

^{۲۴} Intraperitoneal (i.p.)

^{۲۵} Dimethyl sulfoxide (DMSO)

^{۲۶} Catalepsy

^{۲۷} Bar Test

اینترلوکین ۱۰، 59°C و 65°C ثانیه و ۴۰ سیکل تکرار گردید. همراه با واکنش Real-Time PCR منحنی ذوب نیز جهت تشخیص قطعه هدف رسم شد. در این مطالعه برای سنجش بیان ژن‌ها از تکنیک Real-Time PCR از نوع سنجش کمی به روش SYBER GREEN استفاده شد و جهت محاسبه بیان ژن هدف نسبت به رفرنس، از روش کمیت سنجی نسبی و متد $\Delta\Delta\text{CT}$ استفاده شد. همچنین ژن GAPDH^{۲۹} به عنوان ژن کنترل داخلی انتخاب شد.

رنگ آمیزی تیروزین هیدروکسیلاز

کل بافت مغز موش‌های از گروه‌های مختلف خارج شد. به منظور تأیید تخریب نورون‌های دوپامینی بخش متراکم جسم سیاه در اثر آسیب با نورو توکسین، از آنتی بادی آنتی تیروزین هیدروکسیلاز (TH)^{۳۰} استفاده شد. به منظور انجام این تکنیک بافت‌های مغز پس از استخراج ۲۴ ساعت در فرمالین-سالیین قرار داده شد. سپس مراحل آگیری و پردازش روی آن‌ها انجام گرفت. بافت‌ها در پارافین مذاب قالب‌گیری شد. ۲۴ ساعت پس از قالب‌گیری و سرد شدن کامل، قالب‌ها آماده‌ی برش‌گیری شد. برش‌گیری با استفاده از دستگاه میکروتوم و با ضخامت ۱۰ میکرون انجام شد. برش‌ها پس از عبور از حمام آب گرم، زمانیکه کاملاً بدون چروک بافتی بودند بر روی لام‌هایی که قبلاً آغشته به چسب شده‌اند قرار گرفت. با توجه به متعدد بودن مراحل شست و شو از چسب آلبومین استفاده شد که کاملاً سطح لام با آن آغشته شد. پس از قرار دادن لام‌ها در دمای 60°C به مدت یک ساعت، سلول‌ها با پارافرمالدئید ۴٪ به مدت نیم ساعت تثبیت شد. سپس با اسیدکلریدریک ۲ نرمال به مدت یک ساعت و به دنبال آن با بافر بورات ۰/۱ مولار (pH ۸/۵) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 37°C انکوبه شد سپس به مدت ۳۰ دقیقه در معرض ۰/۳ درصد تریتون X-۱۰۰ و سرم بز ۱۰٪ قرار داده شد. سپس با آنتی‌بادی مونوکلونال ضد تیروزین هیدروکسیلاز (Abcam، آلمان) (۱:۱۰۰) به مدت ۲۴ ساعت در دمای 4°C قرار داده شد. پس از شستشو با بافر فسفات با آنتی بادی ثانویه DAbI (Abcam، آلمان) (۱:۱۰۰) به مدت ۲ ساعت در دمای 37°C و تاریکی قرار داده شد.

کتامین و زایلازین (شرکت Sigma، آمریکا) بیهوش نموده و سر آن‌ها با کمک قیچی مخصوص جدا کرده و کل بافت مغز را از مجسمه خارج نمودیم. بافت مغز را در میکروتوم یخچال‌دار قرار داده و سپس در ژل فیکساسیون مخصوص بافت فیکس نموده و برش‌هایی با ضخامت ۲۰ میکرون گرفتیم تا به نزدیکی ناحیه مورد نظر (جسم مخطط و جسم سیاه) برسیم. سپس با استفاده از اطلس پاکسینوس از پیاز بویایی به ابتدای جسم سیاه رسیده؛ برش‌زدن را متوقف نموده و پانچر مخصوص (به قطر ۱/۵ میلی‌متر) را داخل بافت مغز فرو برده و ابتدا جسم مخطط را خارج نمودیم و برای بار دوم پانچر را داخل بافت مغز فرو بردیم و جسم سیاه را از بافت مغز خارج نمودیم. نمونه‌ها را جداگانه در داخل میکروتیوب استریل در داخل تانک ازت قرار داده و به دنبال آن نمونه‌ها هوموژنیزه و سانتیفریوژ شده و با استفاده از تکنیک برادفورد و سپس با استفاده از کیت الایزا Mouse TNF alpha (ab۱۰۸۸۷۰) محصول شرکت abcam (آلمان) میزان پروتئین TNF- α اندازه‌گیری شد.

روش اندازه‌گیری سطح mRNA ژن‌های سیتوکروم b و اینترلوکین ۱۰ از بافت مغز

میزان RNA بافت مغز موش‌ها طبق دستور العمل کیت (شرکت Gene All، کره جنوبی) استخراج شد. با استفاده از نانودراپ مقدار RNA استخراج شده و خلوص آن مشخص شد. با استفاده از کیت HyperScriptTM RT premix with Random hexamer شرکت Gene All، cDNA سنتز شد. برای آن که مشخص شود cDNA به درستی استخراج شده است با استفاده از پرایمرهای طراحی شده برای سیتوکروم b و اینترلوکین ۱۰ واکنش زنجیره‌ای پلیمرز^{۲۸} انجام گرفت (جدول ۱).

cDNA سنتز شده در گروه‌های مختلف با استفاده از مسترمیکس (شرکت آمپلیکون، دانمارک) در حضور پرایمر اختصاصی‌های سیتوکروم b و اینترلوکین ۱۰ تحت واکنش Real-Time PCR قرار گرفت.

واکنش Real-Time PCR به شرح زیر انجام گرفت. دناتوراسیون در دمای 95°C به مدت ۱۰ دقیقه، در هر سیکل دناتوراسیون 93°C ۲۰ ثانیه، دمای اتصال و سنتز برای پرایمر GAPDH 58°C و زمان ۵۵ ثانیه، برای پرایمر سیتوکروم b و

²⁹ Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

³⁰ Tyrosine hydroxylase (TH)

²⁸ Real-Time PCR

رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اُئوزین^{۳۱}

کل بافت مغز در فرمالین ۱۰ درصد منتقل شد. سپس مراحل آگیری، شفاف سازی، حمام پارافین و قالب گیری انجام شد و در مرحله بعد به وسیله میکروتوم برش هایی به ضخامت ۷ میکرون تهیه شد. پس از رنگ آمیزی با تیروزین هیدروکسیلاز و هماتوکسیلین-اُئوزین (شرکت Merck، آلمان) وضعیت بافتی و تعداد نورون های دوپامینرژیک جسم سیاه شمارش شد. مقاطع با میکروسکوپ Dino Lite camera و دوربین Medacm n۱۰۷ و Dino Capture ۲/۰ بررسی و عکسبرداری شد. با استفاده از نرم افزار Image Pro Plus (V. ۶)، نقاط با سایز بزرگتر از ۷ میکرومتر (سطح ۵۰۰ میکرومتر و با ۵ بار تکرار) به عنوان هسته نورون های عصبی در نظر گرفته شد.

آنالیز آماری داده ها

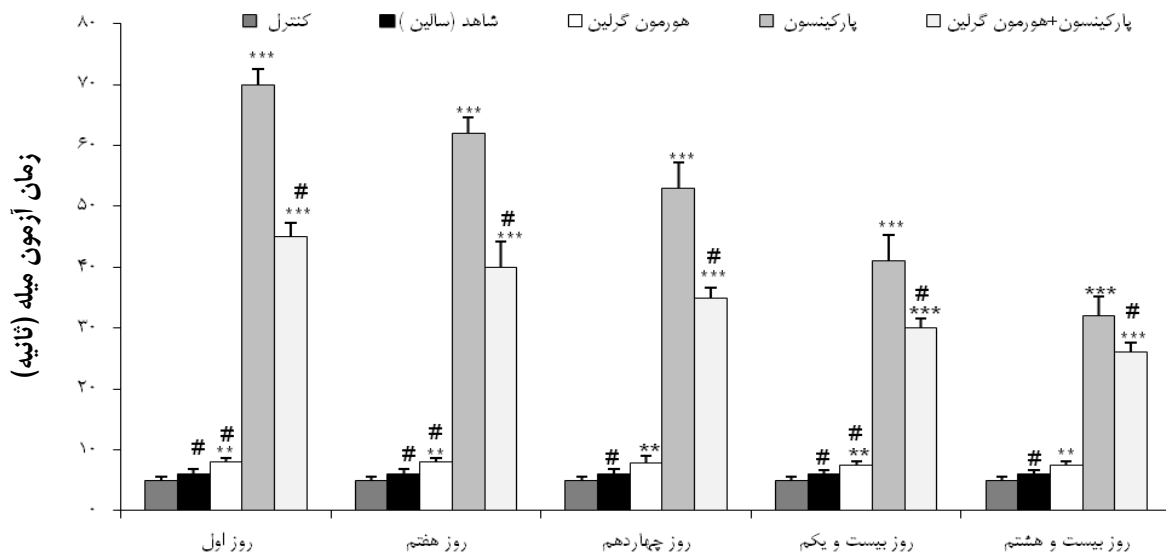
آنالیز داده های حاصل با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ صورت گرفت. مقایسه گروه ها توسط آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و سطح معنی داری بین گروه ها توسط آزمون تعقیبی توکی مشخص شد. داده ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش و مقادیر $p < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

در این مطالعه، اختلاف میانگین در زمان آزمون میله بین گروه های کنترل، شاهد (سالین) و هورمون گرلین در روزهای اول، هفتم، چهاردهم، بیست و یکم و بیست و هشتم معنادار است. گروه هورمون گرلین نسبت به دو گروه کنترل و شاهد (سالین) افزایش معناداری در زمان آزمون میله داشته است ($p < 0/01$). اختلاف میانگین در زمان آزمون میله بین گروه پارکینسون و گروه های کنترل، شاهد (سالین)، هورمون گرلین و پارکینسون + هورمون گرلین معنادار است و کاتالپسی در گروه پارکینسون افزایش معناداری داشته است ($p < 0/001$).

هورمون گرلین در گروه پارکینسون + هورمون گرلین موجب کاهش معناداری در زمان آزمون میله نسبت به گروه پارکینسون گردید ($p < 0/001$). میانگین مشاهده شده بین گروه های کنترل، شاهد (سالین) تفاوت معناداری نداشت ($p > 0/05$). اثر هورمون گرلین در زمان آزمون میله نسبت به گروه کنترل بیشتر بوده و کاهش معناداری در مقایسه با گروه پارکینسون دارد. اختلاف

³¹ Hematoxylin and Eosin (H & E)



نمودار ۱- اثر هورمون گرلین بر زمان آزمون میله در طی روزهای اول، هفتم، چهاردهم، بیست و یکم و بیست و هشتم بین گروه‌های پارکینسون و پارکینسون تیمار شده. داده‌ها به صورت انحراف معیار $\pm$ میانگین نشان داده شده است. **: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل با $p < 0.01$; ***: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل با $p < 0.001$; #: اختلاف معنی‌دار با گروه پارکینسون با $p < 0.001$.

پارکینسون نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری داشته است ($p < 0.001$). بیان ژن سیتوکروم b در گروه‌های هورمون گرلین و پارکینسون + هورمون گرلین نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری را نشان داده است ($p < 0.001$) ولی گروه کنترل با گروه شاهد (سالین) اختلاف معناداری نداشته است (نمودار ۳ سمت راست).

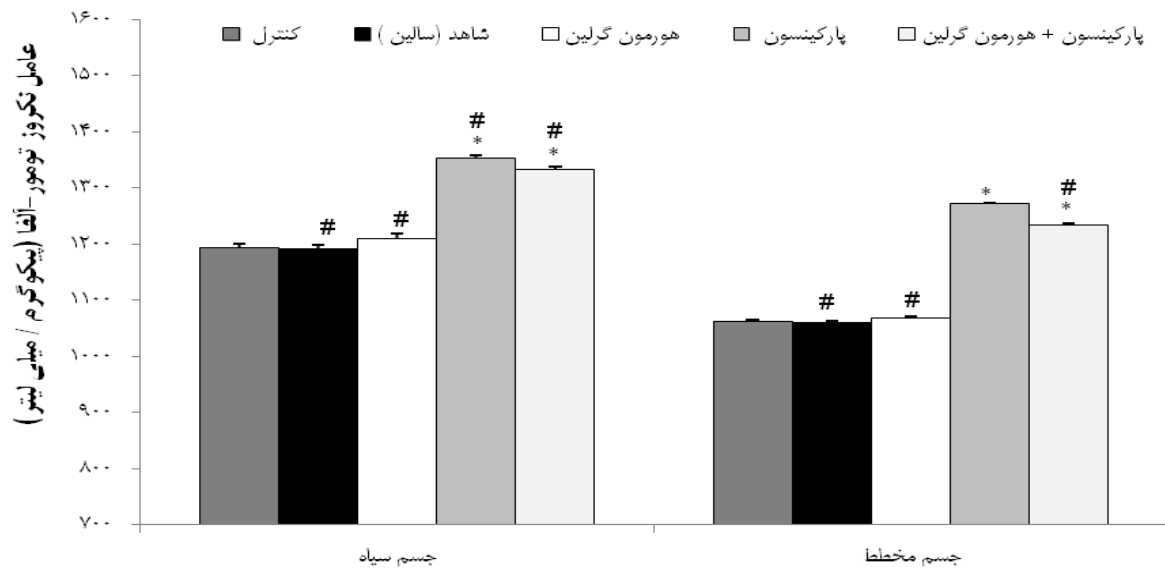
همانطوری که در نمودار ۴ مشاهده می‌شود در تایید مدل پارکینسونی از رنگ‌آمیزی تیروزین هیدروکسیلاز (تخصصی) و رنگ‌آمیزی همتوکسیلین و اتوزین (عمومی)، شمارش نورونی دوپامینرژیک در بخش جسم سیاه در گروه پارکینسون نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری داشته است ($p < 0.001$) اما بعد از درمان با هورمون گرلین شمارش نورونی دوپامینرژیک در بخش جسم سیاه افزایش یافته است به گونه‌ای که در تمامی حالات افزایش معناداری نسبت به گروه پارکینسون مشاهده می‌شود ($p < 0.001$). اختلاف مشاهده شده بین گروه پارکینسون و سایر گروه‌ها معنادار است ($p < 0.001$).

همانطوری که در شکل ۱ مشاهده می‌شود برش‌های تهیه شده از ناحیه جسم سیاه نیز مورد بررسی قرار گرفت. که در گروه پارکینسونی نورون‌های دوپامینرژیک جسم سیاه در مقایسه با گروه کنترل دچار تخریب شدند. در حالی که مصرف هورمون گرلین به مدت ۲۸ روز از کاهش نورون‌های

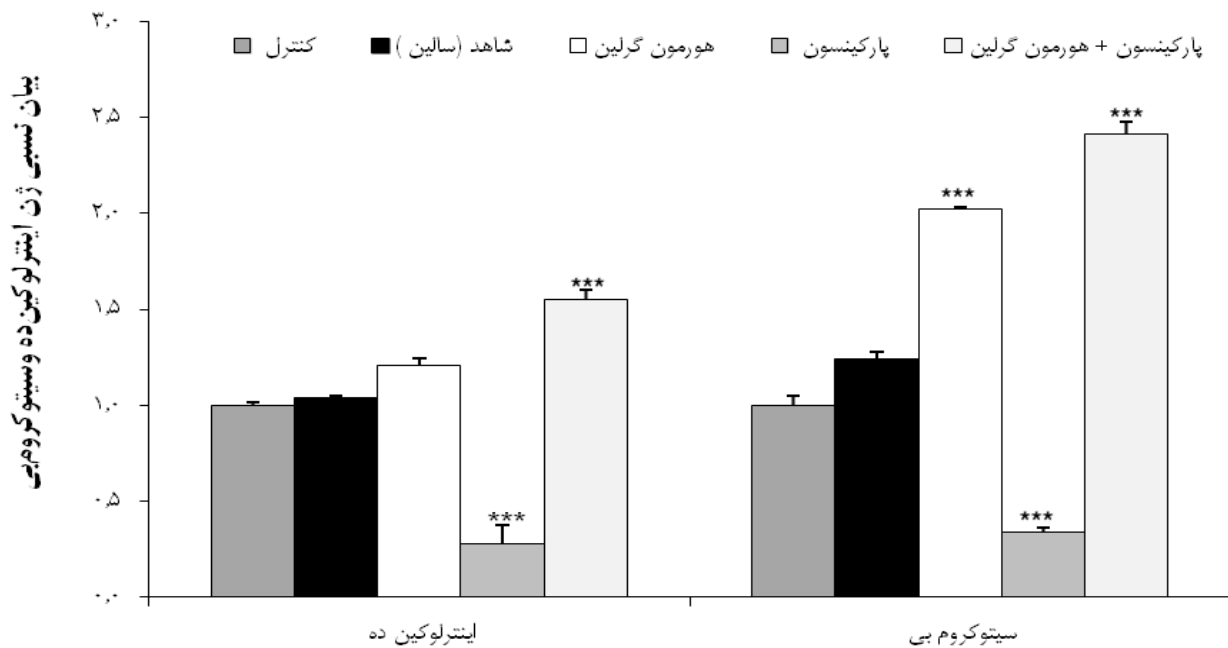
($p < 0.001$) و هورمون گرلین باعث کاهش سطح $TNF-\alpha$ شده است (نمودار ۲ سمت چپ). و همچنین سطح $TNF-\alpha$ در جسم مخطط در گروه‌های پارکینسون و گروه پارکینسون + هورمون گرلین نسبت به گروه کنترل دارای افزایش معناداری می‌باشد ($p < 0.001$) و MPTP باعث افزایش میزان التهاب در نورون‌های دوپامینرژیک در ناحیه جسم مخطط در مدل حیوانی شده است. سطح $TNF-\alpha$ در جسم مخطط در گروه پارکینسون + هورمون گرلین نسبت به گروه پارکینسون کاهش معنادار ($p < 0.001$) دارد و هورمون گرلین باعث کاهش سطح $TNF-\alpha$ شده است (نمودار ۲ سمت راست). سطح $TNF-\alpha$ در جسم مخطط نسبت به جسم سیاه کمتر می‌باشد و اختلاف بین آن‌ها در بین تمامی گروه‌ها معنادار می‌باشد ($p < 0.001$).

با توجه به نتایج Real-Time PCR بیان ژن اینترلوکین ۱۰ در گروه پارکینسون نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری را نشان می‌دهد ($p < 0.001$) که به عنوان یک فاکتور ضدالتهاب محسوب می‌شود و در گروه پارکینسون + هورمون گرلین نسبت به گروه کنترل افزایش معنادار نشان دارد ($p < 0.001$) و گروه کنترل با گروه‌های شاهد (سالین)، و هورمون گرلین اختلاف معناداری نداشته است ($p > 0.05$) (نمودار ۳ سمت چپ). همچنین بیان ژن سیتوکروم b در گروه

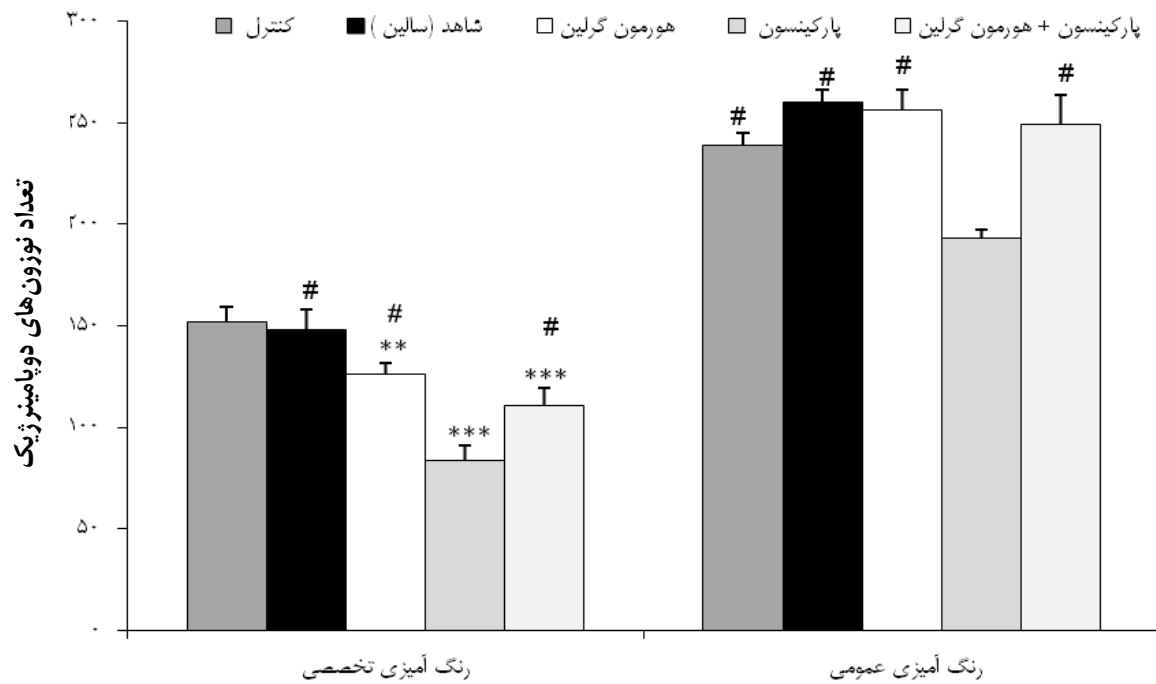
دوپامینرژیک جسم سیاه جلوگیری می‌کنند.



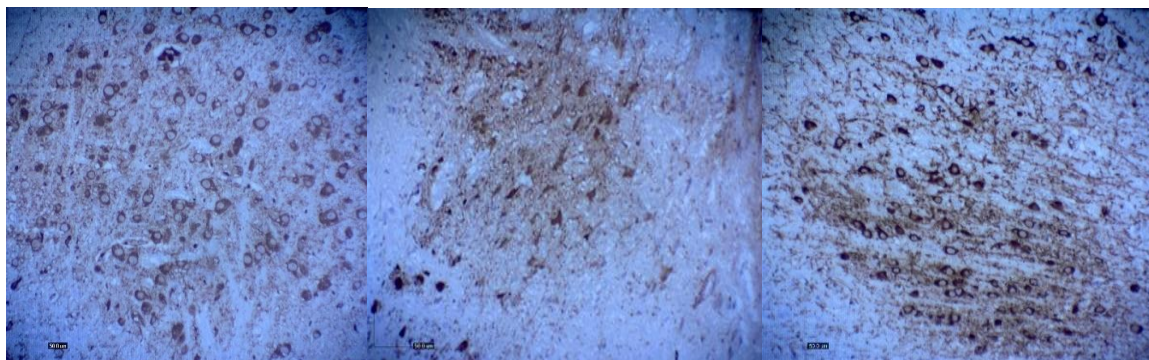
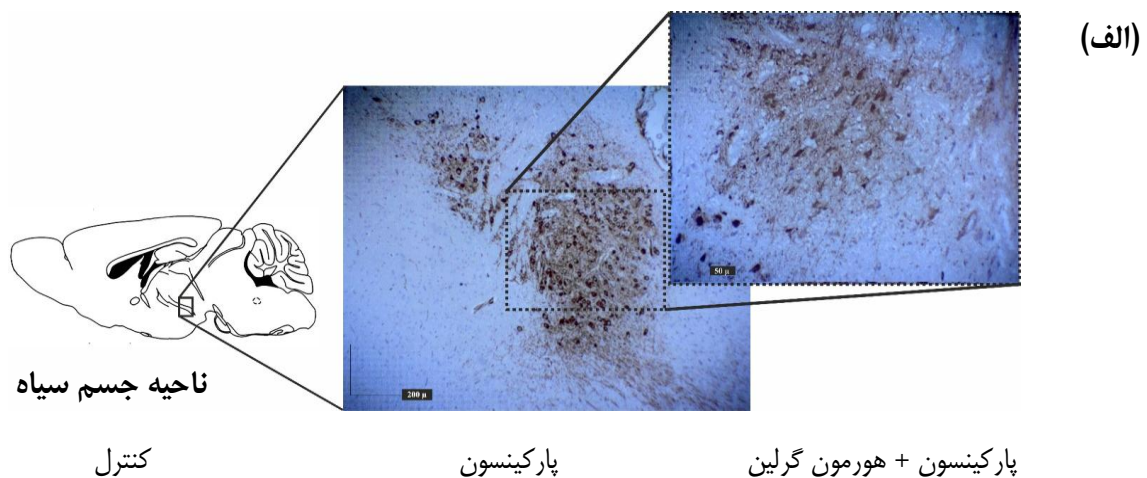
نمودار ۲- سطح پروتئین $TNF-\alpha$ در ناحیه جسم سیاه و جسم مخطط بین گروه‌های پارکینسون و پارکینسون تیمار شده. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین نشان داده شده است. *: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل با $p < 0.001$; #: اختلاف معنی‌دار با گروه پارکینسون با $p < 0.001$.

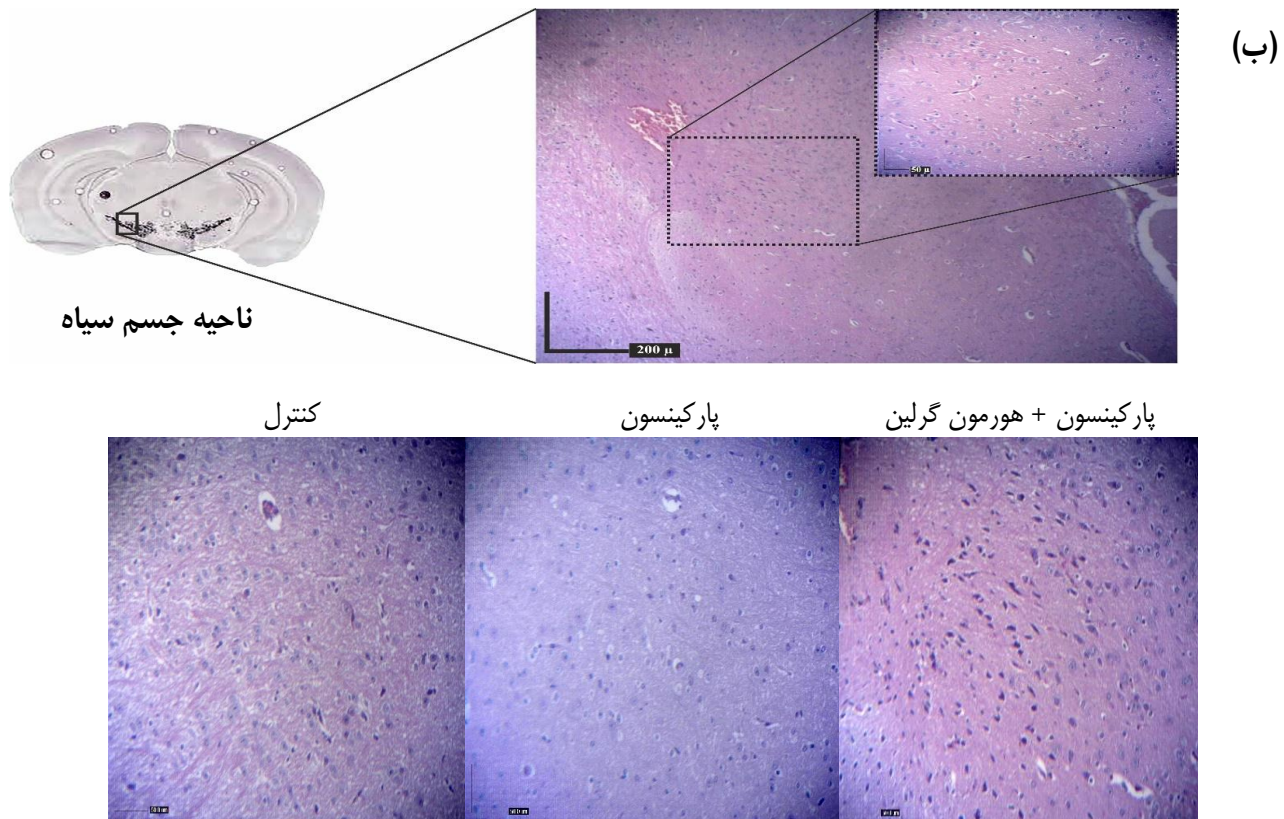


نمودار ۳- میزان بیان ژن اینترلوکین ۱۰ و سیتوکروم b در کل بافت مغز بین گروه‌های پارکینسون و پارکینسون تیمار شده. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین نشان داده شده است. ***: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل با $p < 0.001$.



نمودار ۴- تعداد نورون‌های دوپامینرژیک در برش‌های ناحیه‌ی جسم سیاه بین گروه‌های پارکینسون و پارکینسون تیمار شده با استفاده از رنگ‌آمیزی تیروزین هیدروکسیلاز (تخصصی) و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین (عمومی). داده‌ها به صورت انحراف معیار $\pm$ میانگین نشان داده شده است. ***: نماد اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل با $p < 0.001$; #: اختلاف معنی‌دار با گروه پارکینسون با $p < 0.01$.





شکل ۱ - تصاویر میکروسکوپی تهیه شده از برش عرضی در ناحیه جسم سیاه در موش‌های سوری نر با استفاده از رنگ آمیزی تیروزین هیدروکسیلاز (تخصصی) (الف) و رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین (عمومی) (ب) با بزرگ نمایی ۱۰۰ و ۱۰، نوار مقیاس ۵۰۰ میکرومتر. نقاط با قطر بزرگتر از ۷ میکرومتر به عنوان هسته نوروهای عصبی در نظر گرفته شد.

بحث

در این پژوهش تاثیر هورمون گرلین بر میزان $TNF-\alpha$ و میزان بیان ژن‌های سیتوکروم b، اینترلوکین ۱۰ در مدل پارکینسون القاء شده با MPTP بررسی شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تجویز هورمون گرلین با دوز ۰/۴ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۲۸ روز موجب کاهش معنادار زمان آزمون میله و بهبود کاتالپسی و کاهش سطح پروتئین $TNF-\alpha$ در ناحیه‌های جسم سیاه و جسم مخطط مغز و افزایش بیان ژن‌های سیتوکروم b و اینترلوکین ۱۰ در گروه‌های دریافت کننده MPTP می‌شود.

هورمون گرلین ممکن است به صورت مجزا باعث مهار تبدیل MPTP به متابولیت فعال خود یعنی ۱-متیل-۴-فنیل پیریدینیوم^{۳۲} گردد. یکی از عوامل شیمیایی موثر در ایجاد بیماری پارکینسون، MPTP است. MPTP بعد از تزریق قادر به عبور از سد خونی مغزی می‌باشد و در آستروسیت‌ها متابولیزه

شده و توسط منو آمین اکسیداز ^{33}B تبدیل به متابولیت فعال خود یعنی MPP^+ می‌گردد. MPP^+ به طور انتخابی تر، از طریق انتقال دهنده‌های دوپامینی وارد نوروهای دوپامینرژیک می‌شود. این ماده که توسط سلول‌های جسم سیاه مهار می‌شود، با مهار کمپلکس I میتوکندریایی مانع از فسفوریلاسیون اکسیداتیو می‌گردد و در نهایت مرگ سلولی رخ می‌دهد. به دنبال این امر تخلیه دوپامین از استریاتوم صورت می‌گیرد و بیماری پارکینسون ایجاد می‌شود. MPTP فعالیت کمپلکس I میتوکندری را فقط در سلول‌های غیر فعال کننده ناقل دوپامین مهار می‌نماید [۱۲]. نتایج حاصل از مطالعه ما نشان داد که تعداد نوروهای دوپامینرژیک در جسم سیاه موش‌های پارکینسونی کاهش یافته است. در حالی که مصرف هورمون گرلین به مدت ۲۸ روز باعث افزایش تعداد نوروهای دوپامینرژیک در جسم سیاه شده است. قاسمی و همکاران در سال ۱۳۹۶، با استفاده از رنگ آمیزی کروزیل و پله نشان دادند که ۶ هیدروکسی دوپامین تعداد نوروهای دوپامینرژیک را کاهش داده است

³³ Monoamine oxidase B (MAO-B)

³² 1- methyl- 4- phenylpyridinium (MPP^+)

نیکوکلام نظیف می‌باشد که توسط معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال تایید شده است. نویسندگان بدینوسیله از کلیه عزیزانی که در انجام این تحقیق همکاری صمیمانه داشته‌اند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

نقش نویسندگان

ن.ن: انجام مطالعه و آنالیز آماری؛ م.خ: ایده، طراحی، نظارت بر حسن انجام مطالعه و نگارش مقاله؛ ر.ا: طراحی، نظارت بر حسن انجام مطالعه و نگارش مقاله؛ م.ب: کمک در طراحی مطالعه و نگارش مقاله؛ ا.م: کمک در طراحی مطالعه و نگارش مقاله.

[۱۵]. نتایج این مطالعه نشان داد که سطح $TNF-\alpha$ در جسم مخطط نسبت به جسم سیاه کمتر می‌باشد. به علاوه به نظر می‌رسد که اختلاف گروه کنترل با سایر گروه‌های آزمایشی از لحاظ سطح $TNF-\alpha$ در ناحیه جسم سیاه بیش‌تر از ناحیه جسم مخطط است. این امر احتمالاً به علت تجمع بیشتر اعصاب دوپامینرژیک در جسم سیاه در مقایسه با جسم مخطط است و می‌تواند نشانه‌ی این باشد که عمده تغییرات $TNF-\alpha$ مربوط به نورون‌های دوپامینرژیک این نواحی است [۱۶]. بررسی کاتالپسی به عنوان یک پارامتر مهم برای تعیین آسیب حرکتی در مدل‌های حیوانی پارکینسون استفاده می‌شود. برای ارزیابی کاتالپسی از آزمون میله استفاده شد [۱۴]. یافته‌ها نشان می‌دهد که گرلین نقش مهمی در حفاظت نورون‌های جسم مخطط در برابر کاهش دوپامین در بیماران پارکینسون به عمل می‌آورد [۱۷]. شواهد نشان می‌دهد که تولید گرلین در بیماران پارکینسونی کاهش می‌یابد [۱۸]. گرلین با اتصال به گیرنده خود سبب تغییر شکل فضایی واحدهای G پروتئین شده که آن نیز به نوبه خود سبب تحریک فسفولیپاز C (PLC) ^{۳۴} در درون سلول شده و از این طریق با افزایش اینوزیتول تری فسفات (IP3) ^{۳۵} درون سلول سبب افزایش کلیسم درون سلولی می‌شود [۱۹].

مطالعات دیگر نشان می‌دهد که گرلین به واسطه خاصیت حفاظتی ممکن است به کاهش آسیب پذیری نورون‌های دوپامینرژیک کمک کند. گرلین همچنین می‌تواند آپوپتوز نورونی هیپوتالاموس و هیپوکامپ را مهار کند و با کاهش میکروگلیاها، خواص محافظت نورونی ایجاد می‌کند [۶].

نتیجه‌گیری

هورمون گرلین به واسطه اثر ضدالتهابی و نقش حفاظتی از طریق جلوگیری از آسیب پذیری نورون‌های دوپامینرژیک مغز میانی می‌تواند باعث بهبود بیماری پارکینسون ناشی از MPTP در موش‌ها شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه دوره دکتری خانم ندا

³⁴ Phospholipase C

³⁵ Inositol trisphosphate (IP3)

فهرست منابع

- [1] Balarajah S, Cavanna AE, The pathophysiology of impulse control disorders in Parkinson disease. *Behav Neurol* 26 (2013) 237-244.
- [2] Levin J, Kurz A, Arzberger T, Giese A, Höglinger GU, The differential diagnosis and treatment of atypical parkinsonism. *Dtsch Arztebl Int* 113 (2016) 61-69.
- [3] Kang MJ, Lee SS, Koh HC, Prooxidant properties of ascorbic acid in the nigrostriatal dopaminergic system of C57BL/6 mice. *Toxicology* 294 (2012) 1-8.
- [4] Taylor JM, Main BS, Crack PJ, Neuroinflammation and oxidative stress: co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease. *Neurochem Int* 62 (2013) 803-819.
- [5] Craig WJ, Health-promoting properties of common herbs. *Am J Clin Nutr* 70 (1999) 491-499.
- [6] W dos Santos V, Rodrigues S, Lúcia A, C De Lima T, R de Barioglio S, Raisman-Vozari R, Prediger RD, Ghrelin as a neuroprotective and palliative agent in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Curr Pharm Des* 19 (2013) 6773-6790.
- [7] Morgan AH, Rees DJ, Andrews ZB, Davies JS, Ghrelin mediated neuroprotection-A possible therapy for Parkinson's disease? *Neuropharmacology* 136 (2018) 317-326.
- [8] Zendeheel M, Allahdini P, Safarpour E, Abrehdari Z, Pourrahimi M, Mazaheri Nezhad Fard R, Effects of co-administration of ghrelin agonist (GHRP-2) and GH on TNF- α , IL-6 and iNOS gene expression induced by LPS in the mouse brain. *Iran J Vet Res* 14 (2013) 341-344.
- [9] Moon M, Kim HG, Hwang L, Seo J-H, Kim S, Hwang S, Kim S, Lee D, Chung H, Oh MS, Lee KT, Park S, Neuroprotective effect of ghrelin in the 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease by blocking microglial activation. *Neurotox Res* 15 (2009) 332-347.
- [10] Prusak B, Grzybowski T, Non-random base composition in codons of mitochondrial cytochrome b gene in vertebrates. *Acta Biochim Pol* 51 (2004) 897-905.
- [11] Blanco FJ, Rego I, Ruiz-Romero C, The role of mitochondria in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 7 (2011) 161-163.
- [12] Hantraye P, Brouillet E, Ferrante R, Palfi S, Dolan R, Matthews RT, Beal MF, Inhibition of neuronal nitric oxide synthase prevents MPTP-induced parkinsonism in baboons. *Nat Med* 2 (1996) 1017-1019.
- [13] Ahmadi R, Sohrabian L, The effect of ghrelin agonist, exercise, and nicotine on catalepsy in an animal model of parkinson's disease. *Shefaye Khatam J* 5 (2017) 28-34.
- [14] Toy WA, Petzinger GM, Leyshon BJ, Akopian GK, Walsh JP, Hoffman MV, Vučković MG, Jakowec MW, Treadmill exercise reverses dendritic spine loss in direct and indirect striatal medium spiny neurons in the 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 63 (2014) 201-209.
- [15] Ghasemi Z, Kiasalari Z, Ebrahimi F, Ansari F, Sharayeli M, Roghani M, Neuroprotective effect of diosgenin in 6-hydroxydopamine-induced model of Parkinson's disease in the rat. *Sci Res J Shahed Univ* 129 (2017) 87-98.
- [16] Nicola SM, Surmeier DJ, Malenka RC, Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Ann Rev Neurosci* 23 (2000) 185-215.
- [17] Andrews ZB, The extra-hypothalamic actions of ghrelin on neuronal function. *Trends Neurosci* 34 (2011) 31-40.
- [18] Bayliss JA, Lemus M, Santos VV, Deo M, Elsworth JD, Andrews ZB, Acylated but not des-acyl ghrelin is neuroprotective in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. *J Neurochem* 137 (2016) 460-471.
- [19] Grinspoon S, Miller KK, Herzog DB, Grieco KA, Klibanski A, Effects of estrogen and recombinant human insulin-like growth factor-I on ghrelin secretion in severe undernutrition. *J Clin Endocrinol Metabol* 89 (2004) 3988-3993.

Research paper

The effect of ghrelin hormone on level of tumor necrosis factor alpha and gene expression of cytochrome b and interleukin 10 in *substantia nigra* in an animal model of Parkinson's disease

Neda Nikokalam Nazif¹, Maryam Khosravi^{1*}, Ramesh Ahmadi², Maryam Bananej¹, Ahmad Majd¹

1. Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, North-Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Department of Physiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran

Received: 3 July 2019

Accepted: 5 August 2019

Abstract

Background and aims: Inflammatory pathways play an important role in incidence and progression of Parkinson's disease (PD). Ghrelin has anti-inflammatory and antioxidant effects and inhibits the release of inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α). This study has aimed to investigate the effect of ghrelin hormone on amount of TNF- α , and gene expression of cytochrome b and interleukin10 in Parkinson's disease induced by 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in male mice.

Methods: Thirty male NMRI mice were randomly divided to 5 groups (six mice in each) including control, saline, ghrelin hormone, Parkinson, and Parkinson + ghrelin hormone. Parkinson's disease was induced by intraperitoneal (i.p.) injection of 25mg/kg MPTP for 4 days. Ghrelin was injected for 28 days (0.4 μ g/kg, i.p.). Catalepsy was evaluated by bar test at the 1st, 7th, 14th, 21th, and 28th day after injection of MPTP. TNF- α level and gene expression of cytochrome b, and interleukin10 were measured in *Substantia nigra* and *Corpus striatum* by ELISA and Real time PCR techniques at the 29th day.

Results: Catalepsy and TNF- α level significantly increased in *substantia nigra* and *corpus striatum* of the Parkinson group, whereas gene expression of cytochrome b, and interleukin10 decreased ($p < 0.001$). On the other hand, ghrelin hormone significantly decreased catalepsy and TNF- α level while increased gene expression of cytochrome b, and interleukin10 ($p < 0.001$).

Conclusion: It seems that ghrelin hormone improves catalepsy, decreases TNF- α level, and increases gene expression of cytochrome b, and interleukin10 by inhibiting inflammatory pathways involved in PD.

Keywords: Parkinson, Catalepsy, Ghrelin, 1-Methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine

Please cite this article as follows:

Nikokalam Nazif N, Khosravi M, Ahmadi R, Bananej M, Majd A, The effect of ghrelin hormone on level of tumor necrosis factor alpha and gene expression of cytochrome b and interleukin 10 in *substantia nigra* in an animal model of Parkinson's disease. *Iran J Physiol Pharmacol* 3 (2019) 63-73.

*Corresponding author: maryam-khosravi@iau-tnb.ac.ir (ORCID ID: 0000-0001-8210-9066)