

اثر داروی گیاهی آیمود بر تولید نیتریک اکساید در سلولهای میکروگلیای ملتهب

بنفشه امیر اصلانی^{۱،۲}، فرزانه صابونی^{۱*}، شاه صنم عباسی^۱، مولود میررضوی^{۱،۲}، حبیب‌الله ناظم^۲، حمیدرضا خرم خورشید^۳ و محمدصادق ثابت^۴

^۱ تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری

^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 از حالت استراحت به فنوتیپ فعال و ترشح فاکتورهای قابل نفوذ، توانایی منحصر به فرد آنها را در پاسخ به محرکهای التهابی نشان می‌دهد. 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 تعدیل‌کننده 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 می‌دهد رفتهای 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 می‌توان با استفاده از این دارو به کاهش آسیبهای نورونی ناشی از فعالیت شدید میکروگلیا در بیماریهای نورودژنراتیو کمک شایانی نمود.

واژه‌های کلیدی: میکروگلیا، نیتریک اکساید، LPS، نورودژنراتیو، آیمود

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۴۴۵۸۰۳۷۴-۴۴۵۸۰۳۷۴، 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 می‌شود که با خصوصیات جسم سلولی کوچک، استتالهای منشعب و بیان کم آنتی‌ژنهای

سطحی همراه است. در پاسخ به آسیب مغز، ایسکمی و محرکهای التهابی چون سیگنالهای میکروبی، پروتئینهای پاتولوژیکی، ATP خارج سلولی و فاکتورهای سرمی، سلولهای 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

پیامبر های سیگنال سلولی در تنظیم روند التهاب مؤثر است (۷). بنابراین ضمن اینکه NO دارای نقش فیزیولوژیکی در سیگنال سلولی نورونی است، اماستز 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 از مغز موشهای صحرايي نوزاد ۱ تا ۴ روزه نژاد wistar انجام گردید. ابتدا پرده منتر از بافت 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 ۱۰ تا ۱۴ روز از زمان کشت، انواع مختلفی از سلولهای عصبی شامل نورونها و گلیاها (آستروسیت ها، الیگودندروسیت ها و میکروگلیا) در سطح فلاسک قابل رویت بودند (۱)(شکل ۱).

انتشار همچون سیتوکین ها، کموکاین ها، فاکتورهای تروفیک و میانجیگرهای التهابی اسید چرب مثل آراشیدونیک اسید، پروستاگلاندین های E₂، D₂ و F_{2 α} ، فاکتور فعال کننده پلاکتها، ترومبوکسان B₂ و لوکوتری ان B₄ می باشند (۳).

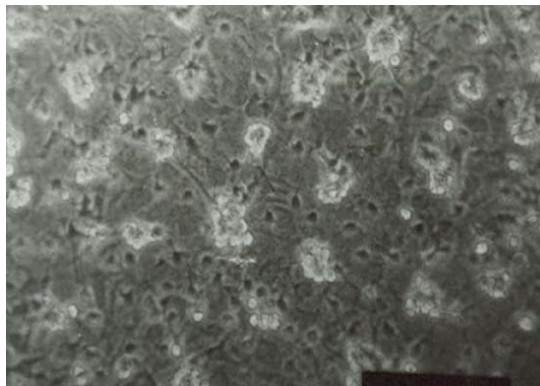
بسیاری از عوامل محرک سلولهای میکروگلیا و همچنین دسته وسیعی از آسیبهای نورولوژیکی و بیماریها با القای iNOS و تولید NO مرتبط است (۳). القای iNOS در سلولهای میکروگلیا، توسط اندوتوکسین LPS مشتق شده از دیواره باکتریهای گرم منفی که به عنوان اولین عامل محرک قوی سلولهای میکروگلیا در مقالات علمی مطرح شد و نیز توسط سیتوکین های معینی همچون اینترفرون گاما (INF- γ)، فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF- α) یا اینترلوکین یک آلفا (IL-1 α) که از طریق گیرنده های مشخصی در غشای پلاسمایی عمل می کنند، صورت می پذیرد (۳ و ۴). همچون سایر سلولهای میلوئید، سلولهای میکروگلیا با آزاد کردن مقدار زیادی از سیتوکین ها، کموکاین ها، گونه های فعال اکسیژن (ROS)، پروتازها 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- κ B تنظیم می شود. اتصال LPS به رسپتور خود منجر به تخریب و آزاد شدن سریع مهار کننده این فاکتور یعنی I κ B شده، و انتقال NF- κ B 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 نیتريت و نیتروزیل دار کردن

اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد.

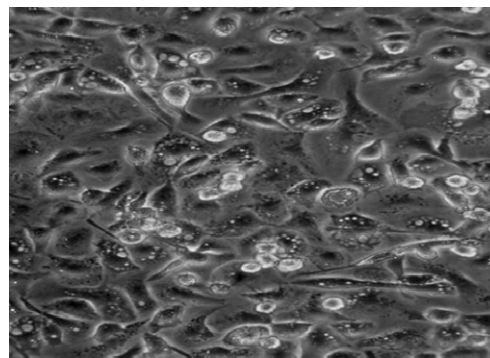
پس از این مدت سلولهای دیگر به شکل ورقه ای از کف فلاسک جدا می گردند که این ورقه سلولی حاوی آستروسیت ها و الیگودندروسیت ها می باشد. در حالی که سلولهای میکروگلیا همچنان به سطح فلاسک چسبیده باقی می مانند(۱). برای جدا کردن سلولهای میکروگلیا از سطح فلاسک، از Cell scrapper استفاده گردید. پس از رنگ آمیزی و شمارش (حدود ۱۰۰۰۰ سلول در هر ول)، سلولهای میکروگلیا داخل پلیتهای ۹۶ تایی کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت 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 $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ در محیط کشت DMEM استفاده گردید. پس از تهیه رفتهای مورد نیاز ($1/2000$ - $1/50$) از داروی آیمود (با استفاده از آیمود و محیط کشت DMEM)، جهت فعال سازی سلولها از LPS استفاده گردید و سپس تیمار آنها 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 $1/5 \text{ml}$ منتقل گردید و پس از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه و دور 1500RPM ، حدود $50 \mu\text{l}$ از آن داخل پلیتهای ۹۶ تایی دیگری انتقال داده شدند. سپس حدود $50 \mu\text{l}$ معرف Griss (تهیه شده از شرکت دارویی سیگما) به هر ول اضافه گردید و میزان جذب توسط دستگاه الیزا ریدر (Microplate reader lab system multiscan) و در طول موج 540 nm (۱۶) مورد بررسی قرار گرفت.

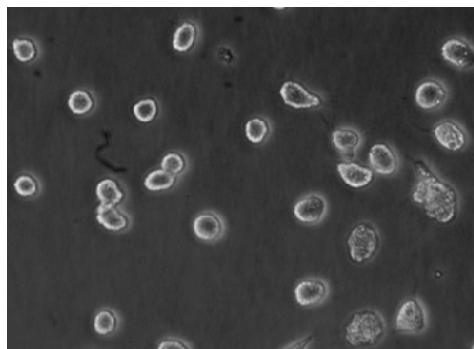


شکل ۱- سلولهای میکروگلیا با جسم سلولی گرد و شفاف که بر سطح سلولهای آستروسیت نوع اول قرار گرفته اند. (میکروسکوپ فاز کنتراست، بزرگنمایی ۲۰۰)

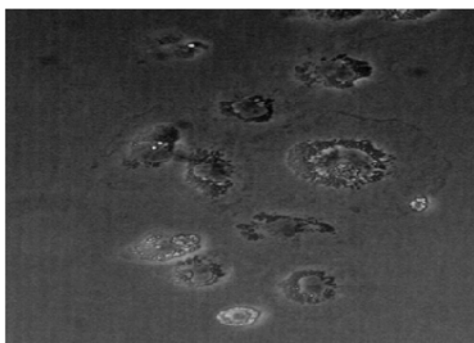


شکل ۲- سلولهای میکروگلیا یک هفته پس از کشت میکروسکوپ فاز کنتراست، بزرگنمایی ۲۰۰

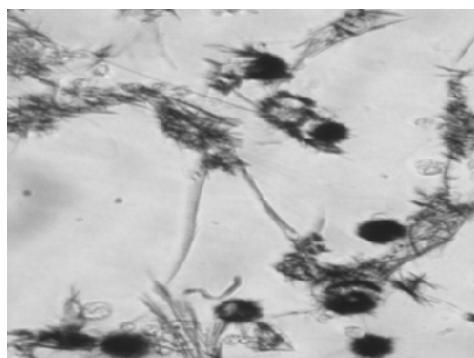
خالص سازی سلولهای میکروگلیا: جداسازی این سلولها بر اساس قدرت چسبندگی به سطح بستر است. با توجه به اینکه از میان سلولهای گلیا، سلولهای میکروگلیا دارای قدرت چسبندگی بالاتری هستند(۱۶)، لذا در مواجهه با تریپسین همچنان متصل به کف بستر باقی می مانند در صورتی که سایر سلولهای گلیا (آستروسیت ها و الیگودندروسیت 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 $0/25$ درصد (۱۶) استریل به فلاسکها



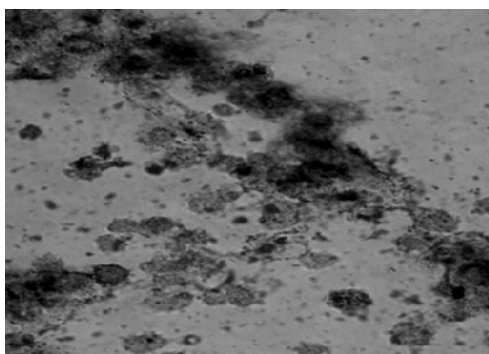
شکل ۳- سلولهای میکروگلیا پس از حذف سایر سلولها با استفاده از روش آنزیمی میکروسکوپ فاز کنتراست، بزرگنمایی ۲۰۰



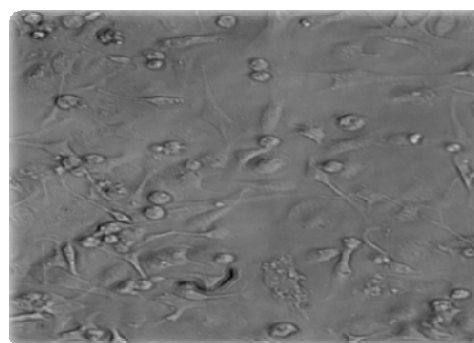
شکل ۴- اثر LPS (1 µg / ml) بر سلولهای میکروگلیا میکروسکوپ فاز کنتراست، بزرگنمایی ۲۰۰



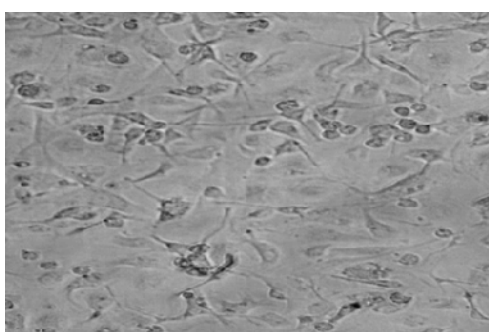
شکل ۵- تست MTT سلولهای میکروگلیا در حضور LPS و محیط کشت DMEM پس از ۴۸ ساعت میکروسکوپ فاز کنتراست، بزرگنمایی ۲۰۰



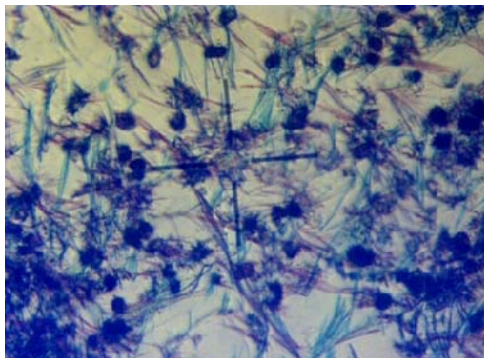
شکل ۶- سلولهای میکروگلیا تیمار شده با LPS و رقت ۱/۵۰ آیمود میکروسکوپ فاز کنتراست، بزرگنمایی ۲۰۰



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



شکل ۸- سلولهای میکروگلیا تیمار شده با LPS 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



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

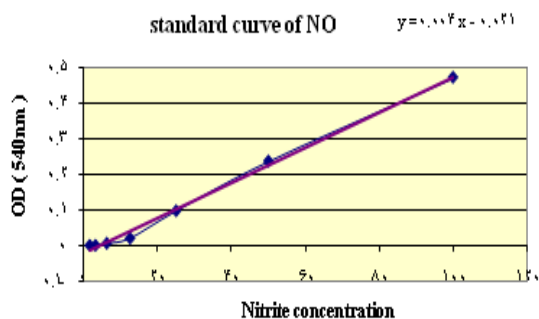
تترازولیوم MTT را به کریستالهای بنفش رنگ فارمازون تبدیل می‌کنند. در نهایت جذب با استفاده از دستگاه الیزا ریدر (Microplate reader lab system multiscan) و در طول موج ۵۸۰ nm مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت (۱۲).

آنالیز آماری: تجزیه واریانس (ANOVA) داده‌ها 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 می‌دهند سلولهایی که LPS به همراه رقت ۱/۵۰ داروی آیمود دریافت کرده بودند، قادر به بقاء نبودند (شکل ۶)، همین امر در مورد سلولهایی که با رقتهای ۱/۱۰۰ و ۱/۵۰۰ دارو

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 می‌گردد. در این روش از ماده NaNO_2 جهت تهیه غلظتهای NO_2^- استفاده می‌شود. (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 در هر ول در پلیت ۹۶ تایی، حدود $10 \mu\text{l}$ 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 $100 \mu\text{l}$ از DMSO اضافه شد. لازم به ذکر است، سلولهایی که از لحاظ متابولیسی فعال باشند نمک زرد رنگ

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 تا ۱/۲۰۰۰) یک سیر صعودی در میزان بقای سلول‌ها مشاهده شده و مقدار فعالیت متابولیکی سلول‌ها تقریباً مشابه با گروه کنترل می‌باشد. 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 ملاحظه‌ای را در نمودار نشان می‌دهد.

بحث

در این سری از آزمایشات، داروی IMOD به عنوان مهارکننده دیگری برای ژن iNOS مطرح می‌شود. 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 می‌باشد. 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 می‌گردد به نحوی که در رقت‌های بالاتر، میزان بقای سلول‌ها تقریباً مشابه با گروه کنترل می‌باشد. ذکر این نکته لازم است که هر دارویی دارای دُز مؤثر مشخصی است، بنابراین به نظر می‌رسد دُز مؤثر داروی آیمود برای کاهش میزان نیتریک اکساید، در محدوده رقتی ۱/۸۰۰ تا ۱/۲۰۰۰ می‌باشد. 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 می‌رسد این رقت‌ها دارای اثر توکسیک بر سلول‌های میکروگلیا بوده، به طوری که در این رقت‌ها میزان بقای سلول‌ها حداقل بوده است و تشکیل

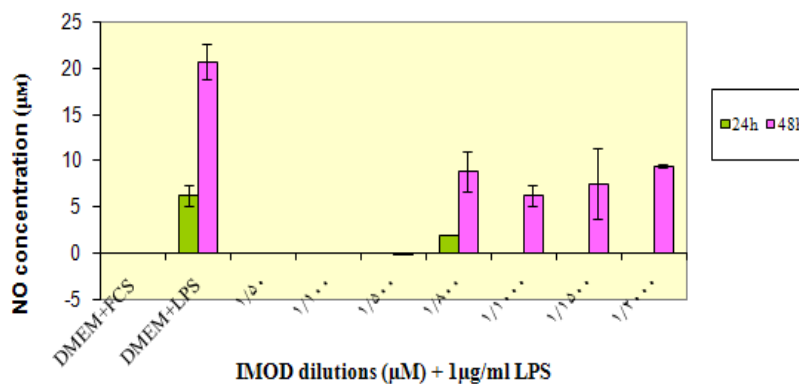
تیمار شده بودند نیز مشاهده گردید. به نظر می‌رسد در رقت‌های بالاتر از ۱/۵۰۰ (۱/۸۰۰، ۱/۱۰۰۰، ۱/۱۵۰۰ و ۱/۲۰۰۰) دریافت دارو دارای اثر سویی بر سلول‌ها نبوده و میزان بقای سلول‌ها تقریباً مشابه با گروه کنترل می‌باشد (شکل‌های ۴-۲ و ۸-۶).

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 و ۱/۵۰۰ در حد صفر بوده است. با بررسی میزان بقای سلول‌ها (نمودار ۳)، به نظر می‌رسد 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 می‌دهد که در رقت‌های بالاتر دارو، 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 می‌دهد. 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.

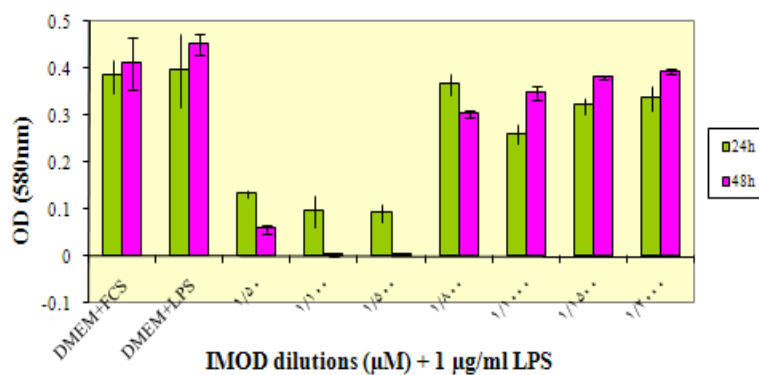
با مقایسه میزان تولید NO در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت، به نظر می‌رسد پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان تیمار مقدار کمی NO توسط سلول‌های میکروگلیای ملتهب آزاد شده است و بیشترین میزان NO تولید شده پس از گذشت ۴۸ ساعت از زمان تیمار بوده است، به طوری که تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین میزان NO آزاد شده در این دو زمان دیده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

نتایج حاصل از سنجش فعالیت متابولیکی سلول‌ها: با توجه به نمودار ۳، به نظر می‌رسد که در رقت‌های پایین (۱/۵۰، ۱/۱۰۰ و ۱/۵۰۰)، میزان بقای سلول‌ها در کمترین حد خود بوده و دارای تفاوت قابل ملاحظه‌ای با گروه کنترل می‌باشد. بررسی نتایج میکروسکوپی نیز گویای این

کریستالهای فارمازون منفی و یا بسیار کم گزارش شده است (نمودار ۳).



نمودار ۲- 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 متابولیسی 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. ($P < 0/05$)

می باشد و بسیاری از عوامل 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.

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

استفاده از داروی آیمود به عنوان یک داروی گیاهی ضد التهاب می‌تواند 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.

با توجه به گسترش روز افزون استفاده از داروهای ضد التهاب سنتتیک و عوارض بی‌شمار 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 می‌دهد آیمود به عنوان یک داروی گیاهی ضد التهاب (۱۰ و ۱۳)، می‌تواند هم در افراد سالم و هم در افراد مبتلا به ویروس ایدز استفاده شود. بنابراین با توجه به نتایج سایر محققان و نیز پروژه انجام شده، به نظر می‌رسد

منابع

- ۱ - علیزاده، مریم و همکاران، ۱۳۸۸. تاثیر شیکونین، داروی گیاهی مورد استفاده در آسیای شرق، بر فعالیت و آپوپتوز سلولهای Khorram-Khorshid HR. 2009. Preclinical and phase 1 clinical safety of Setarud (IMOD™), a novel immunomodulator. DARU Vol. 17, No. 3, p. 148-156.
2. Azonov JA. Et al, (2008). Protective effects of setarud (IMOD™) 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., 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.
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. Mohraz M., Khairandish P., Kazerooni PA., Davarpanah MA., Shahhosseiny MH., Mahdavian B., Vaziry S., Shahriari 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.
13. Moncada, S. and J.P. Bolaños, 2006. *Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration*. Journal of Neurochemistry, 97(6): p. 1676-1689.
14. Pålsson-McDermott, E.M. and L.A.J. O'Neill, 2004. *Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4*. Immunology, 113 (Y)p. 153-162.
15. Saura, J., J.M. Tusell, and J. Serratosa, 2003. *High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization*. Glia, 44(3): p. 183-189.
16. 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.

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