DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.11.0

مهار سمیت روتنون در مدل سلولی بیماری پارکینسون با عصاره متانولی زیتون‌های ایرانی

دینا مرشدی[1*]، فرهنگ علی اکبری[1،2]، سها پارسافر[1]، حسین محمدبیگی[2]، فائزه دهقانی عصمت‌آبادی[1] و علیرضا امیری نودیجه[3]

[1] ایران، تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده زیست‌فناوری صنعت و محیط زیست، گروه مهندسی زیست فرآیند

[2] دانمارک، آرهوس، دانشگاه آرهوس، مرکز بین رشته‌ای علوم نانو (iNANO)

[3] ایران، تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی، گروه زیست فناوری مولکولی گیاهی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۱۲

چکیده

بیماریهای تحلیل سیستم عصبی از جمله بیماری پارکینسون (PD)، بیماریهای درمان ناپذیر و به شدت رو به رشد در جوامع بشری هستند. در PD با از بین رفتن سلولهای نرونی به ویژه در جسم سیاه مغز، بیمار با عوارض حرکتی و ادراکی غیر قابل برگشتی روبرو می شود. آسیب و مرگ نرونی همراه با تجمعات پروتئین آلفاسینوکلئین است. برخی سموم نیز با ایجاد شرایط استرس‌زا بر روی سلولهای عصبی می توانند باعث ایجاد PD شوند. روتنون به عنوان سم عصبی باعث نابودی سلولهای عصبی شده، منجر به PD می‌گردد. در این مطالعه به تأثیر عصاره‌های متانولی میوه سه رقم زیتونِ ایرانی شامل روغنی، زرد و مجنون بر روی سلولهای مهندسی شده مدل PD با بیش بیان آلفاسینوکلئین پرداخته شد. این سلولها به شدت به تیمار با روتنون واکنش نشان دادند. علاوه بر ایجاد سمیت، طول رشته‌های نوریت نیز در تیمار با روتنون کاهش یافت. عصاره‌ها به صورت معنی‌داری سلولها را در مقابل سمیت ناشی از روتنون حفظ کرده و میزان ROS درون سلولی نیز به طور معنی‌داری کاهش یافت. پاکسازی رادیکالهای فعال نشان داد که این عصاره‌ها می توانند از طریق این مکانیسم نقش محافظتی برای سلولهای نرونی داشته باشند، اما با توجه به رفتار متفاوت عصاره‌ها در محیط برون سلولی به نظر می‌رسد مکانیسمهای پیچیده‌تری در نقش محافظتی آنها در نرونها دخیل باشند. این مطالعه نشان داد رقمهای اصیل ایرانی روغنی و زرد می توانند به صورت معنی‌داری موجب زنده مانی سلولهای حساس نرونی حتی در حضور روتنون شوند؛ باتوجه به بومی بودن رقمهای زیتون ، این نتایج می توانند بسیار ارزشمند باشند.

واژه های کلیدی: پارکینسون، روتنون، سمیت سلولی، عصاره زیتون

* نویسنده مسئول، تلفن: ۹۸۲۱۴۴۷۸۷۴۲۳+ ، پست الکترونیکی: morshedi@nigeb.ac.ir

مقدمه

بیماری پارکینسون (PD) از شایعترین بیماریهای تحلیل سیستم اعصاب مرکزی است که همراه با افزایش طول عمر و سالخوردگی جمعیت جهان روبه رشد است؛ درحالی که تاکنون درمانی برای آن یافت نشده است . تحلیل سیستم اعصاب مرکزی به این معنی است که سلولهای عصبی در ناحیه خاص و یا در نواحی مختلف مغز شروع به تحلیل و از بین رفتن می کنند. در PD معمولاً بیماری با نابودی سلولهای سازنده و انتقال دهنده دوپامین (دوپامینرژیک) در ناحیه جسم سیاه همراه است و موجب علائم حرکتی و غیر حرکتی گسترده می شود. از عواملی که نشان داده شده است موجب بروز بیماری می شود می توان به تجمع آمیلوئیدی پروتئین آلفاسینوکلئین، در معرض قرار گیری با سموم آفت کش و حتی فلزات سنگین اشاره کرد(۲۱،۱۲۸و ۲۷). آفت کش روتنون به عنوان یکی از

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.11.0

ترکیبات شناخته شده در مدل سازی پارکینسون مطرح است و در معرض قرارگیری طولانی مدت با آن منجر به بروز بسیاری از عوارض دیده شده در انسان ازجمله ازبین رفتن سلولهای دپامینرژیک در ناحیه جسم سیاه، تشکیل تجمعات آلفاسینوکلئینی به نام لوئی بادیها در سلولها، پلی اوبیکوئینه شدن آنها و حتی افزایش پاسخهای التهابی و فعال شدن میکروگلیاهاست (۹ و ۱۶).

در سالهای اخیر مطالعات زیادی برروی ترکیبات در دسترس طبیعی در مواد غذایی شده است، ترکیباتی که می توانند به عنوان ترکیبات زیستی فعال بر علیه بیماریهای حاد و درمان ناپذیر مانند بیماریهای تحلیل سیستم عصبی فعالیت داشته باشند (۷، ۲۵ و۳۲). بسیاری از مطالعات نشان داده است که دلیل سلامت بالای رژیم غذایی مدیترانه‌ای به واسطه وجود ترکیبات فعال در مواد غذایی آن است. در این نوع رژیم غذایی، استفاده از فراورده های زیتون اعم از میوه و روغن بالا است (۱۱). زیتون حاوی ترکیبات فنولی متنوعی است که در برگ و میوه آن قرار دارد و البته بسته به زمان میوه دهی و اقلیم و همچنین نوع رقم زیتون این ترکیبات از نظر غلظت و نوع تغییراتی می کنند (۲۲). مطالعات متعددی نشان داده است که استخراجهای زیتون بر روی تشکیل تجمعات آمیلوئیدی و همچنین سمیت آنها که منجر به بیماریهای تحلیل سیستم عصبی می‌شوند اثر مهاری دارند؛ ازجمله برروی پروتئین تائو، آ-بتا و آلفاسینوکلئین که تجمعات آمیلوئیدی آنها در بیماریهای آلزایمر و پارکینسون تأیید شده است (۳ و ۱۳). اخیراً نشان داده شده است که در سیستم درون تنی نیز استخراجهای زیتون می توانند مانع اثر سمی تجمعات آمیلوئیدی شوند (۶ و ۲۴). به نظر می رسد که استرسهای اکسیداتیو در بروز و گسترش آلزایمر و پارکینسون بسیار مؤثر است (۱۷). استرس اکسیداتیو به علت برهم خوردن تعادل بین میزان تولید و باز جذب گونه‌های رادیکالی فعال در سلول است که می تواند ساختار زیست مولکولها رادر سلول تغییر داده و حتی تخریب نماید و به دنبال آن موجب غیر طبیعی شدن فعالیتهای سلولی به صورت گسترده در میتوکندری، شبکه‌های اندوپلاسمی، هسته و غشاء پلاسمایی شود (۱۷). علاوه بر تأثیر استخراجهای زیتون بر روی تجمعات سمی آمیلوئیدی، این استخراجها خاصیت آنتی اکسیدانی بالایی نیز دارند. مطالعات نشان داده است ترکیبات پلی فنولی موجود در فراورده‌های زیتون اعم از میوه، روغن و برگ، گونه‌های رادیکالی در مدل پارکینسونی را پاکسازی می کنند (۲۴). در این مطالعه اثر استخراجهای متانولی میوه زیتون سه رقم روغنی، زرد و مجنون بر روی مدلهای برون تنی PD مطالعه شد. در این بررسیها، سلولهای SH-SY5Y در معرض روتنون قرار گرفتند و سمیت سلولی ارزیابی شد. همچنین میزان ROS و ریخت در سلولها سنجیده شد. نتایج اثر حفاظتی استخراجها در مقابل عوامل آسیب رسان را نشان دادند.

مواد و روشها

حلالها و نمکها از شرکت Merck (آلمان)، رادیکال آلفا، آلفا-دی‌فنیل-بتا-پیکریل‌هیدرازیل (DPPH)، دی‌متیل تیازول-۲-ایل)-۲،۵ دی‌فنیل تترازولیوم (MTT)، روتنون و رتینوئیک اسید از شرکت Sigma (آمریکا) خریداری شدند. محیط کشت DMEM، سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS) و آنتی‌بیوتیک Penicillin/Streptomycin از شرکت GIBCO (آمریکا) تهیه شدند.

تهیه عصاره میوه زیتون: میوه های دو رقم اصلی ایرانی زیتون زرد و روغنی به همراه یک رقم کشت شده در مزارع تحقیقاتی طارم به نام رقم T20 یا مجنون بعد از ۱۸۰ روز برداشت شدند (۵). بعد از جداکردن هسته، ناحیه گوشتی میوه در نیتروژن مایع منجمد شد و بعد از کوبیدن شدید به صورت پودر آماده گردید. به ازا هر ۳ گرم از پودر به دست آمده ۱۲ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد به نمونه اضافه گردیده، در دمای اتاق با ورتکس به شدت مخلوط شد و با دور ۱۳۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شد. روماند بعد

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.11.0

از انجماد خشک به صورت پودر در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. در هنگام مطالعه، نمونه ها در آب/ DMSO با نسبت ۹۰ به ۱۰حل شد و به نام عصاره‌های MExR (استخراج روغنی)، MExZ (استخراج زرد) و MExM (استخراج از مجنون) در غلظتهای مختلف مورد مطالعه قرارگرفت.

بیش بیان و تمایز سلولهای SH-SY5Y: یکی از وقایعی که منجر به بیماریPD می شود بیش بیان پروتئین آلفاسینوکلئین است، بنابراین ایجاد مدل سلولی با استفاده از بیان بالای پروتئین در مطالعات مربوط به مکانیسم پارکینسون و نیز تحقیقات دارویی مفید واقع می شود. سلولهای SH-SY5Y دارای سیستم کامل دوپامینرژیک هستند که به طور گسترده‌ای برای مدل‌سازی PD استفاده می‌شوند. این رده سلولی از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. حامل لنتی‌ویروسی pLEX-JRed-TurboGFP (تهیه شده از بن یاخته) که در آن cDNA آلفاسینوکلئین کلون شده بود به همراه حاملهای بسته‌بندی کننده (psPAX) و پوششی (pMD2.G) به سلولهای HEK293T انتقال داده شدند. محیط کشت حاوی ویروس جمع‌آوری و با استفاده از PEG6000 تغلیظ شد. ویروس تغلیظ شده به سلولهای HEK293T و سپس سلولهای SH-SY5Y انتقال داده شدند.

کشت و تمایز سلولی: برای کشت سلولهای SH-SY5Y از محیط کشت DMEM-F12 حاوی ۱۰ درصد سرم گاوی و ۱ درصد پنی‌سیلین/استرپتومایسین استفاده شد. پس از ساخت محیط کشت و بافر فسفاتی سلولها از مخزن نیتروژن مایع خارج شده و به سرعت یخزدایی گردیدند. بعد از شمارش سلولی، سلولها با غلظت ۱۵۰۰۰ در میلی لیتر در پلیت های ۹۶ خانه کشت داده شدند. دو روز پس از کشت، غلظت سرم محیط ۲ درصد گردید و به محیط ۱۰ میکرو مولار رتینوئیک اسید اضافه گردید.

تیمار سلولی: بعد از هفت روز کشت، سلولها با محیط کشت حاوی دو غلظت ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از استخراجهای MExR، MExZ و MExM همراه و بدون ۱ میکرومولار روتنون تیمار شدند و بعد از ۴۸ ساعت سلولها از جهت زنده مانی (آزمون MTT و LDH). برای درک بیشتر از نحوه عملکرد عصاره‌ها بر روی سمیت سلولی روتنون، تغییرات گونه‌های فعال اکسیژن درون سلولی (Reactive Oxygen Species: ROS) مطالعه شد. تغییرات طولی دنباله‌های عصبی (نوریتها) نیزمورد بررسی قرارگرفتند.

بررسی فعالیت آنزیمهای میتوکندریایی با استفاده از آزمون MTT: MTT یک نمک تترازولیوم زرد رنگ و محلول در آب است. شکستن حلقه تترازولیوم با آنزیمهای دِهیدروژناز، MTT محلول را به فورمازان غیرمحلول و بنفش رنگ تبدیل می کند. دِهیدروژنازهای میتوکندریایی فعال در سلولهای زنده، علت این تبدیل هستند و این تبدیل در سلولهای مرده اتفاق نمی‌افتد. از همین ویژگی برای ارزیابی میزان سلولهای زنده استفاده می شود. بعد از زمان مورد نظر برای تیمار، ۲۰ میکرولیتر محلول MTT حل شده در بافر فسفاتی (PBS) با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به سلولها اضافه گردید و سلولها به مدت ۴ ساعت در تاریکی در انکوباتور نگهداری گردیدند. پس از این زمان، محیط کشت خارج شده و کریستالهای فورمازانِ تشکیل شده توسط ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال DMSO حل شده و جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه طیف‌سنج نوریِ پلیت ریدر (Lab system Multiscan-ms) بررسی گردید.

بررسی حفظ تمامیت غشاء با اندازه‌گیری میزان آزاد شدن آنزیم لاکتات دِهیدروژناز (LDH): اساس این آزمون سنجش میزان رها شدن آنزیم لاکتات دِهیدروژناز در محیط است. این آنزیم سیتوپلاسمی است و تنها در مواقع آسیب سلولی در محیط دیده می شود. اگر

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.11.0

سوبسترای این آنزیم (پیروات) در محیط باشد، مورد استفاده قرار گرفته و میزان آن در محیط کم می شود. کاهش سوبسترا نسبت به نمونه کنترل بیانگر آسیب غشای سلولها و خروج آنزیم به محیط کشت می باشد. پس از ۴۸ ساعت تیمار سلولی ، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محیط روی سلولها از هر چاهک برداشته شده و به نیم میلی‌لیتر محلول از قبل آماده شده، طبق دستور کیت (کیت شرکت پارس آزمون) افزوده گردید. جذب نمونه‌ها چهار بار با فاصله زمانی ۱ دقیقه در طول موج ۳۴۰ نانومتر بررسی و طبق دستورالعمل و فرمول کیت میزان لاکتات دِهیدروژناز آزاد شده از سلولهای تیمار شده اندازه گیری شد.

سنجش گونه‌های فعال اکسیژن درون سلولی (ROS): به منظور بررسی میزان تولید رادیکالهای آزاد در سلولها از 2′-7′-Dichlorodihydrofluorescein) DCFH-DA diacetate) استفاده شد که یک مولکول نفوذپذیر به درون سلول و غیرفلورسانس است. این ماده توسط استرازهای سلولی به DCFH2 (2′-7′-dichlorodihydrofluorescein) شکسته می شود. پراکسیدازها، سیتوکروم C و Fe^{2+} در حضور هیدروژن‌پراکسید می توانند DCFH2 را به DCF (2′-7′-dichlorofluorescein) اکسید کنند. برای بررسی میزان ROS درون سلولی پس از اعمال تیمار مورد نظر و انکوباسیون به مدت ۴-۵ ساعت، DCFH-DA (حل شده در اتانول ۱۰۰ درصد) با غلظت ۱۵ µM (در PBS یا محیط کشت حاوی ۲ درصد FBS) به سلولها زده شد و به مدت ۴۵ دقیقه در تاریکی انکوبه گشت. سلولها تریپسینه شده و در PBS حل شدند سپس شدت فلورسانس نمونه‌ها توسط دستگاه فلوریمتری VARIAN مدل Cary خوانده‌شد. افزایش DCF در سلولها با افزایشِ فلورسانس در ۵۳۰ نانومتر با برانگیختگی در ۴۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها: ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با توانایی پاکسازی رادیکال آزاد توسط عصاره‌ها با استفاده از آزمون DPPH مورد ارزیابی قرار گرفت. محلول متانولی DPPH با غلظت ۰/۰۰۲ درصد وزنی/حجمی آماده شد. سپس یک میلی‌لیتر از این محلول با یک میلی‌لیتر (حاوی غلظتهای مختلف) از عصاره‌ها ترکیب شد و پس از ۳۰ دقیقه قرارگیری در دمای اتاق، جذب نوری محلول در ۵۱۷ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت.

اندازه‌گیری طول دنباله‌های عصبی (نوریتها): یکی از شاخصه‌های سلولهای عصبی، دنباله‌های عصبی (اکسونها و دندریتها) می باشد که عملکرد اصلی سلولهای عصبی با واسطه آنها اعمال می شود. بعد از تمایز، سلولهای دوپامینرژیکِ SH-SY5Y دارای دنباله‌های گسترده خواهند شد. این دنباله‌ها بسیار سریع به سموم عصبی واکنش می‌دهند. اندازه نوریتها بعد از ۴۸ ساعت تیمار با استفاده از [Image J 15] سنجیده شد. تصاویر میکروسکوپی با بزرگ نمایی ۲۰ و ابعاد ۴۶۰۸ در ۲۵۹۲ پیکسل در نظر گرفته شد. بعد از کالیبراسیون تصویر در نرم افزار با تبدیل پیکسل به میکرومتر، طول نوریتها در سه تصویر برای هر نمونه سنجیده شد.

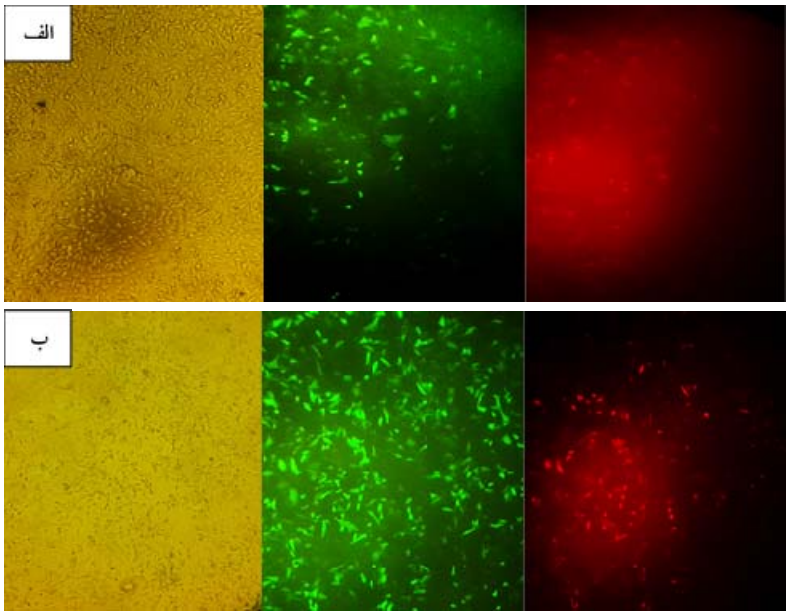
آنالیز آماری داده‌ها: آزمایشات با حداقل سه تکرار انجام شد و نتیجه به صورت میانگین به همراه انحراف معیار ارائه شد. داده‌ها با نرم‌افزار SPSS مورد تحلیل قرار گرفته، معنادار بودن نتایج بین دو گروه و درون گروه‌ها به ترتیب با روشهای Student-T test و One-way ANONA سنجیده شد. حداقل معنی‌دار بودن $P < ۰/۵$ در نظر گرفته شده است.

نتایج و بحث

در مطالعه حاضر به بررسی اثرات محافظتی نرونی سه رقم مختلف زیتون ایرانی (روغنی، زرد و مجنون) بر روی سمیت آلفاسینوکلئین و روتنون بر سلولهای دوپامینرژیک SH-SY5Y پرداخته شد. در این تحقیق نشان داده شد که

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.11.0

حضور عصاره‌های روغنی و زرد باعث کاهش سمیت روتنون بر سلولهای عصبی می‌شوند. ابتدا سلولهای SH-SY5Y با ویروس حاوی ژن آلفاسینوکلئین که در آن دو ژن دیگر GFP و J-red نیز بیان می‌گردید، آلوده شدند و صحت انتقال با مطالعات میکروسکوپ فلورسانس تأیید گردید (شکل ۱).

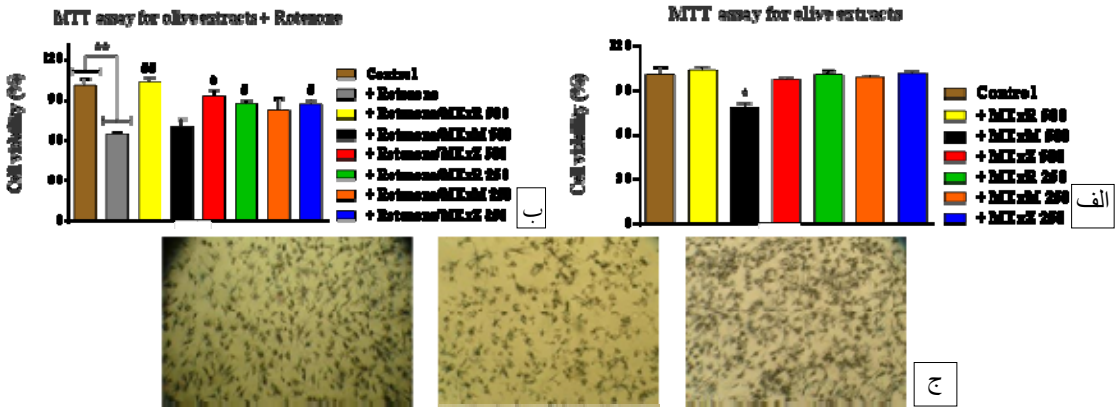


شکل۱- تصاویر میکروسکوپ نوری (ستون سمت چپ) و فلورسانس GFP (ستون وسط) و فلورسانس J-red (ستون سمت راست) از سلولهای SH-SY5Y آلوده شده با لنتی‌ویروس نوترکیب: الف) ۲۴ و ب) ۴۸ ساعت پس از آلوده‌سازی در بزرگنمایی 10X

سپس تیمار با سم عصبی شناخته شده روتنون بر روی این سلولها مطالعه شد. بعد از تمایز سلولهای بیش بیان شده SH-SY5Y با رتینوئیک اسید، سلولها در معرض روتنون (۱ میکرومولار) قرارگرفتند. نتایج سنجش MTT چنانچه در شکل ۲ الف، ب و ج نشان داده شده است موجب کاهش زنده‌مانی سلولهای عصبی شد. سمیت روتنون در سلولهای نورنی می تواند به دلایل متفاوتی باشد. یکی از آنها مداخله در زنجیره انتقال الکترون در میتوکندری بین کمپلکس یک و یوبی کوئینون است که منجر به فقدان NADH و نهایتاً کمبود ATP و انرژی می شود و منجر به فعال شدن سیستم آپوپتوز درونی با فعال شدن مسیر کاسپاز می شود (۴). از طرفی در واجذب کلسیم و سیناپس زایی اختلال ایجاد می کند (۵). در مرحله بعد سلولها در حضور استخراجهای متانولی زیتون تیمار شد. در مطالعات پیشین این گروه نشان داده شده بود که این روش عصاره گیری موجب استخراج بالایی از پلی فنولها و اثر دهی بالای آنها بر روی تجمعات سمی و گونه های رادیکال آزاد می شود (۵ و ۲۲). حضور عصاره‌ها به تنهایی به غیر از غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتراز MExR تأثیر خاصی روی زنده‌مانی سلولها نداشت (شکل ۲ الف). حضور عصاره‌های MExZ و همچنین MExR در هر دو غلظت ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر به طور همزمان با روتنون باعث کاهش معنی دار سمیت روتنون به ویژه در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از MExR.($p \leq 0.01$) گردید (شکل ۲ ب). در این مطالعه عصاره MExM برخلاف دو عصاره دیگر نقش محافظتی برای سلولهای عصبی در مقابل روتنون از خود نشان نداد و خود نیز در غلظت بالا تا حدی منجر به سمیت سلولی گردید. در مطالعات پیشین نشان داده شده است که غلظت و محتوی ترکیبات پلی فنولی زیتون مانند اولئوروپئین (Oleuropein)

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.11.0

بستگی به عوامل ژنتیکی و محیطی از جمله رقم زیتون، محل کشت و زمان برداشت میوه دارد (۳۱). مطالعات نشان داده است که ترکیبات پلی فنولی موجود در میوه زیتون نقش مهمی در فعالیتهای منسوب به زیتون در رابطه با سلامت دارند (۱۰، ۱۴ و ۱۵). اما گاهی غلظتهای بالا با ایجاد ترکیبات ناشی از متابولیزم پلی فنولها مانند تولید دوپامین و هیدروکسی تیروزول می توانند موجب سمیت شوند (۳۰). در مطالعات بر روی دوپامین و مشتقات آن مشخص شده است که غلظت بالا می تواند در سلولهای عصبی دوپامینرژیک سمیت و آپوپتوز را القاء کند (۱۹ و ۲۸).



شکل ۲- آزمون MTT برای تعیین سمیت نرونی روتنون در عدم حضور و حضور استخراجهای MExZ، MExR و MExM

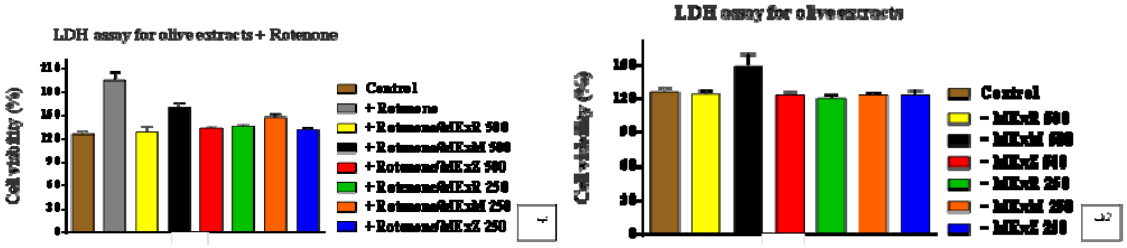
الف: سلولها در حضور دو غلظت ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از استخراجهای MExZ، MExR و MExM به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری گردیدند. سلول کنترل SH-SY5Y بیش بیانی آلفاسینوکلئین بدون هیچ تیماری است. ستاره معنادار بودن نسبت به کنترل با $p < ۰/۰۵$ را نشان می دهد.

ب: سلولها به مدت ۴۸ ساعت با روتنون (یک میکرومولار) در حضور دو غلظت ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از استخراجهای MExZ، MExR و MExM تیمار شدند. سلول کنترل سلول SH-SY5Y بیش بیانی آلفاسینوکلئین بدون هیچ تیماری است. دو ستاره معنادار بودن نسبت به کنترل با $p < ۰/۰۱$ را نشان می دهد. یک و دو δ به ترتیب معنادار بودن نسبت به تیمار با روتنون را با $p < ۰/۰۵$ و $p < ۰/۰۱$ نشان می دهد.

ج: تشکیل بلورهای فورمازان در سلولهای بیش بیانی آلفاسینوکلئین SH-SY5Y بعد از نفوذ نمک MTT و تجزیه آنزیمی. سمت چپ کنترل، وسط تیمار با روتنون و سمت راست تیمار با روتنون و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از MExR.

نتایج سنجش LDH نیز نتایج سنجشMTT را پشتیبانی کرد. لاکتات دِهیدروژناز آنزیمی سیتوپلاسمی است که در هنگام آسیب سلولی به محیط خارج سلولی وارد می شود. در حضور روتنون آسیب سلولی منجر به آزاد سازی آنزیم در محیط شده، اما حضور توام استخراجهای زیتون اثر مهاری بر آسیب سلولی و رهاسازی آنزیم در محیط داشت (شکل ۳). در مطالعه‌ای که اخیراً انجام گردید، نشان داده شد که مشتقات اولئوروپئینی که از میوه زیتون استخراج شده بود مانع اثر سمی تجمعات آلفاسینوکلئین می شود و سلولهای نرونی و حتی الیگودندریتی را در مقابل تجمعات سمی آن محافظت می کند (۲۲). این نکته بسیار حائز اهمیت است، چرا که تجمعات پروتئینی که در محیط اطراف سلول قرار دارند، معمولاً با مکانیسمهای ویژه‌ای به ویژه با تغییر در نفوذ پذیری غشای پلاسمایی که در نهایت باعث بر هم خوردن هومئوستازی و شرایط طبیعی سلول می شود، منجر به آسیب و در نهایت مرگ سلولهای نرونی می‌شوند. اما در مورد روتنون مکانیسم سمیت نرونی معمولاً با ورود روتنون به سلول و آغاز مسیرهایی است که یا با افزایش استرس اکسیداتیو همراه است و یا با تأثیر بر بیان و تولید پروتئینهای تشکیل دهنده نوریتها عملکرد نرونها را به شدت تضعیف می کند (۲۳).

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.11.0



شکل ۳- آزمون LDH برای تعیین سمیت نرونی روتنون در عدم حضور و حضور استخراجهای MExZ ، MExR و MExM .

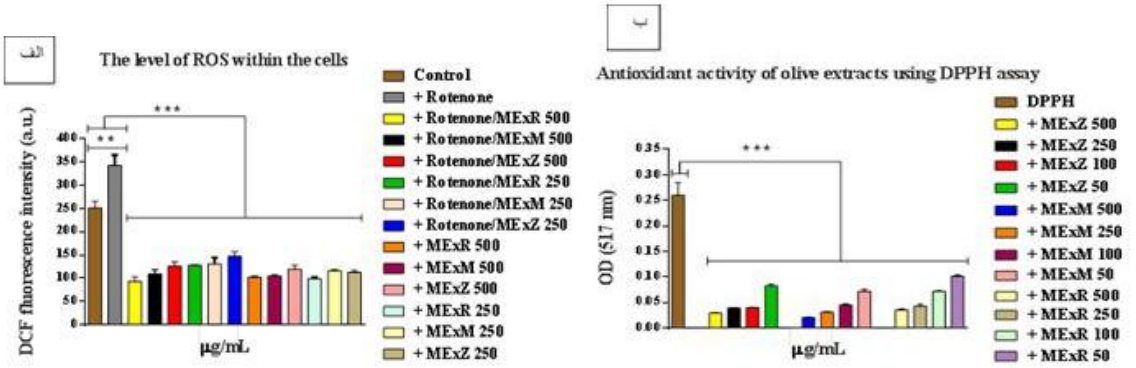
الف: سلولها در حضور دو غلظت ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از استخراجهای MExZ، MExR و MExM به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری گردیدند. سلول کنترل سلول SH-SY5Y بیش بیانی آلفاسینوکلئین بدون هیچ تیماری است.

ب: سلولها به مدت ۴۸ ساعت با روتنون (یک میکرومولار) در حضور دو غلظت ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از استخراجهای MExZ، MExR و MExM تیمار شدند. سلول کنترل سلول SH-SY5Y بیش بیانی آلفاسینوکلئین بدون هیچ تیماری است.

تیمار با استخراجهای زیتون همراه با کاهش شدید ROS درون سلولی: اعتقاد بر این است که استرس اکسیداتیو و تولید بیش از حد طبیعی رادیکالهای آزاد نقشی کلیدی در بروز و پیشرفت PD دارد(۱ و ۲). روتنون نیز در مسیر مهار انتقال الکترون در زنجیره تنفسی از کمپلکس یک به دو موجب تجمع الکترونها و آسیب میتوکندری می شود که منبع تشکیل رادیکالهای آزاد هستند(۲۶) ترکیباتی که بتوانند موجب کاهش ترکیبات اکسیداتیو یا مهار استرس ناشی از آنها شوند، امروزه اهمیت ویژه‌ای در بهبود آسیبهای مغزی به ویژه در بیماران مبتلا به تحلیل سیستم عصبی پیدا کرده‌اند. همان طور که نتایج حاصل از آزمون DCF نشان می دهد (شکل ۴- الف) تیمار سلولهای نرونی SH-SY5Y با روتنون بعد از ۱۲ ساعت منجر به افزایش شدید و معنی‌داری در میزان ROS درون سلولی گردید ($p\leq 0.01$). درحالی که حضور استخراجهای سه زیتون روغنی، زرد و مجنون در هر دو غلظت به شدت میزان ROS درون سلولی را کاهش می دهد ($p \leq 0.01$). این فرض وجود دارد که تأثیر استخراجهای زیتون در کاهش مقدار ROS درون سلولی به واسطه ویژگی پاک‌کنندگی رادیکالها توسط ساختارهای آروماتیکی پلی فنولی موجود در این استخراجها باشد. برای نشان دادن اثر پاکسازی کننده رادیکالهای آزاد سنجش DPPH نیزانجام گردید. در شکل ۴-ب نشان داده شده است که استخراجهای هر سه رقم زیتون منجر به پاکسازی رادیکالها از محیط شده است و حتی این فعالیت در MExM محسوس‌تر می‌باشد. اما در آزمونهای بقای سلولی (شکل ۲و ۳) دیده شد MExZ، MExR نقش حفاظتی بیشتری داشته اند. همان طور که در بخشهای پیشین نیز اشاره شد آسیبهای نورنی فرآیندهای پیچیده و چند وجهی هستند و تأثیر عوامل محافظتی می تواند به واسطه مکانیسمهای دیگر علاوه بر حذف اثر رادیکالهای آزاد باشد که در ادامه نیز تأثیر بر دنباله های عصبی بررسی شده است.

محافظت دنباله های عصبی در مقابل روتنون به واسطه استخراجهای زیتون: تغییر در تعداد و پیکربندی دنباله‌های عصبی یا نوریتها، از مهم ترین اتفاقاتی است که در واکنش به شرایط نامناسب در سلولهای عصبی رخ می دهد. نوریتها به شرایط محیطی حساس هستند و به این واسطه به عنوان یکی از شاخصه‌های مطالعه سمیت در سلولهای عصبی محسوب می‌شوند (۲۰). همان طور که در شکل ۵ دیده می شود روتنون به شدت موجب کوتاه شدن و کاهش تعداد نوریتها در سلولهای نورونیSH-SY5Y می شود. مطالعات دیگر نیز نشان داده است که روتنون به شدت بر روی ساختارهای نوریتها تأثیر گذار است و این تأثیر به واسطه مهار تولید بتا-توبولین و تیروزین هیدروکسیلاز می‌باشد (۲۰ و ۲۳).

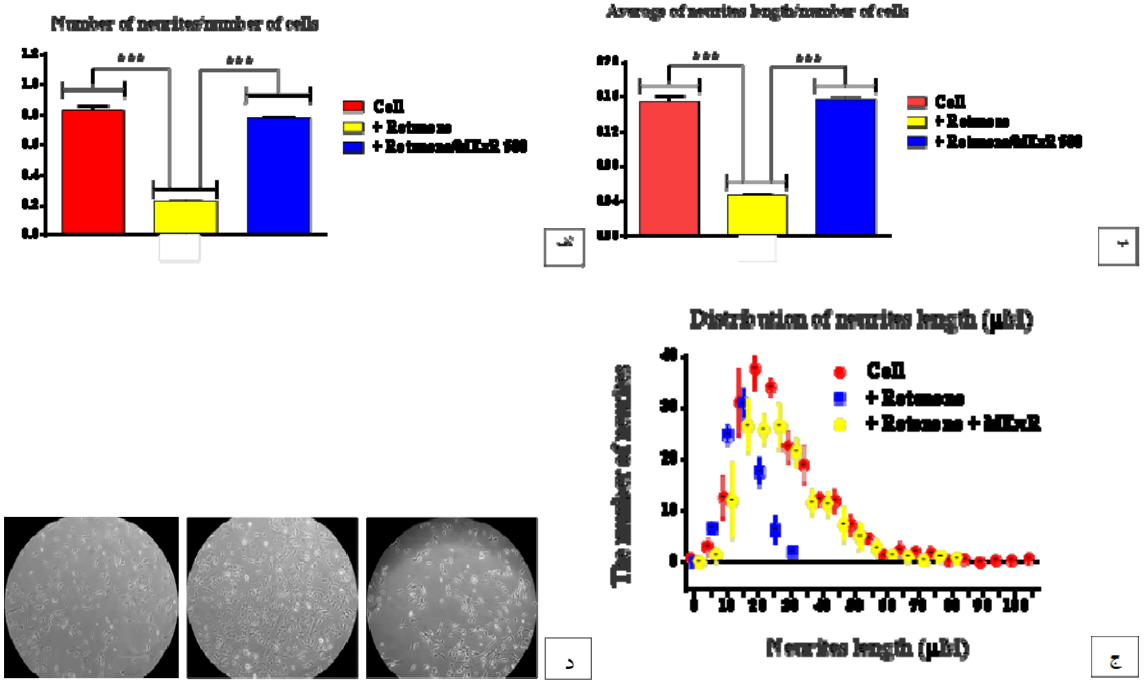
DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.11.0



شکل ۴- فعالیت آنتی اکسیدانی درون سلولی و برون سلولی استخراجهای زیتون:

الف: سنجش ROS درون سلولی؛ سلولها به مدت ۱۲ ساعت با روتنون (یک میکرومولار) در حضور دو غلظت ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از استخراجهای MExZ، MExR و MExM تیمار شدند.

ب: سنجش پاکسازی رادیکالهای DPPH از محیط توسط استخراجهای MExZ، MExR و MExM در دوغلظت ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر. دو و سه ستاره به ترتیب معنادار بودن نسبت به کنترل با $p < ۰/۰۱$ و $p < ۰/۰۰۱$ را نشان می‌دهند.



شکل ۵- بررسی تعداد و ریخت‌شناسی دنباله‌های عصبی در سلولهای SH-SY5Y که پس از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار سلولها با روتنون (یک میکرومولار) در حضور و عدم حضور ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از استخراج MExR مورد مطالعه قرار گرفتند. سه ستاره معنادار بودن در سطح $p < ۰/۰۰۱$ را نشان می دهد.

الف: شاخصه تعداد دنباله‌های عصبی به تعداد سلولها.

ب: شاخصه میانگین طول دنباله‌های عصبی به تعداد سلولها.

ج: پراکندگی میانگین طول دنباله‌های عصبی.

د: ریخت شناسی سلولها، سلولهای کنترل (سمت راست)، سلولهای تیمار شده با روتنون (وسط) و سلولهای تیمار شده با روتنون در حضور ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از استخراج MExR

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.11.0

در مطالعات دیگر که با تیمار با روتنون مدلهای سلولی و حیوانی شبه PD ایجاد شده است تأثیر استخراجهای گیاهان دارویی متفاوتی مانندCynodon dactylon ، Agaricus blazei و Mucuna pruriens بررسی شده است(۱۸، ۲۹ و۳۳) در این مطالعات نشان داده شده است که برخی از این استخراجها نیز توانسته اند علائم بیماری از جمله ایجاد رادیکالهای آزاد یا مرگ سلولهای دپامینرژیک را تخفیف دهند. تمامی این گزارشات و بررسیها جهت یافتن ترکیبات و راه کارهای مناسب به منظور درمان و تخفیف بیماریهای تحلیل سیستم عصبی بسیار مهم هستند. با توجه به ناشناخته بودن علل اصلی بروز و از آن مهم تر گسترش این نوع بیماریها در مغز نیاز است بررسیها در مدلهای مختلف سلولی و حیوانی و با استفاده از نشانگرهای زیستی بررسی شوند.

در این مطالعه با توجه به تفاوت معناداری که بین سطح سلامت جوامعی که رژیم غذایی مدیترانه ای را به کار می برند و در آن زیتون از مواد غذایی اصلی است و همچنین گزارشات متعددی که بر روی تأثیر مثبت استخراجهای زیتون بر تجمعات منجر به بیماری وجود داشت تأثیر آن بر روی سلولهای بیش بیان شده آلفاسینوکلئین در حضور روتنون به عنوان عامل تشدید کننده بیماری بررسی شد. در مطالعات آینده سعی خواهد شد تا بیشتر بر روی مکانیسمهای مولکولی در رابطه با این اثرات پرداخته شود وترکیباتی که نقش بیشتری در این فعالیت داشته اند شناسایی شوند. امید است نتایج این مطالعه بتواند کمکی برای یافتن داروهای ضد پارکینسونی باز نماید.

قدردانی

این مطالعه با حمایت مرکز مطالعات و همکاریهای بین‌المللی با شماره طرح ۹۸۲ و حمایت پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و طرح شماره ۶۰۷ انجام شده است.

منابع

۱- علیزاده، مریم و همکاران، ۱۳۸۸ .تاثیر شیکونین، داروی گیاهی مورد استفاده در آسیای شرق، بر فعالیت و آپوپتوز سلولهای ملتهب میکروگلیا در vitro in. مجله زیست شناسی ایران، جلد ۲۲، صفحات۳۰۰-۳۱۱.

۲- امیراصلانی، بنفشه و همکاران، ۱۳۹۲ .اثر داروی گیاهی آیمود برتولید نیتریک اکساید در سلولهای میکروگلیای ملتهب. مجله زیست شناسی ایران، جلد ۲۶، صفحات ۲۴۲-۲۵۰.

3- Abuznait, A. H., Qosa, H., Busnena, B. A., El Sayed, K. A., & Kaddoumi, A. (2013). Olive-oil-derived oleocanthal enhances β-amyloid clearance as a potential neuroprotective mechanism against Alzheimer's disease: in vitro and in vivo studies. ACS chemical neuroscience, 4(6), 973-982.

4- Ahmadi, F. A., Linseman, D. A., Grammatopoulos, T. N., Jones, S. M., Bouchard, R. J., Freed, C. R., ... & Zawada, W. M. (2003). The pesticide rotenone induces caspase-3-mediated apoptosis in ventral mesencephalic dopaminergic neurons. Journal of neurochemistry, 87(4), 914-921.

5- Amiri-Nowdijeh, A., Fazelipour, F., Haghbeen, K., Taheri, M., & Hosseini-Mazinani, M. (2018). Minor olive varieties from Iran with promising nutraceutical properties. Journal of Agricultural Science and Technology, 20(2), 347-357.

6- Amiri-nowdijeh, A., Moosavi, M. A., Hosseinzadeh, S., Soleimani, M., Sabooni, F., & Hosseini-Mazinani, M. (2019). Anti-oxidant and Selective Anti-proliferative Effects of the Total Cornicabra Olive Polyphenols on Human Gastric MKN45 Cells. Iranian Journal of Biotechnology, 17(1), 37-44.

7- Angeloni, C., Malaguti, M., Barbalace, M., & Hrelia, S. (2017). Bioactivity of olive oil phenols in neuroprotection. International journal of molecular sciences, 18(11), 2230.

8- Betarbet, R., Sherer, T. B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A. V., & Greenamyre, J. T. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. Nature neuroscience, 3(12), 1301.

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.11.0

9- Blesa, J., & Przedborski, S. (2014). Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. Frontiers in neuroanatomy, 8, 155.

10- Buckland, G., & Gonzalez, C. A. (2015). The role of olive oil in disease prevention: a focus on the recent epidemiological evidence from cohort studies and dietary intervention trials. British Journal of Nutrition, 113(S2), S94-S101.

11- Casamenti, F., & Stefani, M. (2017). Olive polyphenols: New promising agents to combat aging-associated neurodegeneration. Expert Review of Neurotherapeutics, 17(4), 345-358.

12- Chen, P., Parmalee, N., & Aschner, M. (2014). Genetic factors and manganese-induced neurotoxicity. Frontiers in genetics, 5, 265.

13- Daccache, A., Lion, C., Sibille, N., Gerard, M., Slomianny, C., Lippens, G., & Cotelle, P. (2011). Oleuropein and derivatives from olives as Tau aggregation inhibitors. Neurochemistry international, 58(6), 700-707.

14- Ferrando, A., Gonzalez, E., Franco, M., Commendatore, M., Nievas, M., Militon, C., ... & Cuny, P. (2015). Oil spill effects on macrofaunal communities and bioturbation of pristine marine sediments (Caleta Valdés, Patagonia, Argentina): experimental evidence of low resistance capacities of benthic systems without history of pollution. Environmental Science and Pollution Research, 22(20), 15294-15306.

15- Gorzynik-Debicka, M., Przychodzen, P., Cappello, F., Kuban-Jankowska, A., Marino Gammazza, A., Knap, N., ... & Gorska-Ponikowska, M. (2018). Potential health benefits of olive oil and plant polyphenols. International journal of molecular sciences, 19(3), 686.

16- Gould, F. D., Gross, A., German, R. Z., & Richardson, J. R. (2018). Evidence of Oropharyngeal Dysfunction in Feeding in the Rat Rotenone Model of Parkinson's Disease. Parkinson's Disease, 2018.

17- Jiang, T., Sun, Q., & Chen, S. (2016). Oxidative stress: A major pathogenesis and potential therapeutic target of antioxidative agents in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. Progress in Neurobiology, 147, 1-19.

18- Johnson, S., Park, H., DaSilva, N., Vattem, D., Ma, H., & Seeram, N. (2018). Levodopa-Reduced Mucuna pruriens Seed Extract Shows Neuroprotective Effects against Parkinson's Disease in Murine Microglia and Human Neuroblastoma Cells, Caenorhabditis elegans, and Drosophila melanogaster. Nutrients, 10(9), 1139.

19- Khalife, M., Morshedi, D., Aliakbari, F., Marvian, A. T., Beigi, H. M., Jamalkandi, S. A., & Pan-Montojo, F. (2015). Alpha-synuclein fibrils interact with dopamine reducing its cytotoxicity on PC12 cells. The protein journal, 34(4), 291-303.

20- Krug, A. K., Balmer, N. V., Matt, F., Schönenberger, F., Merhof, D., & Leist, M. (2013). Evaluation of a human neurite growth assay as specific screen for developmental neurotoxicants. Archives of toxicology, 87(12), 2215-2231.

21- Marvian, A. T., Koss, D. J., Aliakbari, F., Morshedi, D., & Outeiro, T. F. (2019). In vitro models of synucleinopathies: informing on molecular mechanisms and protective strategies. Journal of neurochemistry.

22- Mohammad-Beigi, H., Aliakbari, F., Sahin, C., Lomax, C., Tawfike, A., Schafer, N. P., ... & Christiansen, G. (2019). Oleuropein derivatives from olive fruit extracts reduce α-synuclein fibrillation and oligomer toxicity. Journal of Biological Chemistry, 294(11), 4215-4232.

23- Neely, M. D., Davison, C. A., Aschner, M., & Bowman, A. B. (2017). From the cover: manganese and rotenone-induced oxidative stress signatures differ in iPSC-derived human dopamine neurons. Toxicological Sciences, 159(2), 366-379.

24- Omar, S., Kerr, P., Scott, C., Hamlin, A., & Obied, H. (2017). Olive (Olea europaea L.) biophenols: a nutriceutical against oxidative stress in SH-SY5Y Cells. Molecules, 22(11), 1858.

25- Omar, S., Scott, C., Hamlin, A., & Obied, H. (2019). Olive biophenols reduces alzheimer's pathology in SH-SY5Y cells and APPswe mice. International journal of molecular sciences, 20(1), 125.

26- Pamies, D., Block, K., Lau, P., Gribaldo, L., Pardo, C. A., Barreras, P., ... & Hartung, T. (2018). Rotenone exerts developmental neurotoxicity in a human brain spheroid model. Toxicology and applied pharmacology, 354, 101-114.

27- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., ... & Stenroos, E. S. (1997). Mutation in the α-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. science, 276(5321), 2045-2047.

DOR: 20.1001.1.23832738.1400.34.2.11.0

28- Riddle, E. L., Fleckenstein, A. E., & Hanson, G. R. (2006). Mechanisms of methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity. The AAPS journal, 8(2), E413-E418.

29- Sharma, N., & Bafna, P. (2012). Effect of Cynodon dactylon on rotenone induced Parkinson's disease. Oriental Pharmacy and Experimental Medicine, 12(3), 167-175.

30- Shaw, I. C. (2016). Possible toxicity of olive leaf extract in a dietary supplement. The New Zealand Medical Journal (Online), 129(1432), 86.

31- Talhaoui, N., Gómez-Caravaca, A., León, L., De la Rosa, R., Fernández-Gutiérrez, A., & Segura-Carretero, A. (2016). From olive fruits to olive oil: phenolic compound transfer in six different olive cultivars grown under the same agronomical conditions. International journal of molecular sciences, 17(3), 337.

32- Tarozzi, A., Angeloni, C., Malaguti, M., Morroni, F., Hrelia, S., & Hrelia, P. (2013). Sulforaphane as a potential protective phytochemical against neurodegenerative diseases. Oxidative medicine and cellular longevity, 2013.

33- Venkatesh, V. G., Rajasankar, S., Swaminathan, W. J., Prabu, K., & Ramkumar, M. (2019). Antiapoptotic role of Agaricus blazei extract in rodent model of Parkinson's disease. Frontiers in bioscience (Elite edition), 11, 12-19.

Using olive methanolic extracts to inhibit rotenone toxicity in Parkinson's cell model

Morshedi D.,[1] Aliakbari F.,[1,2] Parsafar S.,[1] Mohammad-Beigi H.,[2] Dehghani Esmatabadi F.[1] and Amiri-Nowdijeh A.[3]

[1] Dept. of Bioprocess Engineering, Institute of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, I.R. of Iran.

[2] Interdisciplinary Nanoscience Centre (iNANO) and Department of Molecular Biology and Genetics, Aarhus University, Gustav Wieds Vej 14, DK–8000 Aarhus C, Denmark

[3] Dept of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, I.R. of Iran.

Abstract

Central nervous system disorders, including Parkinson's Disease (PD), are growing pathogenic incurable diseases. In PD, with the loss of neurons especially in the areas which produce and secrete dopamine, the patient is facing with irreversible motorized and perceived complications. Neuronal damage and death are usually accompanied by increasing the expression of alpha-synuclein (αSN) protein. Rotenone, a known neurotoxin, is also contributed to PD by inducing oxidative stress. In this study, we investigated the effect of the extracts of three Iranian olive cultivars on the PD cell model which overexpresses αSN. These cells react strongly to rotenone through which, above and beyond neurotoxicity, the length of the neurites is also reduced in the treatment with rotenone. Some extracts played a protective role in rotenone-treated cells and decreased intracellular reactive oxygen species (ROS) significantly. The radical scavenging activity of the extracts suggested that these reagents can play a protective role on neuronal cells through this mechanism; however, due to the different behavior of the extracts in the extracellular environment, it seems that more complex mechanisms are involved in their neuronal protective effect. This study showed that original Iranian olives belong to Roghani and Zard cultivars could protect the neurons against damage adopted from toxins and αSN and finally could be used in the diet to prevent PD.

Key words: Parkinson, toxicity, cell