

اثر نوبیلین بر آپوتوز در مغز میانی و نئو استریاتوم در مدل تجربی بیماری پارکینسون القا شده با تزریق داخل نیگرا ل لیپولی ساکارید در موش صحرایی

نویسندگان: صدیقه کشتکار^۱، مریم خراسانی^۱، مرضیه فکور^۱، ریحانه قاسمی^۱،
مهرداد روغنی^۲، زهرا کیاسالاری^{۲*}

۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۲. مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

E-mail: Kiasalari@shahed.ac.ir

* نویسنده مسئول: زهرا کیاسالاری

چکیده

مقدمه و هدف: نوبیلین، فلانوئید موجود در مرکبات است. خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد التهابی و ضد آپوتوزی نوبیلین در بسیاری از مطالعات اخیر مشاهده شده است. هدف مطالعه حاضر، بررسی اثر نوبیلین بر شدت آپوتوز در مدل تجربی بیماری پارکینسون ایجاد شده با تزریق داخل نیگرا ل لیپولی ساکارید در موش صحرایی بود.

مواد و روش‌ها: موش‌های صحرایی نر (n=28) به چهار گروه شم، شم تحت تیمار با نوبیلین، ضایعه دیده و ضایعه دیده تحت درمان با نوبیلین تقسیم شدند. با تزریق ۵ میکروگرم لیپولی ساکارید داخل سمت راست ناحیه جسم سیاه موش‌های صحرایی در سیستم نیگرا استریاتال ضایعه ایجاد شد. نوبیلین به میزان ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از یک ساعت بعد از جراحی تا یک هفته بعد آن به طور روزانه و به شکل خوراکی تجویز شد. در پایان هفته اول پس از جراحی هموژنه بافتی تهیه شده و اندازه‌گیری شاخص شدت آپوتوز انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که درمان با نوبیلین به کاهش معنی‌دار میزان DNA fragmentation در گروه LPS تیمار شده با نوبیلین در مقایسه با گروه LPS در مغز میانی منجر شد ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: تجویز نوبیلین به موش‌های پارکینسونی شده با لیپولی ساکارید موجب کاهش آپوتوز می‌شود و احتمالاً می‌تواند در درمان کمکی بیماری پارکینسون تأثیر داشته باشد.

واژگان کلیدی: نوبیلین، آپوتوز، بیماری پارکینسون، لیپولی ساکارید

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست و هفتم - شماره ۱۴۲
شهریور ۱۳۹۸

دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۰۹

آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۸/۰۵/۲۶

پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۳۱

مقدمه

بیماری پارکینسون یک بیماری مزمن و همیشه در حال پیشرفت است که اولین بار توسط جیمز پارکینسون در سال ۱۸۱۷ به عنوان یک اختلال عصبی که عملکرد اسکلتی عضلانی را تحت تأثیر قرار می‌دهد شناخته شد. بیماری پارکینسون شایع‌ترین بیماری نورودژنراتیو بعد از بیماری آلزایمر به شمار می‌رود (۱). این بیماری به طور معمول در بین سنین ۶۵-۵۵ سالگی پیشرفت می‌کند و در مردان بیشتر از زنان دیده شده است. این بیماری در تمام دنیا و در تمام نژادها اتفاق می‌افتد ولی در بین نژاد اسپانیایی بستر از سایر نژادها دیده شده است و پس از آن سفیدپوستان، آسیایی‌ها و آفریقایی‌ها قرار دارند (۲). بیشتر علائم بیماری پارکینسون مربوط به اختلالات حرکتی شامل لرزش در حال استراحت، کندی حرکات، سفتی عضلانی و اختلال در رفلکس‌های وضعیتی است (۳). همچنین اختلالات غیر حرکتی چون اختلال در بلع، شب‌اداری، یبوست، اختلالات خواب، احتباس ادرار، افت فشارخون وضعیتی، سنکوپ، تاری دید، اضطراب، نیز در بیماری پارکینسون دیده شده است (۴). مهم‌ترین عامل بیماری پارکینسون مرگ نورون‌های دوپامینرژیک در بخش متراکم هسته جسم سیاه و کاهش متعاقب دوپامین در استریاتوم است. افزایش سن، عوامل محیطی و عوامل ژنتیکی، التهاب، اختلال در عملکرد میتوکندریایی، استرس اکسیداتیو و فعال شدن مسیرهای آپوپتوزی عوامل دخیل در ایجاد بیماری پارکینسون هستند که در نهایت باعث تخریب نورون‌های دوپامینرژیک می‌گردند (۵). آپوپتوز مرگ برنامه‌ریزی شده سلول است که دارای مشخصات مورفولوژیک و بیوشیمیایی اختصاصی چون چروک شدن سلول، متراکم شدن کروماتین، قطعه‌قطعه شدن DNA و تشکیل اجسام آپوپتوتیک است (۶،۲). مجموعه این تغییرات به دنبال فعالیت آنزیم‌هایی تحت عنوان کاسپاز که جزء خانواده سیستئین پروتئاز هستند و در نتیجه پروتئولیز اجزای سلولی صورت می‌گیرد. آپوپتوزیس به طور کلی

از دو مسیر خارجی و داخلی سلول را تحت تأثیر قرار داده و از بین می‌برد. در مسیر خارجی پیام‌های مرگ نظیر $(\beta\text{-IL-1}, \alpha\text{-TNF})$ به گیرنده‌های مرگ غشای سلول (TRAIL3, TRAIL2, TNFR1) متصل می‌شوند و موجب فعال‌سازی کاسپازها و در نهایت آپوپتوز سلولی می‌گردند (۷). در مسیر داخلی میتوکندری و رتیکولوم اندوپالسمیک محوریت فرآیند را دارند که در این مسیر محوریت میتوکندری در ایجاد آپوپتوز بیشترین اهمیت را دارد. ایجاد استرس (تشنج‌ها، مواد شیمیایی، عفونت‌های ویروسی، فقدان عوامل رشد و نیز استرس‌های اکسیداتیو ایجاد شده توسط رادیکال‌های آزاد) به میتوکندری موجب تغییراتی در نفوذپذیری آن می‌گردد و سیتوکروم C که در غشای داخلی میتوکندری و فضای بین غشایی قرار دارد به داخل سیتوزول آزاد می‌گردد و با اتصال به فاکتور ۱ پروتئاز فعال‌کننده آپوپتوزیس (۱-Apaf) آپوپتوزوم تشکیل می‌دهد که در نهایت باعث فعال شدن کاسپاز ۹ و سپس فعال شدن کاسپازهای عمل‌کننده و در نهایت آپوپتوز سلول می‌گردد (۸)؛ اما فرآیند آپوپتوز سلولی توسط برخی پروتئین‌های میتوکندریایی شامل پروتئین‌های خانواده ۲ lymphoma B-cell (Bcl-2) که به دو بخش پروتئین‌های ضدآپوپتوتیک (مثل Bcl-2) پروتئین‌های پیش آپوپتوتیک (مثل Bad, Bak, Bax) تقسیم می‌شوند، تنظیم می‌گردد که در تسریع شروع یا ممانعت از ایجاد آن نقش اصلی را دارند (۹، ۱۰). درحالی‌که پروتئین‌های ضدآپوپتوتیک، آپوپتوز را با جلوگیری از رهاسازی سیتوکروم c از میتوکندری، تنظیم می‌کنند، پروتئین‌های پیش آپوپتوتیک موجب تسریع رهاسازی آن می‌شوند (۱۱). نسبت تعادل بین پروتئین‌های پیش آپوپتوتیک و پروتئین‌های ضد آپوپتوتیک یکی از فاکتورهای اصلی مشخص‌کننده این است که سلول زنده می‌ماند یا دچار آپوپتوز می‌گردد (۵، ۱۲). بررسی‌های اولیه انجام شده بر روی مغز بیماران پارکینسونی پس از مرگ بیانگر نقش کاسپاز ۳ به عنوان یکی از عوامل اساسی در مرگ

نوروتروفیک که از سلول‌های گلیا مشتق می‌شوند را حفظ می‌کند بنابراین باعث کاهش تخریب نورون‌های دوپامینرژیک می‌شود (۲۶). نوبیلین فعالیت تضعیف شده اتوفسفوریلیشن پروتئین کیناز وابسته به کلسیم کالمودلین و فسفوپروتئین ۳۲ تنظیم‌کننده cAMP را بازیابی می‌کند که به بازسازی افزایش فعالیت تیروزین هیدروکسیلاز و بهبود اختلال حرکتی و شناختی ناشی از MPTP منجر می‌شود (۲۷). از این رو، هدف تحقیق حاضر، بررسی اثر نوبیلین بر شدت آپوپتوز در موش صحرایی با بیماری پارکینسون ناشی از تزریق داخل نینگرال لیپوپلی ساکارید است.

مواد و روش‌ها

روش اجرا

در این تحقیق از موش‌های صحرایی نر در محدوده وزنی ۱۹۵-۲۴۵ گرم به تعداد ۲۸ سر استفاده می‌شود. حیوانات به صورت تصادفی به ۴ گروه تقسیم شدند که عبارتند از گروه کنترل که در این گروه موش‌های سالمی قرار دارند که بر روی آنها جراحی استریوتاکسیک با تزریق داخل نینگرال نرمال سالین انجام شد. گروه کنترل دریافت‌کننده نوبیلین که دارو را به میزان ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از یک ساعت بعد از جراحی تا یک هفته بعد آن به طور روزانه و به شکل خوراکی دریافت نمودند. گروه Lesion که در این گروه برای ایجاد مدل بیماری پارکینسون، لیپوپلی ساکارید با دوز ۵ میکروگرم به درون ناحیه جسم سیاه سمت راست تزریق گردید و گروه Lesion دریافت‌کننده نوبیلین که هنگام جراحی لیپوپلی ساکارید مشابه گروه Lesion دریافت نموده و نوبیلین را به میزان ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از یک ساعت بعد از جراحی تا یک هفته بعد آن به طور روزانه و به شکل خوراکی دریافت نمودند. در پایان هفته اول پس از جراحی، موش‌ها با کتامین به طور عمیق بی‌هوش شده و بلوک جسم سیاه تهیه شد. پس از تهیه هموزنه بافتی، اندازه‌گیری شدت آپوپتوز با سنجش fragmentation DNA به وسیله کیت شرکت سیگما انجام شد.

سلول‌های موجود در جسم سیاه بوده است (۱۳). شاهد مرگ سلولی آپوپتیک در سلول‌های نورنی و غیر نورنی، از طریق DNA fragmentation و تغییرات مورفولوژی در مغزهای بیماری پارکینسونی دیده می‌شود (۱۴). در بین مدل‌های حیوانی القا ایجاد بیماری پارکینسون، از لیپوپلی ساکارید که اندوتوکسین باکتری گرم منفی است برای ایجاد مدل بیماری پارکینسون استفاده می‌شود. در این مدل TLR4 حساس به LPS به وسیله میکروگلیاها و آستروسیت‌ها بیان می‌شود. فعال شدن ژن‌های فرودست TLR4 یک آبشار سیگنالی شامل JNK P38, ERK, IRAK, MYD88 را فعال می‌کند که در نهایت منجر به تنظیم نسخه‌برداری از طریق پروتئین NF- κ B و راه‌اندازی سیستم التهابی می‌گردد. بیان بیش از حد سیتوکاین‌ها TNF, ROS, NO و IL-6, IL-1 β در مغز یک فاکتور مهم در فعال‌سازی مسیرهای آپوپتوزی و مرگ آپوپتیک نورون‌های دوپامینرژیک بشمار می‌آید (۱۵). نوبیلین یک پلی‌متاکسی فلاوون غیر سمی است که از پوسته مرکبات استخراج می‌شود (۱۶). نوبیلین به دلیل ماهیت لیپوفیلی بالا و نفوذپذیری بالای خود به راحتی جذب می‌شود که این یک مکانیسم خاص را نشان می‌دهد. گزارش شده است که نوبیلین دارای خواص مفید گوناگونی چون: ضد سرطان، ضد التهاب، آنتی‌اکسیدانی، ضد مقاومت انسولینی ایمنومودلاسیون، حفاظت قلب و عروق، حفاظت نورونی است (۱۷-۲۴). نوبیلین به طور قابل توجهی بیان Akt و Bcl-2 بالا می‌برد که به بهبود اختلال عصبی، ادم مغزی و نفوذپذیری سدخونی مغزی در موش صحرایی منجر می‌شود (۲۵). نوبیلین بیان HO-1, GSH, SOD1 و NF- κ B افزایش می‌دهد در حالی که بیان MDA و NF- κ B کاهش می‌دهد که به حفاظت نورونی در برابر ادم مغزی و اختلال عصبی منجر می‌شود (۲۴). تخریب نورون‌های دوپامینرژیک در substantia nigra نقش مهمی در پاتوژنی بیماری پارکینسون دارد در موش‌هایی که با ۱ میلی‌گرم ۴ فنیل پردنیموم پارکینسونی شدند نوبیلین فعالیت میکروگلیا را مهار می‌کند، بیان فاکتور

بررسی بیوشیمیایی

جهت تهیه هموژنه بافتی جهت بررسی‌های بیوشیمیایی، موش‌ها پس از بیهوشی با کتامین کشته شده و بافت مغز از بدن آنها خارج شد و بلوک مغز میانی و استریاتوم تهیه گردید. پس از شستشوی مغز با محلول نرمال سالین سرد و خشک نمودن، سریعاً توزین شده و سپس بافت جداگانه به همراه بافر لایزس (Lysis) ۵ درصد با غلظت ۵۰ میلی مول و PH برابر ۷/۴ در ظرف بشر با حجم ۱۰ میلی لیتر به مدت ۱-۲ دقیقه در دستگاه هموژنایزر با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه هموژنیزه شد. محلول حاصل سپس در دمای ۴ درجه (به منظور جلوگیری از تخریب پروتئین‌ها) به مدت ۵ دقیقه و با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از آن محلول شفاف فوقانی (سوپرناتانت) به وسیلهی سمپلر جدا شده و جهت بررسی‌های آزمایشگاهی در دمای ۷۰- درجه فریز گردید. در این روش از کیت اختصاصی DNA fragmentation شرکت سیگما و بر اساس دستورالعمل آن استفاده شد و در پایان کار جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شد.

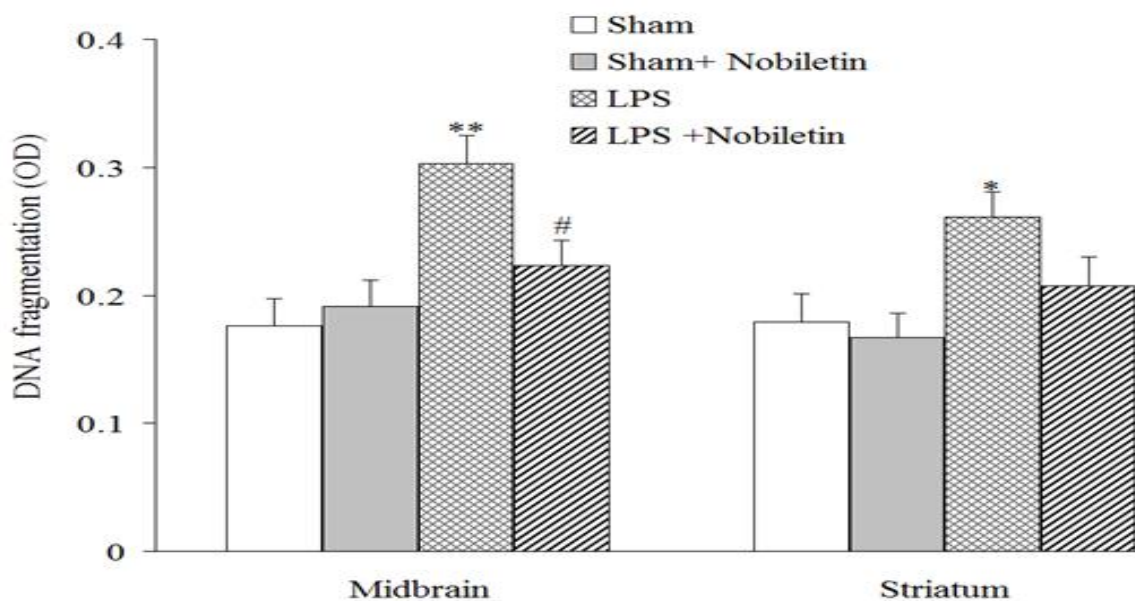
آنالیز آماری

در این پژوهش نتایج به صورت میانگین \pm پلاسما انحراف معیار گزارش شده است برای تعیین نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov test) استفاده شد. پس از اثبات نرمال بودن داده‌ها برای مقایسه بین گروه‌ها از

آزمون ANOVA یک طرفه و تست تعقیبی توکی (Test-Tukey) استفاده شد. برای آنالیز داده‌ها از نرم افزار سیگما پلات نسخه ۱۲ و برای رسم نمودارها از برنامه اکسل ۲۰۱۳ استفاده شد $P < 0.05$ در تمام داده‌ها به عنوان سطح معنی دار استفاده شد.

نتایج

نمودار ۱ نتایج میزان فاکتور DNA fragmentation که می‌تواند شاخص آپوپتوز باشد در گروه‌های مختلف در دو ناحیه مغز میانی و استریاتوم مغز موش‌ها را نشان می‌دهد. در ناحیه مغز میانی افزایش معنادار سطح DNA fragmentation در گروه LPS در مقایسه با گروه شم مشاهده شد ($P < 0.01$). افزایش معنادار DNA fragmentation در گروه LPS تیمار شده با نوبیلترین در مقایسه با گروه شم مشاهده نشد. از طرفی دیگر میزان DNA fragmentation مغز میانی در گروه LPS تیمار شده با نوبیلین در مقایسه با گروه LPS یک کاهش معنادار نشان داد ($P < 0.05$). همچنین با بررسی نتایج DNA fragmentation در ناحیه استریاتوم مشخص شد که افزایش معنادار این پارامتر در گروه LPS در مقایسه با گروه شم وجود دارد ($P < 0.05$) و افزایش این پارامتر در گروه LPS تیمار شده با نوبیلین در مقایسه با گروه شم مشاهده نشد. کاهش معنادار DNA fragmentation در گروه LPS تیمار شده با نوبیلین در مقایسه با گروه LPS مشاهده نشد.



نمودار ۱. میزان DNA fragmentation در هموزنه دو بافت مغز میانی و استریاتوم در گروه‌های مختلف

*: $P < 0.05$ نسبت به گروه شم
 **: $P < 0.01$ نسبت به گروه شم
 #: $P < 0.05$ نسبت به گروه لیپولی ساکارید

(۲۸). در پژوهش حاضر نیز از موش‌های صحرائی ویستار استفاده شد و نتایج نشان داد که نوبیلین موجب کاهش معنی‌دار سطح DNA fragmentation در مغز میانی می‌شود اما در استریاتوم کاهش سطح DNA fragmentation معنادار نبود. با توجه به اینکه تزریق لیپولی ساکارید در جسم سیاه انجام شده و جسم سلولی نورون‌ها نیز در جسم سیاه است و پایانه‌های سیناپسی الیاف نیگرا در استریاتوم قرار دارد، لذا نتیجه در مغز میانی معنادار بوده در حالی که در استریاتوم معنادار نبوده است.

لیو و همکارانش در پژوهشی اثر محافظتی نوبیلین بر مرگ سلولی ناشی از H_2O_2 را در سلول‌های RPE مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که نوبیلین به طور قابل توجهی قدرت حیات سلول را در استرس اکسیداتیو افزایش می‌دهد. نوبیلین از تولید ناشی از H_2O_2 و فعالیت caspase-3/7 در سلول‌های ARPE-19 جلوگیری می‌کند. علاوه بر این نوبیلین فسفوریلاسیون AKT را در سلول‌های ARPE-19 که در معرض H_2O_2 بودند را افزایش داد (۲۹).

بحث

نشانه اصلی آپوپتوز قطعه‌قطعه شدن DNA است در پژوهش حاضر با تزریق LPS به صورت داخل صفاقی در مغز میانی DNA fragmentation در مغز میانی و استریاتوم در گروه‌های لیپولی ساکارید و لیپولی ساکارید تحت تیمار با نوبیلین و قیاس آن با سطح پایه‌ی این مقادیر در موش‌های سالم افزایش معنادار می‌یابد. Bi Junying و همکارانش در بررسی اثر نوبیلین بر روی اختلال شناختی ناشی از ایزوفلوران نشان دادند که نوبیلین از طریق تنظیم Akt، Bax، CREB و BDNF در موش‌های سالخورده اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضد آپوپتوزی دارد. در این پژوهش از موش‌های بزرگ آزمایشگاهی سفید اسپراگ داوولی نر (سن ۱۸ ماهگی) برای تحلیل اثرات نوروپاتیک نوبیلین استفاده شد. برای اندازه‌گیری فاکتور هسته‌ای کاپا B، TNF آلفا، IL-6، IL-1 β ، گلوکوتیون (GSH)، GSH پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و غلظت مالون دی‌الدید آزمون ELISA و وسترن بلات استفاده شده است

الفاشده توسط سیس پلاتین به علت اثرات ضد اکسید کننده، ضدالتهابی و ضد آپوپتوزی می‌شود. موش‌های صحرایی بالغ نر به ۶ گروه تقسیم شدند. نوبیلتن در دوزهای ۱.۲۵، ۲.۵ و ۵ mg / kg برای مدت ۱۰ روز تجویز شد. در روز هفتم یک تک تزریق از سیس پلاتین (۸ mg/kg) به موش تزریق شد. پیش درمان با نوبیلتن از عملکرد کلیه محافظت می‌کند و قابلیت آنتی‌اکسیدانی آن را بازسازی می‌کند. مکمل نوبیلتن فعال‌سازی مسیرهای آپوپتوتیک و آسیب DNA را مهار می‌کند (۳۱).

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که تیمار نوبیلتن در موش‌های پارکینسونی شده با تزریق داخل نیگرا لیبو پلی ساکارید موجب کاهش شاخص آپوپتوز در مغز میانی می‌گردد.

تقدیر و تشکر

پژوهش حاضر حاصل پایان‌نامه دانشجویی صدیقه کشتکار مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه شاهد در سال ۱۳۹۶ است و با حمایت مالی این دانشگاه به انجام رسیده است که بدینوسیله از این معاونت تشکر می‌گردد.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

منابع

1. Sanz FJ, Solana-Manrique C, Muñoz-Soriano V, Calap-Quintana P, Moltó MD, Paricio N. Identification of potential therapeutic compounds for Parkinson's disease using *Drosophila* and human cell models. *Free Radical Biology and Medicine* 2017;108:683-91.
2. Rizek P, Kumar N, Jog MS. An update on the diagnosis and treatment of Parkinson disease. *The Canadian Medical Association Journal* 2016;188(16):1157-65.
3. Elbaz A, Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Peterson BJ, Ahlskog JE, et al. Risk tables for parkinsonism and Parkinson's disease. *Journal of Clinical Epidemiology* 2002;55(1):25-31.

در پژوهشی که کیو و همکارانش تحت عنوان بررسی اثرات نوبیلتن بر آپوپتوز عصبی ناشی از Cd در مدل تجربی جانور جوئنده انجام دادند به این نتیجه رسیدند که نوبیلتن با مهار انواع اکسیژن واکنشی و تنظیم شبکه‌های JNK / ERK1/2 و Akt / mTOR در موش صحرایی مانع از آپوپتوز عصبی ناشی از کادمیم می‌شود. روش به این صورت است. چند روز قبل از تزریق Cd، گروه‌های درمان به طور منظم طی دوره مطالعه به طور خوراکی نوبیلتن (۵۰، ۱۰۰ یا ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) دریافت کردند. نتایج به این قرار بود که سطوح ROS ناشی از Cd و محتوای مالون دی آلدئید (MDA) توسط نوبیلتن مهار شد و سطوح گلوکاتایون افزایش یافت. Nobiletin آپوپتوزی عصبی ناشی از Cd را کاهش داد و سطوح کاپاز ۳ شکسته شده را افزایش داد. جالب توجه است، nobiletin فسفوریلاسیون JNK و Erk1 / 2 مسدود کرده است و مسیرها را تنظیم کاهشی کرده است. سرکوب بیان فسفاتازها PP2A و PP5 در درمان نوبیلتن تنظیم افزایشی دارد. Nobiletin به طور قابل توجهی فعال شدن سیگنالینگ Akt / mTOR مسدود می‌کند (۳۰).

در پژوهشی که مالیک و همکارانش با هدف بررسی خواص نوبیلتن، یک پلی متوکسی فلاون در آسیب حاد کلیه ناشی از سیس پلاتین انجام دادند به این نتیجه رسیدند که نوبیلتن باعث کاهش آسیب کلیوی حاد

4. Boeve BF, Silber MH, Ferman TJ, Lucas JA, Parisi JE. Association of REM sleep behavior disorder and neurodegenerative disease may reflect an underlying synucleinopathy. *Movement disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 2001;16(4):622-30.
5. Lin T-K, Liou C-W, Chen S-D, Chuang Y-C, Tiao M-M, Wang P-W, et al. Mitochondrial dysfunction and biogenesis in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Chang Gung Medical Journal* 2009;32(6):589-99.
6. Tadibi V, Yosefi B, Taheri H, Taherzadeh J. The impact of a physical therapy regimen on motor function in people with parkinson's disease. *J Pajouhesh* 2008;18:157-69.

7. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. Apoptosis signaling by death receptors. *European Journal of Biochemistry* 1998;254(3):439-59.
8. Wang ZB, Liu YQ, Cui YF. Pathways to caspase activation. *Cell Biology International* 2005;29(7):489-96.
9. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998;281(5381):1322-6.
10. Upadhyay D, Panduri V, Ghio A, Kamp DW. Particulate matter induces alveolar epithelial cell DNA damage and apoptosis: role of free radicals and the mitochondria. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2003;29(2):180-7.
11. Marzetti E, Privitera G, Simili V, Wohlgemuth SE, Aulisa L, Pahor M, et al. Multiple pathways to the same end: mechanisms of myonuclear apoptosis in sarcopenia of aging. *The Scientific World Journal* 2010;10:340-9.
12. Kim S-E, Ko I-G, Kim B-K, Shin M-S, Cho S, Kim C-J, et al. Treadmill exercise prevents aging-induced failure of memory through an increase in neurogenesis and suppression of apoptosis in rat hippocampus. *Experimental Gerontology* 2010;45(5):357-65.
13. Bloem B, Irwin I, Buruma O, Haan J, Roos R, Tetrud J, et al. The MPTP model: versatile contributions to the treatment of idiopathic Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences* 1990;97(2-3):273-93.
14. Lev N, Melamed E, Offen D. Apoptosis and Parkinson's disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2003;27(2):245-50.
15. Roth J, Harré E-M, Rummel C, Gerstberger R, Hubschle T. Signaling the brain in systemic inflammation: role of sensory circumventricular organs. *Frontiers in Bioscience* 2004;9(7):290-300.
16. Yoshigai E, Machida T, Okuyama T, Mori M, Murase H, Yamanishi R, et al. Citrus nobiletin suppresses inducible nitric oxide synthase gene expression in interleukin-1 β -treated hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2013;439(1):54-9.
17. Kimura O, Ohta C, Koga N, Haraguchi K, Kato Y, Endo T. Carrier-mediated uptake of nobiletin, a citrus polymethoxyflavonoid, in human intestinal Caco-2 cells. *Food Chemistry* 2014;154:145-50.
18. Lee Y-C, Cheng T-H, Lee J-S, Chen J-H, Liao Y-C, Fong Y, et al. Nobiletin, a citrus flavonoid, suppresses invasion and migration involving FAK/PI3K/Akt and small GTPase signals in human gastric adenocarcinoma AGS cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2011;347(1-2):103-15.
19. Ihara H, Yamamoto H, Ida T, Tsutsuki H, Sakamoto T, Fujita T, et al. Inhibition of nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression by a polymethoxyflavone from young fruits of Citrus unshiu in rat primary astrocytes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2012:120215.
20. Miyata Y, Tanaka H, Shimada A, Sato T, Ito A, Yamanouchi T, et al. Regulation of adipocytokine secretion and adipocyte hypertrophy by polymethoxyflavonoids, nobiletin and tangeretin. *Life Sciences* 2011;88(13-14):613-8.
21. Tominari T, Hirata M, Matsumoto C, Inada M, Miyaura C. Polymethoxy flavonoids, nobiletin and tangeretin, prevent lipopolysaccharide-induced inflammatory bone loss in an experimental model for periodontitis. *Journal of Pharmacological Sciences* 2012:11188SC.
22. Li W, Wang X, Niu X, Zhang H, He Z, Wang Y, et al. Protective effects of nobiletin against endotoxic shock in mice through inhibiting TNF- α , IL-6, and HMGB1 and regulating NF- κ B pathway. *Inflammation* 2016;39(2):786-97.
23. Parkar N, Bhatt L, Addepalli V. Efficacy of nobiletin, a citrus flavonoid, in the treatment of the cardiovascular dysfunction of diabetes in rats. *Food & Function* 2016;7(7):3121-9.
24. Zhang L, Zhang X, Zhang C, Bai X, Zhang J, Zhao X, et al. Nobiletin promotes antioxidant and anti-inflammatory responses and elicits protection against ischemic stroke in vivo. *Brain Research* 2016;1636:130-41.
25. Zhang L, Zhao H, Zhang X, Chen L, Zhao X, Bai X, et al. Nobiletin protects against cerebral ischemia via activating the p-Akt, p-CREB, BDNF and Bcl-2 pathway and ameliorating BBB permeability in rat. *Brain Research Bulletin* 2013;96:45-53.
26. Jeong KH, Jeon M-T, Kim HD, Jung UJ, Jang MC, Chu JW, et al. Nobiletin protects dopaminergic neurons in the 1-methyl-4-phenylpyridinium-treated rat model of Parkinson's disease. *Journal of Medicinal Food* 2015;18(4):409-14.
27. Yabuki Y, Ohizumi Y, Yokosuka A, Mimaki Y, Fukunaga K. Nobiletin treatment improves motor and cognitive deficits seen in MPTP-induced Parkinson model mice. *Neuroscience* 2014;259:126-41.
28. Bi J, Zhang H, Lu J, Lei W. Nobiletin ameliorates isoflurane-induced cognitive

- impairment via antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects in aging rats. *Molecular Medicine Reports* 2016;14(6):5408-14.
29. Liu L, Wu Xw. Nobiletin protects human retinal pigment epithelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative damage. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 2018;32(5):e22052.
30. Qu Y, Liu Y, Chen L, Zhu Y, Xiao X, Wang D, et al. Nobiletin prevents cadmium-induced neuronal apoptosis by inhibiting reactive oxygen species and modulating JNK/ERK1/2 and Akt/mTOR networks in rats. *Neurological Research* 2018;40(3):211-20.
31. Malik S, Bhatia J, Suchal K, Gamad N, Dinda AK, Gupta YK, et al. Nobiletin ameliorates cisplatin-induced acute kidney injury due to its anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2015;67(7-8):427-33.

Daneshvar
Medicine

*Scientific-Research
Journal of Shahed
University
27th Year, No.142
August- September
2019*

Received: 30/06/2019

Last revised: 17/08/2019

Accepted: 22/08/2019

The effect of nobiletin on apoptosis in midbrain and neostriatum in a rat model of Parkinson's disease induced by intranigral injection of lipopolysaccharide

Sedigheh Keshtkar¹, Mehrdad Roghani², Maryam Khorasani¹, Marzieh Fakour¹, Reihane Ghasemi¹, Zahra Kiasalari^{2*}

1. Department of Physiology, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.
2. Neurophysiology Research Center, Department of Physiology, Shahed University, Tehran, Iran.

* Corresponding author e-mail: kiasalari@shahed.ac.ir

Abstract

Background and Objective: Nobiletin is a flavonoid in the citrus. The antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic properties of nobiletin have been observed in many recent studies. The aim of the present study was to investigate the effect of nobiletin on apoptosis in an experimental model of Parkinson's disease induced by intranigral injection of lipopolysaccharide in the rat.

Materials and Methods: Male rats (n = 28) were divided into four groups: sham, sham under treatment with nobiletin, lesion, and lesion treated with nobiletin. To achieve unilateral lesion of the nigrostriatal system, rats received 5 microgram of LPS into the right substantia nigra. Nobiletin was daily administered *p.o.* at a dose of 10 mg/kg one hour after surgery for one week. At the end of the first week, tissue homogenate was prepared and severity of apoptosis was measured.

Results: The results showed that treatment with nobiletin decreases the level of DNA fragmentation in the LPS group as compared to the LPS group in midbrain area (p <0.05).

Conclusion: Administration of nobiletin to lipopolysaccharide-induced Parkinsonian rats reduces apoptosis and may be potentially effective for ancillary therapy of Parkinson's disease.

Keywords: Nobiletin, Apoptosis, Parkinson's disease, lipopolysaccharide