دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال بیست و پنجم، شماره ۱، صفحه ۱۲-۱ (فروردین و اردیبهشت ۱۴۰۱)

Iran South Med J 2022; 25(1): 1-12

اثر کارواکرول بر بیان ژن‌های Hmox-1، iNOS، Nrf2 و NF-ĸB در نخاع موش‌های مدل انسفالومیلیت خود ایمن آزمایشگاهی

مهدیه احمدی (MSc)[1*]، اکرم عیدی (PhD)[1]، حسن احمدوند (PhD)[2**]،
مجتبی خاکساریان (PhD)[3]، فتاح ستوده‌نژاد نعمت‌الهی (PhD)[1]

[1] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم و فنون همگرا، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
[2] گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران
[3] مرکز تحقیقات گیاهان دارویی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران

(دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۷/۲- پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۱۰/۲۵)

چکیده

زمینه: مالتیپل اسکروزیس از شایع‌ترین بیماری‌های مرتبط با سیستم عصبی می‌باشد که با التهاب سیستم عصبی مرکزی و استرس اکسیداتیو مشخص می‌شود. کارواکرول یک ترکیب فنلی مونوترپنی است که ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی مشخصی بر علیه رادیکال‌های آزاد دارد. هدف از این مطالعه بررسی اثر کارواکرول بر بیان ژن‌های Hmox-1، iNOS، Nrf2 و NF-ĸB در نخاع موش‌های صحرایی مدل انسفالومیلیت خود ایمن آزمایشگاهی یا Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE)، به‌عنوان مدل حیوانی مالتیپل اسکلروزیس است.

مواد و روش‌ها: EAE در موش‌های صحرایی ماده لویس القاء شد. موش‌ها به سه گروه کنترل، مدل EAE و گروه EAE تحت تیمار با کارواکرول دسته‌بندی شدند. کارواکرول به‌صورت روزانه و داخل صفاقی به مدت ۱۷ روز تزریق شد. نمونه‌برداری و استخراج RNA از کل بافت نخاع صورت گرفت و تغییرات بیان ژن‌های Hmox-1، iNOS، Nrf2 و NF-ĸB به‌وسیله real time-PCR بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که کاهش وزن شدیدی که در گروه مدل وجود داشت،در اثر تیمار با کارواکرول متوقف شده و میانگین وزنی روند افزایشی پیدا کرد. از سوی دیگر مشخص شد کارواکرول باعث کاهش بیان ژن‌های iNOS و NF-ĸB و افزایش سطح Hmox-1mRNA و Nrf2 mRNA می‌شود.

نتیجه‌گیری: با اثرگذاری کارواکرول بر تغییرات وزنی موش‌های تحت تیمار و همچنین افزایش بیان ژن HO-1 در نخاع حیوانات، که با افزایش Nrf2 mRNA، کاهش بیان iNOS و NF-ĸB همراه بود، زمینه کاهش التهاب، استرس اکسیداتیو و افزایش محافظت از نورون‌ها، ایجاد شده و محیط تهاجمی که برای برخی سلول‌ها همچون اولیگودندروسیت‌ها ایجاد می‌گردد، تعدیل می‌گردد.

واژگان کلیدی: استرس اکسیداتیو، کارواکرول، مالتیپل اسکلروزیس، iNOS، Nrf2

** خرم آباد، کمالوند، پردیس دانشگاه علوم پزشکی، گروه بیوشیمی

E.mail: Hassan_a46@yahoo.com
* ORCID: 0000-0003-2159-340X
** ORCID: 0000-0002-9406-3592

مقدمه

مالتیپل اسکروزیس، مهم‌ترین دلیل ناتوانی افراد جوان، بعد از تروما و نیز مهم‌ترین علت ناتوانی عصبی مرتبط با بیماری در جوامع غربی می‌باشد (۱). التهاب سلولی یکی از مشخصه‌های بیماری مالتیپل اسکلروزیس است که در زخم‌های دمیلینه کننده این بیماران، منجر به تولید انواع اکسیژن و نیتروژن واکنشگر شده و بر دفاع آنتی‌اکسیدانی نورون‌ها، غلبه می‌کند. در مقایسه با آستروسیت‌ها و میکروگلیا، اولیگودندروسیت‌ها به خاطر ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی کمتر، به استرس اکسیداتیو و نیتراتیو حساس‌تر هستند. این استرس‌ها منجر به مرگ اولیگودندروسیت‌ها و دمیلیناسیون و تخریب غلاف میلینی می‌گردد (۲ و ۳). عدم تعادل میان تولید سلولی انواع اکسیژن و نیتروژن واکنشگر و توانایی سلول‌ها برای دفاع در برابر آن‌ها را استرس اکسیداتیو می‌گویند که در بیماری‌های التهابی و تخریب کننده نورونی مانند مالتیپل اسکلروزیس، باعث آسیب انواع سلول‌ها به ویژه نورون‌ها و مرگ سلولی آن‌ها می‌شود. نورون‌ها به استرس اکسیداتیو حساسیت بالایی دارند. اکسیژن‌های واکنشگر، ترکیبات سلولی مانند لیپیدها، پروتئین‌ها، DNA و به ویژه DNA میتوکندریایی را تخریب می‌کند (۴ و ۵). در زمینه درمانی، داروهای رایج برای بیماری مالتیپل اسکلروزیس معمولاً پرهزینه بوده و اثرات جانبی فراوانی داشته و تنها علائم بیماری را هدف قرار می‌دهند و نه علت یا علل آن را. به همین دلیل درمان‌های ترکیبی یا گیاه درمانی، امروزه بسیار مورد توجه قرار گرفته است. ترکیبات پلی‌فنلیک مستخرج از گیاهان دارویی، در بیماری‌های مخرب نورون‌ها، کاربرد فراوان داشته‌اند.

از جمله این ترکیبات می‌توان به کارواکرول اشاره کرد که ماده مؤثره گیاهانی همچون Nigella sativa، Origanum majorana و Thymus vulgaris بوده و نقش آن به‌عنوان یک فنل مونوترپنوئید، بر برخی از بیماری‌های التهابی و نورودژنراتیو مغزی همچون ایسکمی مغزی و صدمات مختلف مغزی و التهاب پوستی به اثبات رسیده است. این ماده اثرات آنتی‌اکسیدانی ویژه‌ای بر علیه رادیکال‌های آزاد دارد و تشکیل ۳-نیتروتیروزین، که یک بیومارکر استرس است را مهار می‌کند (۶). اثرات نوروپروتکتیو کارواکرول در برخی از بیماری‌های نورولوژیکی مانند مدل‌های آزمایشگاهی Parkinson disease و epilepsy به اثبات رسیده است (۷ و ۸). مطالعات نشان داده است که کارواکرول سایتوکاین‌های التهابی را کاهش می‌دهد و اثرات مهاری بر بلوغ سلول‌های دندریتی و عملکرد آن‌ها دارد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که اثرات مهاری کارواکرول می‌تواند منافع بالقوه‌ای برای درمان بیماری‌های ایمنی داشته باشد (۹).

NF-κB شامل یک خانواده از فاکتورهای نسخه‌برداری است که بیان صدها ژن را هماهنگ می‌کند. باعث تقویت التهاب موضعی از طریق تولید واسطه‌های التهابی و سرکوب سطوح مولکول‌های چسبنده نوروپروتکتیو و سلول‌های T تنظیم‌کننده Tregs می‌شود و در میانجی‌گری پاسخ‌های Th2 ضروری است. برخی از مطالعات ارتباط بین افزایش ژن‌های مرتبط با NF-kB در سلول‌های T و عود مالتیپل اسکلروزیس را نشان داده‌اند (۱۰).

موجودات مختلف، بسیاری از مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی را به کار می‌گیرند تا بر اثرات مخرب استرس اکسیداتیو غلبه کنند. هم اکسیژناز یا HO-1

در بین این مکانیسم‌ها پتانسیل قوی دارد و اثرات محافظتی بسیار خوبی در بیماری‌های التهابی و مخرب نورونی از خود نشان می‌دهد (۱۱).

نیتریک اکسید نیز نقش مهمی در مسیر بیماری‌زایی بیماری‌های دمیلینه کننده دارد و باعث اختلال در متابولیسم انرژی اولیگودندرسیت‌ها می‌شود. این مولکول توسط iNOS تولید شده و باعث آسیب DNA، غشا و کمپلکس‌های زنجیره تنفس میتوکندریایی می‌شود. در پیشبرد مالتیپل اسکلروزیس، NO باعث دمیلیناسیون، تخریب و مرگ آکسونی می‌گردد (۱۲).

Nuclear factor-erythroid 2-related (Nrf2) factor 2 نیز یک فاکتور نسخه‌برداری است که بیان بسیاری از آنزیم‌های آنتی اکسیدان محافظتی و سم زدا را تنظیم می‌کند. عدم وجود Nrf2 پیشرفت EAE را تشدید می‌کند و فعال شدن Nrf2 ممکن است پاتوژنز بیماری‌های خودایمنی مانند مالتیپل اسکلروزیس و همچنین سایر بیماری‌های نورودژنراتیو که با التهاب عصبی ظاهر می‌شوند را کاهش دهد (۱۳). هدف از این مطالعه، بررسی اثر کارواکرول بر بیان ژن‌های Hmox-1 و iNOS (به‌عنوان مارکرهای التهابی)، Nrf2 (مارکر پروگنوستیک) و NF-KB در نخاع موش‌های صحرایی مدل EAE می‌باشد.

EAE یک بیماری دمیلینه کننده خودایمن است که از لحاظ کلینیکی با دمیلیناسیون، نواقص نورولوژیکی و بافت‌شناسی در اثر ارتشاح لنفوسیت‌ها به CNS شناخته شده و باعث افزایش نفوذپذیری سد خونی مغزی می‌شود. در آن میانکنش میان انواعی از مکانیسم‌های آسیب‌رسان به نورون و سیستم ایمنی، منجر به شباهت زیاد به ویژگی‌های بیماری‌زای مالتیپل اسکلروزیس می‌گردد که بر پایه شباهت‌ها در مسیر بیماری و بافت‌شناسی بیماری، EAE به‌طور گسترده به‌عنوان مدل بیماری MS و غالباً در موش‌های ماده استفاده می‌شود (۱۴ و ۱۵).

تاکنون مطالعات کمی در رابطه با اثر کارواکرول در بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس یا در مدل EAE انجام شده است. در سال ۲۰۱۹ و با بررسی اثر کارواکرول در مدل EAE و با کشت سلول‌های طحال، مشخص شد که کارواکرول می‌تواند باعث کاهش اسکوربندی کلینیکی، کاهش بیان IFN-γ، IL-17 و IL-6 و افزایش TGF-β و IL-10 شود و موش‌های تحت تیمار با کارواکرول، کاهش وزن کمتری را تجربه می‌کنند (۱۵).

مواد و روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی، القاء مدل EAE و درمان آن

۳۰ موش لویس ماده (دارو پخش، ایران) با وزن ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. رت‌ها با شرایط نوری ۱۲ ساعت تاریکی /۱۲ ساعت نور در اتاق‌های ایزوله با دمای ۲±۲۴ و دور از آلودگی نگه‌داری شدند. حیوانات به آب و غذا دسترسی آزادانه داشتند. این شرایط با کد ۳۰۹. ۱۳۹۶. IR.LUMS.REC مورد تأیید کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی در دانشگاه علوم پزشکی لرستان قرار گرفت. ایجاد مدل طبق روش بیتون (Beeton) همکاران انجام شد (۱۶). در این روش هموژنای نخاع خوکچه هندی (انستیتو پاستور، ایران) با ترکیب نخاع و آب مقطر تهیه شده و به نسبت یک به یک با ادجوان فروند کامل (Sigma، آمریکا) مخلوط شد تا امولسیون یکنواختی

حاصل شود. مطالعات نشان داده‌اند که آنتی‌ژن‌های میلین خوکچه هندی، قوی‌ترین انسفالیتوژن در موش‌های صحرایی لویس هستند (۱۷). برای القاء مدل در روز اول به هر یک از حیوانات گروه مدل، ۰/۵ سی‌سی از امولسیون در ناحیه قائده دم تزریق شد. پس از ۲ و در ادامه ۴۸ ساعت، در ناحیه داخل صفاقی ۲۰۰ نانوگرم از پرتوزیس توکسین (شرکت Sigma، آمریکا) در ۰/۲ میلی‌لیتر آب مقطر به حیوانات تزریق شد. تزریق این امولسیون به معنای شروع ایمنی زایی است که باعث فعالسازی و تکثیر لنفوسیت‌های T انسفالیتوژنیک اختصاصی میلین شده و برای القاء بیماری حیاتی است.

پرتوزیس توکسین میانکنش میان سیستم ایمنی ذاتی و سازشی را در پاسخ به آنتی‌ژن‌های خودی افزایش می‌دهد و EAE را با باز کردن سد خونی مغزی و در نتیجه تسهیل مهاجرت لنفوسیت‌های T بیماری‌زا به CNS به راه می‌اندازد (۱۸).

بعد از ایمنی‌زایی، حیوانات به‌صورت یک بار در روز وزن می‌شدند و نشانه‌های کلینیکی بیماری مورد بررسی قرار می‌گرفت. معیارهای امتیازبندی بیماری در جدول ۱ ذکر شده است (۱۶). موش‌های دارای درجه‌بندی یکسان، در گروه‌های یکسان قرار گرفتند. معیار درجه‌بندی، آخرین درجه از میزان فلج عضو یا اعضا بود. پس از مشاهده نشانه‌های کلینیکی بیماری، حیوانات به گروه‌های زیر تقسیم شدند و تزریق کارواکرول تا روز کشتار در گروه تیمار ادامه یافت: گروه کنترل و گروه مدل یا EAE که هیچ تیماری دریافت نکردند و گروه EAE که روزانه و به‌مدت ۱۷ روز (۱۹) و پس از مشاهده نشانه‌های بیماری ۲۵ میلی‌گرم/ کیلوگرم کارواکرول ۹۸ درصد (شرکت مرک، آلمان) دریافت کردند (۲۰).

جدول ۱) نشانه‌های کلینیکی در امتیاز بندی‌های مختلف EAE

امتیازبندی	علائم کلینیکی
صفر	بدون علائم کلینیکی
۱	فلج کامل دم
۲	اختلال در راه رفتن با پاهای عقبی
۳	فلج پای عقبی
۴	فلج پاهای عقبی
۵	فلج کامل دست و پاها
۶	در حال مرگ یا مرگ

نمونه‌برداری و بررسی بیان ژن

در روز ۲۹ موش‌های مورد مطالعه ابتدا با تزریق کتامین ۵ درصد ۴۰۰ میلی‌گرم / کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی‌گرم/ کیلوگرم) به‌صورت عمیق بی‌هوش و تحت شرایط استریل و RNase free نخاع حیوان استخراج شد. نمونه‌ها پس از انجماد سریع در نیتروژن مایع در فریزر با دمای c° ۸۰- نگه‌داری شدند. RNA با استفاده از محلول ترایزول (سیگما- آلدریچ) و طبق پروتکل شرکت از ۱۰۰ میلی‌گرم بافت نخاع استخراج شد. خلوص و غلظت RNA استخراج شده، هم از طریق دستگاه اسپکتروفوتومتر (خوانش جذب در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر) و هم از طریق الکتروفورز در داخل ژل آگاروز یک درصد مورد سنجش قرار گرفت. سنتز cDNA با استفاده از کیت YTA (یکتا تجهیز آزما، ایران) و بر طبق پروتکل مربوط به شرکت صورت گرفت. پس ازآن بیان کمی ژن‌های هدف توسط روش RT-PCR با استفاده از کیت Master Mix 2X (YTA، یکتا تجهیز آزما، ایران) که حاوی سایبرگرین است، cDNA سنتز شده و پرایمرهای مرتبط با ژن‌های هدف، صورت گرفت. توالی نوکلئوتیدی پرایمرها در جدول ۲ درج گردیده است.

جدول۲) توالی پرایمرهای مورد استفاده در Real-Time PCR		
Gene symbole	**Sequence (5´⟶3)**	**Accession ID**
Nrf2	F:GTCCCAGCAGGACATGGATT	NM_031789.2
	R:GTTTGGGAATGTGGGCAACC	
Hmox-1	F:GGGAAGGCTTTAAGCTGGTGA	NM_012580.2
	R:GTGGGGCATAGACTGGGTTC	
iNOS	F:TGGTGAGGGGACTGGACTTT	NM_012611.3
	R:ATCCTGTGTTGTTGGGCTGG	
NF-Kβ	F:CTATGACAGCAAAGCCCCCA R:ACATCCGTGGGGGAAAAGTC	NM_001276711.1
GAPDH	F:AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG	NM_017008.4
	R: CATACTCAGCACCAGCATCAC	

واکنش Real-Time PCR در دستگاه Rotor-Gene Q ساخت شرکت Qiagene انجام شد. ژن GAPDH برای نرمالیزه کردن آنالیز بیان ژن استفاده شد. واکنش‌ها به صورت سه تایی و طبق برنامه دمایی جدول ۳ انجام شد.

جدول ۳) برنامه زمانی واکنش Real-Time PCR		
۹۵درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه		**واسرشت اولیه**
۴۰ سیکل	۹۵درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه	واسرشت
	۶۰درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه	اتصال پرایمرها
	۶۰درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه	تکثیر

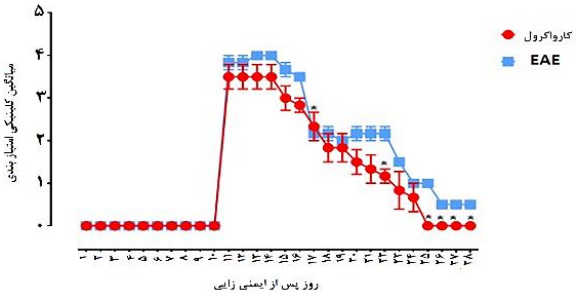
تجزیه و تحلیل آماری

جهت بررسی کارایی پرایمرها، منحنی استاندارد اختصاصی هر ژن رسم شد. نتایج ریل تایم نیز توسط نرم‌افزار REST آنالیز شد و معنی‌داری برای $p\leq ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. جهت آنالیز داده‌ها از ΔΔCT استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا سیکل آستانه (CT) برای هر نمونه را به‌دست آورده و سپس با استفاده از CT مربوط به ژن کنترل داخلی (GAPDH) همان نمونه نرمال شد (ΔCT). سپس اعداد به‌دست آمده در هر گروه با گروه کنترل مقایسه گردید (ΔΔCT) و در ادامه مقادیر ΔΔCT ۲ برای هر یک از نمونه‌ها محاسبه و تغییرات بیان ژنی به‌دست آمد.

یافته‌ها

بررسی تغییرات وزنی

علائم بیماری مالتیپل اسکلروزیس حدود ۱۱ تا ۱۴ روز پس از تزریق امولسیون در موش‌ها ظاهر شد. امتیازبندی بیماری در حیوانات مبتلا، بسته به شدت علائم نمره‌گذاری شد. تزریق روزانه کارواکرول به میزان زیادی باعث کاهش امتیازبندی شدت بیماری در حیوانات تحت تیمار با کارواکرول، در مقایسه با گروه EAE شد (P<۰/۰۰۱). (نمودار ۱)(۲۱).

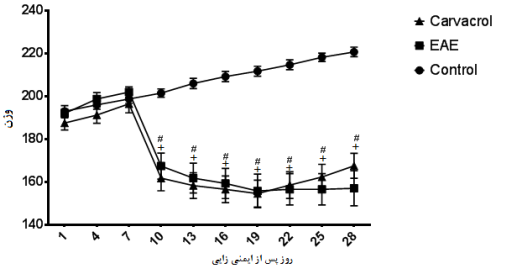


نمودار ۱) نمودار میانگین نمرات شدت بیماری EAE در موش‌های گروه‌های EAE و تیمار با کارواکرول.
* اختلاف معنادار گروه EAE با گروه کارواکرول (P<۰/۰۰۱).

Fig 1) Graph of mean EAE disease severity scores in EAE and carvacrol-treated mice.
*Significant difference between EAE group and carvacrol group (P<0.001).

تغییرات وزنی موش‌ها به صورت زیر بود:

وزن موش‌ها در ابتدای شروع القاء اندازه‌گیری و ثبت شد. ۲۴ تا ۴۸ ساعت قبل از تظاهر نشانه‌های بیماری و فلج شدن حیوانات، وزن آن‌ها در حدود ۱۵ تا ۲۰ درصد کاهش نشان می‌دهد که از نشانه‌های مهم القاء مدل می‌باشد. پس از ثبت روزانه وزن موش‌ها، تغییرات وزنی در هر سه گروه بررسی شد. تا روز نهم، هیچ اختلاف معناداری بین گروه‌های مورد مطالعه وجود نداشت. در دو گروه EAE و تیمار با کارواکرول از روز نهم کاهش وزن محسوسی در حیوانات مشاهده شد. این کاهش وزن در گروه EAE تا روز کشتار با روند آهسته‌تری ادامه داشت، اما در گروه دریافت کننده کارواکرول، در روزهای ۲۱ تا ۲۳ تغییر وزن روند صعودی پیدا کرد. نتایج حاصل برای هر سه گروه به صورت نمودار ۲ گزارش شد.

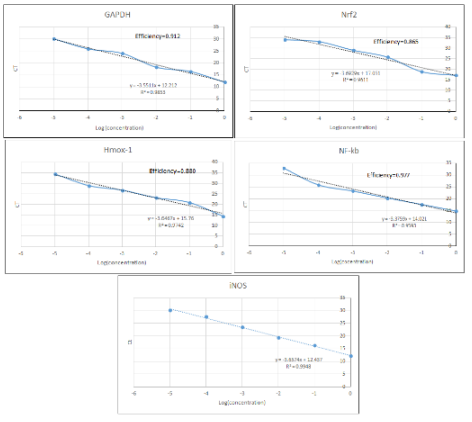


نمودار ۲) نشان دهنده تغییر در وزن موش‌ها (بر حسب گرم) در طول دوره از روز اول تا ۲۸ می‌باشد. + اختلاف معنی‌دار گروه کارواکرول با گروه کنترل. # اختلاف معنادار گروه EAE با گروه کنترل

Fig 2) shows the change in weight of mice (in grams) during the period from the first day to 28. +Significant difference between carvacrol group and control group. # Significant difference between EAE group and control group

بررسی ژن‌های موثر در استرس اکسیداتیو

برای تأیید کارایی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه، منحنی Melt curve به‌علاوه نمودار خطی R2 هر یک از پرایمرها در نمودار ۳ مشخص شده است.

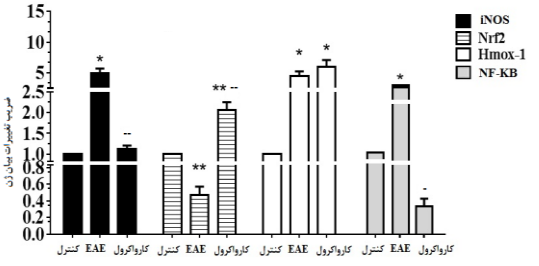


نمودار ۳) منحنی‌های ذوب و نمودار خطی R2 برای پرایمرهای Hmox-1، iNOS، Nrf2 و NF-ĸB و ژن کنترل داخلی GAPDH

Fig 3) Melting curves and R2 line diagram for Hmox-1, *iNOS*, *Nrf2* and *NF-ĸB* primers and *GAPDH* internal control gene

پس از اطمینان از کارایی پرایمرها، Real-Time PCR انجام شد و آنالیزهای آماری، صورت گرفت. بیان iNOS mRNA در گروه EAE نسبت به گروه کنترل به میزان ۴/۹۱۸۳ افزایش یافت. (P<۰/۰۰۰۱) در موش‌هایی که به وسیله کارواکرول تحت تیمار قرار گرفتند، میزان بیان این ژن به ۰/۹۸۲۶ و تا حدود سطح کنترل کاهش یافت؛ (P<۰/۰۵). میان گروه تحت درمان با کارواکرول و گروه کنترل اختلاف معناداری وجود نداشت. بیان ژن Nrf2 در گروه EAE نسبت به گروه کنترل برابر ۰/۴۶۶۵ بود (P<۰/۰۵) با تیمار موش‌های صحرایی با کارواکرول بیان ژن Nrf2 نسبت به گروه EAE و حتی کنترل (۲/۰۵۵۲ برابر) افزایش نشان داد (P<۰/۰۵). بیان ژن Hmox در گروه EAE نیز نسبت به گروه کنترل، افزایشی برابر ۴/۴۳۹۵ داشت (P<۰/۰۰۰۱) و در گروه تیمار با کارواکرول، این روند افزایشی ادامه یافت (۶/۰۳۳۷ برابر)(P<۰/۰۰۰۱) که نشان دهنده اثرگذاری کارواکرول بر بیان این ژن است. در این مطالعه میزان

بیان NF-ĸB در سطح mRNA در رت‌های مدل، نسبت به گروه کنترل به میزان ۴/۸۱۴۵ بالا رفت (P<۰/۰۰۰۱)، اما تیمار با کارواکرول این تغییرات را در سطح نسخه‌برداری نسبت به گروه بیمار به‌طور کامل معکوس کرده و به ۰/۲۸۰۱ کاهش داد (P<۰/۰۰۰۱)، به‌طوری که این سطح از بیان، از گروه کنترل نیز کمتر بود. نتایج بالا در نمودار ۴ نشان داده شده است.



نمودار ۴) اثر کارواکرول بر بیان ژن‌های *Hmox-1*، *iNOS*، *Nrf2* و *NF-ĸB* پس از انجام Real-time PCR

اختلاف معنادار گروه‌ها با گروه کنترل: (P<۰/۰۰۰۱)* و (P<۰/۰۵)**

اختلاف معنادار گروه‌ها با گروه کنترل: (P<۰/۰۰۰۱)- و (P<۰/۰۵) --

Fig 4) The effect of carvacrol on the expression of *Hmox-1*, *iNOS*, *Nrf2* and *NF-ĸB* genes. After performing Real-time PCR. Significant difference between groups and control group*(P<0.0001), **(P<0.05). Significant difference between carvacrol group and EAE. -(P<0.0001), -- (P<0.05).

بحث

به علت اثربخشی کارواکرول بر برخی از بیماری‌های التهابی و نورودژنراتیو مغزی، این ترکیب گزینه مناسبی برای درمان بیماری التهابی مالتیپل اسکلروزیس است. مکانیسم‌های متعددی که در بیماری مالتیپل اسکلروزیس به راه می‌افتند، در نهایت یک محیط ملتهب و اکسیداتیو را ایجاد می‌کند. که منجر به آسیب و تخریب بافت عصبی می‌گردد (۲۲).

یک مولکول کلیدی در سیستم عصبی که به آسیب‌های ناشی از التهاب و استرس اکسیداتیو، پاسخ می‌دهد، هم اکسیژناز-۱ یا HO-1 می‌باشد. HO-1 یک پروتئین شوک حرارتی است که در شرایط استرس اکسیداتیو تولید می‌شود و هم را به بیلی‌روبین آنتی‌اکسیدان و مونوکسیدکربن تبدیل می‌کند و در بسیاری از بیماری‌ها مکانیسم قدرتمندی را بر علیه رادیکال‌های آزاد ایجاد می‌کند. به خوبی اثبات شده است که فعالیت HO-1 در نورون‌ها دارای نقش محافظتی بر علیه آسیب اکسیداتیو و مرگ سلولی است (۲۳ و ۲۴). افزایش بیان HO-1 مکانیسم قدرتمندی برای آداپته شدن سلول با استرس است و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی آن عموماً به دلیل فعالیت زیستی محصولات متابولیکی آن است (۲۴). عدم تنظیم سیستم Hmox با بیماری‌زایی مالتیپل اسکلروزیس مرتبط است و دخالت آن در سمیت نورون‌ها و در التهاب نورونی به اثبات رسیده است. در موش‌های ناک اوت Hmox دمیلیناسیون، فلج و مرگ افزایش می‌یابد. فعال شدن وابسته به Nrf-2 آنزیم HO-1 عموماً با نقش محافظتی آن از نورون‌ها و سلول‌های گلیال همراه است. این اثر احتمالاً به دلیل توانایی Nrf2 در راه‌اندازی نسخه‌برداری ژن‌های آنتی‌اکسیدانی و محافظتی است (۲۴ و ۲۵). از سوی دیگر نقش Nrf-2 در حفظ و نگهداری میلین CNS به خوبی مشخص شده است. تا به امروز بیش از ۲۰۰ ژن مرتبط با Nrf2 شناسایی شده‌اند که Nrf2 به عنوان فاکتور نسخه‌برداری، بیان آن‌ها را تنظیم می‌کند. از جمله این آنزیم‌ها و پروتئین‌ها می‌توان به هم اکسیژناز یا Hmox-1 اشاره کرد که در دفاع آنتی‌اکسیدانی و سم‌زدایی مشارکت دارد (۲۰). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که کارواکرول باعث

افزایش بیان Hmox-1 و Nrf-2 شد و چون افزایش بیان HO-1 با افزایش Nrf-2 همراه بوده است، دارای اثر محافظتی از نورون می‌باشند. همسو با این مطالعه، لیو (Liu) و همکاران، نشان دادند که در آسیب‌های حاصل از EAE، افزایش بیان HO-1 به وسیله ماکروفاژها وجود دارد و این افزایش بیان، می‌تواند شدت EAE را کاهش دهد (۱۱).

آلوی (Alvi) و همکاران، با بررسی اثر کارواکرول بر تشنج و التهاب نورونی در موش صحرایی دریافتند که کارواکرول می‌تواند به عنوان یک فعال کننده Nrf2 عمل کند و از طرق مختلف، آنتی‌اکسیدان‌های پایین دست خود را القا، عوارض التهابی را کاهش داده و باعث بهبود و تسکین التهاب و تخریب نورونی می‌گردد (۲۶).

احمد (Ahmed) و همکاران، بر نقش محوری Nrf2/Hmox-1 در کاهش التهاب نورونی تأکید کردند. آن‌ها نشان دادند که افزایش بیان Hmox-1 (که به Nrf2) وابسته است، بر پاسخ‌های التهابی که به وسیله لیپو پلی ساکارید در RAW264.7 ایجاد می‌شود، اثر گذار است و محور Nrf2/Hmox-1 بر روی سلول‌های میکروگلیایی و هیپوکمپی موشی و در نهایت بر روی التهاب نورونی، اثرگذار هستند. آن‌ها نشان دادند که افزایش بیان Hmox-1 از طریق مسیر Nrf2 (پروتئین اختصاصی در هسته سلول است که هر گاه فعال شود قدرت آنتی‌اکسیدانی سلول افزایش می‌یابد) در سلول‌های میکروگلیایی موش، باعث جلوگیری از مرگ سلول‌های هیپوکمپی می‌شود.(۲۳ و ۲۴ و ۲۵). در سلول‌های میکروگلیایی موش، باعث جلوگیری از مرگ سلول‌های هیپوکمپی می‌شود (۲۳ و ۲۴).

اگر فعالیت HO-1 مستقل از Nrf2 باشد(که معمولاً همراه با فعال شدن NF-κB است) اثرات سیتوتوکسیک و سمی از خود نشان می‌دهد. مسیر دیگر که به نقش آنتی اکسیدانی Hmox-1 کمک می‌کند، بیان کاهشی NF-κB است، که یکی از فاکتورهای التهابی مهم می‌باشد (۲۵). در تحقیق پیش رو، نتایج حاصل در گروه تیمار با کارواکرول، کاهش این فاکتور التهابی را تأیید کرد. فعال شدن NF-κB در میکروگلیا/ ماکروفاژها باعث تولید واسطه‌های التهابی شده و اثرات مختلفی در پیشرفت مالتیپل اسکلروزیس دارد (۲۷). همچنین میزان بیان Hmox-1 و iNOS در گروه مدل EAE افزایش بسیار نشان داد که چون این افزایش با فعال شدن NF-κB و کاهش Nrf2 همراه بود، باعث ایجاد محیط سیتوتوکسیک و التهابی شد. هیل (Hill) و همکاران، در مطالعه خود نشان دادند که مارکر آسیب میلینی، یعنی نیتروتیروزین که نشانه تخریب میلین به وسیله iNOS است، در قطعه‌های MBP و در پلاک‌های مالتیپل اسکلروزیس مشاهده شده است و بر نقش محوری Inos در بیماری‌زایی مالتیپل اسکروزیس تأکید کردند (۳۰-۲۸).

تیمار با کارواکرول میزان بیان Hmox-1 را مجدداً افزایش داد. از سوی دیگر این تیمار باعث کاهش NF-κB، iNOS و افزایش قابل توجه Nrf2 همراه بود. این تغییرات منجر به کاهش استرس اکسیداتیو و ایجاد یک محیط اکسیداسیون- احیای مناسب برای سلول‌های عصبی می‌شود و بنابراین می‌تواند شرایط مناسب برای برخی فرایندهای حیاتی همچون میلیناسیون نورون‌ها ایجاد کرده و دمیلیناسیون بیشتر نورون‌ها را مهار کند. نتایج حاصل از این مطالعه با آنچه که از مطالعات قبلی در مورد اثرات ضدالتهابی کارواکرول بر برخی بیماری‌های مخرب نورونی به دست آمده بود، هم‌خوانی داشت و همان‌طور که انتظار می‌رفت استفاده از کارواکرول، اثرات

آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی خوبی در موش‌های EAE از خود به جای گذاشت.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه مشخص شد که کارواکرول می‌تواند بر برخی فاکتورهای مولکولی رت‌های EAE اثرگذار باشد که در حالت بالینی باعث بهبود اسکوربندی بیماری و ممانعت از کاهش وزن رت‌های مدل شد. مطالعات ژنی در این بررسی، نشان دهنده بیان بالای Hmox-1 در گروه مدل EAE نسبت به گروه کنترل بود که چون این افزایش با فعال شدن ژن‌های مارکر استرس اکسیداتیو یعنی NF-κB و iNOS و کاهش بیان Nrf2 همراه بود، باعث ایجاد محیط سیتوتوکسیک و التهابی در موش‌های EAE شد. پس از تیمار با کارواکرول؛ افزایش بیان ژن HO-1 در نخاع حیوانات تحت تیمار نسبت به هر دوگروه کنترل و EAE، نشان داده شد که با افزایش Nrf2 mRNA و کاهش بیان iNOS و NF-KB همراه بود. تمامی این دست آوردها می‌تواند زمینه کاهش التهاب و استرس اکسیداتیو و افزایش محافظت از نورون‌ها، را فراهم کرده و محیط تهاجمی که برای برخی سلول‌ها همچون اولیگودندروسیت‌ها ایجاد می‌گردد، را تعدیل کند.

سپاس و قدردانی

نگارندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب قدردانی خود را از همکاری مرکز تحقیقات هپاتیت علوم پزشکی لرستان اعلام کنند. این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی لرستان انجام شده است.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان مقاله بیان نشده است.

References:

1.Kasper LH, Shoemaker J. Multiple Sclerosis Immunology: The Healthy Immune System vs The MS Immune System. Neurology 2010; 74(Suppl 1): S2-S8.

2.Kim DY, Hao J, Liu R, et al. Inflammation-Mediated Memory Dysfunction And Effects Of A Ketogenic Diet In A Murine Model Of Multiple Sclerosis. PLoS One 2012; 7(5): e35476.

3.Gray E, Thomas TL, Betmouni S, et al. Elevated Myeloperoxidase Activity In White Matter In Multiple Sclerosis. Neurosci Lett 2008; 444(2): 195-8.

4.Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free Radicals And Antioxidants In Normal Physiological Functions And Human Disease. Int J Biochem Cell Biol 2007; 39(1): 44-84.

5.Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative Stress, Glutamate, And Neurodegenerative Disorders. Science 1993; 262(5134): 689-95.

6.Khazdair MR, Boskabady MH. The Effect Of Carvacrol On Inflammatory Mediators And Respiratory Symptoms In Veterans Exposed To Sulfur Mustard, A Randomized, Placebo-Controlled Trial. Respir Med 2019; 150: 21-9.

7.Baluchnejadmojarad T, Hassanshahi J, Roghani M, et al. Protective Effect Of Carvacrol In 6-Hydroxydopamine Hemi-Parkinsonian Rat Model. J Basic Clin Pathophysiol 2014; 2(2): 29-34.

8.Baluchnejadmojarad T, Roghani M. The Protective Effect Of Carvacrol On Kainic Acid-Induced Model Of Temporal Lobe

Epilepsy In Male Rat. J Basic Clin Pathophysiol 2016; 4(2): 11-6.

9.Gholijani N, Amirghofran Z. Effects Of Thymol And Carvacrol On T-Helper Cell Subset Cytokines And Their Main Transcription Factors In Ovalbumin-Immunized Mice. J Immunotoxicol 2016; 13(5): 729-37.

10.Zhou Y, Cui C, Ma X, et al. Nuclear Factor κB (NF-κB)–Mediated Inflammation in Multiple Sclerosis. Front Immunol 2020; 11: 391.

11.Liu Y, Zhu B, Luo L, et al. Heme Oxygenase-1 Plays An Important Protective Role In Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. Neuroreport 2001; 12(9): 1841-5.

12.Lan M, Tang X, Zhang J, et al. Insights In Pathogenesis Of Multiple Sclerosis: Nitric Oxide May Induce Mitochondrial Dysfunction Of Oligodendrocytes. Rev Neurosci 2017; 29(1): 39-53.

13.Johnson DA, Amirahmadi S, Ward C, et al. The Absence Of The Pro-Antioxidant Transcription Factor Nrf2 Exacerbates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. Toxicol Sci 2010; 114(2): 237-46.

14.Cerghet M, Skoff RP, Bessert D, et al. Proliferation And Death Of Oligodendrocytes And Myelin Proteins Are Differentially Regulated In Male And Female Rodents. J Neurosci 2006; 26(5): 1439-47.

15.Yoshida H, Kimura A, Fukaya T, et al. Low Dose CP-690,550 (Tofacitinib), a pan-JAK Inhibitor, Accelerates The Onset Of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis By Potentiating Th17 Differentiation. Biochem Biophys Res Commun 2012; 418(2): 234-40.

16.Beeton C, Garcia A, Chandy KG. Induction And Clinical Scoring Of Chronic-Relapsing Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. J Vis Exp 2007; (5): e224.

17.Stosic-Grujicic S, Ramic Z, Bumbasirevic Z, et al. Induction Of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis In Dark Agouti Rats Without Adjuvant. Clin Exp Immunol 2004; 136(1): 49-55.

18.Hofstetter HH, Shive CL, Forsthuber TG. Pertussis Toxin Modulates the Immune Response to Neuroantigens Injected in Incomplete Freund's Adjuvant: Induction of Th1 Cells and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Presence of High Frequencies of Th2 Cells. J Immunol 2002; 169(1): 117-25.

19.Mohajeri M, Sadeghizadeh M, Najafi F, et al. Polymerized Nano-Curcumin Attenuates Neurological Symptoms In EAE Model Of Multiple Sclerosis Through Down Regulation Of Inflammatory And Oxidative Processes And Enhancing Neuroprotection And Myelin Repair. Neuropharmacology 2015; 99: 156-67.

20.Gholami M, Rajaei Z, Malek M. Effects Of Carvacrol On Spatial Learning Performances, Hippocampal Interleukin-1ß Level And Oxidative Stress Markers In Lipopolysaccharide-Treated Rats. Physiol Pharmacol 2019; 23(4): 286-95.

21.Ahmadi M, Eidi A, Ahmadvand H, et al. Effect Of Carvacrol On The Expression of IL-10, FOX-P3, IL-4 and TGF-β Genes In The Spinal Cord Of Rats Model Of Multiple Sclerosis. Iran J Biol Sci 2020; 15(2): 53-61. (Persian)

22.Pareek TK, Belkadi A, Kesavapany S, et al. Triterpenoid Modulation Of IL-17 and Nrf-2 Expression Ameliorates Neuroinflammation And Promotes Remyelination In Autoimmune Encephalomyelitis. Sci Rep 2011; 1: 201.

23.Ahmed SMU, Luo L, Namani A, et al. Nrf2 Signaling Pathway: Pivotal Roles In Inflammation. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis 2017; 1863(2): 585-97.

24.Habtemariam S. The Nrf2/HO-1 Axis As Targets For Flavanones: Neuroprotection By Pinocembrin, Naringenin, And Eriodictyol. Oxid Med Cell Longev 2019; 2019: 4724920.

25.Movahed A. Beneficial Effects Of Resveratrol, Present In Grapes In The Preven-

tion And Treatment Of Heart Disease And Failure. Iran South Med J 2015; 18(1): 183-99. (Persian)

26.Nitti M, Piras S, Brondolo L, et al. Heme Oxygenase 1 In The Nervous System: Does It Favor Neuronal Cell Survival Or Induce Neurodegeneration?. Int J Mol Sci 2018; 19(8): 2260.

27.Alvi AM, Al Kury LT, Alattar A, et al. Carveol Attenuates Seizure Severity and Neuroinflammation in Pentylenetetrazole-Kindled Epileptic Rats by Regulating the Nrf2 Signaling Pathway. Oxid Med Cell Longev 2021; 2021: 9966663.

28.Yue Y, Stone S, Lin W. Role Of Nuclear Factor κB In Multiple Sclerosis And Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. Neural Regen Res 2018; 13(9): 1507-15.

29.Hill KE, Zollinger LV, Watt HE, et al. Inducible Nitric Oxide Synthase In Chronic Active Multiple Sclerosis Plaques: Distribution, Cellular Expression And Association With Myelin Damage. J Neuroimmunol 2004; 151(1-2): 171-9.

30.Mirzazadeh E, Khezri S, Abtahi Froushani SM. Effects of Quercetin on Improving the Damage Caused by Free Radicals in the Rat Models of Multiple Sclerosis. Iran South Med J 2019; 22(1): 1-15. (Persian)

Original Article

The Effect of Carvacrol on the Expression of Genes *Hmox-1, iNOS, Nrf2 and NF-ĸB* in the Spinal Cord of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Mice

M. Ahmadi (MSc)[1*], A. Eidi (PhD)[1], H. Ahmadvand (PhD)[2**], M. Khaksarian (PhD)[3], F. Sotoodehnejadnematalahi (PhD)[1]

[1] Department of Biology, School of Convergent Sciences and Technologies, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran
[2] Department of Biochemistry, School of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran
[3] Razi Herbal Medicines Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran

(Received 24 Sep, 2021 Accepted 15 Jan, 2022)

Abstract

Background: Multiple sclerosis (MS) is one of the most common diseases of the nervous system, characterized by inflammation of the central nervous system and oxidative stress. Carvacrol is a monoterpenoid phenol with antioxidant effects against free radical. The aim of this study was to evaluate the effect of carvacrol on the expression of *Hmox-1*, *iNOS*, *Nrf2* and *NF-ĸB* genes in the spinal cord of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) rats as an animal model of MS.

Materials and Methods: EAE was induced in female Lewis rats and they were then divided into three groups: control, EAE model, and EAE treated with carvacrol. Carvacrol was daily injected intraperitoneally for 17 days after immunization. RNA was extracted from rat spinal cord tissue and changes in the expression of the *Hmox-1*, *iNOS*, *Nrf2* and *NF-ĸB* genes were examined by Real-Time PCR.

Results: The results showed that carvacrol treatment stopped severe weight loss in the EAE model group and their mean weight increased. Furthermore, carvacrol was found to reduce the expression of *iNOS* and *NF-ĸB* genes and increase the levels of *Hmox-1* mRNA and *Nrf2* mRNA.

Conclusion: The effect of carvacrol on weight changes in treated rats, along with the increased *HO-1* gene expression in their spinal cord, associated with increased *Nrf2* mRNA and decreased expression of *iNOS* and *NF-ĸB*, led to a reduction in inflammation and oxidative stress, and an increase in the neuroprotection. Furthermore, the invasive environment created for some cells, such as oligodendrocytes, was modulated.

Keywords: Carvacrol, iNOS, Multiple sclerosis, Nrf2, Oxidative stress

©Iran South Med J.All right sreserved

Cite this article as: Ahmadi M, Eidi A, Ahmadvand H, Khaksarian M, Sotoodehnejadnematalahi F. The Effect of Carvacrol on the Expression of Genes Hmox-1, iNOS, Nrf2 and NF-ĸB in the Spinal Cord of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Mice. Iran South Med J 2022; 25(1): 1-12

Copyright © 2022 Ahmadi, et al This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

***Address for correspondence*: Department of Biochemistry, School of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran.
E.mail: Hassan_a46@yahoo.com
* ORCID: 0000-0003-2159-340X
** ORCID: 0000-0002-9406-3592