مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۸، شماره ۵، آذر و دی ۱۴۰۲(شماره پی در پی ۱۶۰)

توانمندی پرگنونولون در تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی موشی و کاستن نشانگرهای التهابی و اکسیدانی پس از القای التهاب با لیپوپلی ساکارید در شرایط آزمایشگاهی

کوروش نگین تاجی[۱و۲]، محسن فروزانفر[۱]، مجتبی جعفری نیا[۱]، امیر قنبری[۲*]

[۱]گروه زیست‌شناسی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران، [۲]مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

تاریخ وصول: ۱۴۰۱/۱۲/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۱۲

چکیده

زمینه و هدف: پرگنونولون به عنوان پیش‌ساز سایر هورمون‌های استروئیدی عمل می‌کند و اثر خود را به عنوان یک مولکول ضدالتهابی برای حفظ هموستاز ایمنی در شرایط مختلف التهابی اعمال می‌کند. در این بیماری‌ها کاهش سطح پرگنونولون مشاهده شده است که بر نقش آن در محافظت عصبی و بازسازی عصبی و نقش ضد التهابی آن تأکید دارد، بنابراین هدف از این مطالعه، تعیین و توانمندی پرگنونولون در تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی موشی و کاستن نشانگرهای التهابی و اکسیدانی پس از القای التهاب با لیپوپلی ساکارید در شرایط آزمایشگاهی بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۹۹ در دانشگاه علوم پزشکی یاسوج انجام شد، سلول‌های بنیادی عصبی از برجستگی‌های گانگلیونی خارجی مغز جنین ۱۴ روزه موش سوری به روش استاندارد تهیه گردید. زنده مانی سلول‌ها به روش MTT و به دنبال تیمار با غلظت‌های ۱، ۲، ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار پرگنونولون و تیمار توام پرگنونولون با مدل التهابی لیپوپلی ساکارید(LPS) انجام شد. هم‌چنین تعداد نوروسفرها و سلول‌های مشتق از نوروسفرها در شرایط استاندارد انکوبه شد و پس از ۵ روز شمارش گردید. محیط رویی سلول‌ها برداشته و به روش الیزا میزان نشانگرهای اکسیدانی و آنتی اکسیدانی FRAP, MDA, NO و نشانگرهای التهابی IL6 وTNFα اندازه‌گیری شد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار آماری واریانس یک طرفه و تست تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که زنده مانی سلول‌های بنیادی عصبی به وسیله LPS کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان داد در حالی که پرگنونولون باعث افزایش معنی‌دار این سلول‌ها نسبت به گروه کنترل گردید و غلظت ۱۰ میکرومولار بیشترین زنده مانی را نشان داد (p<۰/۰۱)، هم‌چنین در تیمار توأم LPS و پرگنونولون با غلظت ۱۰ میکرومولار، تعداد نوروسفرها و سلول‌های منتج ازنورسفرها از آن به صورت معنی‌دار نسبت به گروه LPS افزایش یافت(به ترتیب p<۰/۰۰۱ و p<۰/۰۰۰۱ وp<۰/۰۰۰۱). پرگنونولون به صورت معنی‌داری میزان NO حاصل از التهاب ایجاد شده LPS را نسبت به گروه کنترل کاهش داد(p<۰/۰۰۰۱)، به علاوه کاهش معنی‌دار میزان NO در تیمار توأم پرگنونولون و LPS در غلظت‌ها مختلف نسبت به گروه LPS مشاهده گردید(p<۰/۰۰۰۱). از سوی دیگر این نورواستروئید به صورت تنها و هم‌چنین توأم با LPS باعث کاهش معنی‌دار سطح IL-6 نسبت به گروه LPS گردید(p<۰/۰۰۰۱) و تیمار با غلظت ۱۵ میکرومولار پرگنونولون میزان TNF-α را به صورت معنی‌داری کاهش داد(p<۰/۰۰۰۱).

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پرگنونولون با اثر بر فاکتورهای التهابی می‌تواند تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی را در شرایط ایجاد التهاب افزایش دهد، هم‌چنین می‌تواند میزان نشانگرهای التهابی و اکسیدانی در مدل التهابی محیط کشت کاهش دهد.

واژه‌های کلیدی: سلول بنیادی عصبی، نورواستروئید، پرگنونولون، مدل التهاب، لیپوپلی ساکارید، استرس اکسیداتیو

***نویسنده مسئول: امیر قنبری، یاسوج،** دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی

Email: amirghanbari52@yahoo.com

مقدمه

از دست رفتن سلول‌های عصبی می‌تواند به علل مختلف ژنتیکی، محیطی، التهاب و یا ضربات صورت گیرد. بسته به این که بخش تحلیل رفته سیستم عصبی چه عملکردی در فرد داشته باشد و روند تحلیل با چه سرعتی و چه مکانیزمی پیش رود، عوارض بیماری و پیامدهای آن می‌تواند متفاوت باشد(۲و۱). در سراسر بدن سلول‌های سامانه ایمنی، به طور گسترده‌ای فعالیت می‌کنند و به هنگام بروز عفونت در هر قسمتی از بدن، این سلول‌ها و فرآورده‌های آنها در محل عفونت حضور پیدا می‌کنند. فرآیندی که طی آن این نتایج حاصل می‌شود، التهاب نام دارد. عواملی که منجر به ایجاد بیماری‌های عصبی می‌شود، بسیار است. این عوامل به تنهایی یا به صورت توأمان می‌توانند در ایجاد بیماری‌های عصبی نقش داشته باشند(۴ و۳)، نقش و اهمیت التهاب عصبی به عنوان یک عامل خطرساز در رخداد بیماری‌های عصبی هر روز بیشتر آشکار می‌شود و گمان می‌رود التهاب نقش برجسته‌ای در ایجاد شرایط پاتولوژی هم در سیستم عصبی مرکزی هم سیستم عصبی محیطی ایفاء می‌کند، پژوهش‌های گذشته نشان می‌دهند که برخی از استروئیدهای درون‌زا اثرات محافظتی داشته و شرایط مخرب LPS بر عملکرد سیستم عصبی نظیر مشکلات یادگیری، حافظه و همچنین آسیب های اکسیداتیو در بافت مغز را بهبود میدهد(۶ و۵). التهاب عصبی در شرایط پاتولوژی متعددی چون سکته، عفونت و اختلالات انحطاط نورونی[۱] دیده می‌شود(۷)، همچنین بقایای تخریب نورونی در سیستم عصبی، عوامل مهاجم مانند ویروس‌ها و باکتری‌ها، ترکیبات شیمیایی مضر و نیز پروتئین‌های تغییر شکل یافته در خود مغز می‌توانند التهاب ایجاد کنند(۸)، اگر چه پاسخ التهابی در بدن برای بقا ضروری است. با این حال، فعال شدن نامناسب سیستم ایمنی ممکن است اثرات مضری به دنبال داشته باشد، که خود این پاسخ می‌تواند تشدید کننده التهاب نیز باشد(۱۰ و ۹، ۶). التهاب عصبی با فعال شدن میکروگلیاها، افزایش نفوذ پذیری سد خونی مغزی و ورود سلول‌های ایمنی محیطی به بافت مغزی و تراوش سایتوکین‌های التهابی شروع می‌شود و سرانجام در صورت عدم کنترل التهاب، با آسیب و مرگ نورونی مشخص می‌گردد.[۱۰] البته این فرآیندها تنها تحت تأثیر میکروگلیاها نبوده بلکه آستروسیت‌ها، نورون‌ها، سلول‌های اندوتلیال عروق خونی مغز، سلول‌های T و بیگانه خواری‌های محیطی نیز در این فرآیند نقش دارند(۸ و۷). از دیرباز مدل‌هایی برای ایجاد التهاب در دسترس بوده که استفاده از قطعات باکتری برای ایجاد مدل التهاب در بسیاری از پژوهش‌های گزارش گردیده است. مولکول‌های لیپوپلی ساکارید(LPS)[۲] مولکول‌های بزرگی هستند که با عنوان لیپوگلیکان[۳] و اندوتوکسین[۴] هم معروفند. این مولکول‌ها در غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی یافت می‌شوند و

1-Neurodegenerative disorders
2-lipopolysaccharide
3-Lipoglycan
4-Endotoxins

پاسخ‌های ایمنی شدیدی را ایجاد می‌کند و می‌توانند مدل مناسبی برای ایجاد التهاب در شرایط برون و درون تنی باشند(۱۱).

در میان بسیاری از عوامل دخیل در واکنش التهابی، اکسید نیتریک(NO) از فاکتورهای اصلی ایجاد التهاب می‌باشد. سنتز بیش از حد NO می‌تواند بسته به غلظت و شرایط محیطی(غلظت سوپراکسید رادیکال) برای سلول‌ها سمی باشد. مدل التهابی می‌تواند بر فاکتورهای پیش التهابی نظیر؛ اینترلوکین۶ ، TNF الفا و تغییر در تعادل فعالیت اکسیدانی و انتی اکسیدانی و تکثیر و تمایز سلول‌ها اثرگذار باشد(۱۳و۱۲). هورمون‌ها و سایر فاکتورهای درون زاد می‌توانند بر التهاب بدن اثرگذار باشند. هورمون‌های استروئیدی می‌توانند نقش مهمی در کنترل التهاب داشته باشند.

پرگنونولون یک پیش ساز هورمون‌های استروئیدی است که در بافت‌های مختلف تولید کننده استروئیدها سنتز می‌شود(۱۱). در پژوهش‌های قبلی گزارش شده که پرگنونولون در زمره نورواستروئید بوده و می‌تواند موجب تکثیر سلولی و نورون‌زایی در بدن شود(۱۴) و همچنین مشخص شده که در مغز و لنفوسیت‌ها نیز تولید می شود(۱۵). تولید این هورمون در مغز و سیستم ایمنی می‌تواند نشان دهنده پاسخ این سیستم‌ها به عملکرد این هورمون باشد. کاهش سطح پرگنونولون در بیماری‌های التهابی مغزی مشاهده شده است که به نوعی نقش محافظتی این نورواستروئید را در سیستم عصبی مرکزی تقویت می‌کند و نیاز مغز به تولید این هورمون را در شرایط گوناگون اثبات می‌کند اگرچه مکانیسم‌های احتمالی آن روشن نیست(۱۵). بررسی‌ها نشان دادند که پرگنونولون می‌تواند از طریق تأثیر بر روی گیرنده‌های TLR2[1] و TLR4 سلول‌های ماکروفاژی، فعالیت آنها را در مدل التهابی با LPS مهار کرده و ترشح TNF-α و IL-6 را کم نمایند(۱۶ و۱۵). هم‌چنین مشتقات دیگر پرگنونولون نیز میزان TNF و COX-2 را در میکروگلیاها مهار کرده و اثرات التهابی را در مدل LPS به صورت وابسته به دوز کاهش دادند(۱۷). با توجه به اهمیت بیماری‌های التهابی مغزی و افزایش روز افزون این بیماری‌ها در جامعه و از سوی دیگر، افزایش توجه محققین به بررسی نقش اکثر نورواستروئیده‌ها و تأثیر آنها بر فاکتورهای التهابی پرداخته اند، ولی پژوهش‌های اندکی در زمینه اثرات پرگنولونون وجود دارد، لذا هدف از این مطالعه بررسی تاثیر توانمندی پرگنونولون در تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی موشی و کاستن نشانگرهای التهابی و اکسیدانی پس از القای التهاب با لیپوپلی ساکارید در شرایط آزمایشگاهی بود.[2]

روش بررسی

در این مطالعه تجربی که در سال ۱۴۰۰_ ۱۳۹۹ انجام شد، ۴سر موش بالب‌سی باردار از مرکز آزمایشگاهی حیوانات دانشگاه علوم پزشکی یاسوج خریداری شد. موش‌ها به طور آزاد به آب و غذا

1-Toll-Like Receptors 2(TLR2)

دسترسی داشتند و در دمای ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد و چرخه ۱۲ ساعته تاریکی/ روشنایی با رطوبت مطلوب نگهداری شدند. جراحی با بیهوشی و بی حسی با کتامین و زایلازین درون صفاقی انجام شد و هم‌چنین تمام تلاش‌های ممکن برای به حداقل رساندن رنج حیوانات انجام گردید. در کلیه مراحل پژوهش، اصول اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد.

موش‌ها در روز ۱۴ حاملگی پس از بیهوشی و بی‌حسی به روش دررفتگی گردن تحت عمل جراحی قرار گرفته، جنین‌های موش E14 استخراج و با محیط بافری استریل گردید، برای حذف خون و مو شسته شد. در شرایط استریل و در زیر میکروسکوپ استریو، مغز جنین موش E14 استخراج شد. سپس مغزها تشریح گردید و برجستگی‌های گانگلیونی طبق پروتکل استاندارد کشت سلول‌های بنیادی عصبی کشت داده شدند. سلول‌های ازاده شده در درون فلاسک‌های T25 با تراکم $۱۰^{۵}\times۵$ سلول در میلی‌لیتر در محیط کشت(Invitrogen) DMEM/F12، حاوی گلوتاماکس (۱۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر، سیگما-آلدریچ)، پنی‌سیلین/استرپتومایسین(۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر). B27(۲۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر، گیبکو)، N2 (۲۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر، گیبکو)، فاکتور رشد اپیتلیال(EGF)(۲۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، گیبکو) کشت داده شدند و به مدت ۵ روز در شرایط استاندارد(دی‌اکسید کربن ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه) انکوبه شدند. نوروسفرهای اولیه جمع‌آوری شده و با تیمار تریپسین/EDTA(سیگما-آلدریچ) به سلول‌های منفرد تفکیک شده و پاساژ داده شدند. در پاساژ دوم سلول ها جهت تیمار مورد استفاده قرار گرفت.

برای تعیین زنده ماندنی در ابتدا تعداد ۱۰۰۰۰ سلول به پلیت ۹۶ خانه منتقل شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه گردید. پس از تیمار با پرگنونولون(سیگما آلدریچ) با غلظت‌های(۱،۲، ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار) و LPS(سیگما آلدریچ) با غلظت‌های(۰/۵و ۱ میکرومولار) در شرایط استاندارد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه گردیدند. سپس با خارج کردن محیط روی سلول‌ها، مقدار ۱۰ میکرولیتر محلول MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به هر چاهک اضافه گردید و نمونه به مدت ۳ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. پس از آن، محلول دی‌متیل‌سولفوکسید (DMSO) جایگزین محیط انکوبه شده با MTT گردید([۱۸]). در ادامه محصول فورمازان در دستگاه ELISA با جذب ۴۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. پس از تعیین زنده‌مانی سلول‌های بنیادی به دنبال تیمار با LPS و پرگنونولون و تعیین دوز مناسب در مرحله دوم تیمار توام با غلظت‌های مختلف پرگنونولون و LPS با غلظت یک میکرومولار به روش گفته شده انجام شد. اثر هر غلظت دارو در سه تکرار بررسی شد و در نهایت تأثیر پرگنونولون و LPS بر میزان بقای سلولی به شرح زیر محاسبه شد:

زنده ماندن سلول= (نمونه OD) / (OD کنترل×۱۰۰)، که در آن OD چگالی نوری است.

سلول‌های بنیادی پس از قرارگرفتن در پلیت ۲۴ خانه و رشد اولیه بعد از ۲۴ ساعت تحت تیمار با

دوزهای مختلف پرگنونولون(۲، ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار) به تنهایی و توأم با غلظت ۱ میکرومولار LPS قرار گرفتند. ۳ روز بعد که نوروسفرها در محیط کشت شکل گرفتند و به وسیله میکروسکوپ نوری معکوس Olympus، نوروسفرهای با اندازه قطر بزرگتر یا مساوی ۵۰ میکرومتر در هر چاهک شمارش شدند. کلیه تست‌ها سه بار تکرار شد. سپس سلول‌های منتج از نوروسفرهای هر گروه(هر چاهک) به صورت جداگانه با استفاده از لام نئوبار شمارش گردید.

به دنبال کشت سلول‌ها و تیمار با غلظت‌های گفته شده LPS و پرگنونولون به صورت مجزا و هم توأم با LPS، بعد از ۳ روز محتویات هر فلاسک جمع‌آوری و محیط رویی نمونه جهت سنجش میزان اکسید نیتریک(NO)، مالون‌دی‌الدهید(MDA)[1] و فراپ(FRAP)[2] استفاده گردید. سنجش نیتریک اکساید به کمک واکنش گریس به روش میکروپلیتی انجام پذیرفت. برای پروتئین‌زدایی با استونیتریل، ۲۰۰ میکرولیتر نمونه با ۱۰۰ میکرولیتر استونیتریل مخلوط گردید(۲۰ و۱۹). برای اندازه‌گیری غلظت نیتریت و نیترات(NOx) تام ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر سرم پروتئین‌زدایی شده و سپس ۱۰۰ میکرولیتر مخلوط(۱ به ۱) سولفانامید و NEDD به محیط فوق‌الذکر افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. بعد از انجام واکنش و تشکیل رنگ، جذب نوری حاصل از تشکیل ماده رنگی در ۵۴۰ نانومتربه وسیله دستگاه خوانشگر الایزا قرائت گردید.

از تجزیه اسیدهای چرب چند غیر اشباع، مالون دی آلدئید(MDA) تشکیل می‌شود که بهترین شاخص تعیین مقدار پراکسیداسیون لیپیدی است. ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی با ۱ میلی‌لیتر از معرف TCA-TBA-HCl مخلوط و بعد از ورتکس شدید به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری جوش قرار گرفت. سپس بعد از سرد شدن به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰ گرم سانتریفوژ شد. جذب محلول صورتی رنگ رویی در طول موج ۵۳۵ نانومتر در مقابل لوله بلانک، که شامل همه معرف‌ها به غیر از نمونه بود، قرائت گردید. غلظت مالون دی‌آلدئید(MDA) نمونه با استفاده از ضریب خاموشی $۱/۵۶ \times ۱۰^{۵}\ M^{-۱}cm^{-۱}$ محاسبه شد(۲۳-۲۱).[3]

در هر لوله آزمایش مقدار ۳۳ میکرولیتر از محیط رویی سلول‌های بنیادی عصبی در گروه‌های مختلف و یا استانداردهای تهیه شده جمع‌آوری و میزان یک میلی‌لیتر از معرف FRAP به آنها افزوده شد. در روش اندازه‌گیری FRAP ، توانایی پلاسما در احیای یون‌های فریک اندازه‌گیری شد. با احیای یون‌های فریک و تبدیل آن به یون‌های فرو ۲ در pH اسیدی و در حضور تری پیریدیل-اس-تری آزین(TPTZ)، کمپلکس TPTZ-Fe تشکیل گردید که رنگ آن آبی است. محتویات لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد، شدت رنگ حاصله در طول موج ۵۹۳ نانومتر به وسیله دستگاه خوانش الیزا اندازه‌گیری گردید(۲۵ و۲۴).

1-Malondialdehyde(MDA)
2-Ferric Reducing Antioxidant Power(FRAP)

برای تعیین پاسخ التهابی در هر گروه، سطوح TNF-α، IL-6 مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از انکوبه شدن سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت، مایع رویی هر گروه جمع‌آوری و جهت سنجش مارکرهای التهابی مورد استفاده قرار گرفت. تعیین کمیت TNF-α، IL-6 بر اساس یک روش کمی ساندویچ با کیت‌های تشخیص ELISA برای موش بود. تمام مراحل طبق دستورالعمل سازنده کیت انجام شد(۲۶). جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه خوانش الیزا خوانده شد.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism-7 و آزمون‌های آماری تست شاپیرو ویلک، واریانس یک طرفه و تست تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که به دنبال تیمار گروه‌های مختلف سلول‌های بنیادی عصبی به وسیله پرگنونولون، زنده‌مانی سلول‌ها در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکرومولار در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشتند($p<0/01$**). هم‌چنین زنده‌مانی سلول‌های بنیادی عصبی جنینی در گروه‌های تیمار شده با LPS با غلظت ۱ میکرومولار بیشترین کاهش معنی‌دار را نسبت به گروه کنترل نشان داد($p<0/0001$****). زنده مانی در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های ذکر شده پرگنونولون در بالا نسبت به گروه با غلظت یک میکرومولار LPS افزایش معنی‌داری داشت($p<0/001$***)(نمودار A-۱). زنده مانی گروه‌های تیمار شده توأم LPS و پرگنونولون در غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار نسبت به LPS نیز افزایش معنی‌داری نشان داد، به ترتیب($p<0/0001$****، $p<0/0001$**** و $p<0/001$***)،($p<0/05$*)(نمودار B-۱).

داده‌های حاصل از شمارش نوروسفرها نشان داد در تیمار با غلظت‌های مختلف پرگنونولون، تعداد نوروسفرهای گروه ۱۰ میکرومولار افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان داد($p<0/01$**). LPS با غلظت ۱میکرومولار باعث کاهش معنی‌دار در تعداد نوروسفرها نسبت به گروه کنترل گردید($p<0/0001$****)، هم‌چنین در گروه‌های تیمار شده با پرگنونولون در حضور LPS به صورت توأم، تعداد نوروسفرها در گروه ۲ میکرومولار نیز یک کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشت($p<0/01$**). از سوی دیگر در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار پرگنونولون توأم با LPS، افزایش معنی‌داری در تعداد نوروسفرها نسبت به گروه LPS مشاهده گردید(به ترتیب؛ $p<0/0001$****، $p<0/001$*** و $p<0/01$**). تعداد نوروسفرها در گروههای که فقط پرگنونولون دریافت کردند، نسبت به گروه LPS افزایش معنی‌داری داشتند($p<0/0001$****)(نمودار C-۱, D). نتایج شمارش سلول‌های منتج از نوروسفر روند مشابهی را همانند تأثیر پرگنونولون بر تعداد نوروسفرها نشان داد. در گروه‌های تیمار شده با غلظت ۵ و ۱۰ میکرومولار پرگنونولون، افزایش معنی‌دار در تعداد سلول‌های

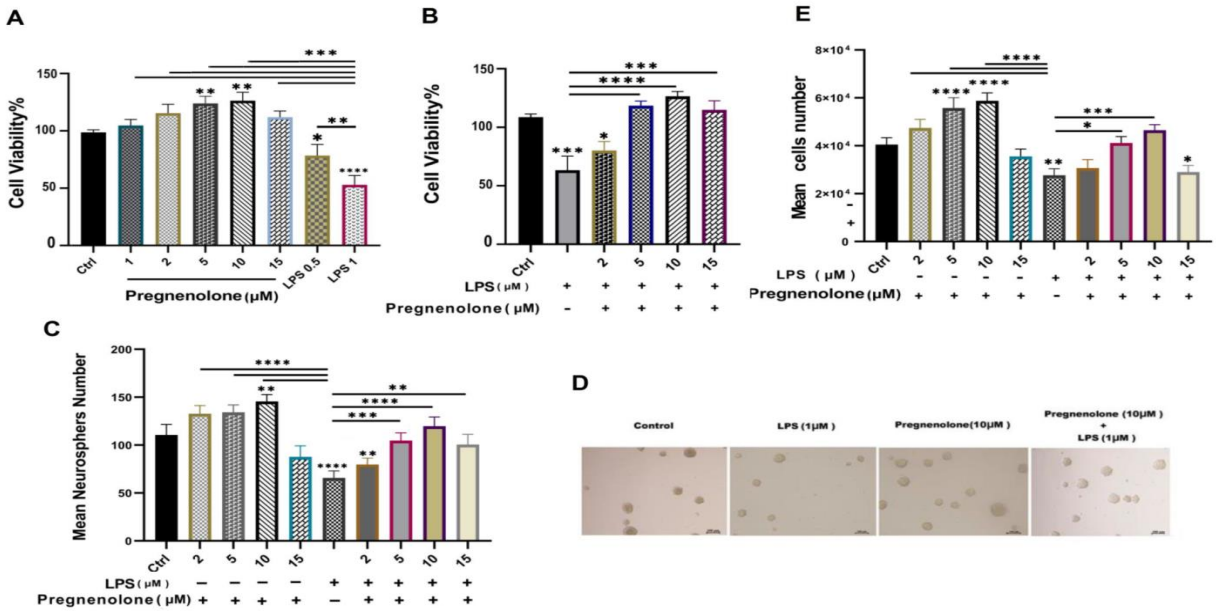
منتج از نوروسفرها نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید(p<۰/۰۰۰۱****). از طرفی LPS به صورت معنی‌داری این سلول‌ها را نسبت به گروه کنترل کاهش داد(p<۰/۰۱**). به علاوه در گروه‌های تیمار شده پرگونولون توأم با LPS، گروه ۱۵ میکرومولار کاهش معنی‌داری با گروه کنترل را نشان داد(p<۰/۰۵*). از طرفی گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکرومولار پرگونولون که به صورت توأم با LPS تیمار شدند، افزایش معنی‌داری نسبت به گروه LPS نشان دادند، به ترتیب(p<۰/۰۵*، p<۰/۰۰۱***) از سوی همه گروههای مطالعه که فقط با پرگونولون تیمار شدند، نسبت به LPS افزایش معنی‌داری نشان دادند(p<۰/۰۰۰۱****)(نمودار E_۱).

تیمار با LPS و ایجاد التهاب در محیط کشت بر روی سلول‌های بنیادی عصبی نشان داد که میزان NO در گروه تیمار شده با LPS به صورت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است(p<۰/۰۰۰۱****). در گروه تیمار شده توأم LPS با غلظت‌های ۱۰ و ۱۵ میکرومولار پرگونولون افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان داده شد. (به ترتیبp<۰/۰۵*، p<۰/۰۰۱***). گروه تیمار شده غلظت ۲ میکرومولار پرگونولون نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد(p<۰/۰۵*)، از سوی دیگر میزان NO در همه گروه‌های تیمار شده توأم LPS و پرگونولون نسبت به گروه LPS کاهش معنی‌داری را نشان دادند(p<۰/۰۰۰۱****). هم‌چنین در گروه‌های مشابه که فقط با پرگونولون تیمار شدند نیز کاهش معنی‌داری نسبت به گروه LPS مشاهده گردید(p<۰/۰۰۰۱****)(نمودارA_۲). تأثیر LPS بر روی سلول‌های بنیادی عصبی نشان داد که میزان MDA در گروه تیمار شده با LPS به صورت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است(p<۰/۰۱**). میزان MDA در گروه تیمار شده با غلظت ۲ میکرومولار پرگونولون کاهش معنی‌داری نسبت به گروه LPS نشان داد(p<۰/۰۵*)(نمودارB_۲).

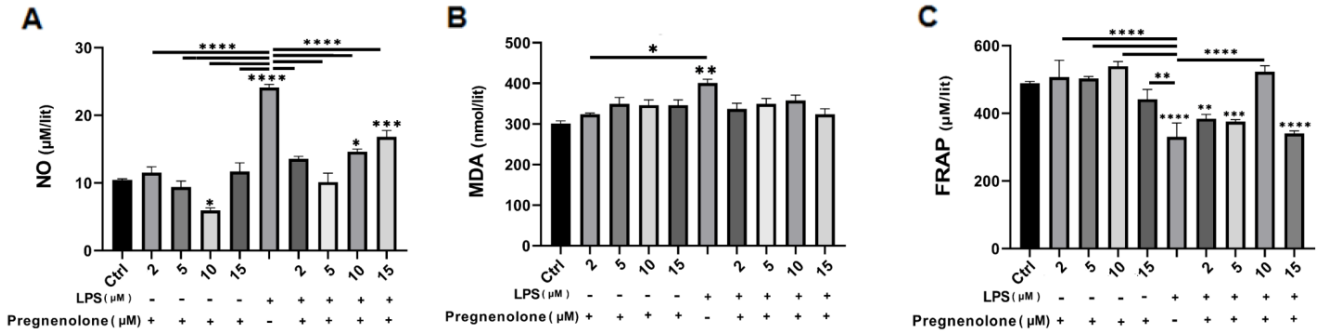
داده‌های به دست آمده نشان داد که میزان FRAP در گروه تیمار شده با LPS کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشته است(p<۰/۰۰۰۱****). هم‌چنین میزان FRAP در گروه‌های توأم تیمار شده با LPS و غلظت‌های ۲، ۵ و ۱۵ میکرومولار پرگونولون نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان دادند.(به ترتیب p<۰/۰۰۰۱****، p<۰/۰۰۱***، p<۰/۰۱**). میزان FRAP در گروههای تیمار شده با دوزهای مختلف پرگونولون(۲، ۵ ، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار) در مقایسه با گروه تیمار شده با LPS افزایش معنی‌داری داشتند. به ترتیب(p<۰/۰۰۰۱****، p<۰/۰۰۱**، p<۰/۰۰۰۱**** و p<۰/۰۰۰۱****) و میزان FRAP در گروه تیمار توأم LPS و غلظت ۱۰ میکرومولار پرگونولون افزایش معنی‌داری نسبت به گروهی که فقط با LPS تیمار شد نشان داد(p<۰/۰۰۰۱****)(نمودارC_۲).

در محیط کشت سلول‌های بنیادی عصبی جنینی، لیپوپلی‌ساکارید(LPS) باعث افزایش معنی‌دار میزان اینترلوکین ـ ۶ و TNF-α نسبت به گروه کنترل

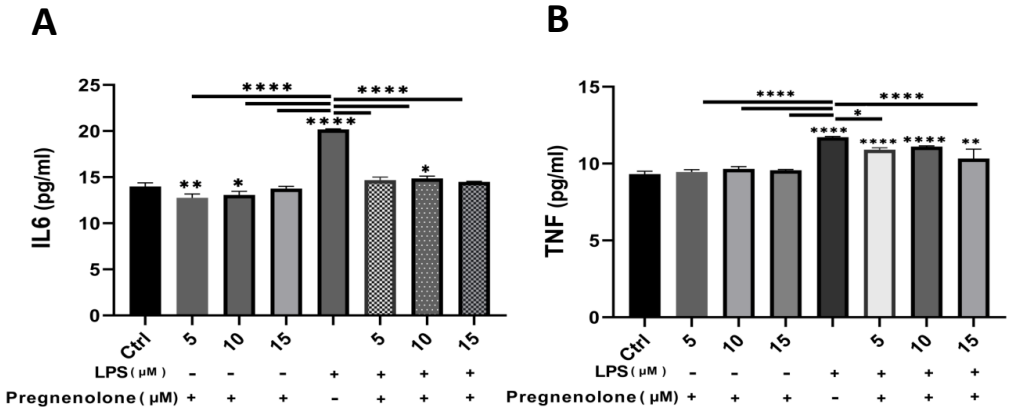
گردیـد(p<۰/۰۰۰۱****)، پرگنونولـون بـا غلظت‌هـای ۵ و ۱۰ میکرومولار سطح IL-6 را به صـورت معنـی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش داد، به ترتیـب(p<۰/۰۱**، p<۰/۰۵*)، تیمـــار تـــوأم LPS و ۱۰ میکرومـــولار پرگنونولون نسبت به گروه کنترل افـزایش معنـی‌داری نشان داد(p<۰/۰۵*). از سوی دیگر تیمار پرگنونولـون بـا غلظت‌هـای ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومـولار بـه تنهـایی و همچنین به صورت توأم با LPS به صورت معنی‌داری میـــزان IL-6 را نســـبت بـــه گـــروه LPS کـــاهش داد(p<۰/۰۰۰۱****). تیمـار بـا غلظت‌هـای ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار پرگنونولون باعث کاهش معنـی‌دار میـزان TNF-α نسـبت بـه گـروه LPS گردیـد(p<۰/۰۰۰۱****)، تیمـار تـوأم LPS و گروه‌هـای بـا غلظـت ۵ و ۱۵ میکرومولار پرگنونولون باعث کاهش معنـی‌دار سـطح TNF-α نسبت به گروه LPS گردید، به ترتیـب(p<۰/۰۵*، p<۰/۰۰۰۱****). از سـوی دیگـر در گـروه هـای تیمـار شـــده تـــوأم بـــا LPS و غلظت‌هـــای ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار پرگنونولون، افزایش معنی‌داری در میزان TNF-α در محـیط کشـت سـلول‌های بنیـادی عصـبی نسبت به گروه کنترل دیده شد، به ترتیب(p<۰/۰۰۱***، p<۰/۰۰۱***، p<۰/۰۱**)(نمودار A,B_۳).



نمودار ۱: میزان زنده‌مانی در گروه‌های مختلف تیمار براساس MTT **و تعداد نوروسفر و سلول‌های منتج از نوروسفره،** A: میزان زنده مانی سلول‌ها در گروه‌های ۵ و ۱۰ میکرومولار پرگنونولون نسبت به کنترل افزایش معنی‌دار داشت(p<۰/۰۱) B: گروه‌های تیمار توأم پرگنونولون و LPS نسبت به گروه LPS افزایش معنی‌دار نشان دادند. به ترتیب(p<۰/۰۰۰۱، p<۰/۰۰۰۱ و p<۰/۰۰۱). C: درگروه‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ تیمار با LPS وپرگنونولون توام نسبت به گروه LPS به تنهایی به صورت معنی‌دار به ترتیب(p<۰/۰۰۱ ، p<۰/۰۰۰۱ و p<۰/۰۱) تعداد نورسفرافزایش نشان داد. E : تعداد سلول‌های منتج از نورسفرها در گروه ۵ و ۱۰ میکرومولار پرگنونولون و LPS به صورت توأم نسبت به گروه LPS افزایش معنی‌دار نشان داد. به ترتیب(p<۰/۰۵ ، p<۰/۰۰۱)



نمودار ۲: میزان تولید MDA , NO و FRAP **به وسیله سلول‌های بنیادی در تیمار با پرگنونولون و** LPS **در گروه‌های مختلف مطالعه،** A**: سطح** NO **در کلیه گروه‌های دریافت کننده پرگنونولون نسبت به گروه** LPS **کاهش معنی‌داری داشت**($p<۰/۰۰۰۱$)**، گروه‌های توأم** LPS **و پرگنونولون نیز نسبت به گروه** LPS **به تنهایی کاهش معنی داری نشان دادند**($p<۰/۰۰۰۱$)**،** B **: سطح** MDA **در گروه تیمار شده با غلظت ۲ میکرومولار پرگنونولون نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار نشان داد**($p<۰/۰۵$)**.**



نمودار ۳: نمودار میزان تولید IL-6 **و** TNF-a **به وسیله سلول‌های بنیادی در گروه‌های مختلف مطالعه،** گروه‌های تیمار شده توأم پرگنونولون و LPS نسبت به گروه LPS کاهش معنی‌دار میزان تولید IL6 و TNF-a را نشان داد($p<۰/۰۰۰۱$)

بحث

پژوهش‌های گذشته نشان داده که پرگنونولون به عنوان پیش ساز استروئیده نقش ضد التهابی ایفا نموده و توانایی تکثیری آن بر سلول‌های بنیادی عصبی نیز گزارش شد، فلذا در این مطالعه سعی شد با ایجاد مدل التهابی اثر ضد التهابی آن بر سلول‌های بنیادی عصبی که تا کنون انجام نشده مورد بررسی قرار گیرد(۱۵)، بنابراین هدف از این مطالعه، تعیین و توانمندی پرگنونولون در تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی موشی و کاستن نشانگرهای التهابی و اکسیدانی پس از القای التهاب با لیپوپلی ساکارید در شرایط آزمایشگاهی بود.

نوروواستروئیدها در فعالیت‌های متعددی در سیستم عصبی دخیل هستند، با توجه به تنوع

استروئیدها و تبدیل آنها به یکدیگر، عملکرد خاص هر استروئید مبهم می‌باشد. پرگنونولون نیز به عنوان نورواستروئیدی است که بر بیوژنز بسیاری از سلول‌های پارانشیم مغز تأثیر می‌گذارد(۲۸ و ۲۷، ۱۵)، پرگنونولون علاوه بر این که به عنوان پیش‌ساز سایر نورواستروئیدها عمل می‌کند، اثرات بیولوژیکی خاص خود را نیز دارد. پژوهش‌های قبلی گزارش داده‌اند که پرگنونولون موجب تکثیر سلولی و نورون‌زایی در داخل بدن می‌شود(۳۱-۲۹ و ۱۴).

پرگنونولون با غلظت ۱۰ میکرومولار با افزایش ۲۹ درصدی بیشترین زنده‌مانی را در گروه‌های تیمار شده نسبت به گروه کنترل نشان داد. از سوی دیگر زنده مانی سلول‌های بنیادی عصبی در مواجه با LPS کاهش معنی‌داری داشته است، این در حالی است که در گروه‌های دریافت کننده توأم LPS با غلظت ۱ میکرومولار و پرگنونولون، زنده مانی سلول‌های بنیادی عصبی نسبت به گروهی که با LPS به تنهایی تیمار شده بودند افزایش نشان داد و بیشترین افزایش به میزان ۱۹ درصد در گروه تیمار شده با دوز ۱۰ میکرومولار مشاهده گردید.

افزایش ۳۱ درصد تعداد نوروسفرها نسبت به گروه کنترل به دنبال تیمار با پرگنونولون نشان از توانایی تکثیری پرگنونولون دارد. LPS باعث کاهش ۴۰ درصدی تعداد نوروسفرها نسبت به گروه کنترل در محیط کشت گردید. گروه‌های دریافت کننده تیمار توام پرگنونولون و LPS افزایشی به میزان ۸۳ درصد در تعداد نوروسفرها نسبت به گروه LPS داشتند که بیشترین افزایش در گروه با غلظت ۱۰ میکرومولار مشاهده گردید. به علاوه داده‌ها نشان داد پرگنونولون توانسته است افزایش ۴۵ درصدی در سلول‌های منتج از نوروسفرها نسبت به گروه کنترل ایجاد کند و در تیمار توأم LPS و پرگنونولون نیز در غلظت ۱۰ میکرومولار تفاوتی به میزان ۶۸ درصد نسبت به گروه LPS مشاهده گردید، در همین راستا، بادران و همکاران گزارش نمودند که پرگنونولون موجب تکثیر سلول‌های شبه استئوبلاست MC3T3-E1 می‌گردد(۳۲). علاوه بر این، نشان داده شده است که پرگنونولون باعث افزایش تکثیر سلول‌های LNCaP سرطان پروستات می‌شود(۳۳). هم‌چنین در بررسی‌های انجام شده نشان داده شد که پروژسترون به عنوان یکی از مشتقات پرگنونولون، تکثیر سلولی را از طریق گیرنده کیناز و گیرنده اختصاصی پروژسترون بهبود می‌بخشد(۲۶). از سوی دیگر پژوهش‌های قبلی در تأیید نتایج حاضر نشان دادند، پرگنونولون قادر به سرکوب سیتوکین‌های پیش التهابی ناشی از LPS و Pam3CSK4 در ماکروفاژها و سلول‌های میکروگلیال است. نقش محافظت کننده عصبی پرگنونولون عمدتاً به خاصیت ضد التهابی آن نسبت داده می‌شود(۱۵).

از سوی دیگر، تغییر در تعادل بین اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها به نفع اکسیدان‌ها "استرس اکسیداتیو" نامیده می‌شود(۳۴). داده‌های این مطالعه نشان داد که پرگنونولون به صورت معنی‌داری توانست میزان NO القاء شده به وسیله LPS را کاهش دهد و بیشترین تأثیر کاهشی در تیمار با دوز ۱۰

میکرومولار پرگنونولون دیده شد(۵۰ درصد). هم‌چنین تیمار با غلظت‌های مختلف پرگنونولون توأم با LPS نیز موجب کاهش معنی‌دار میزان NO نسبت به گروه LPS گردید و غلظت ۵ میکرومولار بیشترین درصد کاهش را نشان داد. همان طور که پیشتر اشاره شد، اکسید نیتریک(NO) از فاکتورهای اصلی ایجاد التهاب می‌باشد(۱۱). NO به عنوان یک مولکول سیگنال‌دهی ناپایدار شناخته می‌شود که می‌تواند به وسیله سه ایزوفرم مختلف NO سنتاز (NOS) تولید شود(۳۵). تولید بیش از حد NO در التهاب عصبی اکنون به عنوان یک جزء پاتولوژیک مهم بیماری‌های سیستم عصبی مرکزی مانند بیماری آلزایمر و بیماری پارکینسون شناخته شده است و تعدیل NO در این بیماری‌ها می‌تواند در بهبود شرایط بیماری مفید باشد. تجمع پلاک‌های بتا آمیلوئید(Ab) و گره‌های نوروفیبریلاری(APP) مشخصه پاتولوژی بیماری آلزایمر است. فعال‌سازی iNOS و افزایشNO باعث نیتروتیروزیناسیون Ab42 می‌شوند و تجمع آن‌ها در پلاک‌های آمیلوئید را تسریع می‌کنند(۳۶). در پژوهش‌های قبلی تأثیر پرگنونولون و مشتقات آن مانند پرگنونولون سولفات و آلوپرگنانولون به عنوان محافظ عصبی[1] در بیماری‌های التهابی عصبی مانند پارکینسون، آلزایمر، مولتیپل اسکلروز[2] مورد بررسی قرار گرفته است و گزارش شده که میزان این نورواستروئیدها در مغز این بیماران دچار اختلال شده است(۳۸ و ۳۷).

در مطالعه‌ای که به وسیله پنتو و همکاران انجام گرفت گزارش شد که استرس اکسیداتیو ناشی از سیس پلاتین باعث تأثیر مخرب بر بافت عصبی می‌شود که ممکن است به دمیلینه شدن یا حتی تخریب میلین منجر شود. علاوه بر این، آسیب آکسونی می‌تواند در طول فرآیند آزادسازی اکسید نیتریک(NO) ایجاد شود(۳۹). این در حالی است که در این مطالعه از التهاب ایجاد شده به وسیله LPS در محیط کشت استفاده شده و ممکن است پرگنونولون با تأثیر بر این گیرنده‌ها و مهار آنها نقش ضدالتهابی خود را اعمال کرده و موجب کاهش استرس اکسیداتیو در محیط کشت گردیده است. غلظت‌های بالاتر پرگنونولون(۱۰ میکرومولار) توانسته افزایش میزان NO را به عنوان یک عامل اکسیدان در محیط حاوی لیپوپلی ساکارید، کاهش دهد. احتمال می‌رود پرگنونولون باعث کاهش تولید iNOS شده و یا توانسته میزان nNOS را در محیط افزایش دهد.[4] پژوهش‌های گذشته نشان دادند که در بافت‌های عصبی، عوامل پیش برنده التهابی باعث افزایش رونویسی iNOS، NADPH(NOX) اکسیداز و سایتوکین ها شده و در نتیجه آزاد شدن NO, ROS و PGE2 از این سلول‌ها، آستروسیت‌ها و میکروگلیاها فعال شده و موجب فعال شدن آبشارهای التهابی و در نهایت تخریب بافت‌های عصبی می‌شود(۷ و۳). در مطالعه‌ای دیگر گزارش شده که درمان پرگنونولون پس از سکته مغزی ROS میتوکندری را به دنبال

1-Neuroprotective
2-Multiple sclerosis

ایسکمی کاهش داد و پیشنهاد دادند که پرگنونولون از طریق کاهش ROS میتوکندری، آسیب‌های عصبی را کاهش می‌دهد(۴۰). بررسی داده‌های این مطالعه نشان از افزایش معنی‌دار میزان MDA در اثر القای LPS دارد که به عنوان یک مارکر اکسیدان در محیط کشت سلول‌های بنیادی عصبی نسبت به گروه کنترل افزایش ۳۳ درصدی داشت و تیمار با پرگنونولون توانست MDA را ۲۰ درصد نسبت به LPS کاهش دهد.

در پژوهش‌های گذشته نشان داده شده است که پرگنونولون خواص ضد التهابی دارد و نقش آن در جلوگیری از التهاب عصبی و افزایش محافظت عصبی به خوبی تأید شده است(۴۲ و ۴۱). در مطالعه‌ای که به وسیله مورسی و همکاران انجام شد، گزارش دادند اثرات محافظتی قلبی پرگنونولون در موش‌های تحت درمان با داکسوروبوکسین(DOX)[1] نشان می‌دهد. محافظت قلبی حاصل از درمان پرگنونولون را می‌توان به اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدآپوپتوز آن نسبت داد(۴۳). به علاوه گزارش شده است که متابولیت‌های پرگنونولون مانند پرگنونولون سولفات و آلوپرگنانولون التهاب عصبی را تعدیل می‌کنند و محافظت عصبی را ارتقا می‌دهند(۱۵)، پرگنونولون به صورت توأم با LPS ۳۰ درصد و به تنهایی به میزان ۳۷ درصد باعث کاهش معنی‌دار میزان IL6 نسبت به گروه LPS گردید و از سوی دیگر پرگنونولون با غلظت ۵ میکرومولار نیز تأثیر مشابه‌ای بر میزان TNFα نسبت به گروه LPS نشان داد و به صورت توأم با LPS نیز در غلظت ۱۵ میکرومولار بیشترین درصد کاهش را به میزان ۱۲ درصد نشان داد. در همین راستا، مورگان و همکاران با بررسی اثر پرگنونولون بر ماکروفاژها و میکروگلیاها گزارش کردند که پرگنونولون از طریق غیر فعال کردن مسیر سیگنالینگ گیرنده TLR2 و TLR4 باعث کاهش التهاب در سیستم ایمنی شده است(۱۵). التهاب به عنوان یکی از عوامل ایجاد کننده بیماری آلزایمر شناخته می‌شود(۴۴)، در این بیماری میکروگلیاها از طریق گیرنده سطح سلولی TLR و اتصال به بتا آمیلوئید باعث تقویت روند التهاب و هم‌چنین افزایش IL6,IL1β و TNFα می‌شوند(۴۵).

هرچند که مکانیسم عملکردی ضد التهابی پرگنونولون تا کنون مشخص نیست(۴۶)، غیر فعال نمودن گیرنده‌های TLR2 و TLR4 به وسیله این نورواستروئید گزارش شده است(۲۷). این در حالی است که LPS از طریق فعال نمودن این گیرنده‌ها نقش التهابی خود را ایفا می‌کند(۴۷ و۱۵). علی‌رغم این که تا کنون گیرنده اختصاصی جهت پرگنونولون شناسایی نشده است(۴۸ و۲۹)، اما پروژسترون به عنوان یکی از مشتقات پرگنونولون از طریق گیرنده درون سلولی خود عمل می‌کند و اثرات ضدالتهابی خود را از طریق این گیرنده اعمال می‌کند(۴۹ و۱۷).[5]

در پژوهش‌های گذشته گزارش شده که پرگنونولون و تعدادی از مشتقات آن از طریق اتصال به گیرنده‌های GABA A، SIGMA 1 و NMDA و ایجاد تعادل در عملکرد آنها می‌توانند نقش ضدالتهابی،

1-Doxorubicin

محافظت عصبی و حتی افزایش در حافظه و یادگیری را اعمال کنند، هر چند که مکانسیم دقیق آن هنوز نامشخص می باشد(۵۰).

هم‌چنین گزارش شده فعال‌سازی CLIP170 میکروتوبول دخیل در تنظیم دینامیک میکروتوبول، مهاجرت سلولی، میتوز و انتقال درون سلولی از طریق پرگنونولون موجب سرکوب TLR4 می‌شود(۵۱) و مورگان و همکاران اعلام کردند که پرگنونولون ممکن است از طریق حذف پروتئین‌های کلیدی در مسیر سیگنالینگ TLR از طریق CLIP170 و کاهش ترشح عوامل التهابی IL6 و TNF آلفا نقش محافظتی خود را اعمال کند(۱۵). آنالیز داده‌های مطالعه حاضر نشان داد، دوزهای بالای پرگنونولون توانست مقدار این دو عامل التهابی را که به وسیله LPS در محیط کشت افزایش یافته به میزان معنی‌داری کاهش دهد، که با توجه به مکانیسم عملکردی گزارش شده، شاید پرگنونولون از طریق مسیرسیگنالینگ TLR و تأثیر بر آن چنین نقشی را اعمال می کند.

به نظر می‌رسد که نورواستروئید پرگنونولون می‌تواند با تعدیل فعالیت گیرنده‌هایTLR در شرایط التهاب سیستم عصبی، به کاهش استرس اکسیداتیو و فعالیت فاکتورهای پیش‌التهابی نظیر سیتوکین‌ها و کموکین‌ها کمک کند، هرچند برای مشخص شدن نحوه عملکرد پرگنونولون به پژوهش‌ها و بررسی‌های بیشتری نیازدارد.

کمبود داروها، مواد مصرفی و دسترسی سخت به مواد اصلی از جمله محدودیت‌های این مطالعه بود.

نتیجه‌گیری

داده‌های این مطالعه نشان داد پرگنونولون به عنوان پیش‌ساز استروئیدها می‌تواند تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی را در شرایط ایجاد التهاب افزایش داده و هم‌چنین با کاهش اکسیدان‌ها نظیر؛ NO، MDA و افزایش آنتی اکسیدانهای مانند FRAP فعالیت التهابی را تعدیل و موجب کاهش فاکتورهای التهابی TNF-α و IL-6 در محیط کشت گردد، به نظر می‌رسد که نورواستروئیدپرگنونولون بدون دخالت سایر متابولیت‌هایش در بهبود شرایط التهابی در سیستم عصبی و جایگزین شدن سلول‌های عصبی در شرایط آسیب سلولی ناشی از التهاب می‌تواند تأثیرگذار باشد، هرچند که مشخص شدن مکانیسم اثر آن نیاز به انجام پژوهش‌های بیشتری دارد.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان نامه دکترای بیولوژی رشته سلولی مولکولی با کد اخلاق IR.yums.REC.1399.120 از دانشگاه علوم پزشکی یاسوج می‌باشد، که با حمایت مالی این دانشگاه انجام شد.

REFERENCES

1.Lunn JS, Sakowski SA, Hur J, Feldman EL. Stem cell technology for neurodegenerative diseases. Annals of Neurology 2011; 70: 353-61.
2.Tian C, Zheng JC. Reprogrammed astrocytes as a potential therapy for neurodegenerative disorders. Science (New York, NY) 2011; 334: 53.
3.Saavedra JM. Angiotensin II AT1 receptor blockers as treatments for inflammatory brain disorders.Clinical Science 2012; 123: 567-90.
4.Hosseini M, Zakeri S, Khoshdast S, Yousefian FT, Rastegar M, Vafaee F, et al. The effects of Nigella sativa hydro-alcoholic extract and thymoquinone on lipopolysaccharide-induced depression like behavior in rats. Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences 2012; 4: 219.
5.Pourganji M, Hosseini M, Soukhtanloo M, Zabihi H, Hadjzadeh MA. Protective role of endogenous ovarian hormones against learning and memory impairments and brain tissues oxidative damage induced by lipopolysaccharide. Iranian Red Crescent Medical Journal 2014; 16(3):25-8.
6.Joshi R, Garabadu D, Teja GR, Krishnamurthy S. Silibinin ameliorates LPS-induced memory deficits in experimental animals, Neurobiology of Learning and Memory 2014; 116: 117-31.
7.González H, Elgueta D, Montoya A, Pacheco R. Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. Journal of Neuroimmunology 2014; 274:1-13.
8.Nakagawa Y, Chiba K. Role of microglial m1/m2 polarization in relapse and remission of psychiatric disorders and diseases. Pharmaceuticals 2014; 7: 1028-48.
9.Strosznajder RP, Gadamski R, Czapski GA, Jesko H, Strosznajder JB. Poly (ADP-ribose (polymerase during reperfusion after transient forebrain ischemia. Journal of Molecular Neuroscience 2003; 20: 61-71.
10.Emerit J, Edeas M, Bricaire F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. Biomedicine & Pharmacotherapy 2004; 58: 39-46.
11.Stoffel-Wagner B. Neurosteroid metabolism in the human brain. European Journal of Endocrinology 2001; 145: 669-80.
12.Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar TR, Kim YM. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. Biochemical and Biophysical Research Communications 2001; 282: 1075-79.
13.Gow AJ, Ischiropoulos H. Nitric oxide chemistry and cellular signaling. Journal of Cellular Physiology 2001; 187: 277-82.
14.Negintaji K, Ghanbari A, Jafarinia M, Zibara K. Pregnenolone enhances the proliferation of mouse neural stem cells and promotes oligodendrogenesis, together with Sox10, and neurogenesis, along with Notch1 and Pax6. Neurochemistry International 2023; 163: 105489.
15.Murugan S, Jakka P, Namani S, Mujumdar V, Radhakrishnan G. The neurosteroid pregnenolone promotes degradation of key proteins in the innate immune signaling to suppress inflammation. Journal of Biological Chemistry 2019; 294: 4596-4607.
16.Balan I, Beattie MC, O'Buckley TK, Aurelian L, Morrow AL. Endogenous neurosteroid (3α, 5α) 3-hydroxypregnan-20-one inhibits toll-like-4 receptor activation and pro-inflammatory signaling in macrophages and brain. Journal of Scientific Reports 2019; 9: 1-14.
17.Lei B, Mace B, Dawson H.N, Warner DS, Laskowitz DT, James ML. Anti-inflammatory effects of progesterone in lipopolysaccharide-stimulated BV-2 microglia. Journal of PloS One 2014; 9: 103969.
18.Park C, Lee H, Hong S, Molagoda IMN, Jeong JW, Jin CY, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammatory and oxidative responses by trans-cinnamaldehyde in C2C12 myoblasts. International Journal of Medical Sciences 2021; 18: 2480.
.19.Ghasemi A, Hedayati M, Biabani H. Protein precipitation methods evaluated for determination of serum nitric oxide end products by the Griess assay. Journal of Medical Sciences Research 2007; 2: 29-32.
20.Bryan NS, Grisham MB. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. Free Radical Biology and Medicine 2007; 43: 645-57.
21.Zaki SM, Mohamed E, Motawie AG, Fattah SA. N-acetylcysteine versus progesterone on the cisplatin-induced peripheral neurotoxicity. Folia Morphologica 2018; 77: 234-45.

22.Fauziah PN, Maskoen AM, Yuliati T, Widiarsih E. Optimized steps in determination of malondialdehyde (MDA) standards on diagnostic of lipid peroxidation. Padjadjaran Journal of Dentistry 2018; 30: 136-9.
23.Al-Fawaeir S, Akgul EO, Cayci T, Demirin H, Kurt YG, Aydin I, et al. Comparison of two methods for malondialdehyde measurement. Journal of Clinical and Analytical Medicine 2011; 2: 11-4.
24.Benzie F, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay, Analytical Biochemistry1996; 239: 70-6.
25.Sadeghi A, Bastin AR, Ghahremani H, Doustimotlagh AH. The effects of rosmarinic acid on oxidative stress parameters and inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-induced peripheral blood mononuclear cells. Molecular Biology Reports 2020; 47: 3557- 66.
26.Yang JW, Mao B, Tao RJ, Fan LC, Lu HW, Ge BX, Xu JF. Corticosteroids alleviate lipopolysaccharide-induced inflammation and lung injury via inhibiting NLRP3-inflammasome activation, Journal of Cellular and Molecular Medicine 2020; 24: 12716-725.
27.Veiga S, Garcia-Segura LM, Azcoitia I. Neuroprotection by the steroids pregnenolone and dehydroepiandrosterone is mediated by the enzyme aromatase. Journal of Neurobiology 2003; 56: 398-406.
28.Borowicz K, Czuczwar S, Piskorska B, Banach M. Neuroprotective actions of neurosteroids. Frontiers in Endocrinology 2011; 2: 38- 50.
29.Fontaine-Lenoir V, Chambraud B, Fellous A, David S, Duchossoy Y, Baulieu EE, Robel P, Microtubule-associated protein 2 (MAP2) is a neurosteroid receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences 2006; 103: 4711- 6.
]30.Mayo W, Lemaire V, Malaterre J, Rodriguez J, Cayre M, Stewart M, et al. Pregnenolone sulfate enhances neurogenesis and PSA-NCAM in young and aged hippocampus, Neurobiology of Aging 2005; 26: 103-14.
31.Xu B, Yang R, Chang F, Chen L, Xie G, Sokabe M, Chen L. Neurosteroid PREGS protects neurite growth and survival of newborn neurons in the hippocampal dentate gyrus of APPswe/PS1dE9 mice. Current Alzheimer Research 2012; 9: 361-72.
32.Badran SA, Fayyaz S, Muhammad BT, Choudhary MI. Effect of Steroidal Hormone Pregnenolone on Proliferation and Differentiation of MC3T3-E1 osteoblast like cells. Letters in Drug Design & Discovery 2020; 17: 1139-45.
33.Grigoryev DN, Long BJ, Njar VC, Brodie AH. Pregnenolone stimulates LNCaP prostate cancer cell growth via the mutated androgen receptor. The Journal of steroid biochemistry and Molecular Biology 2000; 10: 56-75.
34.Birben E, Sahiner U.M, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. World Allergy Organization Journal 2012; 5: 9-19.
35.Mirzaei F, Khazaei M. Role of nitric oxide in biological systems: a systematic review. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences 2017; 27: 192-222.
36.Kummer MP, Hermes M, Delekarte A, Hammerschmidt T, Kumar S, Terwel D, et al. Nitration of tyrosine 10 critically enhances amyloid β aggregation and plaque formation. Neuron 2011; 71: 833-44.
[۳۷]Naylor J.C, Kilts J.D, Hulette C.M, Steffens D.C, Blazer D.G, Ervin, Strauss J.L, Allen T.B, Massing M.W, Payne V.M, Allopregnanolone levels are reduced in temporal cortex in patients with Alzheimer's disease compared to cognitively intact control subjects, Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids 2010; 1801 :951-59.
38.Vallée M. Neurosteroids and potential therapeutics: focus on pregnenolone, The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 2016; 160: 78-87.
]39.de Pinto MC, Tommasi F, De Gara L. Changes in the antioxidant systems as part of the signaling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in tobacco Bright-Yellow 2 cells. Plant Physiology 2002; 130: 698-708.
40.Andrabi SS, Kaushik P, Mumtaz SM, Alam MM, Tabassum H, Parvez S. Pregnenolone attenuates the ischemia-induced neurological deficit in the transient middle cerebral artery occlusion model of rats., ACS Omega 2022; 7: 19122-130.
41.Baptista P, Andrade JP. Adult hippocampal neurogenesis: regulation and possible functional and clinical correlates. Frontiers in Neuroanatomy 2018; 12: 44.
42.Daugherty DJ, Selvaraj V, Chechneva OV, Liu XB, Pleasure DE, Deng W. A TSPO ligand is protective in a mouse model of multiple sclerosis. EMBO Molecular Medicine 2013; 5: 891-903.

43.Morsy MA, Abdel-Gaber SA, Mokhemer SA, Kandeel M, Sedik WF, Nair AB, et al. Pregnenolone Inhibits doxorubicin-induced cardiac oxidative stress, inflammation, and apoptosis—role of matrix metalloproteinase 2 and nadph oxidase 1. Pharmaceuticals 2023; 16: 665 .
44.Higuchi M, Ji B, Maeda J, Sahara N, Suhara T. In vivo imaging of neuroinflammation in Alzheimer's disease. Clinical and Experimental Neuroimmunology 2016; 7: 139-44.
45.Reed-Geaghan EG, Savage JC, Hise AG, Landreth GE. CD14 and toll-like receptors 2 and 4 are required for fibrillar Aβ-stimulated microglial activation. Journal of Neuroscience 2009; 29: 11982-92.
46.Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids—new mechanisms for old drugs. New England Journal of Medicine 2005; 353: 1711-23.
47.Mansell A, Smith R, Doyle SL, Gray P, Fenner JE, Crack PJ, et al. Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation, Nature Immunology 2006; 7: 148-55.
48.Weng JH, Liang MR, Chen CH, Tong SK, Huang TC, Lee SP, et al. Pregnenolone activates CLIP-170 to promote microtubule growth and cell migration. Nature Chemical Biology 2013; 9: 636-42.
49.Brinton RD, Thompson RF, Foy MR, Baudry M, Wang J, Finch CE, et al. Progesterone receptors: form and function in brain. Frontiers in Neuroendocrinology 2008; 29: 313-39.
50.Ferri C, Fioranelli M. The role of pregnenolone in inflammatory degenerative brain disease. Interdiscip J Microinflammation 2014, 1: 2.
51.Larti F, Kahrizi K, Musante L, Hu H, Papari E, Fattahi Z, et al. Erratum: A defect in the CLIP1 gene (CLIP-170) can cause autosomal recessive intellectual disability. European Journal of Human Genetics 2015; 23 :416-16.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

The Ability of Pregnenolone in Proliferation of Mouse Neural Stem Cells and Reduction of Inflammatory and Oxidant Markers after Induction of Inflammation with Lipopolysaccharide in Vitro

Negintaji K[1,2], Foroozanfar M[1], Jafarinia M[1], Ghanbari A[2*]

[1]Department of Biology, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran, [2] Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

Received: 03 Mar 2023 Accepted: 03 Sep 2023

Abstract

Background & aim: Pregnenolone acts as a precursor to other steroid hormones and exerts its effect as an anti-inflammatory molecule to maintain immune homeostasis in various inflammatory conditions. In these diseases, a decrease in the level ofP has been observed, which emphasizes its role in neuroprotection and nerve regeneration and its anti-inflammatory role. Accordingly, the purpose of the present study was to determine the ability of Pregnenolone in the proliferation of mouse neural stem cells and reduce inflammatory and oxidant markers. of inducing inflammation with lipopolysaccharide in laboratory conditions.

Methods: In the present experimental study conducted at Yasuj University of Medical Sciences, neural stem cells (NSCs) were isolated from the embryonic cortex of E14 mice with standard protocol and incubated for 5 days. Subsequently, neurosphere formation and propagation for second passage the survival of the cells was done after pregnenolone combined treatment with lipopolysaccharide (LPS) inflammatory model. The number of neurospheres and cells derived from neurospheres were counted after 5 days of incubation in the inflammatory model. The supernatant of the cells was removed and the levels of oxidant and antioxidant markers MDA, NO FRAP, and inflammatory markers IL6 and TNFα were measured by ELISA method. Data were analyzed by one-way variance statistical method and Tukey's post hoc test.

Results: The results indicated that pregnenolone with its effect on inflammatory factors could increase the proliferation of neural stem cells in conditions of inflammation and the greatest effect was observed in the group treated with 10 µM dose of pregnenolone with an increase of 68% compared to the LPS group. On the other hand, it caused a decrease in the inflammatory factors TNF-α (12%) and IL-6 (30%) and oxidative stress factors including NO (38%) and MDA (20%) compared to the LPS group, as well as a significant increase FRAP was an antioxidant marker ($P<0.0001$) in the model of inflammation caused by LPS in the culture medium of mouse neural stem cells.

Conclusion: The results of the present study indicated that Pregnenolone, by affecting inflammatory factors, increased the proliferation of neural stem cells in the conditions of inflammation, and it was as well able to reduce the amount of inflammatory and oxidant markers in the inflammatory model of the culture medium.

Keywords*:* Neural stem cell, Neurosteroid, pregnenolone, Inflammation model, lipopolysaccharide, Oxidative stress

***Corresponding author: Ghanbari A,** Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran.
Email: amirghanbari52@yahoo.com

Please cite this article as follows: Negintaji K, Foroozanfar M, Jafarinia M, Ghanbari A. The Ability of Pregnenolone in Proliferation of Mouse Neural Stem Cells and Reduction of Inflammatory and Oxidant Markers after Induction of Inflammation with Lipopolysaccharide in Vitro. Armaghane-danesh 2023; 28(5): 620-637.