

تأثیر هشت هفته مصرف ژل رویال بر برخی از شاخص‌های آپوپتوزی در موش‌های آلزایمری شده با تری‌متیل‌تین

مریم عظیم پور، محمد فتحی*، امید دزفولیان

گروه تربیت بدنی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۹/۰۴/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۱۹

چکیده:

زمینه و هدف: با توجه به این که ژل رویال حاوی ترکیباتی است که اثرات مطلوبی بر سیستم اعصاب مرکزی و عملکردهای عصبی دارند، لذا هدف از این پژوهش تعیین و بررسی تأثیر مصرف ژل رویال بر شاخص‌های آپوپتوزی در مدل تری‌متیل‌تینی بیماری آلزایمر بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی که در پاییز سال ۱۳۹۷ انجام شد، ۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد اسپراگ داوولی وارد مطالعه شدند که تعداد ۲۴ سر از آن‌ها به‌وسیله تری‌متیل‌تین القای آلزایمر شدند. در ادامه موش‌های صحرایی به‌طور تصادفی به ۴ گروه: سالم هفته آخر، کنترل قربانی هفته آخر، شم و ژل رویال تقسیم شدند. بررسی میزان بیان ژن‌های P53, BAX, BCL-2 با تکنیک Real Time PCR انجام شد. داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: یافته‌های تحقیق حاضر نشان می‌دهد که متغیر وابسته P53 در گروه آلزایمر هفته آخر بیشتر از گروه‌های سالم هفته آخر و ژل بود و در گروه شم بیشتر از گروه‌های سالم هفته آخر و ژل شد، شاخص BAX در گروه ژل کمتر از شم و آلزایمر هفته آخر شد و در گروه سالم هفته آخر کمتر از شم و آلزایمر هفته آخر شد. BCL-2 در گروه ژل بیشتر از شم و سالم هفته آخر و آلزایمر هفته آخر شد و در گروه سالم هفته آخر بیشتر از شم و آلزایمر هفته آخر گردید.

نتیجه‌گیری: تجویز تری‌متیل‌تین احتمالاً در پدیده مرگ نورونی انتخابی و مسیرهای آپوپتوز میتوکندریایی در اختلالات نورودژنراتیو مشارکت دارد و مصرف مکمل ژل رویال ممکن است بتواند به عنوان یک راهکار مهار کننده در روند مسیر داخلی آپوپتوز و تقویت عملکرد عصبی و بازسازی نورون‌ها در مدل حاضر به کار برده شود.

واژه‌های کلیدی: ژل رویال، شاخص‌های آپوپتوزی، بیماری آلزایمر

*نویسنده مسئول: محمد فتحی، خرم‌آباد، دانشگاه لرستان، دانشکده علوم انسانی، گروه تربیت بدنی

Email: fathi.m@lu.ac.ir

مقدمه

با توجه به رشد و توسعه جوامع و تغییر سبک زندگی، نیاز روز افزون به تولید محصولات کشاورزی، صنعتی و آفت‌کش‌ها افزایش یافته است (۱). همچنین دسترسی زیاد افراد به سموم و داروها و یا باقیمانده‌های آن‌ها در محیط زیست، باعث شده است که مواجهه انسان با این‌گونه سموم و ترکیبات ارگانوتینی^(۱) از طریق غذا، آب و هوا تقریباً غیر قابل اجتناب گردیده، به‌طوری که می‌تواند به صورت غیرعمدی و تصادفی سبب مسمومیت افراد شود (۲). یکی از سموم ارگانوتینه متیله شده تری‌متیل تین کلراید (TMT)^(۲) است، TMT در آفت‌کش‌ها، بسته‌بندی‌های مختلف مواد غذایی و محصولات سیلیکونی مانند ظروف آشپزخانه، در پلی‌ونیل کلراید PVC^(۳)، به‌عنوان حلال رنگ، جلا دهنده چوب، در صنعت کشتی‌سازی، لوله‌کشی‌های آب آشامیدنی و سیستم آب خانگی و بسیاری دیگر از امور صنعتی مربوط به انسان کاربردهای زیادی دارد (۳). TMT به‌عنوان یک تعدیل‌کننده تولید پلاستیک سبب ۶۷ نوع مسمومیت در سراسر جهان شده و ۱۸۴۹ نفر را به‌طور حاد بین سال‌های ۱۹۸۷ تا ۲۰۰۸ متأثر کرده است (۴). در افرادی که به‌واسطه شغل خود در صنایع کشاورزی و در کارخانه‌های تولید قلع و پلاستیک، در معرض TMT قرار دارند، سندرمی مشاهده می‌شود که با پرخاشگری، اختلال شناختی، تشنج عضلانی، سرگیجه و کاهش حافظه همراه است (۵). پژوهش‌هایی که در مورد تحلیل عصبی ناشی از TMT انجام شده، نشان داده‌اند که این سم دارای پتانسیل مسمومیت عصبی است که احتمالاً باعث مرگ نورونی و القا

آپوپتوز در سیستم لیمبیک انسان و حیوان، به‌خصوص در ناحیه هیپوکامپ مغز و بروز حالت شبه آلزایمر می‌شود. البته مکانیسم‌های آپوپتوز ناشی از TMT هنوز به‌درستی مشخص نیست (۶). شواهدی نیز وجود دارد که این ماده از طریق آسیب اکسیداتیو مغزی سبب ایجاد اختلال حافظه می‌گردد (۵). در بسیاری از پژوهش‌های صورت گرفته از جمله سون لی و همکاران مشخص شد که تزریق سم TMT به نمونه موش موجب اختلالات شناختی و حافظه و رفتاری از جمله افسردگی، اضطراب و پرخاشگری و بیش‌فعالی می‌شود که ظاهراً به دلیل آسیب هیپوکامپ است (۸ و ۷). در تحقیقی که به وسیله ایمان و همکاران بر روی تأثیرات نوروتوکسیتی TMT در سیستم عصبی مرکزی انجام شده، نشان داده است که این سم باعث تخریب عصبی در سیستم عصبی مرکزی می‌شود و همچنین بر روی عوامل شناختی و رفتاری رت‌ها نیز تأثیرگذار است (۹). در تحقیقی که به وسیله سمیرا ملک‌زاده و همکاران بر روی بررسی انواع داروهایی که باعث القای آلزایمر در رت می‌شود صورت گرفته، عنوان شده است که TMT قادر به ایجاد اختلالات حافظه و خلقی نظیر پرخاشگری و استرس و کاهش سطح خلق و خو می‌شود و با ایجاد آپوپتوز و مرگ نورونی می‌تواند القاکننده حالت‌های آلزایمر در انسان و حیوان گردد (۱۰).

محققان در حال کشف راه‌های جدید درمان بیماری‌های تخریب عصبی هستند، داروهای استفاده

1-Organotin Compounds
2-Trimethyltin Chloride
3-Polyvinyl Chloride

شده به وسیله این قبیل بیماران اختلالات نورودژنراتیو اصل بیماری را درمان نمی‌کنند، بلکه تنها علائم شناختی را بهبود می‌بخشند و از طرف دیگر این داروها دارای عوارض جانبی متعددی نیز هستند (۱۱)، بنابراین محققین تلاش می‌کنند با روشن کردن مکانیسم‌های این بیماری‌ها روش‌های درمانی کارآمدتری برای درمان و پیشگیری از بیماری آلزایمر پیدا کنند (۱). استفاده از رژیم غذایی مناسب و تغییر در عادات و محیط زندگی، روش‌های غیر دارویی جلوگیری یا درمان اختلالات ناشی از آلزایمر و دیگر بیماری‌های تخریب عصبی هستند (۱۲). محققین استفاده طولانی مدت از آنتی‌اکسیدان‌ها را عامل به تأخیر انداختن بیماری می‌دانند (۱۳). یکی از ترکیبات طبیعی که خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن به اثبات رسیده است، ژل رویال (RJ) می‌باشد. RJ به وسیله غدد زیر حلقی^(۲) و تحت فکی^(۳) زنبورهای کارگر جوان از جنس آپیس ملیفرا^(۴) ترشح می‌شود (۱۴). RJ دارای ارزش غذایی فراوان است و از لحاظ شیمیایی حاوی آب (۵۰ تا ۶۰ درصد)، پروتئین‌ها (۱۸ درصد)، کربوهیدرات (۱۵ درصد)، چربی (۳ تا ۶ درصد)، نمک‌های معدنی (۱۵ درصد) و بسیاری از ویتامین‌ها و مواد فعال زیستی (۱۵-۱۸ و ۱۳) است. همچنین نشان داده شده که RJ فعالیت‌های فارماکولوژیکی متفاوتی از قبیل خواص ضد توموری، ضد میکروبی، اتساع دهنده عروق، کاهش دهنده فشار خون، تحریک کننده رشد و نروژنز، تقویت سیستم ایمنی بدن، ضد آلرژیک و ضد پیری، ضد هایپرکلسترولمی و فعالیت‌های ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی و مهار رادیکال‌های آزاد دارد که این خصوصیات می‌تواند باعث افزایش طول عمر و به

تعویق افتادن سالمندی شود (۱۸). RJ حاوی ترکیبات بیواکتیو می‌باشد که بر عملکردهای عصبی مغز اثرات مفید دارد و ممکن است در پیشگیری و درمان برخی از اختلالات عصبی نقش استراتژیک داشته باشد (۱۳). با توجه به محدودیت‌های فراوان موجود در توانایی ترمیم سیستم عصبی مرکزی آسیب‌دیده، کاهش هرچه بیشتر آسیب‌های وارده از طریق مهار مرگ سلول‌های عصبی تحت تأثیر محرک‌های مرگ سلولی نظیر؛ توکسین‌ها، تشعشعات، هیپوکسی، استرس‌ها و فقدان عوامل تروفیکی اکسیداتیو، ایسکمی و آسیب حائز اهمیت است (۱۹). مطالعه و درک مسیرهای مرگ سلول عصبی تأثیر زیادی بر شناخت و پیشگیری و درمان بیماری‌ها دارند که از این اختلالات رنج می‌برند (۱۲). متأسفانه، کلیه سازوکارهای آسیب‌های عصبی که در بیماری‌های نورودژنراتیو، آلزایمر و سایر اختلالات عصبی رخ می‌دهد به طور کامل مشخص نیستند. هنوز روشی به‌منظور درمان و یا اصلاح بیماری‌های عصبی با حداقل عوارض جانبی وجود ندارد و یا بسیار کم است، بنابراین برای بهبود روش‌های درمانی این‌گونه از بیماری‌ها به دست آوردن درک دقیقی از مکانیسم‌های مرگ سلول‌های عصبی می‌تواند مؤثر باشد (۱). آپوپتوز^(۵) (مرگ سلولی برنامه ریزی شده) نورونی یکی از علل شناخته شده نوروپاتی محیطی و مرکزی است (۲۰). با توجه به این که آپوپتوز تا ۵۰ برابر در بیماری آلزایمر افزایش

1-Royal Jelly
2-Hypopharynx
3-Mandibular
4-Apis Meliphera
5-Apoptosis

حافظه و احساسات دارد در مسمومیت‌های مزمن با سموم تخریب‌کننده عصبی بیشترین تأثیر تخریبی قرار می‌گیرد و فعالیت عوامل آپوپتوزی در این ناحیه موجب اختلال در چرخه عصبی و تسریع در مرگ سلول‌های عصبی شده است و این امر بیشترین ارتباط با پاتولوژی بیمار آلزایمر را دارا بوده است (۲۵)، لذا استراتژی‌های درمانی که موجب محدودیت آسیب‌های میتوکندری و در نتیجه کاهش اختلالات عملکرد میتوکندری و یا حذف میتوکندری‌های آسیب دیده شوند، افقی تازه در درمان بیماری‌های نورودژنراتیو فراهم خواهند آورد (۲۷ و ۲۶، ۲۰). با وجود پژوهش‌هایی که تاکنون در خصوص مهار آپوپتوز به وسیله ترکیبات مختلف صورت گرفته، پیشرفت‌های حاصله چندان مؤثر و شایان ذکر نبوده است، که نیاز به بررسی‌های بیشتر در این خصوص ضروری به نظر می‌رسد (۲۰ و ۱۹)، لذا هدف از این پژوهش تعیین و بررسی تأثیر مصرف ژل رویال بر شاخص‌های آپوپتوزی در مدل تری‌متیل‌تینی بیماری آلزایمر بود.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۹۷ انجام شد، ۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد اسپراگ داوولی از بین موش‌های نر هشت هفته‌ای مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت انتخاب شده و به آزمایشگاه

می‌یابد، بر این اساس یکی از استراتژی‌های درمانی این بیماری در آینده، کنترل هرچه بیشتر آپوپتوز سلول‌های عصبی در مراحل اولیه است (۲۱). از میان مناطق مختلف مغزی، هیپوکامپ یکی از حساس‌ترین نواحی است که در مقابل عوامل آسیب‌رسان مانند؛ سموم شیمیایی، استرس اکسیداتیو و بیماری‌های نورودژنراتیو مانند آلزایمر بسیار آسیب‌پذیر بوده و طی آن دستخوش تغییرات نوروفیزیولوژیکی، ساختاری و مولکولی خواهد شد (۲۲). اگر پیام‌های مرگ داخلی باشند، مسیر آپوپتوز درونی بوده و اولین اندامک فعال شده میتوکندری خواهد بود و اعضای خانواده بی سی ال تو (BCL-2)^(۱) شامل پروتئین‌های بکس (BAX)^(۲) و BCL-2 به‌عنوان پروتئین‌های اصلی، در شکل‌گیری کانال‌های آپوپتوزی، تنظیم نفوذپذیری میتوکندری و پیام‌های آپوپتوزی میتوکندریایی درگیر می‌شوند (۲۳). همچنین P53 که پروتئین سرکوب‌کننده تومور^(۳) و یک حسگر عمومی برای استرس سلول و معتبرترین مارکر سرمی آپوپتوزیس سلولی است در تنظیم بیان ژن BAX و BCL-2 وارد عمل می‌شود (۲۴). P53 در پی آسیب دیدن DNA چرخه سلول را متوقف می‌کند و در صورتی که آسیب DNA ترمیم نشود در پاسخ به استرس، خود به‌عنوان یک فاکتور پیش آپوپتوزی خواهد بود و در آن صورت باعث تغییر و آغاز نسخه برداری فاکتورهای کمک‌کننده آپوپتوز خواهد شد (۱۱). از طرف دیگر فرایند آپوپتوز در سلول‌های عصبی پستانداران عمدتاً از طریق مسیر وابسته به میتوکندری (مسیر داخلی)^(۴) صورت می‌گیرد. هیپوکامپ که نقش اصلی در سازماندهی خاطرات و

1-B-cell Lymphoma 2
2-Bcl2-Associated X Protein
3-Tumor Suppressor Protein
4-Intrinsic Apoptotic Pathway

TMT + مصرف RJ) تقسیم شدند. کلیه مراحل کار با حیوانات، طبق قوانین حمایت از حیوانات آزمایشگاهی و با نظارت کمیته اخلاقی دانشگاه انجام شد.

جهت تهیه عصاره ژل، ۱۰ گرم RJ را در ۱۰۰۰ سی سی آب مقطر دیونیزه ریخته و مخلوط را به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه کرده، سپس محلول از صافی عبور داده خواهد شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و در هنگام تزریق با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه به مدت هشت هفته به صورت درون صفاقی تزریق شد (۳۰).

پس از پایان یافتن آزمون‌های رفتاری حیوانات با کتامین ۱۰ درصد (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلین ۲ درصد (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شده و پس از خون‌گیری از قلب، بافت هیپوکامپ از مغز جدا شده و بلافاصله در میکروتیوب‌هایی با حجم ۱/۵ میلی‌لیتر با برچسب متناسب با بافت، رت و ساعت تشریح و گروه مورد آزمایش، به سرعت و با ازت مایع منجمد و برای تجزیه و تحلیل بعدی به یخچال ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. در ابتدا بافت‌ها با روش‌های مکانیکی خرد و هموژنیز شدند. برای استخراج RNA ابتدا ۳۵۰ میکرولیتر از بافر لیزکننده آر بی بافر به نمونه (رسوب سلولی حاصل از سانتریفیوژ) اضافه شد (از قبل به ازای هر ۱ میلی‌لیتر ۱۰ میکرولیتر مرکاپتواتانول به بافر اضافه شده است) و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد، در مرحله بعد فیلتر ستونی درون لوله جمع‌آوری قرار گرفت و با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ گردید. بعد از سانتریفیوژ محلول روشن به یک تیوپ میکروسانتریفیوژ جدید انتقال یافت. سپس

فیزیولوژی دانشگاه آزاد مرودشت منتقل شدند. دمای مطلوب سالن نگهداری حیوانات ۲۰ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی حدود ۵۵ تا ۶۵ درصد کنترل و ثبت شد. چرخه روشنایی - تاریکی نیز هر ۱۲ ساعت یک بار به طور دقیق به وسیله تنظیم کننده الکترونیکی نور سالن نگهداری حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد. حیوانات با دسترسی آزادانه به آب و غذا و به صورت چهارتایی در قفس‌ها نگهداری شدند. بر اساس راهنمایی شورای پژوهش ملی برای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی تلاش بر این شد که هرگونه استرس غیرضروری به حیوانات حذف شود. موش‌ها به مدت یک هفته جهت سازگاری در شرایط استاندارد نگهداری شدند. در ادامه در روز هشتم تعداد ۲۴ سر از موش‌های صحرایی به وسیله TMT القای آلزایمر شدند. مقدار ۸ میلی‌گرم از این ماده را درون ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال (نرمال سالین) حل کرده و برای تزریق به موش‌های صحرایی آماده و مقدار ۸ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن موش‌های صحرایی سم TMT به موش‌های صحرایی به صورت صفاقی تزریق شد (۲۸). پس از تزریق TMT، جهت تشخیص آلزایمر با مشاهده یک‌سری علائم رفتاری در موش‌های صحرایی بررسی شد. این علائم بالینی عبارت‌اند از: رعشه‌های عضلانی، افزایش دمای بدن، خون‌ریزی از چشم و بینی، حالت تهوع، تشنج و پیچ و تاب‌های دمی (۲۹). در ادامه موش‌های صحرایی به طور تصادفی به ۴ گروه؛ سالم هفته آخر (HC) (بدون دستکاری تجربی، کنترل قربانی هفته آخر (ADC) دریافت سم (TMT)، شم (SH) (حلال ژل رویال، سرم فیزیولوژی) و مصرف ژل رویال (RJ) (دریافت سم

جهت بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از ریل‌تایم پی‌سی آر تمام پرایمرها به وسیله نرم‌افزار Allele IDv7.8 طراحی شد و از ژن $\beta 2m$ (بتا ۲ میکروگلوبولین) به‌عنوان کنترل داخلی استفاده گردید (جدول ۱). تمام پرایمرها به صورت اتصال آگزون - آگزون طراحی شد. جهت اطمینان از عدم تکثیر DNA ژنومی از ۲۵ نانوگرم cDNA و ۲۵ نانوگرم RNA در تیوب‌های جداگانه از واکنش PCR و به کارگیری از ژل آگاروز ۱/۵ درصد استفاده شد. تکثیر cDNA و مشاهده باند مورد انتظار به وسیله پرایمر اختصاصی و عدم تکثیر RNA پس از واکنش PCR نمایانگر عدم تکثیر DNA ژنومی می‌باشد. سپس برای هر یک از پرایمرها کارایی PCR اندازه‌گیری و منحنی استاندارد برای آن‌ها رسم گردید. جهت بررسی بیان ژن‌ها برای گروه‌های سلولی از مخلوط PCR، RealQ 2x Master mix Green Dye (ساخت AMPLQON آلمان) طبق دستورالعمل کیت استفاده شد. پس از اتمام فعالیت دستگاه و مشاهده نمودارها مبنی بر افزایش تعداد قطعه مورد نظر و میزان نشر فلورسانس با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ میزان بیان ژن مورد نظر نسبت به $\beta 2m$ و گروه کنترل سنجیده شد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری شاپیرو و یلک، مانووا و آزمون تعقیبی شفه تجزیه و تحلیل شدند.

هم‌حجم آن یعنی ۳۵۰ میکرو لیتر اتانول ۷۰ درصد به آن اضافه شد. سپس مینی‌ستون آر بی درون لوله جمع‌آوری قرار گرفت و نمونه‌ای که اتانول به آن اضافه شده بود، به مینی‌ستون آر بی انتقال یافت و با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱ دقیقه سانترفیوژ گردید و محلول درون لوله جمع‌آوری دور ریخته شد. در مرحله بعد ۵۰۰ میکرو لیتر از بافر شستشو ۱ به مینی‌ستون آر بی اضافه شد و با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱ دقیقه سانترفیوژ گردید و محلول درون لوله جمع‌آوری دور ریخته شد. در ادامه مینی‌ستون آر بی با ۷۵۰ میکرو لیتر از بافر شستشوی ۲ با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱ دقیقه سانترفیوژ شد و محلول درون لوله جمع‌آوری دور ریخته شد. این مرحله دو بار تکرار شد، سپس به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانترفیوژ انجام شد، سپس مینی‌ستون آر بی درون لوله جمع‌آوری قرار داده شد و ۵۰ میکرو لیتر از فری ریبونوکلاز (RNase-free ddH₂O) به مینی‌ستون آر بی اضافه و ۱ دقیقه به آن زمان داده شد و سپس به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانترفیوژ گردید. محلول درون وان شستشو، RNAهای استخراج شده بود که در ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سنتز cDNA طبق دستورالعمل موجود در کیت فرمنتاز (K1621) تهیه شد.

جدول ۱: لیست پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

Genes	Primer Sequences	Sizes (bp)
B2m	Forward: 5'- CGTGCTTGCCATTCAGAAA -3'	244
	Reverse: 5'-ATATACATCGGTCTCGGTGG -3'	
Bax	Forward: 5'- CTGCAGAGGATGATTGCTGA -3'	174
	Reverse: 5'- GATCAGCTCGGGCACTTTAG -3'	
Bcl-2	Forward: 5'- ATCGCTCTGTGGATGACTGAGTAC-3'	134
	Reverse: 5'- AGAGACAGCCAGGAGAAATCAAAC -3'	
P53	Forward: 5'- GGCTCCGACTATACCACTATCC -3'	104
	Reverse: 5'- GAGTCTTCCAGCGTGATGATG -3'	

یافته‌ها

برای تجزیه و تحلیل داده‌های پژوهش، متغیرهای وابسته در گروه‌ها از طریق روش تحلیل واریانس چند متغیره مورد مقایسه قرار گرفتند. جدول ۲ یافته‌های توصیفی متغیرهای وابسته مربوط به شاخص‌های آپوپتوزی P53, BCL-2, BAX است را به تفکیک گروه‌ها نشان می‌دهد.

پس از بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها با آزمون شاپیرو ویلک و همگنی واریانس با آزمون لون با سطح معنی‌داری بیشتر از ۰/۰۵، نتایج کلی تحلیل واریانس چندگانه مطابق جدول ۳ بررسی گردید که در هر چهار شاخص زیر ۰/۰۵ بود و اثر پیلایی^(۱) (۷/۰۴۷)، لامبدا^(۲) (۱۳/۶۳۱)، رد هاتلینگ^(۳) (۲۱/۲۴۴) و بزرگ‌ترین ریشه روی^(۴) (۶۵/۷۶۱) حاکی از معنی‌داری شاخص‌ها لااقل در یکی از گروه‌ها و متغیرها بود ($p < 0/05$)

جدول ۴ نتایج آزمون تحلیل واریانس چند متغیری به تفکیک متغیرهای وابسته را نشان می‌دهد. همان‌طور که در جدول مشاهده می‌شود، برای متغیرهای P53, BAX, BCL-2 شاخص F واجد معنی‌داری است ($p < 0/05$). بررسی اندازه اثر نشان می‌دهد که مداخله‌ها بیشترین اثر را بر روی BCL-2 اعمال کرده‌اند. نتایج تحلیل واریانس چند متغیری نشان می‌دهد که در هر سه متغیرهای P53, BCL-2, BAX حداقل در یکی از گروه‌ها تفاوت معنی‌دار وجود دارد. برای بررسی این که در کدامیک از گروه‌ها تفاوت معنی‌دار است از آزمون تعقیبی شفه استفاده شده است که در جدول ۵ به تفکیک متغیرهای وابسته، با ($p < 0/05$)

تفاوت‌های معنی‌دار ما بین گروه‌ها مشخص شده است.

در کل با عطف به نتایج آزمون شفه و تفاضل میانگین‌های گروه‌های معنی‌دار شده، یافته‌های تحقیق حاضر نشان می‌دهد که متغیر وابسته P53 در گروه آلزایمر هفته آخر بیشتر از گروه‌های سالم هفته آخر و ژل بود، در گروه ششم بیشتر از سالم هفته آخر و ژل شد، شاخص BAX در گروه ژل کمتر از ششم و آلزایمر هفته آخر شد، در گروه سالم هفته آخر کمتر از ششم و آلزایمر هفته آخر شد و BCL-2 در گروه ژل بیشتر از ششم و سالم هفته آخر و آلزایمر هفته آخر شد و در گروه سالم هفته آخر بیشتر از ششم و آلزایمر هفته آخر شد.

بحث

رشد و توسعه جوامع و تغییر سبک زندگی، نیاز روز افزون به تولید محصولات کشاورزی، صنعتی و آفت‌کش‌ها افزایش داشته و دسترسی زیاد افراد به سموم و داروها و یا باقیمانده‌های آن‌ها در محیط زیست، باعث شده است که مواجهه انسان با این‌گونه سموم و ترکیبات ارگانوتینی از طریق غذا، آب و هوا غیر قابل اجتناب گردید (۱ و ۲)، لذا هدف از این پژوهش تعیین و بررسی تأثیر مصرف ژل رویال بر شاخص‌های آپوپتوزی در مدل تری‌متیل‌تینی بیماری آلزایمر بود.

- 1- Pillai's Trace
- 2- Wilks' Lambda
- 1- Hotelling's Trace
- 4- Roy's Largest Root

جدول ۲: یافته‌های توصیفی به تفکیک گروه‌ها

میانگین	انحراف استاندارد	متغیر وابسته	گروه
۱	۰/۳	پی ۵۳	سالم هفته آخر
۲/۴	۱		آلزامی هفته آخر
۳	۱		شم
۱	۰/۲		ژل
۰/۱	۰/۰۴	بکس	سالم هفته آخر
۰/۳	۰/۱		آلزامی هفته آخر
۰/۳	۰/۱		شم
۰/۱	۰/۰۴		ژل
۰/۲	۰/۰۹	بی سی ال دو	سالم هفته آخر
۰/۱	۰/۰۴		آلزامی هفته آخر
۰/۱	۰/۰۳		شم
۱	۰/۱		ژل

جدول ۳: نتایج کلی تحلیل واریانس چندگانه

مجدور انا	سطح معنی داری	F	اثر کلی
۰/۴۳۰	۰/۰۰۰۱	۷/۰۴۷	اثر پیلایی
۰/۵۸۲	۰/۰۰۰۱	۱۳/۶۳۱	لامبادای ویلکس
۰/۷۲۱	۰/۰۰۰۱	۲۱/۲۴۴	رد هاتلینگ
۰/۸۷۶	۰/۰۰۰۱	۶۵/۷۶۱	بزرگ‌ترین ریشه روی

جدول ۴: نتایج آزمون تحلیل واریانس چند متغیری به تفکیک متغیرهای وابسته

معنی داری	F	مجدور انا	متغیر وابسته
۰/۰۰۰۱	۲۰/۱۱۴	۰/۶۸۳	پی ۵۳
۰/۰۰۰۱	۱۲/۷۷۸	۰/۵۷۸	بکس
۰/۰۰۰۱	۴۹/۱۶۴	۰/۸۴۰	بی سی ال دو

جدول ۵: آزمون تعقیبی شفه به تفکیک متغیرهای وابسته

معنی داری	گروه	گروه	متغیر مستقل
۰/۰۰۰۱	آلزامی هفته آخر	سالم هفته آخر	پی ۵۳
۰/۰۰۰۱	شم		
۰/۰۰۰۱	آلزامی هفته آخر	ژل	
۰/۰۰۰۱	شم		
۰/۰۰۱	شم	سالم هفته آخر	بکس
۰/۰۰۱	آلزامی هفته آخر		
۰/۰۰۳	شم	ژل	
۰/۰۰۳	آلزامی هفته آخر		
۰/۰۰۰۱	شم	ژل	بی سی ال دو
۰/۰۰۰۱	سالم هفته آخر		
۰/۰۰۰۱	آلزامی هفته آخر		
۰/۰۰۷	آلزامی هفته آخر	سالم هفته آخر	
۰/۰۰۶	شم		

ایسکمی، آسیب DNA و فقدان عوامل تروفیک فعال می‌گردد(۱۱). میتوکندری‌ها حاوی تعدادی پروتئین تحت عنوان پروتئین‌های پروآپوپتوتیک^(۱) هستند. این عوامل به دنبال تشکیل منافذ در غشای میتوکندری به نام منافذ پی‌تی (PTP)^(۲) از میتوکندری‌ها آزاد می‌شوند که نقش اصلی در این تغییرات را پروتئین‌های خانواده Bcl-2 به عهده دارند که خود به دو دسته پروتئین‌های آنتی‌آپوپتوتیک (ضد آپوپتوز) مانند Bcl-2 و نیز پروتئین‌های پروآپوپتوتیک مانند BAX تقسیم می‌شوند(۲۳). پروتئین‌های پروآپوپتوتیک عموماً در سیتوزول به عنوان سنسورهای آسیب سلولی یا استرس وجود دارند. محرک‌های آپوپتوز موجب تغییر در ساختار پروتئین‌های خانواده Bax می‌گردد. در نتیجه این تغییرات، پروتئین‌های مذکور به میتوکندری انتقال یافته و موجب تشکیل منافذ و یا واکنش با کانال‌های غشایی و تسریع نفوذپذیری غشای خارجی میتوکندری از طریق منافذ نفوذپذیری غشای خارجی میتوکندری (MOMP)^(۳) می‌شوند(۲۰). به دنبال افزایش نفوذپذیری غشای میتوکندری، آزادسازی سیتوکروم c و دیگر مولکول‌های پروآپوپتوتیک از میتوکندری(از فضای بین غشاهای داخلی و خارجی) به سیتوزل سلول صورت می‌گیرد و موجب راه‌اندازی واکنش‌های کاسپازی در مسیر داخلی و هیدرولیز و تجزیه بسیاری از پروتئین‌های

طی این پژوهش به بررسی اثر سمیت TMT در القای حالت شبه آلزایمر و ارتباط آن با مسیر داخلی آپوپتوز در رت‌های بالغ پرداخته شد، سپس اثر آنتی‌اکسیدانی Ru در مهار التهاب مغزی و بهبود روند آپوپتوز ناشی از این مسمومیت مورد بررسی قرار گرفت. آپوپتوز یک فرآیند طبیعی و فعال مرگ سلولی در هنگام تکامل بوده که بعد از مواجهه شدن سلول‌ها با عوامل سیتوتوکسیک هم رخ می‌دهد(۱۹). هرگونه اختلال در روند آپوپتوز می‌تواند منجر به بیماری شود به طوری که افزایش غیر طبیعی مرگ سلولی در بیماری‌هایی نظیر اختلالات نورودژنراتیو دیده می‌شود(۲۰). در پژوهش‌های پیشین عنوان شده است که TMT دارای اثرات نورو توکسیک بالقوه در سیستم لیمبیک به‌ویژه هیپوکامپ است که موجب افزایش اختلالات رفتاری و القای آلزایمر تجربی شده و احتمالاً سبب القای آپوپتوز و مرگ نورونی در سیستم عصبی می‌شود و این اختلالات نه تنها به مرور زمان کاهش نمی‌یابند، بلکه تثبیت شده و به‌طور پیشرونده‌ای ادامه پیدا خواهند کرد(۶ و ۵). در همه موارد مرگ سلولی به وسیله TMT نشان داده شده که القای آپوپتوز با میزان بالای آزاد سازی کلسیم(که یکی از تنظیم‌کننده‌های کلیدی بقای سلولی است) از ذخایر درون سلولی (میتوکندری و شبکه اندوپلاسمی) توأم بوده که نشان دهنده آسیب میتوکندریایی است(۳۳ و ۲). مسیر داخلی آپوپتوز که میتوکندری‌ها نقش مهمی در تنظیم مرگ سلولی آن بر عهده دارند، در پی استرس‌های سلولی نظیر توکسین‌ها، هیپوکسی، استرس‌های اکسیداتیو،

1-Pro-Apoptotic
2-Permeability Transition Pore(PTP)
3-Mitochondrial Outer-Membrane Permeability Pore(MOMP)

حیاتی سلولی و ورود سلول به مرحله غیرقابل برگشت مرگ سلولی می‌شوند (۲۳). اهمیت نفوذپذیری میتوکندری در مطالعه فانگ و همکاران نشان داده شده است. آن‌ها بیان کردند که مسدود کردن منافذ نفوذپذیری میتوکندری میزان آپوپتوز را کاهش می‌دهد (۳۲). اعضای آنتی‌آپوپتوتیک خانواده Bcl-2 (موجود در غشای خارجی میتوکندری) با فعالیت Bax مقابله نموده و در نتیجه موجب مهار MOMP می‌شوند (۱۱). از طرف دیگر BAX ممکن است از مسیر غیر وابسته به کاسپاز نیز آپوپتوز را القا کند. در این حالت فاکتوری به نام ای‌آی‌اف (AIF)^(۱) باعث متراکم شدن کروماتین و فراگمنتاسیون DNA می‌شود (۳۳). پروتئین P53 به‌طور طبیعی در غلظت‌های کم در سیتوزول وجود دارد که در پاسخ به تعدادی از تحریکات القا شده آپوپتوزیس شامل استرس اکسیداتیو و آسیب DNA افزایش پیدا می‌کند و از طریق فعال‌سازی فرآیند آپوپتوز به واسطه مسیر داخلی یا میتوکندریایی باعث ممانعت از تکثیر و ترمیم سلول‌های آسیب دیده و تسریع مرگ سلولی می‌شود (۲۴). P53 با افزایش و فعال‌سازی پروتئین BAX و همچنین اتصال آن به غشاء میتوکندری منجر به رهاسازی سیتوکروم c از میتوکندری و فعال نمودن فاکتور ۱ پروتئاز فعال‌کننده آپوپتوزیس به نام آپاف وان (APAF-1)^(۲) و موجب القای آپوپتوز می‌گردد و با کاهش BCL-2 آپوپتوز را گسترش می‌دهد (۳۴). با توجه به این که در تحقیق حاضر متغیر وابسته P53 در گروه آلزایمر هفته آخر بیشتر از گروه‌های سالم

هفته آخر و ژل بود، در گروه ششم بیشتر از سالم هفته آخر و ژل شد، شاخص BAX در گروه ژل کمتر از ششم و آلزایمر هفته آخر شد و در گروه سالم هفته آخر کمتر از ششم و آلزایمر هفته آخر شد. BCL-2 در گروه ژل بیشتر از ششم و سالم هفته آخر و آلزایمر هفته آخر شد و در گروه سالم هفته آخر بیشتر از ششم و آلزایمر هفته آخر شد. احتمالاً بیانگر افزایش روند آپوپتوز از مسیر میتوکندریایی به دنبال تجویز TMT می‌باشد و با توجه به کاهش P53 و BAX و افزایش BCL-2 در گروه ژل، احتمالاً نشان دهنده تأثیر مثبت RJ در کاهش روند آپوپتوز ایجاد شده در اثر سم سیتوتوکسیک TMT بوده است. در تحقیقی که به وسیله آلمیر و همکاران بر روی تخریب عصبی ناشی از کادمیم صورت گرفت نشان داد که مصرف RJ اثر مهاري BCL-2 بر آپوپتوز را به سطح نرمال خود برمی‌گرداند و تأثیر آنتی‌اکسیدانی و ضد آپوپتوزی RJ محرز گردید (۳۵). هم‌سو با این تحقیق و شکینی و همکاران نشان دادند که تیمار با RJ باعث بلوغ و رشد رویان و تخمک بز می‌شود و سطح آپوپتوز از طریق تنظیم کاهشی BAX، P53 در تخمدان و تنظیم افزایشی BCL-2 کاهش یافته است (۳۶). البته در برخی دیگر از پژوهش‌هایی مانند مطالعه رشید و همکاران که بر روی سرطان مثانه صورت گرفت نشان داد که RJ باعث تنظیم افزایشی P53 و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی گردید (۳۷). در مطالعه‌ای که به وسیله وائل و همکاران

1-Apoptosis Inducing Factor(AIF)
2-Apoptotic Protease Activating Factor 1(APAF-1)

پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و غشاهای چربی حمله کرده و در پی آن منجر به ایجاد اختلال در رشد و نمو و عملکرد سلول شوند(۶). بافت‌های مغز حاوی مقادیر زیادی از اسیدهای چرب غیراشباع هستند که در مقابل حملات رادیکال‌های آزاد آسیب‌پذیری خاصی دارند(۱۱ و ۵). نشان داده شده است که RJ مانع از پراکسیداسیون چربی^(۱) در هر دو شرایط *in vitro* و *in vivo* شده است(۴۱). لذا RJ از DNA در مقابل آسیب اکسیداتیو محافظت می‌کند(۴۲)، بنابراین مواد حاوی آنتی‌اکسیدان می‌توانند نقش مهمی در جلوگیری و درمان بیماری‌های نورودژنراتیو بازی کنند(۴۳). در شرایط نرمال، یک تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و تخریب آن‌ها به وسیله سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی وجود دارد(۶). آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند با سازوکارهای مختلفی عمل کنند که می‌توان به مکانیسم‌هایی همانند برداشت اکسیژن یا کاهش غلظت موضعی اکسیژن و قطع کردن واکنش‌های زنجیره‌ای اشاره کرد (۴۴). احتمالاً RJ اکسیژن رسانی به بافت مغز را افزایش می‌دهد، این افزایش اکسیژن رسانی در افراد مسنی که مبتلا به برخی از اختلالات مغزی هستند مفید است(۴۱). پژوهش‌ها نشان داده‌اند که بیماری آلزایمر با سطح بالای کلسترول نیز در ارتباط است چرا که تجمع کلسترول می‌تواند باعث تسریع تشکیل پلاک آمیلوئید بتا شود(۴۵) بنابراین از آنجایی که RJ می‌تواند چربی و کلسترول خون را نیز کاهش

بر تأثیر مصرف RJ و چای سبز بر روی تنظیم افزایش P53 و تعدیل آنزیم‌های آپوپتوزی صورت گرفت نتایج نشان داد که چای سبز و RJ باعث تقویت آنزیم‌های ترمیم کننده DNA در آسیب ناشی از مواجهه با آفت‌کش‌ها در کبد و کلیه موش‌ها شد(۳۸). در تحقیقی که به وسیله دلدار و همکاران بر روی تأثیر RJ بر ژن‌های درگیر در مرگ سلولی در کشت برون تنی رویان بز انجام شد نشان داد که افزایش غلظت RJ بیان نسبی ژن BCL-2 و P53 را افزایش داد، در حالی که منجر به کاهش معنی‌دار بیان نسبی ژن BAX شد، که تکامل و تولید رویان را بهبود داد(۴۰ و ۳۹). در تحقیقی که به وسیله تیاگو و همکاران بر روی تیمار از طریق خوردن RJ بر روی رت‌های آلزایمری صورت گرفت نشان داد که RJ باعث کاهش استرس‌های اکسیداتیو و افزایش نورون‌زایی در هیپوکامپ رت‌ها شد و عملکردهای شناختی را بهبود بخشید(۱۳). نقص در تنفس میتوکندریایی و فسفوریلاسیون اکسیداتیو و تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)^(۱) در بسیاری از بیماری‌های عصبی دخیل بوده و با مرگ سلول‌های عصبی و تخریب نورونی توأم است(۱۱). پژوهشگران نشان داده‌اند آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیبات مهمی برای درمان نقص حافظه و ناهنجاری‌های رفتاری ناشی از استرس اکسیداتیو بوده و یکی از مهم‌ترین عوامل دفاعی علیه رادیکال‌های آزاد هستند(۳۳). به دلایل فیزیولوژیک عقیده بر این است که CNS به‌ویژه هیپوکامپ حساسیت بسیار زیادی به استرس اکسیداتیو دارد(۵). رادیکال‌های اکسیژن می‌توانند به

1-Reactive Oxygen Species
2-Lipid Peroxidation

همچنین احتمالاً HDA-10 می‌تواند باعث کاهش مرگ نرونی نیز شود (۴۶). دیگر ترکیب سودمند اثرگذار بر روی سیستم عصبی که تنها در RJ موجود است، آدنوزین منوفسفات یا آم‌پ (AMP)^(۳) است که به عنوان یک فاکتور نروتروفیک عمل می‌کند (۱۴). در کل این ترکیبات بیواکتیو موجود در RJ بر عملکردهای مغز اثرات مفید دارد و ممکن است در حفظ سلامت و یا استفاده‌های کلینیکی در پیشگیری و درمان برخی از اختلالات عصبی نقش استراتژیک داشته باشد (۱۳).

از جمله محدودیت‌های خارج از کنترل در این تحقیق با توجه به تعداد زیاد رت‌ها عدم بافت برداری همزمان از تمامی رت‌ها بود که در یک شیفت کاری و در یک روز انجام شد. همچنین تزریقات RJ و TMT نیز همزمان برای تمامی رت‌ها صورت نگرفت هر چند که در یک شیفت کاری تزریقات به اتمام می‌رسید، لذا پیشنهاد می‌شود که در تحقیقات آتی و در راستای این پژوهش از دوزهای مختلف RJ استفاده گردد تا تأثیر میزان‌های مختلف مصرف این ماده طبیعی و سودمند به محک آزمایش گذاشته شود. همچنین در مقایسه با تزریق درون صفاقی RJ، مصرف خوراکی این ژل نیز به بوت‌ه آزمایش گذاشته شود.

دهد و احتمالاً از طریق فعال کردن فرم بتای گیرنده‌های استروژن (ER)^(۱) نیز می‌تواند بر روی اختلالات عصبی اثر مثبت بگذارد (۱۸). اثرات مفید ناشی از RJ بر روی مغز را به یک سری ترکیبات موجود در آن نسبت داده‌اند که از طریق دستگاه گوارش جذب و از سد خونی مغزی عبور می‌کنند (۴۱ و ۱۲). در بین مواد فعالی که در RJ موجود است پپتیدهای کوچک و اسیدهای چرب غیراشباع کوچک مولکول جالب توجه هستند که از هیدرولیز پروتئین‌های بزرگ RJ به دست می‌آیند، آمینواسیدهای آزاد، اسیدهای چرب ۱۰ کربنه (HDA-10) و AMP-N1oxide و ترکیب منحصر به فرد اسید ۱۰-هیدروکسی ترانس ۲-دکانوئیک (HDEA)، از جمله آن‌هاست (۱۲). عنوان شده است که HDEA اثرات فاکتور نورون‌زایی مشتق شده از مغز (BDNF)^(۲) را تقلید کرده و احتمالاً نروژن در مغز بالغ را تحریک می‌کند (۲۲ و ۱۳). نشان داده شده است که پپتیدهای کوچک مستخرج از RJ با ۴-۲ اسید آمینه که در انتهای c خود حاوی tyr است، خاصیت آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی دارد که باعث پاک‌سازی رادیکال هیدروکسیل می‌شود، به طوری که اثرات سودمند RJ به خصوصیات آنتی‌اکسیدانی سه دی پپتید Tyr-Tyr, Arg-Tyr, Lys-Tyr نسبت داده می‌شود. توانایی آنتی‌اکسیدانی این پپتیدها مربوط به خواص گروه هیدروکسیل پلی‌فنولی آن‌ها و مهار رادیکال‌های آزاد از طریق مکانیسم هیدروژن‌دهی گروه‌های هیدروکسیل این اسید آمینه‌ها می‌باشد (۱۸ و ۱۳).

1- Estrogen Receptor
2- Brain-Derived Neurotrophic Factor
3-Adenosine Monophosphate

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که مصرف مکمل RJ ممکن است بتواند به عنوان ابزاری نوید بخش برای تقویت عملکرد عصبی و بازسازی نورون‌ها بوده و یک راهکار طبیعی مهار کننده در افزایش بیان ژن‌های پیش‌آپوپتوزی BAX و ممانعت از کاهش بیان BCL-2 به عنوان یک ژن آنتی‌آپوپتوزی به منظور متوقف کردن آپوپتوزیس و بهبود تخریب عصبی ناشی از TMT باشد.

تقدیر و تشکر

مقاله حاضر برگرفته از پایان‌نامه دانشجویی دوره دکترای فیزیولوژی ورزشی دانشگاه لرستان با کد اخلاق IR.Lu.acra.2020.411 می‌باشد. در پایان از تمامی دوستان و همکارانی که در طی مراحل این پژوهش یاری کننده ما بودند، صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایم.

REFERENCES

1. Bhatti GK, Reddy AP, Reddy PH, Bhatti JS. Lifestyle Modifications and Nutritional Interventions in Aging-Associated Cognitive Decline and Alzheimer's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience* 2019; 11: 369.
2. Kivipelto M, Mangialasche F, Ngandu T. Lifestyle interventions to prevent cognitive impairment, dementia and Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology* 2018; 14(11): 653-66.
3. Zhu HB, Ouyang GL, Lai YY, Zhong SQ. Clinical analysis of sequelae of acute trimethyltin oxide poisoning]. *Zhonghua lao dong wei sheng zhi ye bing za zhi = Zhonghua laodong weisheng zhiyebing zazhi = Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases* 2019; 37(5): 376-9.
4. Chen J, Huang C, Zheng L, Simonich M, Bai C, Tanguay R, et al. Trimethyltin chloride (TMT) neurobehavioral toxicity in embryonic zebrafish. *Neurotoxicology and Teratology* 2011; 33(6): 721-6.
5. Ceccariglia S, Alvino A, Del Fa A, Parolini O, Michetti F, Gangitano C. Autophagy is Activated In Vivo during Trimethyltin-Induced Apoptotic Neurodegeneration: A Study in the Rat Hippocampus. *International Journal of Molecular Sciences* 2019; 21(1): 175.
6. Kim J, Kim CY, Oh H, Ryu B, Kim U, Lee JM, et al. Trimethyltin chloride induces reactive oxygen species-mediated apoptosis in retinal cells during zebrafish eye development. *The Science of the Total Environment* 2019; 653: 36-44.
7. Lee S, Yang M, Kim J, Son Y, Kim J, Kang S, et al. Involvement of BDNF/ERK signaling in spontaneous recovery from trimethyltin-induced hippocampal neurotoxicity in mice. *Brain Research Bulletin* 2016; 121: 48-58.
8. Corvino V, Marchese E, Giannetti S, Lattanzi W, Bonvissuto D, Biamonte F, et al. The neuroprotective and neurogenic effects of neuropeptide Y administration in an animal model of hippocampal neurodegeneration and temporal lobe epilepsy induced by trimethyltin. *Journal of Neurochemistry* 2012; 122(2): 415-26.
9. Imam SZ, He Z, Cuevas E, Rosas-Hernandez H, Lantz SM, Sarkar S, et al. Changes in the metabolome and microRNA levels in biological fluids might represent biomarkers of neurotoxicity: A trimethyltin study. *Experimental Biology and Medicine* 2018; 243(3): 228-36.
10. Malekzadeh S, Edalatmanesh MA, Mehrabani D, Shariati M. Drugs induced alzheimer's disease in animal model. *Galen Medical Journal* 2017; 6(3): 185-96.
11. Huang ML, Chiang S, Kalinowski DS, Bae DH, Sahni S, Richardson DR. The role of the antioxidant response in mitochondrial dysfunction in degenerative diseases: cross-talk between antioxidant defense, autophagy, and apoptosis. *Oxid Med Cell Longev* 2019; 2019: 6392763.
12. Morovic S, Budincevic H, Govori V, Demarin V. Possibilities of dementia prevention - it is never too early to start. *Journal of Medicine and Life* 2019; 12(4): 332-7.
13. e Silva TGdS, da Silva JRM, da Silva Alves A, Britto LRG, Xavier GF, Sandoval MRL. Oral treatment with royal jelly improves memory and presents neuroprotective effects on icv-STZ rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Heliyon* 2020; 6(2): e03281.
14. You M, Pan Y, Liu Y, Chen Y, Wu Y, Si J, et al. Royal jelly alleviates cognitive deficits and beta-amyloid accumulation in app/ps1 mouse model via activation of the camp/pka/creb/bdnf pathway and inhibition of neuronal apoptosis. *Frontiers in Aging Neuroscience* 2018; 10: 428.
15. Pasupuleti VR, Sammugam L, Ramesh N, Gan SH. Honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017; 2017.
16. Pourmoradian S, Mahdavi R, Mobasser M, Faramarzi E, Mobasser M. Effects of royal jelly supplementation on body weight and dietary intake in type 2 diabetic females. *Health Promotion Perspectives* 2012; 2(2): 231.
17. Yeung YT, Argüelles S. Bee Products: Royal jelly and propolis. *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements: Elsevier*; 2019; 475-84.
18. Pan Y, Xu J, Jin P, Yang Q, Zhu K, You M, et al. Royal jelly ameliorates behavioral deficits, cholinergic system deficiency, and autonomic nervous dysfunction in ovariectomized cholesterol-fed rabbits. *Molecules* 2019; 24(6): 1149.
19. Guzmán EA. Regulated Cell Death Signaling Pathways and Marine Natural Products That Target Them. *Marine Drugs* 2019; 17(2): 76.
20. Fricker M, Tolkovsky AM, Borutaite V, Coleman M, Brown GC. Neuronal Cell Death. *Physiological Reviews* 2018; 98(2): 813-80.

- 21.Hampel H, Caraci F, Cuello AC, Caruso G, Nisticò R, Corbo M, et al. A path toward precision medicine for neuroinflammatory mechanisms in alzheimer's disease. *Frontiers in Immunology* 2020; 11: 456.
- 22.Seymen CM, Cakir Gundogdu A, Bulut DI, Yilmaz Demirtas C, Elmas C. Royal jelly increased map-2 expression in hippocampal neurons of hypothyroid rats: an immunohistochemical study. *Biotechnic & histochemistry: official Publication of the Biological Stain Commission* 2020; 95(1): 46- 54.
- 23.Prenek L, Boldizsár F, Kugyelka R, Ugor E, Berta G, Németh P, et al. The regulation of the mitochondrial apoptotic pathway by glucocorticoid receptor in collaboration with Bcl-2 family proteins in developing T cells. *Apoptosis : an International Journal on Programmed Cell Death* 2017; 22(2): 239-53.
- 24.Sabapathy K, Lane DP. Understanding p53 functions through p53 antibodies. *Journal of Molecular Cell Biology* 2019; 11(4): 317-29.
- 25.Razavi Y, Katebi N, Zeighamy Alamdary S, Oryan S, Khodaghohi F, Haghparast A. Changes in apoptotic factors caspase-3, PARP and Bax/Bcl-2 ratio in the ventral tegmental area after the acquisition and extinction of morphine-induced conditioned place preference in the rat. *koomesh Journal* 2013; 14(4): 404-13.
- 26.Dickson DW. Apoptotic mechanisms in Alzheimer neurofibrillary degeneration: cause or effect? *The Journal of Clinical Investigation* 2004; 114(1): 23-7.
- 27.Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)* 2012; 4(5): 330.
- 28.Bazyar Y, Rafiei S, Hosseini A, Edalatmanesh MA. Effect of endurance exercise training and gallic acid on tumor necrosis factor- α in an animal model of Alzheimer's disease. *Shefayekhatam J* 2015; 3(3): 21-6.
- 29.Moghadam M, Edalatmanesh MA. The lithium chloride effect on anxiety, exploratory activity, and brain derived neurotrophic factor levels of the hippocampus in a rat model of TMT Intoxication. *The Neuroscience Journal of Shefaye Khatam* 2015; 3(2): 1-1.
- 30.Arzi A, Houshmand G, Goudarzi M, Khadem Haghghighian H, Rashidi Nooshabadi M. Comparison of the analgesic effects of royal jelly with morphine and aspirin in rats using the formalin. *Journal of Babol University of Medical Sciences* 2015; 17(2): 50-6.
- 31.Corvino V, Marchese E, Zarkovic N, Zarkovic K, Cindric M, Waeg G, et al. Distribution and time-course of 4-hydroxynonenal, heat shock protein 110/105 family members and cyclooxygenase-2 expression in the hippocampus of rat during trimethyltin-induced neurodegeneration. *Neurochemical Research* 2011; 36(8): 1490-500.
- 32.Fang J, Wu L, Chen L. Postconditioning attenuates cardiocyte ultrastructure injury and apoptosis by blocking mitochondrial permeability transition in rats. *Acta Cardiologica* 2008; 63(3): 37-87.
- 33.Zong L, Zhao J, Wu W, Wang J, Huang D, Liu M. AIF knockdown induce apoptosis and mitochondrial dysfunction in cochlear spiral ganglion neurons in vitro. *Mol Med Rep* 2020; 21(4): 1910-20.
- 34.Simabuco FM, Morale MG, Pavan ICB, Morelli AP, Silva FR ,Tamura RE. p53 and metabolism: from mechanism to therapeutics. *Oncotarget* 2018; 9(34): 23780-823.
- 35.Almeer RS, Kassab RB, AlBasher GI, Alarifi S, Alkahtani S, Ali D, et al. Royal jelly mitigates cadmium-induced neuronal damage in mouse cortex. *Molecular Biology Reports* 2019; 46(1): 119-31.
- 36.Veshkini A, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Ghanem N, Abazari-kia AH, Mottaghi E, Kamaledini R, et al. Oocyte maturation with royal jelly increases embryo development and reduces apoptosis in goats. *Animal Reproduction (AR)* 2018; 15(2): 124-34.
- 37.Rashid S, Ali N, Nafees S, Hasan SK, Sultana S. Amelioration of renal carcinogenesis by bee propolis: a chemo preventive approach. *Toxicology International* 2013; 20(3): 227.
- 38.Abdel-Mageed W, Fathy R, Othman M. Royal jelly and green tea effect on p53 upregulated modulator of apoptosis (puma) gene and tnf gene. *Research Journal of Applied Biotechnology* 2016; 2(2): 1-10.
- 39.Deldar H .The use of royal jelly as a replacement of fetal bovine serum in in vitro production of goat embryo with emphasis on apoptosis related genes. *Research On Animal Production* 2019; 10(24): 76-84.
- 40.Mazangi H, Deldar H, Kashan N, Mohammadi-Sangcheshmeh A. 305 royal jelly treatment during oocyte maturation improves in vitro meiotic competence of goat oocytes by influencing intracellular

- glutathione synthesis and apoptosis gene expression. *Reproduction, Fertility and Development* 2015; 27(1): 241.
- 41.Hattori N, Ohta S, Sakamoto T, Mishima S, Furukawa S. Royal jelly facilitates restoration of the cognitive ability in trimethyltin-intoxicated mice. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine* 2009; 2011: 26.
- 42.Guardia de Souza EST, do Val de Paulo MEF, da Silva JRM, da Silva Alves A, Britto LRG, Xavier GF, et al. Oral treatment with royal jelly improves memory and presents neuroprotective effects on icv-STZ rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Heliyon* 2020; 6(2): e03281.
- 43.Toczewska J, Konopka T. Activity of enzymatic antioxidants in periodontitis: A systematic overview of the literature. *Dental and Medical Problems* 2019; 56(4): 419-26.
- 44.Unsal V, Dalkiran T, Cicek M, Kolukcu E. The role of natural antioxidants against reactive oxygen species produced by cadmium toxicity: a review. *Adv Pharm Bull* 2020; 10(2): 184-202.
- 45.Notkola IL, Sulkava R, Pekkanen J, Erkinjuntti T, Ehnholm C, Kivinen P, et al. Serum total cholesterol, apolipoprotein E {FC12} e4 allele, and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology* 1998; 17(1): 14-20.
- 46.Weiser MJ, Grimshaw V, Wynalda KM, Mohajeri MH, Butt CM. Long-term administration of queen bee acid (qba) to rodents reduces anxiety-like behavior, promotes neuronal health and improves body composition. *Nutrients* 2018; 10(1): 13.

The Effect of Eight Weeks of Royal Jelly Consumption on Some of Apoptotic Indicators in Trimethyltin-Induced Alzheimer's Mice

Azimpour M, Fathi M*, Dezfulian O

Department of Physical Education, Lorestan University, Khorramabad, Iran

Received: 05 Sep 2020 Accepted: 10 Oct 2020

Abstract:

Background & aim: Given that Royal Jelly contains compounds that have beneficial effects on the central nervous system and neural functions, therefore, the aim of this study was to determine and evaluate the effect of Royal Jelly consumption on apoptotic indices in trimethyltin model of Alzheimer's disease.

Methods: In the present experimental study conducted in fall of 2018, 32 male Sprague-Dawley rats were included in the study. Twenty-four of them were induced by Alzheimer's induction by trimethyltin. The rats were then randomly divided into four groups: healthy last week, victim control last week, sham and royal jelly. The expression of P53, BAX, BCL-2 genes were measured by Real Time PCR technique. Data analysis was performed by Manova test and post hoc Scheffe at the significant level $P < 0.05$ using SPSS software version 20.

Results: The findings of the present study indicated that the dependent variable P53 in the last week Alzheimer's group was more than the healthy groups in the last week and gel. Moreover, the dependent variable P53 in the sham group was more than the healthy groups in the last week and the gel. In the healthy group, the last week was less than sham and Alzheimer's last week. BCL-2 in the gel group was more than sham and healthy last week and Alzheimer's last week and in the healthy group last week was more than sham and Alzheimer's last week.

Conclusion: Trimethylmethine administration may be involved in selective neuronal death and mitochondrial apoptotic pathways in neurodegenerative disorders, and royal jelly supplementation may be used as an inhibitor of the internal pathway of apoptosis and to enhance neural function and neuronal regeneration in the present model.

Keywords: Royal Jelly, Apoptosis Indicators, Alzheimer's Disease

*Corresponding author: Fathi M, Department of Physical Education, Lorestan University, Khorramabad, Iran
Email: fathi.m@lu.ac.ir

Please cite this article as follows:

Azimpour M, Fathi M, Dezfulian O. The Effect of Eight Weeks of Royal Jelly Consumption on Some of Apoptotic Indicators in Trimethyltin-Induced Alzheimer's Mice. *Armaghane-danesh* 2021; 26(3): 307-323.