مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲٦، شماره ۳، مرداد و شهریور ۱٤۰۰(شماره پی در پی ۱٤٦)

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، خرم اباد، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۹/۰٤/۱۵ 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 داولی وارد مطالعه شدند که تعداد ۲٤ سر از آن‌ها به‌وسیله تری‌متیل‌تین القای آلزایمر شدند. در ادامه موش‌های صحرایی به‌طور تصادفی به ٤ 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[1] 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)[2] است، TMT در آفت‌کش‌ها، بسته‌بندی‌های مختلف مواد غذایی و محصولات سیلیکونی مانند ظروف آشپزخانه، در پلی‌ونیل کلراید pvc[3]، 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 ٦٧ نوع مسمومیت در سراسر جهان شده و ۱۸٤۹ نفر را به‌طور حاد بین سال‌های ۱۹۸۷ تا ۲۰۰۸ متأثر کرده است(٤). 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(٥). 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(٦). شواهدی نیز وجود دارد که این ماده از طریق آسیب اکسیداتیو مغزی سبب ایجاد اختلال حافظه می‌گردد(٥). 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 ازجمله افسردگی، اضطراب و پرخاشگری و بیش فعالی می شود که ظاهراً به دلیل آسیب هیپوکامپ است(۸ و۷). 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 وخو 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 علایم 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)[۱] می‌باشد. RJ به وسیله غدد زیر حلقی[۲] و تحت فکی[۳] زنبورهای کارگر جوان از جنس آپیس ملیفرا[٤] ترشح می‌شود(١٤). RJ دارای ارزش غذایی فراوان است و از لحاظ شیمیایی حاوی آب(۵۰ تا ٦۰ درصد)، پروتئین‌ها(۱۸ درصد)، کربوهیدرات(۱۵ درصد)، چربی(۳ تا ٦ درصد)، نمک‌های معدنی(۱۵ درصد) و بسیاری از ویتامین‌ها و مواد فعال زیستی(۱۸ـ۱۵ 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 بیمارانی 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 مکانیزم‌های 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

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 آسیب رسان مانند؛ سموم شیمیایی، استرس اکسیداتیو و بیماری‌های نرودژنراتیو 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)[1] شامل پروتئین‌های بکس (BAX)[2] 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[3] 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(۲٤). 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 کمک کننده آپوپتوز خواهد شد(۱۱). از طرف دیگر فرایند آپوپتوز در سلول‌های عصبی پستانداران عمدتاً از طریق مسیر وابسته به میتوکندری(مسیر داخلی)[4] صورت می‌گیرد. هیپوکامپ که نقش اصلی در سازماندهی خاطرات و حافظه و احساسات دارد در مسمومیت‌های مزمن با سموم تخریب کننده 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 ۲٦، 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 و۱۹)، 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 داولی از بین موش‌های نر هشت هفته‌ای مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت انتخاب شده و به آزمایشگاه

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

فیزیولوژی دانشگاه آزاد مرودشت منتقل شدند. دمای مطلوب سالن نگهداری حیوانات ۲۰ تا ۲٤ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی حدود ٥٥ تا ٦٥ درصد کنترل و ثبت شد. چرخه روشنایی ـ 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 ۲٤ 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 علایم رفتاری در موش‌های صحرایی بررسی شد. این علایم 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 ٤ 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 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 سی‌سی آب مقطر دیونیزه ریخته و مخلوط را به مدت ١٦ ساعت در دمای ٥٠ درجه سانتی‌گراد انکوبه کرده، سپس محلول از صافی عبور داده خواهد شد و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری و در هنگام تزریق با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه به مدت هشت هفته به‌صورت درون صفاقی تزریق شد(۳۰).

پس از پایان یافتن آزمون‌های رفتاری حیوانات با کتامین ۱۰ درصد(٥٠ میلی‌گرم برکیلوگرم) و زایلزین 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 ۱/٥ 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 ۸۰ـ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. در ابتدا بافت‌ها با روش‌های مکانیکی خرد و هموژنیز شدند. برای استخراج RNA ابتدا ۳٥۰ میکرولیتر از بافر لیزکننده آربی 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 ٥ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد، در مرحله بعد فیلتر ستونی درون لوله جمع‌آوری قرار گرفت و با ١٤٠٠٠ دور در دقیقه به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ گردید. بعد از سانترفیوژ محلول روشن به یک تیوپ میکروسانترفیوژ جدید انتقال یافت. سپس

هم‌حجم آن یعنی ۳۵۰ میکرو لیتر اتانول ۷۰ درصد به آن اضافه شد. سپس مینی‌ستون‌آر بی درون لوله جمع‌آوری قرار گرفت و نمونه‌ای که اتانول به آن اضافه شده بود، به مینی‌ستون‌آر بی انتقال یافت و با سرعت ۱٤۰۰۰ 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 مینی‌ستون‌آر بی اضافه شد و با سرعت ۱٤۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱ دقیقه سانترفیوژ گردید و محلول درون لوله جمع آوری دور ریخته شد. در ادامه مینی ستون آر بی با ۷۵۰ میکرولیتر از بافر شستشوی ۲ با سرعت ۱٤۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱ دقیقه سانترفیوژ شد و محلول درون لوله جمع آوری دور ریخته شد. این مرحله دو بار تکرار شد، سپس به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۱٤۰۰۰ دور در دقیقه سانترفیوژ انجام شد، سپس مینی ستون آر بی درون لوله جمع آوری قرار داده شد و ۵۰ میکرولیتر از فری ریبونوکلئاز (RNase-free ddH2O) به مینی ستون آر بی اضافه و ۱ دقیقه به آن زمان داده شد و سپس به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۱٤۰۰۰ دور در دقیقه سانترفیوژ گردید. محلول درون وان شستشو، RNAهای استخراج شده بود که در ۷۰ـ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سنتز cDNA طبق دستورالعمل موجود در کیت فرمنتاز(K1621)تهیه شد.

جهت بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از ریل‌تایم پی‌سی آر تمام پرایمرها به وسیله نرم‌افزار Allele IDv7.8 طراحی شد و از ژن β2m (بتا ۲ میکروگلوبولین) به‌عنوان کنترل داخلی استفاده گردید(جدول ۱). تمام پرایمرها به صورت اتصال اگزون ـ اگزون طراحی شد. جهت اطمینان از عدم تکثیرDNA 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 B2m و گروه کنترل سنجیده شد.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری شاپیرو ویلک، مانووا و آزمون تعقیبی شفه تجزیه و تحلیل شدند.

جدول ۱: لیست پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

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

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 BAX, BCL-2, P53 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)، لامبدای ویلکس[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<۰/۰۵)

جدول ٤ 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<۰/۰۵). 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 متغیرهایBAX,BCL-2,P53 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<۰/۰۵) 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 شم بیشتر از سالم هفته آخر و ژل شد، شاخص BAX در گروه ژل کمتر از شم و آلزایمر هفته آخر شد، در گروه سالم هفته آخر کمتر از شم و آلزایمر هفته آخر شد و 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 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(۲و ۱)، 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

گروه	متغیر وابسته	انحراف استاندارد	میانگین
سالم هفته آخر	پی۵۳	۰/۳	۱
آلزایمر هفته آخر		۱	۲/٤
شم		۱	۳
ژل		۰/۲	۱
سالم هفته آخر	بکس	۰/۰٤	۰/۱
آلزایمر هفته آخر		۰/۱	۰/۳
شم		۰/۱	۰/۳
ژل		۰/۰٤	۰/۱
سالم هفته آخر	بی سی ال دو	۰/۰۹	۰/۲
آلزایمر هفته آخر		۰/۰٤	۰/۱
شم		۰/۰۳	۰/۱
ژل		۰/۱	۱

جدول ۳: نتایج کلی تحلیل واریانس چندگانه

اثر کلی		F	سطح معنی داری	مجذور اتا
گروه	اثر پیلایی	۷/۰٤۷	۰/۰۰۰۱	۰/٤۳۰
	لامبادای ویلکس	۱۳/٦۳۱	۰/۰۰۰۱	۰/۵۸۲
	رد هاتلینگ	۲۱/۲٤٤	۰/۰۰۰۱	۰/۷۲۱
	بزرگ‌ترین ریشه روی	٦۵/۷٦۱	۰/۰۰۰۱	۰/۸۷٦

جدول ٤ : نتایج آزمون تحلیل واریانس چند متغیری به تفکیک متغیرهای وابسته

متغیر وابسته	مجذور اتا	F	معنی‌داری
پی۵۳	۰/٦۸۳	۲۰/۱۱٤	۰/۰۰۰۱
بکس	۰/۵۷۸	۱۲/۷۷۸	۰/۰۰۰۱
بی سی ال دو	۰/۸٤۰	٤۹/۱٦٤	۰/۰۰۰۱

جدول ۵: آزمون تعقیبی شفه به تفکیک متغیرهای وابسته

متغیر مستقل	گروه	گروه	معنی‌داری
پی ۵۳	سالم هفته آخر	آلزایمر هفته آخر	۰/۰۰۰۱
		شم	۰/۰۰۰۱
	ژل	آلزایمر هفته آخر	۰/۰۰۰۱
		شم	۰/۰۰۰۱
بکس	سالم هفته آخر	شم	۰/۰۰۱
		آلزایمر هفته آخر	۰/۰۰۱
	ژل	شم	۰/۰۰۳
		آلزایمر هفته آخر	۰/۰۰۳
بی سی ال دو	ژل	شم	۰/۰۰۰۱
		سالم هفته آخر	۰/۰۰۰۱
		آلزایمر هفته آخر	۰/۰۰۰۱
	سالم هفته آخر	آلزایمر هفته آخر	۰/۰۰۷
		شم	۰/۰۰٦

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 RJ در مهار التهاب مغزی و بهبود روند آپوپتوز ناشی از این مسمومیت مورد بررسی قرار گرفت. آپپتوز یک فرآیند طبیعی و فعال مرگ سلولی در هنگام تکامل بوده که بعد از مواجهه شدن سلول‌ها با عوامل سیتوتوکسیک هم رخ می‌دهد(۱۹). هر گونه 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 نوروتوکسیک 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(٦ و ٥). در همه موارد مرگ سلولی به وسیله TMT نشان داده شده که القای آپوپتوز با میزان بالای آزاد سازی کلسیم(که یکی از تنظیم کننده‌های کلیدی بقای سلولی است) از ذخایر درون سلولی (میتوکندری و شبکه اندوپلاسمی) توام بوده که نشان دهنده آسیب میتوکندریایی است(۳۳ و۲). مسیر داخلی آپوپتوز که میتوکندری‌ها نقش مهمی در تنظیم مرگ سلولی آن بر عهده دارند، در پی استرس‌های سلولی نظیر توکسین‌ها، هیپوکسی، استرس‌های اکسیداتیو، ایسکمی، آسیب DNA و فقدان عوامل تروفیک فعال می‌گردد(۱۱). میتوکندری‌ها حاوی تعدادی پروتئین تحت عنوان پروتئین‌های پروآپوپتوتیک[1]هستند. این عوامل به دنبال تشکیل منافذ در غشای میتوکندری به نام منافذ پی‌تی (PTP)[2] 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)[3] 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 کاساپازی در مسیر داخلی و هیدرولیز و تجزیه بسیاری از پروتئین‌های

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)[1] 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 فعال سازی فرآیند آپوپتوز به واسطه مسیر داخلی یا میتوکندریایی باعث ممانعت از تکثیر و ترمیم سلول های آسیب دیده و تسریع مرگ سلولی می‌شود(۲٤). 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 فعال کننده آپوپتوزیس به نام آپاف وان (APAF-1)[2] و موجب القای آپوپتوز می‌گردد و با کاهش BCL-2 آپوپتوز را گسترش می‌دهد(۳٤). 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 شم بیشتر از 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 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 مهاری 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 P53, BAX در تخمدان و تنظیم افزایشی BCL-2 کاهش یافته است(۳٦). 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)

بـر تـأثیر مصـرف RJ و چـای سـبز بـر روی تنظـیم افزایشی P53 و تعدیل آنـزیم‌هـای آپوپتـوزی صـورت گرفت نتایج نشان داد که چای سبز و RJ باعث تقویـت آنزیم‌های ترمیم کننده DNA در آسیب ناشی از مواجهه با آفت‌کش‌هـا در کبـد و کلیـه مـوش‌هـا شـد(۳۸). در تحقیقی که به وسیله دلدار و همکـاران بـر روی تـأثیر RJ بر ژن‌های درگیر در مرگ سلولی در کشـت بـرون تنی رویان بز انجام شد نشان داد که افزایش غلظت RJ بیان نسبی ژن BCL-2 و P53 را افـزایش داد، در حـالی که منجر به کاهش معنی‌دار بیان نسـبی ژن BAX شـد، که تکامـل و تولیـد رویـان را بهبـود داد(٤٠ و ۳۹). در تحقیقی که به وسیله تیاگو و همکاران بر روی تیمار از طریق خوردن RJ بر روی رت‌های آلزایمـری صـورت گرفـت نشـان داد کـه RJ باعـث کـاهش اسـترس‌هـای اکسیداتیو و افزایش نورون‌زایی در هیپوکامـپ رت‌هـا شد و عملکردهای شناختی را بهبود بخشید(۱۳). نقص در تنفس میتوکندریایی و فسفوریلاسیون اکسیداتیو و تولید گونه‌های اکسیژن فعـال(ROS)[1] در بسـیاری از بیماری‌های عصبی دخیل بوده و با مـرگ سـلول‌هـای عصبی و تخریب نورونی توأم است(۱۱). پژوهشـگران نشان داده‌اند آنتـی‌اکسـیدان‌هـا ترکیبـات مهمـی بـرای درمان نقص حافظه و ناهنجاری‌های رفتاری ناشـی از استرس اکسیداتیو بـوده و یکـی از مهـم‌تـرین عوامـل دفاعی علیه رادیکـال‌هـای آزاد هسـتند(۳۳). بـه دلایـل فیزیولوژیـک عقیـده بـر ایـن اسـت کـه CNS بـه‌ویـژه هیپوکامـپ حساسـیت بسـیار زیـادی بـه اسـترس اکسیداتیو دارد(٥). رادیکال‌های اکسیژن می‌تواننـد بـه پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و غشاهای چربی حملـه کرده و در پی آن منجر به ایجاد اختلال در رشد و نمو و عملکرد سلول شوند(٦). بافت‌های مغز حاوی مقادیر زیادی از اسیدهای چرب غیراشباع هستند که در مقابل حمـلات رادیکـال‌هـای آزاد آسـیب‌پـذیری خاصـی دارند(۱۱ و٥). نشان داده شـده اسـت کـه RJ مـانع از پراکسیداسـیون چربـی[2] در هـر دو شـرایط in vitro و in vivo شده است(٤١). لذا RJ از DNA در مقابل آسـیب اکسیداتیو محافظت می‌کنـد(٤٢)،بنـابراین مـواد حـاوی آنتی‌اکسیدان مـی‌تواننـد نقـش مهمـی در جلـوگیری و درمان بیماری‌های نورودژنراتیـو بـازی کننـد(٤٣). در شرایط نرمال، یک تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و تخریب آن‌ها بـه وسـیله سیسـتم‌هـای آنتـی‌اکسـیدانی وجـود دارد(٦). آنتـی‌اکسـیدان‌هـا مـی‌تواننـد بـا سـازوکارهای مختلفـی عمـل کننـد کـه مـی‌تـوان بـه مکانیسم‌هایی همانند برداشت اکسیژن یا کاهش غلظـت موضعی اکسیژن و قطع کردن واکنش‌هـای زنجیـره‌ای اشاره کرد (٤٤). احتمالا RJ اکسیژن رسـانی بـه بافـت مغز را افزایش می‌دهد، این افزایش اکسیژن رسانی در افراد مسـنی کـه مبـتلا بـه برخـی از اخـتلالات مغـزی هستند مفید است(٤١). پـژوهش‌هـا نشـان داده‌انـد کـه بیماری آلزایمر با سطح بالای کلسترول نیز در ارتباط است چرا که تجمع کلسترول مـی‌توانـد باعـث تسـریع تشکیل پلاک آمیلویید بتا شود(٤٥) بنابراین از آنجـایی که RJ می‌تواند چربی و کلسترول خون را نیـز کـاهش

1-Reactive Oxygen Species
2-Lipid Peroxidation

دهـد و احتمـالاً از طریـق فعـال کـردن فـرم بتـای گیرنده‌هـای اسـتروژن(ER)[1] نیـز مـی‌توانـد بـر روی اختلالات عصـبی اثـر مثبـت بگـذارد(۱۸). اثـرات مفیـد ناشی از RJ بر روی مغـز را بـه یـک سـری ترکیبـات موجـود در آن نسـبت داده‌انـد کـه از طریـق دسـتگاه گوارش جذب و از سد خونی مغزی عبور می‌کننـد(٤١ و۱۳). در بـین مـواد فعـالی کـه در RJ موجـود اسـت پپتیدهای کوچک و اسیدهای چـرب غیراشـباع کوچـک مولکـول جالـب توجـه هسـتند کـه از هیـدرولیز پـروتئین‌هـای بـزرگ RJ بـه دسـت مـی‌آینـد، آمینـواسـیدهای آزاد، اسـیدهای چـرب ۱۰ کربنه(HDA-۱۰) و AMP-N1oxide و ترکیب منحصر بـه فـرد اسـید ۱۰ـ هیدروکسـی تـرانس ۲ـ دکانوئیـک (HDEA)، از جمله آن‌هاست(۱۳). عنوان شده اسـت کـه HDEA اثرات فاکتور نورون‌زایی مشـتق شـده از مغـز (BDNF)[2]را تقلید کرده و احتمالاً نروژنز در مغـز بـالغ را تحریک می‌کند(۲۲ و ۱۳). نشان داده شده اسـت کـه پپتیدهای کوچک مستخرج از RJ با ٤-۲ اسـیدآمینه کـه در انتهـای c خـود حـاوی tyr اسـت، خاصـیت آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی دارد کـه باعـث پـاکسـازی رادیکال هیدروکسیل مـی‌شـود، بـه طـوری کـه اثـرات سودمند RJ بـه خصوصـیات آنتـی‌اکسـیدانی سـه دی پپتیـد Tyr-Tyr, Arg-Tyr, Lys-Tyr نسـبت داده مـی‌شـود. توانایی آنتی‌اکسیدانی این پپتیدها مربـوط بـه خـواص گروه هیدروکسیل پلی‌فنولی آن‌ها و مهار رادیکال‌هـای آزاد از طریـق مکانیسـم هیـدروژن‌دهـی گـروه‌هـای هیدروکسـیل ایـن اسـیدآمینـه‌هـا مـی‌باشـد(۱۸ و۱۳)، هم‌چنین احتمالاً HDA-۱۰ می‌تواند باعـث کـاهش مـرگ نورونی نیز شود(٤٦). دیگر ترکیب سودمند اثرگذار بر روی سیسـتم عصـبی کـه تنهـا در RJ موجـود اسـت، آدنوزین منو فسفات یا آ ام پ (AMP)[3] اسـت کـه بـه عنوان یک فاکتور نروتروفیک عمل می‌کند(١٤). در کـل ایـن ترکیبـات بیواکتیـو موجـود در RJ بـر عملکردهای مغـز اثـرات مفیـد دارد و ممکـن اسـت در حفظ سلامت و یا استفاده‌های کلینیکی در پیشگیری و درمان برخـی از اخـتلالات عصـبی نقـش اسـتراتژیک داشته باشد(۱۳).

از جمله محدودیت‌های خارج از کنترل در ایـن تحقیق با توجه به تعداد زیاد رت‌ها عدم بافت بـرداری همزمان از تمامی رت‌ها بود که در یک شیفت کـاری و در یک روز انجام شد. هم‌چنین تزریقات RJ و TMT نیز هم‌زمان برای تمامی رت‌ها صورت نگرفت هر چند کـه در یک شیفت کاری تزریقات بـه اتمـام مـی‌رسـید، لـذا پیشنهاد می‌شود که در تحقیقات آتی و در راستای این پژوهش از دوزهای مختلف RJ استفاده گردد تا تـأثیر میـزان‌هـای مختلـف مصـرف ایـن مـاده طبیعی و سـودمند بـه محـک آزمـایش گذاشـته شـود. هـم‌چنـین در مقایسـه بـا تزریـق درون صـفاقی RJ، مصرف خوراکی این ژل نیز به بوته آزمایش گذاشـته شود.

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.2020.41I می‌باشد. در پایان از تمامی دوستان و همکارانی که در طی مراحل این پژوهش یاری کننده ما بودند، صمیمانه سپاسگزاری می‌نماییم.

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, Mobasseri M, Faramarzi E, Mobasseri 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, Khodagholi 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.Moghadas 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 Haghighian 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.

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

Original Article

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.