

## اثر کوآنزیم کیو ۱۰ بر محافظت عصبی در مدل سلولی و حیوانی بیماری

### پارکینسون القاء شده با ۶- هیدروکسی دوپامین

مهديه آذرشب<sup>۱</sup>، مهدي رهنما<sup>۲</sup>، رامین حاجی خانی<sup>۱</sup>، جلال صولتی<sup>۳</sup>، محمدرضا بیگلدی<sup>۴</sup>

۱- گروه زیست شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران. meh\_rahnama@yahoo.com

۳- گروه زیست شناسی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

۴- گروه زیست شناسی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۸/۶/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۸/۷/۳۰

#### چکیده

زمینه و هدف: بیماری پارکینسون یکی از شایع ترین انواع بیماری های نورودژنراتیو است. علت اصلی بیماری، تخریب نورون های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه در مغز میانی و کاهش غلظت دوپامین در پایانه های جسم مخطط است. این مطالعه، به منظور بررسی اثر کوآنزیم کیو ۱۰ بر مدل سلولی (PD) القاء شده با سم ۶- هیدروکسی دوپامین با کاهش التهاب انجام شد.

روش کار: برای شمارش سلول های زنده از دو روش MTT و BT استفاده شد. برای ایجاد مدل سلولی پارکینسون از سم ۶- هیدروکسی دوپامین استفاده گردید. بعد از گذشت ۴۸ ساعت، درصد سایتوتوکسیسیتی سم و اثر دارو مشخص شد. یک هفته بعد از جراحی کوآنزیم کیو ۱۰ با دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر حسب وزن موش، به صورت گاوآژ به مدت دو هفته مورد درمان و سپس مورد ارزیابی آزمون های رفتاری قرار گرفتند.

یافته ها: در مدل جانوری دوز ۲۵ میلی گرم کوآنزیم کیو ۱۰ اثر قابل ملاحظه ای بر بهبود علائم رفتاری نداشت. اما دوز ۵۰ میلی گرم کوآنزیم کیو ۱۰ اثر قابل ملاحظه ای بر بهبود علائم رفتاری داشت. در مدل سلولی دوز ۲۰ میکروگرم کوآنزیم کیو ۱۰ اثر قابل ملاحظه ای بر بهبود سلول های مبتلا نداشت. اما؛ دوز ۲۵ میکروگرم کوآنزیم کیو ۱۰ اثر قابل ملاحظه ای بر بهبود سلول های مبتلا داشت.

نتیجه گیری: درمان با کوآنزیم کیو ۱۰ به جهت ضد التهابی و آنتی اکسیدانی می تواند مرگ سلول های دوپامینرژیک در بخش جانوری و سلول های اولیه کاتکول آمینرژیک در بخش سلولی را توسط سم ۶- هیدروکسی دوپامین کاهش دهد.

واژه های کلیدی: سلول کاتکول آمینرژیک، ۶- هیدروکسی دوپامین، پارکینسون، کوآنزیم کیو ۱۰.

#### مقدمه

این بیماری در افراد بالای ۵۰ سال تقریباً ۲ درصد گزارش شده است (۲۰،۷). پارکینسون ثانویه در اثر مسمومیت با منگنز، مسمومیت با مونوکسید کربن، ضربه ی مزمن و مداوم به سر و برخی مواد مخدر تزریقی ممکن است

بیماری پارکینسون Parkinson's disease (PD) یک اختلال مزمن پیشرونده و تخریب کننده ی عصبی است که به عنوان دومین بیماری تخریب کننده ی عصبی رایج در بین افراد پس از بیماری آلزایمر می باشد. میزان شیوع

ایجاد گردد که علائمی مشابه با پارکینسون را دارد. در سال ۱۸۱۷ دانشمند بریتانیایی دکتر جیمز پارکینسون اولین گزارش‌های مربوط به بیماری پارکینسون را ارائه داد (۱۷). بیماری پارکینسون همراه با اختلالات حرکتی می‌باشد که می‌توان به سفتی عضلانی، لرزش در حال استراحت، آکینزی، برادیکینزی، مشکل در شروع حرکات، ضعف در حفظ تعادل و تغییر حالت چهره به هنگام صحبت کردن اشاره کرد (۱۷). در اثر این بیماری ۵۰ تا ۷۰ درصد نورون‌های دوپامینرژیک ناحیه متراکم جسم سیاه Substantia Nigra (SN) تخریب می‌شوند (۶). علاوه بر نورون‌های دوپامینرژیک سایر جمعیت‌های نورونی نیز که شامل بخش‌هایی از لوکوس سرلئوس، هسته‌های رافه‌ای و هسته حرکتی پشتی واگ، قشرسینگولیت Cingulate و پیاز بویایی هم تخریب می‌شوند (۹، ۱۶). این بیماری ناشی از یک عدم تعادل بین تحریک و مهار در هسته‌های قاعده‌ای است (پوتامن، هسته دم دار، جسم سیاه، هسته زیر تالاموسی، گلو بوس پالیدوس) که با افزایش استیل کولین نسبت به دوپامین و مهار دوپامینی پوتامن می‌باشد (۱۱). ۶- هیدروکسی دوپامین یک آنالوگ هیدروکسیله شده از انتقال دهنده عصبی دوپامین است. این ترکیب توسط Senob در سال ۱۹۵۹ ایزوله شد. آثار بیولوژیکی آن اولین بار توسط Porter و همکارانش بررسی شد. آن‌ها نشان دادند که ۶- هیدروکسی دوپامین قادر به القاء کاهش نورآدرنالین در سیستم عصبی خودمختار و قلب است. همچنین این سم قادر به تخریب پایانه‌های نورونی در سیستم سمپاتیک می‌باشد (۱۹). نورون‌های دوپامینرژیک حاوی

سطوح معنی‌داری از دوپامین، هیدروژن پراکسید و آهن آزاد می‌باشند که یک واکنش غیر آنزیمی بین این عناصر ممکن است منجر به شکل‌گیری ۶- هیدروکسی دوپامین گردد. ۶- هیدروکسی دوپامین آسیب به نورون‌های دوپامینرژیک جسم مخططی - جسم سیاه را از طریق تولید هیدروژن پراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل القاء می‌کند (۳). یک ترکیب بنزوکینون محلول در چربی آندروژن است که به طور طبیعی در بیشتر بافت‌های بدن یافت می‌شود. از مهم‌ترین مواد مورد نیاز جهت سلامتی و حیات سلول‌ها است که جهت تولید انرژی داخل سلولی ضروری است (۱). کوآنزیم Q10 در تولید ATP در سلول نقش دارد و در زنجیره‌ی انتقال الکترون در چرخه‌ی تنفسی باعث انتقال الکترون‌ها از مولکول‌های احیاء‌کننده به پذیرنده‌های الکترون در میتوکندری می‌شود و بیشترین مقدار آن نیز در غشای داخلی میتوکندری موجود است. کوآنزیم Q10 هم‌چنین دارای خاصیت ثابت شده‌ی آنتی‌اکسیدانی و ضد رادیکال آزاد می‌باشد که این خاصیت حدود ۵۰ برابر بیشتر از ویتامین E است و در نتیجه از آسیب اکسیداتیو و پراکسیداسیون چربی‌های غشاء و هم‌چنین آسیب‌های ژنوم در سلول جلوگیری می‌کند. امروزه از کوآنزیم Q10 در درمان بیماری‌های نارسایی قلبی، بیماری‌های اعصاب مثل آلزایمر و پارکینسون، اختلالات باروری، نارسایی ایمنی، بیماری‌های پوست، بیماری‌های چشم و دیابت استفاده می‌شود. هم‌چنین ثابت شده است که عوارض جانبی کوآنزیم Q10 بسیار اندک و ناچیز است. این ترکیب در داخل بدن به طور طبیعی سنتز شده ولی میزان آن با افزایش سن، کاهش می‌یابد (۴). کوآنزیم Q10 یک مولکول لیوفیلیک است. وجود آن در واکنش‌های آنزیمی فسفریلاسیون اکسیداتیو لازم

۴۵ سرموش کوچک آزمایشگاهی نر بالغ نژاد NMRI با محدوده وزنی ۳۰ گرم از انستیتو پاستور ایران تهیه و در قفس های ۴ تایی و تحت شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و محدوده دمایی ۲۲-۲۵ درجه ی سانتی گراد نگهداری می شوند. همه ی جانوران دسترسی آزاد به آب و غذای استاندارد را داشته و حداقل ۱۰ روز پس از آدپتاسیون به محیط مورد استفاده قرار می گیرند.

#### گروه بندی جهت ایجاد مدل جانوری پارکینسون:

در این مرحله موش ها به صورت تصادفی به گروه های زیر تقسیم می شوند:

۱- گروه کنترل: این گروه حلال سالین حاوی ۱٪ اسید اسکوربیک را به صورت تزریقی به درون استریاتوم سمت چپ مغز خود دریافت خواهند کرد (۱۰ سر).

۲- گروه تیمار: موش های گروه تیمار  $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  از حلال HDOP - 6 حاوی ۱٪ اسید اسکوربیک را به صورت تزریقی به درون استریاتوم سمت چپ مغز خود دریافت خواهند کرد (۴۰ سر).

#### گروه بندی جهت درمان مدل جانوری پارکینسون

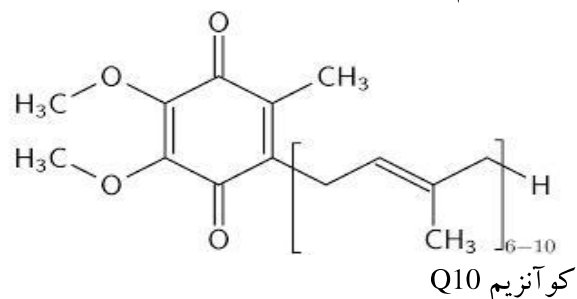
در این مرحله در واقع ۴۰ سر موشی که پارکینسون در آن ها ایجاد شده گروه بندی و سپس با دارو ها درمان تیمار گردیدند

۱- گروه کنترل که فقط آب مقطر حلال Q10 را به صورت گاوژدریافت می نمایند (۱۰ سر).

۲- گروه تیماری با Q10 با دوزهای (۲۵، ۵۰، ۱۰۰ mg/kg) را به صورت گاوژ دریافت می نمایند (۳۰ سر).

حدود ۱٪ اسید اسکوربیک (ویتامین C) به محلول گروه کنترل و نورو توکسین گروه های تیمار در مرحله ایجاد مدل جانوری اضافه می گردید تا در فاصله زمانی چند دقیقه انتقال به سلول های دوپامینرژیک نیگرا، از

است. کوآنزیم Q10، علاوه بر انتقال الکترون ها در زنجیره تنفسی میتوکندریایی، در برخی از اعمال اصلی سلول از قبیل انتقال الکترون در غشا پلاسمایی و لیزوزومی، تعدیل آپوپتوز، انتقال پروتون، مهار پراکسیداسیون لیپیدی و در مواردی به عنوان عامل پرواکسیدان مطرح است (۱۴). هم چنین، در موش های فاقد آپولیپروتئین E، کوآنزیم Q10 مانع وقوع آتروسکلروز می شود (۸). از طرف دیگر، شواهد بیان گر نقش حفاظتی کوآنزیم Q10 در سلول های عصبی است. چنان که در شرایط ایسکمی و توکسیسیته، کوآنزیم Q10 با مهار استرس اکسیداتیو مانع آسیب رسیدن به نورون ها می شود (۱۳). به علاوه، در موش صحرایی، کوآنزیم Q10 با اثر بر اسیدوز منتج از لاکتات و تولید ATP و تعدیل نسبت فرم اکسید و احیا شده گلوکوتایون و فعالیت سوپراکسید دیسموتاز اثر حفاظتی خود را در مدل ایسکمی القا شده از طریق آندوتلین اعمال می کند. از آنجایی که کوآنزیم Q10 به عنوان یک جمع کننده رادیکال های آزاد دارای اثرات آنتی اکسیدانی است، در اختلالات منتج از ایسکمی-رپرفیوژن مغز که به دنبال تجمع رادیکال های آزاد اکسیژنی و متابولیسم غیرطبیعی انرژی حادث می شود، می تواند نقش حفاظتی خود را از طریق بهبود متابولیسم انرژی مغز ایفا نماید (۲۱).



#### مواد و روش ها

#### مدل جانوری پارکینسون:

گذاری می شود (ML محور میانی - جانبی، DV محور پشتی - شکمی، AP محور قدامی - خلفی). جهت بررسی محل دقیق کانول برای تعدادی از موش‌ها مرکب و یا رنگ متیلن بلو تزریق شده و سپس با برش بافتی محل دقیق قرار گیری کانول و تزریق ۶- هیدروکسی دوپامین (6-OHDA)، مشخص می‌شود. بر اساس مدل تعریف شده در مطالعات (تمرینی قبلی و تجربی) برای پارکینسون، کانول گذاری و تخریب استریاتوم فقط یک طرفه و در نیمکره چپ انجام می‌شود. پس از سوراخ کردن محل مورد نظر به کمک دریل دندانپزشکی، ۵ میکروگرم نورتوکسین ۶- OHDA در یک درصد اسید اسکوریک به صورت یک طرفه درون SNC با استفاده از سرنگ هاملتون ۵ میکرولیتری تزریق شد. به منظور جلوگیری از بازگشت محلول محتوی OHDA-6 به درون سرنگ و برای انتشار بهتر محلول در منطقه SNC، سرسوزن به مدت ۱ دقیقه پس از تزریق در جای خود ثابت ماند.

#### تهیه محلول نورتوکسین OHDA-6:

نورتوکسین OHDA-6 از شرکت TOCRIS آمریکایی خریداری شد. برای این منظور می‌توان نورتوکسین را در دوز ۶ میکروگرم در ۲ میکرولیتر محلول نمکی ۰/۹٪ و یک درصد ویتامین C حل کرد.

#### تست های تاییدی مدل پارکینسون:

##### الف) تست های رفتاری:

۱- چرخش ناشی از تزریق آپومورفین: یک هفته بعد از ایجاد مدل پارکینسونی، آپومورفین هیدروکلراید با دوز ۵ mg/kg. وزن موش به صورت داخل صفاقی تزریق خواهد شد. حیوانات از ۱۰ دقیقه قبل از شروع آزمایش به یک محفظه استوانه ای مدرج بر حسب زاویه از جنس پلکسی گلاس به قطر ۳۳ و ارتفاع ۳۵ سانتی متر منتقل می‌شوند. یک دقیقه پس از تزریق

اکسیده شدن HDOP - 6 جلوگیری نماید. چون دوپامین و مشتقات آن در محیط مایع سریع اکسیده می‌شوند. در ضمن خود ویتامین C هم ناپایدار است که باید زودتر مصرف شود.

#### تکنیک اجرایی ایجاد مدل جانوری پارکینسون:

ایجاد مدل جانوری با روش استریوتاکسی:

استریوتاکسی: Stereotaxy روشی با کمترین تهاجم و دقت بیشتر، برای جراحی مغز و اعصاب است که در آن مختصات سه بعدی نقطه مورد نظر بررسی و محل دقیق تزریق مشخص می‌شود. در این پژوهش به منظور تزریق ۶- هیدروکسی دوپامین درون استریاتوم، کانول که از سر سوزن شماره ۲۱ ساخته شده است، با روش جراحی استریوتاکسی در ناحیه مغز موش قرار داده می‌شود. بدین منظور موش‌ها پس از بی‌هوشی به وسیله مخلوط کتامین با دوز ۱۰۰ mg/kg و زایلازین با دوز ۱۰ mg/kg به صورت تزریق داخل صفاقی تحت عمل جراحی قرار خواهند گرفت. سر حیوان توسط میله جلویی مهار و میله های کناری داخل هر دو گوش قرار گرفته و حیوان در دستگاه استریوتاکس ثابت و بی حرکت می‌ماند. موهای ناحیه پشتی جمع‌گه تراشیده شده و با پنبه و الکل پوست سر ضد عفونی می‌شود. یک برش نیم سانتی در ناحیه ایجاد کرده و با پنبه الکلی چربی های محل را پاک نموده تا نقطه برگما (محل اتصال استخوان های آهیانه و پیشانی) و لامبدا (محل اتصال استخوان های آهیانه و پس سری) در یک امتداد به طور واضح دیده شود. نشان گر دستگاه روی نقطه برگما و سپس لامبدا قرار می‌گیرد. به کمک دستگاه استریوتاکسی USA, Stoelting و طبق اطلس آموزشی (Watson and Paxinos) مختصات مغز موش برای ناحیه AP: +0.04 cm, ML: ±0.18, DV: -0.35 cm پیدا شده و کانول جای

از آنجایی که سلول ها به صورت منجمد در فریزر  $80^{\circ}\text{C}$  - برای کوتاه مدت و تانک ازت  $196^{\circ}\text{C}$  - برای طولانی مدت نگهداری شدند، اولین اقدام برای مطالعه و استفاده از این سلول ها دفریز کردن است که باید بسیار سریع صورت گیرد. میکروویال حاوی استوک سلولی خارج شده از فریزر یا تانک ازت، در تماس با دست با حرارت  $37^{\circ}\text{C}$  بدن تحت تاثیر قرار می گیرد. درب میکروویال به آرامی باز شده و آن مقدار از سلول که ذوب شده به فالكون منتقل می شود. این عمل تا ذوب شدن کامل و خالی شدن استوک سلولی، به آهستگی پیتاژ می شود. فالكون حاوی سلول به مدت ۶ دقیقه و با سرعت  $2000\text{ rpm}$  سانتریفوژ سوسپانسیون سلولی تهیه گردید.

### ۳- شمارش سلولی با رنگ تریپان بلو

برای شمارش سلول ها با این روش از یک قطره رنگ تریپان بلو و لام نئوبار استفاده شد. در این روش تعداد سلول ها در یک سطح معین با عمق مشخص شمارش شده و غلظت سلولی محاسبه و مقدار محیط برای محاسبات تعداد سلول در نظر گرفته می گردد. برای شمارش سلولی حجم برابری از رنگ تریپان بلو و سوسپانسیون سلولی تهیه شده، با هم مخلوط می شوند. ۱۰ ماکرولیتر تریپان بلو و ۱۰ ماکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با هم مخلوط شده و ۱۰ ماکرولیتر از این مخلوط روی لام نئوبار به زیر میکروسکوپ منتقل می شود. سلول ها در میکروسکوپ نوری معمولی invert با بزرگنمایی  $10 \times$  شمارش می شوند. تعداد سلول های زنده در هر ۵ بخش لام شمارش شده و میانگین گرفته می شود

### ۴- تعویض محیط کشت سلول ها

بسته به سرعت رشد و متابولیسم و نوع سلول ها، بعد از مدت زمان مشخصی سلول ها به تعویض محیط کشت نیاز دارند. رشد سلول ها با افت pH از ۷ به ۶/۵

آپومورفین، تعداد چرخش در فواصل زمانی ۱۰ دقیقه- ای به مدت کل ۶۰ دقیقه تحت شرایط آرام توسط یک شمارش گر دستی اندازه گیری خواهد شد. با توجه به ناحیه ی آسیب دیده، تعداد چرخش ایپسیترال (چرخش به سمت چپ) به عنوان عدد منفی و تعداد چرخش کنتراترال (چرخش به سمت راست) به عنوان عدد مثبت در نظر گرفته شده و تعداد خالص چرخش به صورت تفاضل چرخش ها در دو جهت محاسبه می شود. این آزمون طبق روش شرح داده شده توسط Cesario و همکارانش در سال ۱۹۹۵ صورت می گیرد. در این آزمون موش های پارکینسونی بیش از ۳۰ چرخش در یک ساعت بر خلاف جهت تزریق نوروتوکسین را نشان می دهند. تعداد این چرخش ها در واحد زمان نشان دهنده شدت تخریب نورونی در جسم سیاه و شدت بیماری است.

### تکنیک اجرایی ایجاد مدل سلولی پارکینسون:

#### کشت سلول

#### ۱- تهیه محیط کشت

محیط کشت مورد استفاده در این مطالعه Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM Medium) است که به صورت پودر خریداری شد. برای تهیه ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت به مقدار  $1/04$  گرم پودر RPMI و  $0/2$  گرم پودر بی کربنات وزن کرده با آب دیونیزه شده به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده می شود. برای تهیه محیط کامل، به محیط کشت تهیه شده به مقدار ۱۰ میلی لیتر  $10\%$  FBS (Fetal bovine serum) و ۱ میلی لیتر مخلوط آنتی بیوتیک های پنی سیلین و استرپتومایسین ( $1\%$ ) در شرایط استریل اضافه می شود و بعد از تهیه، داخل یخچال  $4^{\circ}\text{C}$  نگهداری می گردد.

#### ۲- دفریز یا ذوب کردن سلول ها

متوقف شده و در محدوده pH ۶/۵ تا ۶ آغاز می شود . تغییر PH ۰/۱ در یک روز تغییر چندانی در رشد سلول ها ایجاد نمی کند ولی تغییر ۰/۴ در اسیدیته نشان دهنده ی این است که در فاصله ۲۴ تا ۴۸ ساعت باید مواد غذایی به محیط کشت اضافه شود . اگر سلول ها سریع تکثیر شوند و رشد کنند ، مواد غذایی محیط کشت زودتر و بیشتر استفاده می شود . اگر محیط کشت داخل فلاسک تغییر رنگ داده باشد نشان دهنده ی تغییر pH است . اگر رنگ محیط از قرمز به زرد تغییر کند نشان گر زمان تعویض محیط است . بنابراین محیط سلول ها بسته به نوع سلول باید هر ۲۴-۴۸ ساعت تعویض شود . تعویض به این صورت است که فلاسک حاوی سلول از دستگاه انکوباتور خارج شده و بعد از مشاهده میکروسکوپی ، محیط قبلی داخل فلاسک را دورریز و محیط کشت کامل تازه که دمای آن به ۳۷ °C رسیده را با پیپت داخل فلاسک می ریزیم .

#### ۵- پاساژ دادن سلول ها

زمانی که سلول ها تکثیر پیدا کند و تراکم سلولی در کف فلاسک به ۸۰٪ برسد ، موجب کمبود فضای کافی برای رشد و تکثیر سلول ها می شود . بنابراین سلول ها نیازمند فضای بیشتر بوده در این حالت سلول ها باید به دو یا چند فلاسک مورد نیاز پاساژ داده شوند .

#### مراحل پاساژ سلول های چسبنده به ترتیب زیر انجام می شود :

۱ - فلاسک حاوی سلول را بعد از بررسی میکروسکوپی و اطمینان از عدم آلودگی به زیر هود لامینار منتقل کرده، و برای حذف باقی مانده سرم جنین گاوی ( FBS )، سلول ها ۲ مرتبه با بافر-phosphate buffered saline شسته می شوند . ۲- بافر PBS را از فلاسک خارج نموده ، برای جدا کردن سلول ها از کف فلاسک از 1X (Trypsin-EDTA) استفاده می شود. Trypsin دارای خاصیت آنزیمی است و

موجب کنده شدن سلول ها از ته فلاسک می شود که با EDTA ترکیب شده Trypsin - EDTA به صورت منجمد در میکروویال های ۱/۵ یا ۲ میلی لیتری در فریزر ۲۰°C - نگهداری می شود . به میزان ۰/۱ میلی لیتر به ازای هر سانتی متر مربع از سطح ظرف ، Trypsin - EDTA در فلاسک ریخته می شو .

۳- بعد از گذشت ۳ تا ۵ دقیقه ، سلول ها از کف ظرف کنده شده و شناور می شوند . پس از مشاهده سلول ها در زیر میکروسکوپ و حصول اطمینان از جدا شدن آن ها ، برای جلوگیری از اثر تخریبی تریپسین بر سلول ها ، به محیط کشت ۱۰٪ FBS اضافه می شود تا اثر هضم کنندگی تریپسین بر سلول را خنثی کند . محتویات فلاسک بعد از چند بار پیپتاژ ، با پیپت جمع آوری شده و داخل یک فالكون ۱۵ ریخته می شود و سلول ها به مدت ۶ دقیقه با دور ۲۰۰۰ سانتریفوژ می شود . سپس، محلول حاوی آنزیم تریپسین دورریز می شود و ته فالكون پلاک سلولی تشکیل می گردد که با محیط کامل تازه ، به فلاسک های جدید منتقل می شود .

#### ۶- ذخیره و منجمد کردن سلول ها

به دلیل ننگه داری سلول ها برای مطالعات بعدی ، جلوگیری از پیری سلول ها و کاهش تغییرات ژنتیکی و مورفولوژی آن ها ، ذخیره کردن سلول ها به صورت منجمد ، بهترین روش می باشد . در این روش سوسپانسیون سلولی باید با غلظت زیاد و در حضور یک cryoprotective مانند DMSO فریز شود. cryoprotective با کاهش نقطه انجماد باعث کاهش سرعت فریز شدن سلول ها می گردد . این انجماد تدریجی، ریسک تشکیل بلورهای یخ و در نتیجه آسیب سلولی را کاهش می دهد . برای تهیه ذخیره سلولی و فریز کردن ، ابتدا پس از تهیه سوسپانسیون سلولی سلول ها سانتریفوژ می شوند . برای تهیه

هیدروکسی دوپامین از اکسیده شدن استفاده می شود. سلول های مورد استفاده محیط کشت از سلول های کاتکولامینرژیک هستند. شیه سلول های دوپامینی مغز بوده و در حقیقت سلول اولیه سلول های دوپامینی می باشند. در این مدل خود سلول های دوپامینی به دلیل سمیت استفاده نمی شوند. غلظت های استفاده شده برای محلول ۶ - هیدروکسی ۵۰ و محلول های کوآنزیم کیو ۱۰ با دوزهای ۲۰، ۲۵، ۳۰ میکروگرم بود که با فیلتر سرنگی استریزه شده و با سمپلر به محیط کشت اضافه می شود.

محیط کشت یک: فقط محیط کشت سلول های کاتکولامینرژیک.

محیط کشت دو: فقط حلال DMSO.

محیط کشت سه: ۶ - هیدروکسی دوپامین به همراه کیو ۱۰.

محیط کشت چهار: حلال DMSO به همراه ۶ - هیدروکسی دوپامین

محیط کشت پنج: فقط ۶ - هیدروکسی دوپامین  
محیط کشت شش: حلال DMSO + محلول MTT  
بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون به تمام محیط ها محلول MTT اضافه شد.

۹ - بررسی اثرات داروها

برای انجام این تست ابتدا سوسپانسیون سلولی تهیه و شمارش سلولی انجام شد که مشخص شود چه تعداد از سلول ها زنده مانده اند. سپس سلول ها به تعداد ۵۰۰۰ در هر چاهک به پلیت ۹۶ خانه ته صاف با محیط کشت کامل منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور CO<sub>2</sub> با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری و پس از ۲۴ ساعت محیط کشت قبلی سلول ها با محیط کشت تازه که تیمارها در آن صورت گرفته بود تعویض شد.

غلظت های مختلف از ۶ - هیدروکسی دوپامین و کوآنزیم کیو ۱۰ تهیه شده و ۱ ماکرولیتر از هر یک از

استوکی (Stock) به حجم ۱ میلی لیتر ۹۰۰ ماکرولیتر سرم FBS به پلاک سلولی داخل فالكون اضافه شده و پیتاژ انجام می شود. سپس سوسپانسیون سلولی به میکروویال منتقل شده و ۱۰۰ ماکرولیتر DMSO به آن اضافه می شود. به سرعت میکروویال حاوی سلول به مدت ۱ تا ۲ ساعت در فریزر °C ۲۰ - قرار داده می شود. بعد به فریزر °C ۷۰ - منتقل می شود. در صورت نیاز برای نگه داری طولانی مدت بعد از ۲۴ ساعت به تانک ازت °C ۱۹۶ - منتقل می گردد و مشخصات کامل سلولها ثبت می گردد.

۷ - سنجش توان حیاتی سلول ها

یکی از موارد مهم در بحث زیست شناسی سلولی تعیین بقای سلول است. از جمله آزمایش هایی که در این زمینه از اهمیت خاصی برخوردار است سنجش توان حیاتی سلول ها (Cell Viability) تست MTT است. در این تست محلول زرد رنگ تهیه شده از پودر [4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl- tetrazolium bromide (MTT) توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز سلول های زنده و فعال از نظر متابولیکی، در مدت ۴ ساعت در انکوباتور، به بلورهای ارغوانی رنگ فورمازان تبدیل می شود. کریستال های فورمازان ساخته شده در آب غیر محلول است و به کمک حلال DMSO حل شده و جذب نوری محلول ارغوانی رنگ به وسیله دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده می شود. در نهایت به کمک منحنی استاندارد تعداد سلول های زنده محاسبه می شود. برای هر رده سلولی ارتباط خطی بین تعداد سلول ها و جذب نوری محلول نهایی وجود دارد.

۸ - ایجاد مدل سلولی پارکینسون:

در این مطالعه نیز نوروتوکسین ۶ - هیدروکسی دوپامین به همراه کوآنزیم کیو ۱۰ در حلال سالین با اضافه کردن ۱٪ اسید اسکوربیک به عنوان محافظ ۶ -

داروی کوآنزیم Q10 به علت داشتن خاصیت آنتی اکسیدانتی می تواند از پیشرفت بیماری پارکینسون جلوگیری کند. نتایج حاصل از این پژوهش در دو بخش بررسی می شود.

#### الف) ایجاد و تایید بیماری پارکینسون:

تزریق آپومورفین باعث افزایش معناداری در چرخش موش های پارکینسونی در مقایسه با گروه کنترل شده است ( $P < 0.001$ ) (نمودار ۱). افزایش معنی دار کاتالپسی در گروه های تیماری که به بیماری پارکینسون مبتلا شده اند مشاهده می گردد (نمودار ۲).

نمودار ۳: بعد از تزریق ۶- هیدروکسی دوپامین به گروه تیمار کاهش معنی داری در تعداد نوروں های هسته سابستانتیکا نیگرا نسبت به نوروں های گروه کنترل مشاهده می شود (نمودار ۳).

#### ب) اثرات دوزهای کوآنزیم Q10 بر روی موش های پارکینسونی شده:

تعداد چرخش های ناشی از تزریق آپومورفین به گروه کنترل (آب) و تیمار دریافت کننده دوزهای ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ کوآنزیم Q10 در نمودار ۴ نشان داده است. نتایج به دست آمده نشان می دهد که هر سه دوز Q10 به طور معنی داری تعداد چرخش های ناشی از آپومورفین، نسبت به گروه کنترل دریافت کننده آب، را کاهش داده اند ( $P < 0.001$ ). در خصوص زمان کاتالپسی و مدت زمان بی حرکتی در آزمون تست شنای اجباری دوز ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۰۰ کوآنزیم Q10 داد (نمودار ۵ و ۶). در خصوص تعداد دفعات ورود موش به بازوی بازوبسته ماز، برای ارزیابی آزمون اضطراب در گروه کنترل دریافت کننده آب و تیمار دریافت کننده دوزهای ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ کوآنزیم Q10 است و این تعداد در گروه تیمار با دوز ۵۰ بیشتر شد که نشانه کاهش اضطراب و بهبود بیماری پارکینسون است (نمودار ۷). در خصوص درصد زمان گذرانده در

غلظت های تهیه شده برداشته و با محیط کشت کامل به حجم ۲۰۰ ماکرولیتر رسانده و سپس به داخل چاهک ریخته می شود در ضمن هر تیمار برای خود دارای پنج چاهک است. و بعد پلیت ها به انکوباتور برگردانده می شود. غلظت نهایی ترکیبات برای زمان ۴۸ ساعت تیمار در داخل چاهک برای ۶- هیدروکسی دوپامین ۵۰، و برای کوآنزیم کیو ۱۰ دوز ۲۵ و ۳۰ میکروگرم خواهد بود. در هر پلیت پنج چندچاهک به عنوان کنترل در نظر گرفته می شود. پس از ۴۸ ساعت پلیت از انکوباتور خارج و محیط کشت حاوی تیمارها تخلیه شده و ۲۰۰ ماکرولیتر محلول MTT به هر چاهک اضافه می شود (با غلظت نهایی ۰/۵ mg/ml). اضافه کردن محلول MTT به چاهک ها باید در تاریکی و دور از نور مستقیم انجام شود. سپس، پلیت رابا فوئل پوشانده و به مدت ۴ ساعت انکوبه می شود. بعد از ۴ ساعت، بلورهای فورمازان ظاهر شده و به هر چاهک ۲۰۰ ماکرولیتر DMSO اضافه می شود و بلورهای ارغوانی فورمازان حل شده و جذب نمونه ها در ۵۷۰ nm با دستگاه الایزا اندازه گیری می گردد و درصد سایتوتوکسیسیتی ۶- هیدروکسی دوپامین و -dose response دارو محاسبه می شود که کوآنزیم کیو ۱۰ تا چه حد توانسته از سلول های کاتکولامینرژیک در مقابل نوروٹوکسین محافظت کند.

#### نتایج

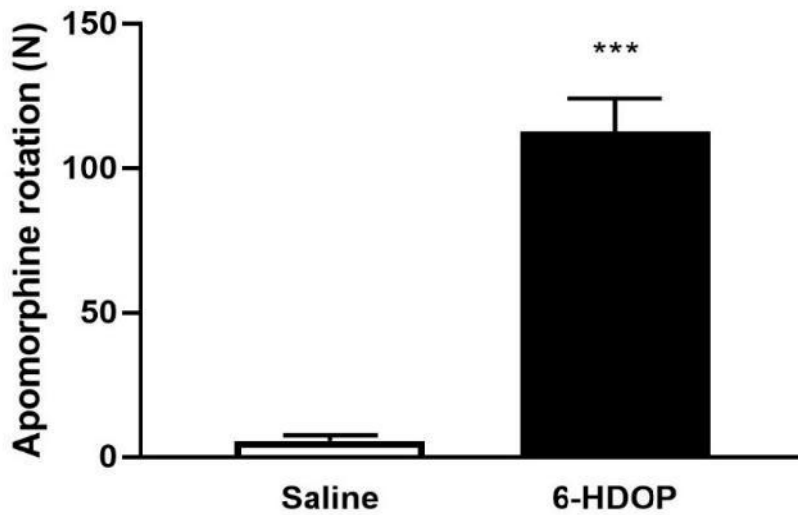
##### بررسی یافته ها و نتایج در بخش جانوری

بر اساس تجزیه و تحلیل آماری مشخص شد که در این پژوهش تفاوت معناداری در گروه تیماری با کوآنزیم کیو ۱۰ نسبت به موش های گروه کنترل وجود دارد. یافته های این تحقیق نشان دهنده اثرات نوروٹوکسین ۶- هیدروکسی دوپامین بر جسم سیاه برای ایجاد بیماری پارکینسون با تخریب نوروں های دوپامینرژیک است و نیز در این پژوهش به این نتیجه رسیده شد که مصرف

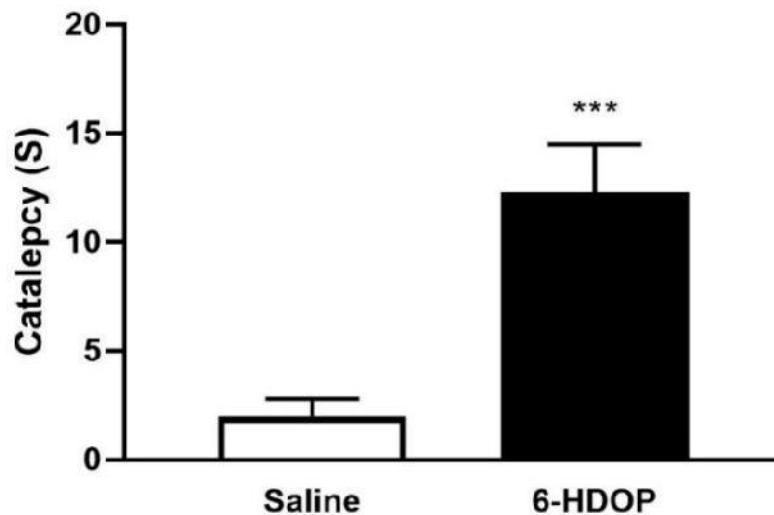


و پارکینسونی تیمار شده با دوزهای ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ کوآنزیم Q10 برحسب mg/kg وزن بدن موش است. که تعداد نورون ها با دوز ۱۰۰ محافظت بیشتری داشت (نمودار ۹).

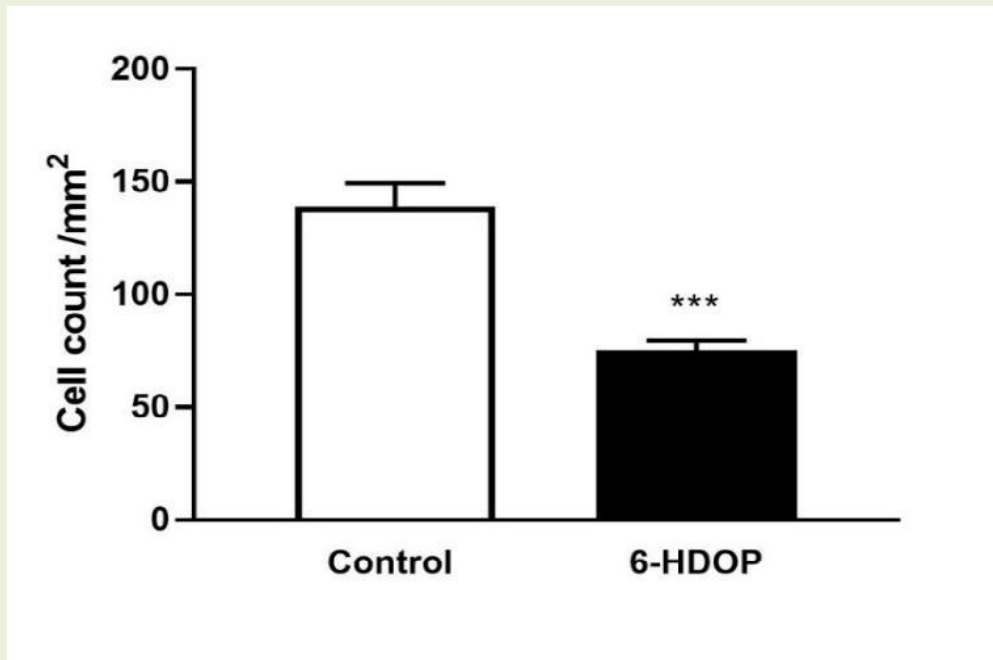
بازوی باز ماز گروه کنترل دریافت کننده آب و تیمار دریافت کننده دوزهای ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ کوآنزیم Q10 است و درصد این فعالیت در گروه تیمار با دوز ۱۰۰ افزایش معنی داری دارد (نمودار ۸). در خصوص بررسی تعداد نورون ها در هسته سابستنتیا نیگرای گروه کنترل



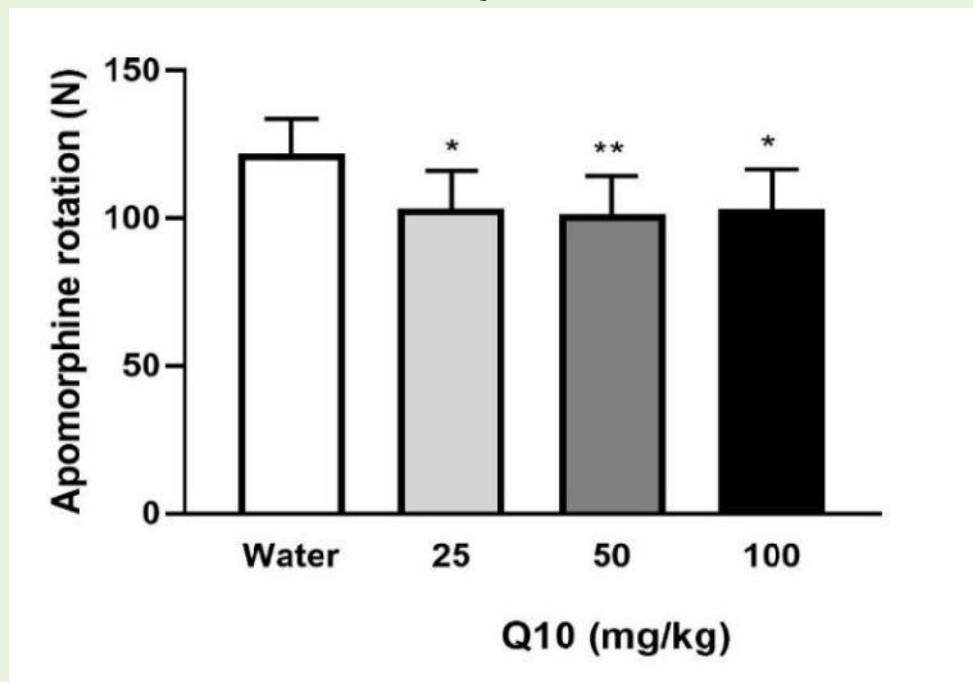
نمودار ۱- مقایسه چرخش ناشی از تزریق آپومورفین در گروه کنترل و گروه پارکینسونی شده با 6-HDOP.



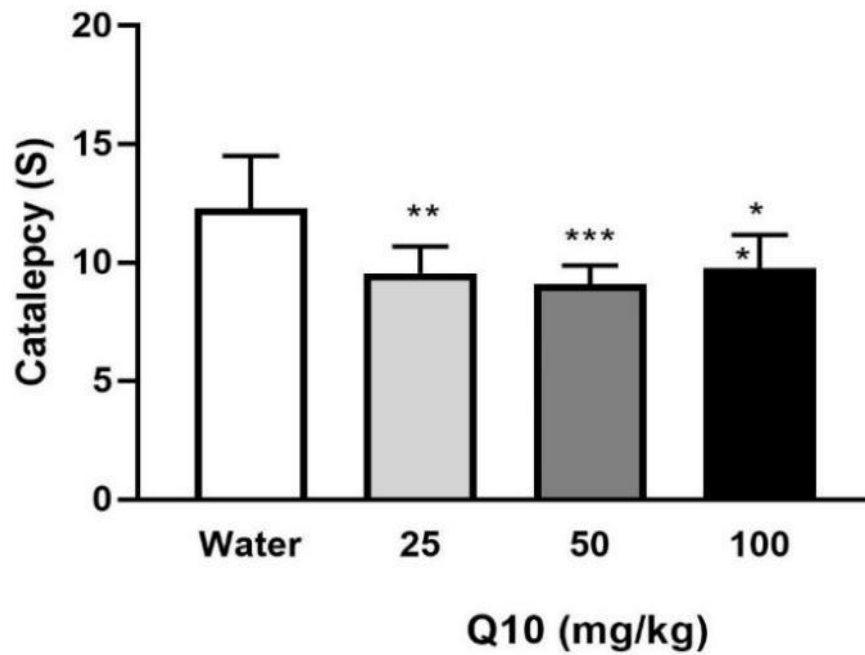
نمودار ۲- نتایج تزریق سالیین به گروه کنترل و تزریق ۶- هیدروکسی دوپامین به گروه های تیماری و افزایش کاتالپسی در گروه های تیماری که نشان دهنده آن است که به بیماری پارکینسون مبتلا شدند.



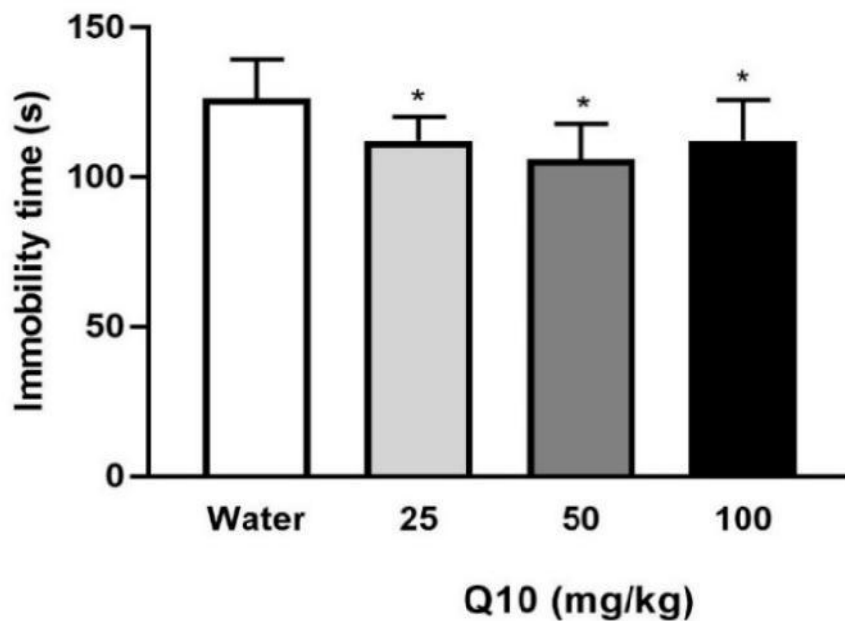
نمودار ۳- نتایج شمارش تعداد نورون ها در هسته سابستانتیقا نیگرا بعد از تزریق ۶-هیدروکسی دوپامین به گروه های بیماری است که نشان می دهد موش های بیمار به بیماری پارکینسون مبتلا شدند. هر ستون نشان دهنده Mean±SEM و  $P < 0.001$  \*\*\*



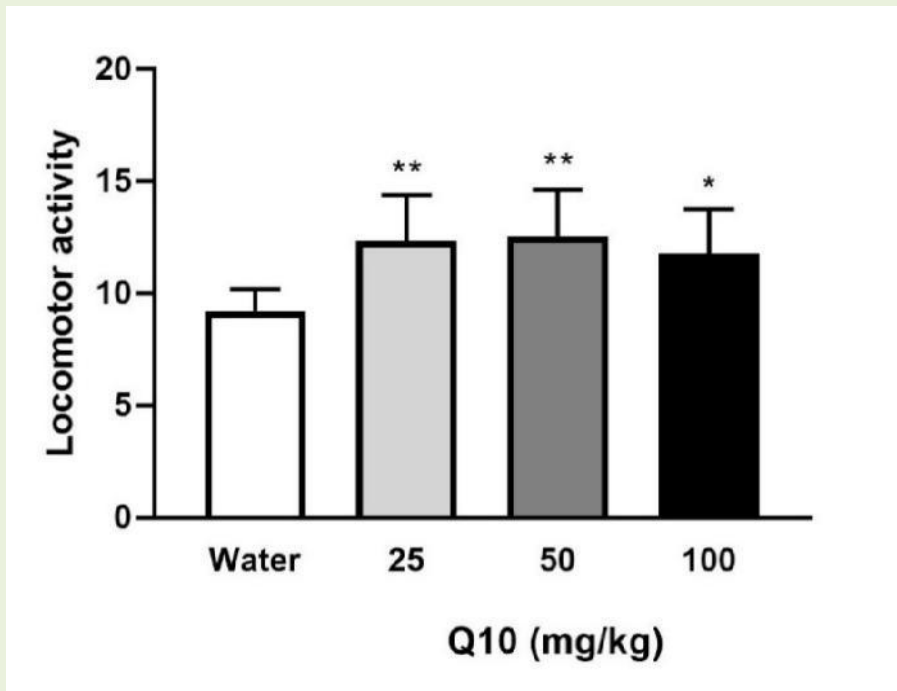
نمودار ۴- چرخش ناشی از تزریق آپومورفین در موش های پارکینسونی بیمار شده با آب و دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم کوآنزیم Q10 هر ستون نشان دهنده Mean±SEM  $p < 0.05$  \* و  $p < 0.01$  \*\*



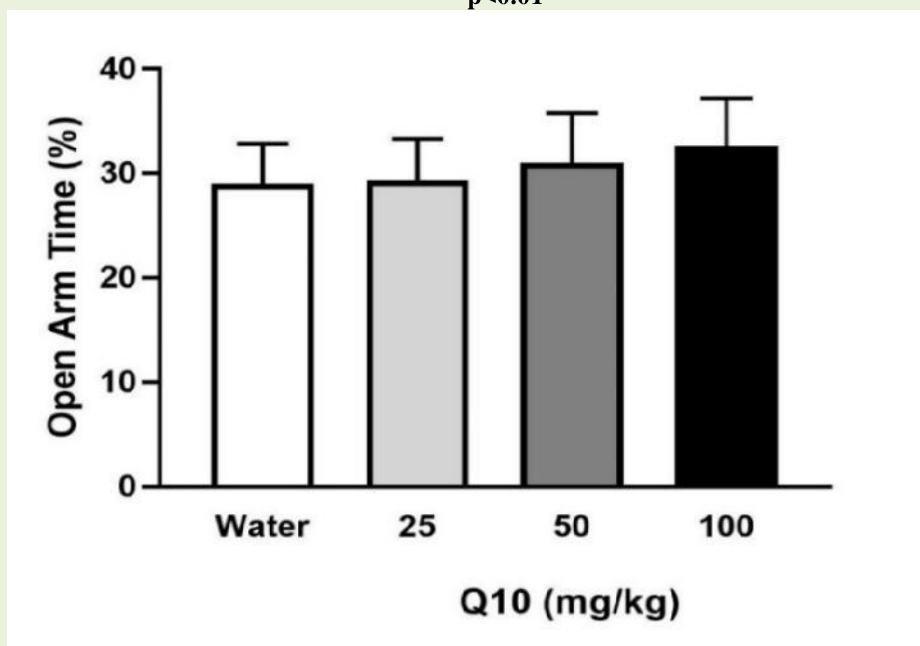
نمودار ۵ - نتایج حاصل از بررسی رفتار کاتالپسی در گروه کنترل و پارکینسونی تیمار شده با دوزهای ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ کوآنزیم Q10 بر حسب mg/kg وزن بدن موش هر ستون نشان دهنده Mean±SEM و  $P < 0.001$ \*\*\* و  $p < 0.01$ \*\*



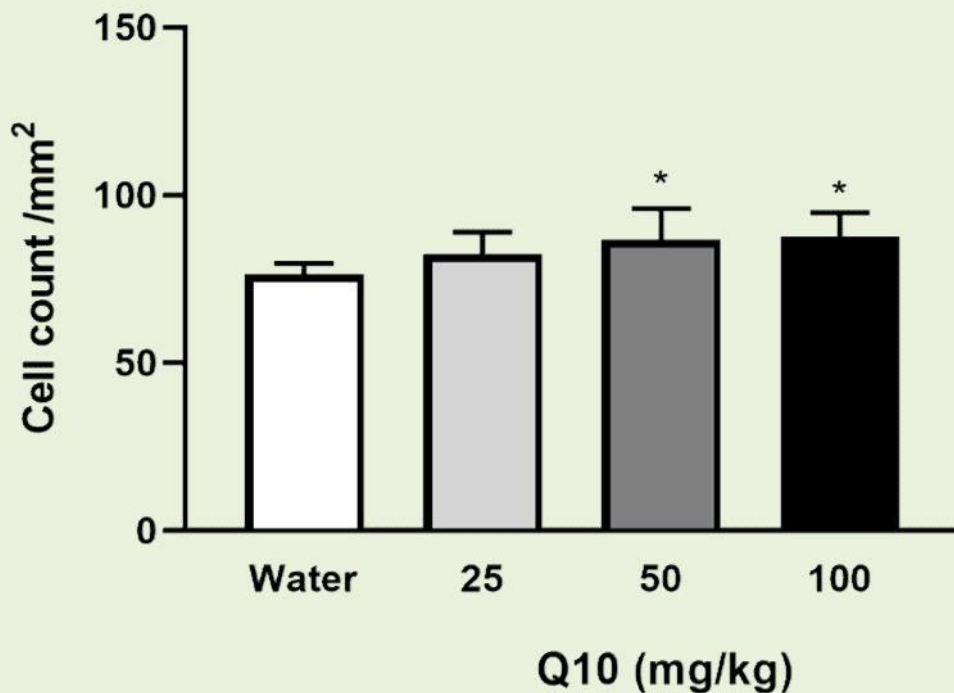
نمودار ۶ - نتایج حاصل از بررسی زمان بی حرکتی درشنای اجباری برای تست افسردگی در گروه کنترل و پارکینسونی تیمار شده با دوزهای کوآنزیم Q10 بر حسب mg/kg وزن بدن موش. هر ستون نشان دهنده Mean±SEM و  $p < 0.05$ \*



نمودار ۷- نتایج حاصل از بررسی زمان رفتار فعالیت حرکتی در ماز برای تست اضطراب در گروه کنترل و پارکینسونی تیمار شده با دوزهای ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ کوآنزیم Q10 بر حسب mg/kg وزن بدن موش هر ستون نشان دهنده Mean ± SEM  $p < 0.05$  \* و  $p < 0.01$  \*\*



نمودار ۸- نتایج حاصل از بررسی زمان رفتار حضور موش در بازوی باز ماز در گروه کنترل و پارکینسونی تیمار شده با دوزهای ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ کوآنزیم Q10 بر حسب mg/kg وزن بدن موش Mean ± SEM و  $P < 0.001$  \*\*\*,  $p < 0.01$  \*\*,  $p < 0.05$  \*



نمودار ۹- نتایج حاصل از بررسی تعداد نوروها در هسته سابستنتیا نیگرای گروه کنترل و پارکینسونی تیمار شده با دوزهای ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ کوآنزیم Q10 بر حسب mg/kg وزن بدن موش هر ستون نشان دهنده Mean±SEM و \* p<0.05

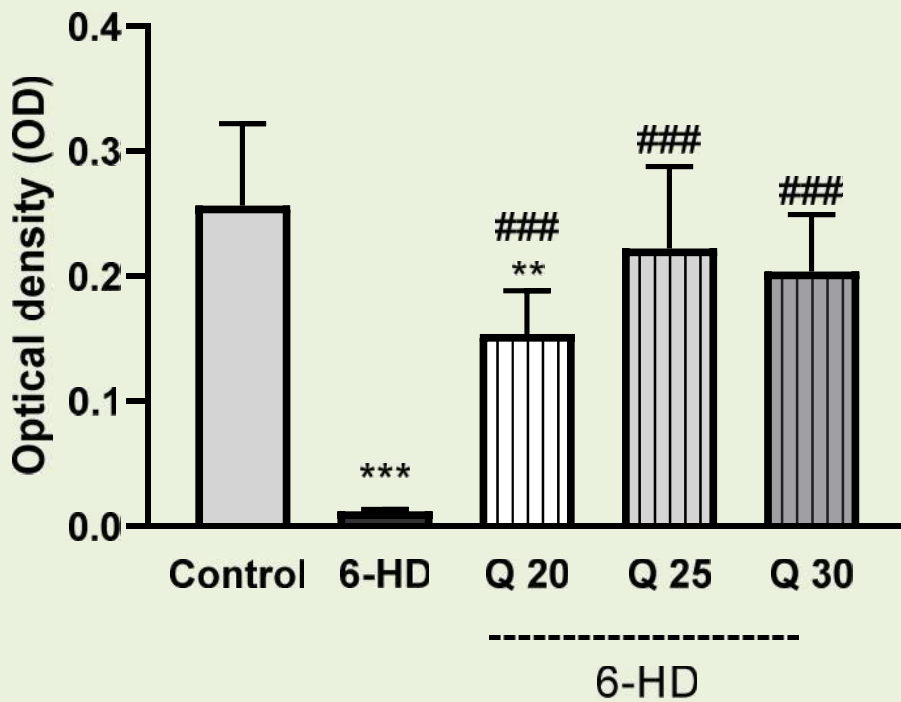
در آزمون MTT این تغییررنگ نشان دهنده فعالیت آنزیمی سوکسینات دهیدروژناز میتوکندیایی سلول های زنده است که مشخص کننده تعداد سلول های زنده می باشد و هر چقدر رنگ حاصل بیشتر باشد، واکنش و تعداد سلول های زنده نیز بیشتر است (نمودار ۱۰ و شکل ۱).

#### آزمون تریپان بلو BT:

این آزمون نشان دهنده تعداد سلول های زنده و مرده پس از تزریق سم ۶-OHDA می باشد. این ترکیب به دلیل مقاومت سلول های زنده، به درون سلول های زنده نفوذ نمی کند و دیواره سلول ها زیر میکروسکوپ شفاف دیده می شوند. در حالی که سلول های مرده رنگ را جذب کرده و دیواره آن ها زیر میکروسکوپ به رنگ تیره دیده می شود (نمودار ۱۱ و شکل ۱).

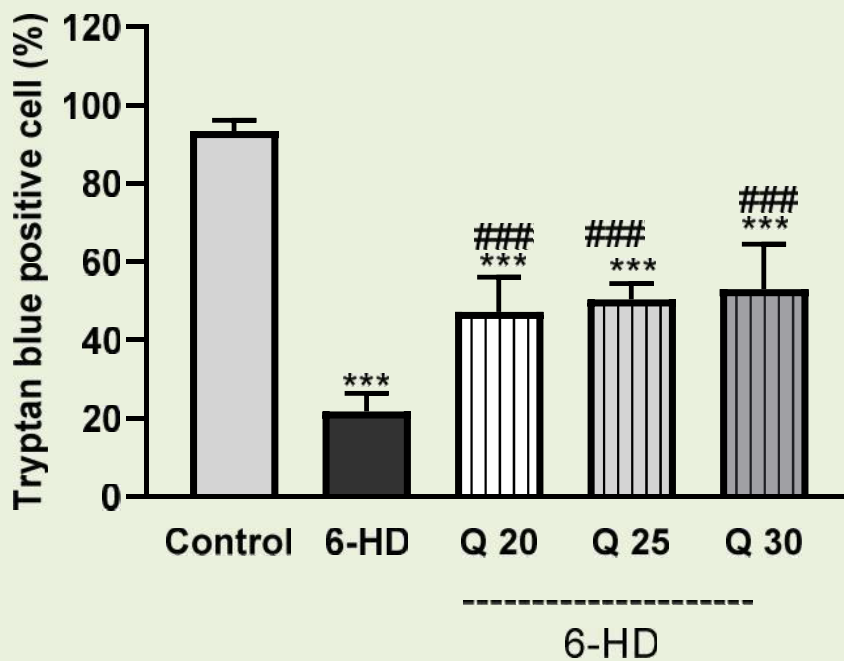
بر اساس تجزیه و تحلیل آماری مشخص شد که در این پژوهش تفاوت معناداری در گروه تیماری با کوآنزیم کیو ۱۰ نسبت به سلول های گروه کنترل وجود دارد. یافته های این تحقیق نشان دهنده اثرات نوروپروتکتیو ۶- هیدروکسی دوپامین، بر سلول های اولیه کاتکول آمینرژیک برای ایجاد بیماری پارکینسون با تخریب نورون های کاتکول آمینرژیک است و نیز در این پژوهش به این نتیجه رسیده شده است که مصرف داروی کوآنزیم Q10 به علت داشتن خاصیت آنتی اکسیدانتی می تواند از پیشرفت تخریب نورون- های کاتکول آمینرژیک و بیماری پارکینسون جلوگیری کند.

#### آزمون MTT:



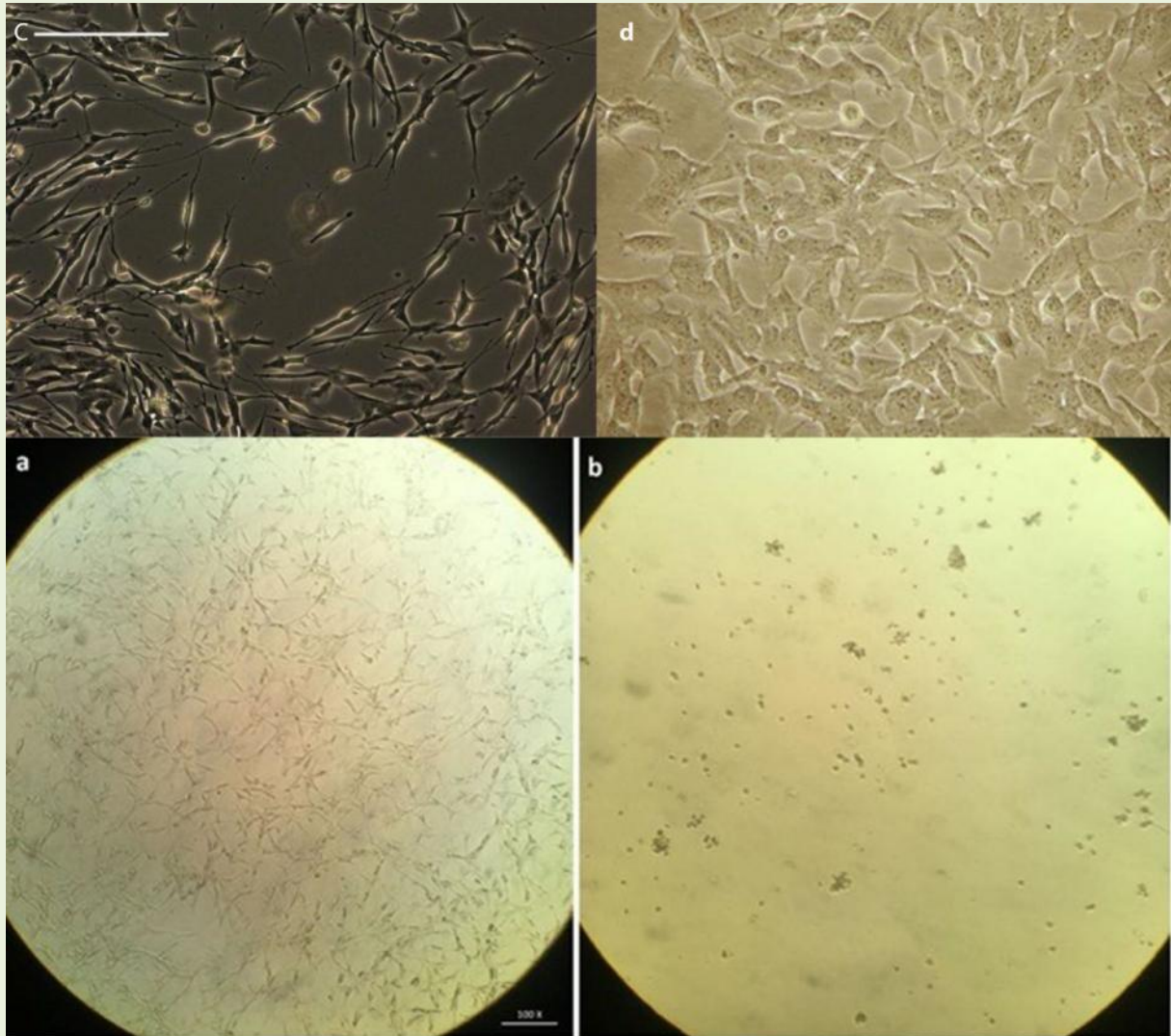
نمودار ۱۰- نتایج حاصل از بررسی تغییر رنگ در تست MTT.

مقایسه گروه سلولی کنترل که دارو و ۶-HD دریافت نکردند، گروه سلولی دریافت کننده فقط ۶-HD و گروه های تیماری دریافت کننده ۶-HD و کوآنزیم کیو ۱۰ با دوزهای ۲۰، ۲۵ و ۳۰ میلی گرم. Mean±SEM.  $P < 0.01$  و  $P < 0.001$  \*\*\*



نمودار ۱۲- نتایج حاصل از بررسی تعداد نورون های زنده در محیط کشت سلولی بارنگ آمیزی تریپان آبی TB.

مقایسه گروه سلولی کنترل که دارو و ۶-HD دریافت نکردند، گروه سلولی دریافت کننده فقط ۶-HD و گروه های تیماری دریافت کننده ۶-HD و کوآنزیم کیو ۱۰ با دوزهای ۲۰، ۲۵ و ۳۰ میلی گرم. Mean±SEM  $P < 0.001$  \*\*\*



شکل ۱- نتایج حاصل از بررسی تعداد نورون های زنده و مرده در محیط کشت سلولی بارتنگ آمیزی تریپان آبی BT و تست MTT  
 d: سلول های مرده در روش BT، c: سلول های زنده در روش BT، a: سلول های زنده در روش MTT، b: سلول های مرده در روش MTT

بیشتر باشد، بیشتر پارکینسونی شده است (۹۲). در تست اضطراب افزایش مدت زمان حضور جانور در بازوی باز به عنوان معیاری برای کاهش اضطراب و کاهش حضور آن به عنوان افزایش اضطراب در نظر گرفته می شود. در تست شنا افزایش زمان بی حرکتی Immobility را معادل افسردگی و کاهش آن به عنوان اثر بخشی درمان ضد افسردگی ارزیابی می شود. نتایج این تحقیق نشان می دهد که تیمار با Q10

### بحث و نتیجه گیری

در آزمون آپومورفین موش های پارکینسونی بیش از ۳۰ چرخش در یک ساعت بر خلاف جهت تزریق نوروتوکسین را نشان دادند. تعداد این چرخش ها در واحد زمان نشان دهنده شدت تخریب نورونی در جسم سیاه و شدت بیماری است (۳۹). در تست میله برای سنجش کاتالپسی اگر در مدت زمان کمتری، دست موش از روی میله بردارد، یعنی؛ هنوز به طور شدید به بیماری پارکینسون مبتلا نشده است و این زمان هر چه

بصورت معنی داری باعث کاهش زمان بی حرکتی و کاتالپسی، افزایش فعالیت های حرکتی و کاهش چرخش ناشی از آپومورفین شده است که نشان دهنده اثرات محافظتی کوآنزیم Q10 در برابر آسیب های ناشی از بیماری پارکینسون می باشد. سلول های پارکینسونی بعد از درمان با Q10 محافظت شدند. علت اصلی بیماری، تخریب نورون های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه در مغز میانی و کاهش غلظت دوپامین در پایانه های جسم مخطط است. از آنجا که افزایش مصرف اکسیژن با استرس اکسیداتیو همراه خواهد بود، مغز بافتی است که به علت نیاز زیاد به اکسیژن، بیشتر در معرض آسیب های ناشی از استرس اکسیداتیو قرار می گیرد. استرس اکسیداتیو یکی از عواملی است که در تخریب نورون های دوپامینرژیک در بیماری پارکینسون نقش دارد. همچنین مطالعات آزمایشگاهی نشان دادند که سرم و مایع مغزی - نخاعی بیماران پارکینسونی سطوح بالاتری از IL-12، TNF- $\alpha$ ، IL-1 $\beta$  را دارا می باشد (۱۹). از طرفی نورون های دوپامینرژیک جسم سیاه به عوامل پیش برنده التهابی و میانجی های اکسیداتیو حساسیت بیشتری دارند. چون غلظت گلوکوتایون داخل سلولی در این نورون ها نسبت به سایر سلول ها کمتر است (۴). مطالعات نشان داده است که صدمات ناشی از استرس اکسیداتیو و رادیکال های آزاد نقش مهمی در تخریب نورون های جسم سیاه دارد. برای پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری ها از جمله پارکینسون مصرف آنتی اکسیدانت ها موجب کاهش خطر ابتلا می شود. کوآنزیم Q10 دارای خاصیت ثابت شده ی آنتی اکسیدانی و ضد رادیکال آزاد می باشد. دربخش سلولی بعد از ایجاد پارکینسون، برای سنجش مقدار درمان بیماری دونهوع آزمون برای مشخص شدن بقای سلول های اولیه محیط کشت انجام گرفت.

کوآنزیم Q10 یکی از ناقل های انتقال الکترون در زنجیره تنفسی می باشد و می تواند با افزایش توان آنتی اکسیدانی و تولید آنزیم های آنتی اکسیدانی نقش به سزایی در حفاظت از غشاهای سلولی در مقابل رادیکال های آزاد داشته باشد. درمان با Q10 از آسیب نورودژنراتیو ناشی از رادیکال های آزاد تولید شده در مغز، پیشگیری می کند (۱۰). مصرف مکمل های Q10 به عنوان آنتی اکسیدانت در بهبود اثرات بیماری پارکینسون، آلزایمر، آتاکسی فردریش و بیماری هانتینگتون و کاهش ریسک ابتلا به بیماری کرونر قلب موثر می باشد. و همچنین باعث کاهش استرس اکسیداتیو و التهاب ناشی از رژیم غذایی ایجاد کننده چاقی در کبد موش شده است (۱۸). در مطالعه تجربی Ogura نشان داده شده است که مصرف کوآنزیم Q10 در آسیب کبد سگ ها با سیستمین، می تواند باعث جلوگیری از تولید رادیکال های آزاد و افزایش بقای حیوان شود (۱۲). مطالعات Beal و همکارانش نشان می دهد که تیمار روزانه موش ها با دوز ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن از کوآنزیم Q10، باعث افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی در مغز شده و اثرات محافظتی برای نورون ها را دارد (۲). Palmira و همکارانش در سال ۲۰۰۱ نشان دادند که کوآنزیم Q10 میتوکندریایی می تواند باعث افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی بدن و کاهش آسیب های اکسیداتیو در رت های دیابتی گردد (۵). Juan و همکارانش در سال ۲۰۰۹ گزارش دادند که کوآنزیم Q10 باعث کاهش ایسکمی و آپوپتوزیز و آسیب های عصبی در مثانه خرگوش می-شود (۱۵). نتایج مطالعه حاضر نشان داد مصرف کوآنزیم Q10 می تواند منجر به افزایش فعالیت و توان آنتی اکسیدانی گردد و در پی آن موجب محافظت سلول از آسیب ناشی از بنیان های فعال اکسیژن می-گردد. نتایج این پژوهش پیشنهاد می کند مصرف



آسیب حاصل از رادیکال های آزاد و کاهش مرگ نورون های عصبی ، اثرات محافظتی و ضد التهابی Q10 مشخص شد.

کوآنزیم Q10 می تواند نقش محافظتی در برابر بیماری پارکینسون و بیماری های عصبی تحلیل برنده را داشته باشد. هم چنین در این مدل سلولی با کاهش

### منابع

- Aly, N. (2012). Reno-protective efficiency of coenzyme Q10 on adriamycin-induced nephro toxicity in rats. *J Appl Sci Res*, 8; 589.
- Beal, MF., Matthews, RT., Tieleman, A., Shults, CW. (1998). Coenzyme Q10 attenuates the 1-methyl - 4- phenyl -1,2,3,6- tetra hydropyridine(MPTP) induced loss of striatal dopamine and dopaminergic axons in aged mice. *Brain Res*, doi:10.1016/S0006-8993(97)01192-X.
- Blum, D., Torch, S., Lambeng, N., Nissou, M.-F., Benabid, A.-L., Sadoul, R. (2001). Molecular pathways involved in the neuro toxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in neurobiology*, 65; 135-172.
- Crane, F.L. (2001). Biochemical functions of coenzyme Q10. *Journal of the American College of Nutrition*, 20; 591-598.
- De Luca, C., Kharaeva, Z., Raskovic, D., Pastore, P., Luci, A. (2012). Coenzyme Q10, vitamin E, selenium, and methionine in the treatment of chronic recurrent viral muco cutaneous infections. *Nutrition*, 28; 509-514.
- Elbaz, A., Bower, J.H., Maraganore, D.M., McDonnell, S.K., Peterson, B.J., Ahlskog, J.E., Schaid, D.J. (2002). Risk tables for parkinsonism and Parkinson's disease. *Journal of clinical epidemiology*, 55; 25-31.
- Hubble, J.P., Cao, T., Hassanein, R., Neuberger, J., Roller, W. (1993). Risk factors for Parkinson's disease. *Neurology*, 43; 1693-1693.
- Lenaz, G., Fato, R., Castelluccio, C., Genova, M., Bovina, C., Estornell, E. (1993). The function of coenzyme Q10 in mito chondria. *The clinical investigator*, 71; S66-S70.
- Lin, T. K., Liou, C. W., Chen, S. D., Chuang, Y. C., Tiao, M. M., Wang, P. W. (2009). Mito chondrial dysfunction and biogenesis in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Chang Gung Med J*, 32; 589-599.
- McCarthy, S., Somayajulu, M., Sikorska, M., Borowy-Borowski, H., Pandey, S. (2004). Paraquat induces oxidative stress and neuronal cell death; neuroprotection by water-soluble coenzyme Q10. *Toxicol Appl Pharmacol*, 201(1); 21-31.
- McGeer, P.L., Mc Geer, E.G. (2004). Inflammation and neuro degeneration in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 10; S3-S7.
- Ogura, Y., Takagi, K., Kawarada, Y., Mizumoto, R. (1996). Patho physiological effect of hepatic ischemia and reperfusion after hepatectomy in dogs with obstructive jaundice, focusing on the effect of coenzyme Q10 and styrene-co-maleic acid superoxide dismutase. *J. Gastroenterol*, 31(3); 379-86.
- Ostrowski, R., Piotrowski, P., Pańkowska, T., Smiałek, M. (1998). Evaluation of morphological changes after treatment with coenzyme Q10 (CoQ10) in endothelin-1 induced experimental ischemia in the rat. *Folia neuropathologica*, 36; 185-188.
- Overvad, K., Diamant, B., Holm, L., Hølmer, G., Mortensen, S., Stender, S. (1999). Coenzyme Q 10 in health and disease. *European Journal of Clinical Nutrition*, 53; 764.
- PubMed – NCBI NeurouroL Urodyn. 2009, 28 (4); 339 – 42. doi : 10.1002/nau.20662
- Savica, R., Rocca, W.A., Ahlskog, J.E. (2010). When does Parkinson disease start? *Archives of neurology*, 67; 798-801.
- Schapira, A.H. (2009). Neurobiology and treatment of Parkinson's disease. *Trends in pharmacological sciences*, 30; 41-47.
- Sohet, FM., Neyrinck, AM., Pachikian, BD., de Backer, FC., Bindels, LB., Niklowitz, P. (2009). Coenzyme Q10 supplementation lowers hepatic oxidative stress and inflammation associated with diet-induced obesity in mice. *Biochem Pharmacol*, 78(11); 1391-400.
- Thoenen, H., Tranzer, J. (1968). Chemical sympathectomy by selective destruction of adrenergic nerve endings with 6-hydroxy dopamine. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für Pharmakologie und Experimentelle Pathologie*, 261; 271-288.
- Veldman, B., Wijn, A., Knoers, N., Praamstra, P., Horstink, M. (1998). Genetic and environmental risk factors in Parkinson's

disease. Clinical neurology and neurosurgery 100; 15-26.

21. Zhen, R., Wenxiang, D., Zhaokang, S., Xinling, G., Huiming, H., Jingfeng, L. (1994). Mechanisms of brain injury with deep

hypothermic circulatory arrest and protective effects of coenzyme Q10. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, 108; 126-133.



# Evaluation of the Effects of Q10 on Neural Protection and Behavioral Disorders in Cell Culture and Mice Models of Parkinson's Disease

M.Aazarshab<sup>1</sup>; M.Rahnema<sup>2</sup>, R. Hajikhani<sup>1</sup>; J. Solati<sup>3</sup>; M.R.Bigdeli<sup>4</sup>

1.Department of Biology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2.Department of Biology, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran

4.Department of Biology, Faculty of Biological Science, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

3.Department of Biology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

Received:2019.23.9

Accepted: 2019.22.10

## Abstract

**Introduction & Objective:** Oxidative stress which is responsible for pathophysiology of hypertension, causes decrease in total antioxidant capacity. PON 1 is an antioxidant enzyme present on the surface of HDL also which is responsible for prevention of HTN and it's complications. The aim of this study was to investigate the Effect of Isosorbide and Garlic Supplementation on Protein levels and Gene expression of PON1 at the Heart tissue in Female rats with hypertension After a period of aerobic training.

**Materials and Methods:** In the experimental study, 30 female Wistar rats weighing 180-220 g were randomly divided into 8 groups: healthy control, sham, blood pressure induction (Hyper), garlic, endurance training, endurance training -garlic. The rats suffered from hypertension of 6 days a week for 8 weeks after dietary period and 10 mg/kg body weight L\_NAME injection. Experimental groups received 50 mg/kg body weight garlic supplement for six weeks. The endurance training program was performed at speeds of 20-30 m/min and 20 to 35 minutes, 5 sessions per week for 6 weeks. Protein levels and expression of PON1 heart tissue were measured using ELISA kit and Real Time PCR. Data were analyzed by t-test, One-way ANOVA and post hoc tokey at the significant level  $P < 0.05$ .

**Results:** The results showed that there was no significant difference between the mean protein and the expression of paraoxonase-1 in the heart tissue of the female rats with hypertension in the different groups of the study ( $P > 0.05$ ). Also, there was no difference between the levels of protein paraoxonase-1 heart tissue in different groups than the group of blood pressure induction ( $P > 0.05$ ).

**Conclusion:** According to the findings, it seems to that the inadequacy of the training period (frequency and intensity of exercise) and the dose rate of Garlic Supplementation can be one of the possible causes of ineffectiveness in the present study.

**Keywords:** *Exercise, Garlic, Hypertension, PON1, Female rats.*