DOI: 10.48305/jims.v44.i879.1823

مجله دانشکده پزشکی اصفهان | سال چهل و چهارم/شماره‌ی ۸۷۹/هفته‌ی دوم آبان ۱۴۰۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۶/۲۰ | تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۸/۰۶ | تاریخ چاپ: ۱۴۰۵/۰۸/۱۴

اثرات محافظتی ایندول–۳–پروپیونیک اسید بر استرس اکسیداتیو در مدل پیری القا شده با دی–گالاکتوز در رت

سحر محمدعلی‌پور[۱]، محمدرضا پریانی[۲]، حسین اریک‌آغاجی[۳]، لیلا عینی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: دی‌گالاکتوز (D-galactose) D-gal به‌طور رایج برای القای تغییرات مرتبط با پیری، از جمله استرس اکسیداتیو و اختلال در همئوستاز ردوکس، استفاده می‌شود. ایندول–۳–پروپیونیک اسید (Indole-3-propionic acid) IPA، یک متابولیت تریپتوفان مشتق از میکروبیوتای روده با خواص آنتی‌اکسیدانی است. با این حال، اثرات آن بر تغییرات اکسیداتیو و ردوکس هیپوکامپ پس از مواجهه با D-gal به‌طور کامل مشخص نیست .در این مطالعه، اثر IPA بر شاخص‌های اکسیداتیو، دفاع آنتی‌اکسیدانی و وضعیت گلوتاتیون در هیپوکامپ موش‌های صحرایی تحت تیمار با D-gal ارزیابی شد.

روش‌ها: چهل سر موش صحرایی نر بالغ Wistar به پنج گروه (n = ۸) تقسیم شدند: کنترل، D-gal، Control+IPA20، D-gal+IPA10 و D-gal+IPA20. D-gal (۵۰۰ mg/kg/day) به‌مدت ۸ هفته داخل صفاقی و سپس IPA به‌مدت ۸ هفته خوراکی تجویز شد. سطوح محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته (Advanced glycation end products) AGEs، مالون‌دی‌آلدئید (Malondialdehyde) MDA، گلوتاتیون احیاشده (Reduced glutathione) GSH، گلوتاتیون اکسیدشده (oxidized glutathione) GSSG و نسبت GSSG/GSH و فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase) SOD، کاتالاز(catalase; CAT) و گلوتاتیون پراکسیداز (Glutathione peroxidase) GPx در هیپوکامپ اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: D-gal موجب افزایش AGEs، MDA و GSSG و نسبت GSSG/GSH و کاهش GSH و فعالیت SOD، CAT و GPx شد. درمان با IPA در هر دو دوز، AGEs، MDA و GSSG را کاهش و GSH، SOD و GPx را افزایش داد. CAT تنها با IPA20 افزایش معنی‌دار یافت. نسبت GSSG/GSH در گروه‌های تحت درمان با IPA کاهش معناداری نشان داد.

نتیجه‌گیری: تجویز مزمن D-gal با افزایش آسیب اکسیداتیو و اختلال در همئوستاز گلوتاتیون همراه بود. IPA پراکسیداسیون لیپیدی راکاهش و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را بهبود بخشید و می‌تواند در تعدیل اختلالات اکسیداتیو و ردوکس مرتبط با پیری القاشده توسط D-gal نقش داشته باشد.

واژگان کلیدی: ایندول–۳–پروپیونیک اسید؛ دی‌گالاکتوز؛ استرس اکسیداتیو؛ هموستاز ردوکس؛ محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته؛ هیپوکامپ

ارجاع: محمدعلی‌پور سحر، پریانی محمدرضا، اریک‌آغاجی حسین، عینی لیلا. **اثرات محافظتی ایندول–۳–پروپیونیک اسید بر استرس اکسیداتیو در مدل پیری القا شده با دی–گالاکتوز در رت.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۵؛ ۴۴ (۸۷۹): ۱۸۲۳– ۱۸۳۱.

مقدمه

فرایند پیری با کاهش تدریجی عملکردهای زیستی همراه است و خطر ابتلا به بیماری‌های مختلف مرتبط با بالا رفتن سن را افزایش می‌دهد. استرس اکسیداتیو یکی از عوامل مهم در این فرایند است و زمانی رخ می‌دهد که تولید گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species) ROS از ظرفیت سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی برای خنثی‌سازی آن‌ها فراتر رود (۱، ۲). این فرایند همچنین با اختلالات نورودژنراتیو مرتبط با افزایش سن همراه است (۳). استرس اکسیداتیو پایدار می‌تواند به مولکول‌های زیستی آسیب وارد کرده و همئوستاز سلولی را مختل کند و در نهایت به اختلال عملکرد سلول و آسیب بافتی منجر شود (٤، ٥).

مدل پیری القاشده با دی‌گالاکتوز (D-galactose) D-gal به‌طور

۱- دانشجوی دکترای تخصصی، گروه علوم پایه دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه علوم پایه دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

۳- استادیار، گروه علوم پایه دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: محمدرضا پریانی: دانشیار، گروه علوم پایه دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

Email: mrparyani@iau.ac.ir

گسترده برای مطالعه تغییرات مرتبط با پیری و ارزیابی مداخلات درمانی بالقوه مورد استفاده قرار می‌گیرد. این مدل امکان بررسی تغییرات مرتبط با پیری را در شرایط آزمایشی کنترل‌شده فراهم می‌کند (۶، ۷). تجویز مزمن D-gal با ایجاد تغییرات شبه‌پیری، از جمله افزایش استرس اکسیداتیو، اختلال در تعادل ردوکس، تغییرات میتوکندریایی و تجمع محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته (Advanced glycation end products) AGEs همراه است (۸). تجمع AGEs با افزایش تولید ROS و تشدید آسیب اکسیداتیو، آسیب ساختاری، التهاب عصبی و آپوپتوز مرتبط می‌باشد (۹). سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase) SOD، کاتالاز (Catalase) CAT و گلوتاتیون پراکسیداز (Glutathione peroxidase) GPx از اجزای اصلی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی هستند (۵، ۱۰). حفظ همئوستاز ردوکس سلولی به عملکرد هماهنگ سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی وابسته است. گلوتاتیون احیاشده (reduced Glutathione) GSH، می‌تواند برخی اکسیدان‌ها را مستقیماً خنثی کند و معادل‌های احیاکننده مورد نیاز برای سم‌زدایی هیدروپراکسیدها توسط GPx را فراهم سازد (۴، ۱۱). SOD، CAT و GPx با سیستم گلوتاتیون به‌صورت هماهنگ عمل می‌کنند تا ROS را کنترل کرده و از آسیب اکسیداتیو به لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA بکاهند (۵).

گلوتاتیون احیاشده (Reduced glutathione) GSH، یکی از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های درون‌سلولی است که نقش مهمی در حفظ هموستاز ردوکس سلولی دارد. در شرایط استرس اکسیداتیو، کاهش GSH با افزایش فرم اکسیدشده آن، یعنی گلوتاتیون دی‌سولفید (oxidized Glutathione) GSSG همراه است. در نتیجه، افزایش نسبت GSSG/GSH نشان‌دهنده‌ی تغییر وضعیت ردوکس سلول به سمت حالت اکسیدشده‌تر بوده و می‌تواند به‌عنوان شاخصی از عدم تعادل ردوکس سلولی و استرس اکسیداتیو مورد استفاده قرار گیرد (۱۲).

ایندول-۳-پروپیونیک اسید (Indole-3-propionic acid) IPA یک متابولیت طبیعی حاصل از متابولیسم تریپتوفان است که توسط میکروبیوتای روده تولید می‌شود و در سال‌های اخیر در زمینه‌ی محور روده- مغز و اختلالات نورودژنراتیو بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۱۳). IPA می‌تواند گونه‌های واکنش‌پذیر را خنثی کرده و از سلول‌ها در برابر آسیب اکسیداتیو محافظت کند (۱۴). همچنین، مطالعات انجام‌شده در مدل‌های حیوانی نشان داده‌اند که IPA می‌تواند استرس اکسیداتیو، از جمله پراکسیداسیون لیپیدی، را کاهش داده و دفاع آنتی‌اکسیدانی را تقویت کند و به‌طور مشخص با افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و GPx و بهبود سطح GSH همراه باشد (۱۵، ۱۶).

اگرچه مطالعات پیشین، اثرات آنتی‌اکسیدانی و محافظت‌کننده‌ی سلولی IPA را گزارش کرده‌اند، اثرات آن بر تغییرات اکسیداتیو و ردوکس ناشی از D-gal همچنان به‌طور کامل مشخص نیست. ارزیابی پراکسیداسیون لیپیدی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و شاخص‌های سیستم گلوتاتیون می‌تواند درک بهتری از نقش بالقوه IPA در تغییرات اکسیداتیو و اختلال همئوستاز ردوکس مرتبط با پیری القاشده با D-gal فراهم کند.

اگرچه مدل پیری القاشده با D-gal در مطالعات مختلف بررسی شده است، شواهد درباره اثر IPA بر همئوستاز اکسیداتیو و ردوکس در این مدل محدود است. با توجه به نقش بالقوه IPA در ارتباط میان روده و مغز، بررسی این اثرات در هیپوکامپ می‌تولند به درک بهتر ظرفیت آن در تعدیل تغییرات مرتبط با پیری کمک کند. ازاین‌رو، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر IPA بر پراکسیداسیون لیپیدی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، سیستم گلوتاتیون و AGEs در هیپوکامپ رت‌های مبتلا به پیری القاشده با D-gal انجام شد.

روش‌ها

حیوانات و طراحی مطالعه

در این مطالعه‌ی تجربی، ۴۰ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار، با سن ۱۲ هفته و وزن ۲۰۰–۲۲۰ گرم، تحت شرایط استاندارد آزمایشگاهی شامل دمای ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۶۵ درصد و چرخه‌ی ۱۲ ساعته روشنایی/تاریکی نگهداری شدند. حیوانات به‌صورت آزاد به غذا (Pars Feed Co., Iran) و آب دسترسی داشتند. پروتکل این مطالعه توسط کمیته‌ی تخصصی اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات (کد: IR.IAU.SRB.REC.1405.288) تأیید شد.

پس از یک هفته سازگاری، مدل پیری با تزریق داخل‌صفاقی D-gal (IP) (Merck, Darmstadt, Germany) با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز (۱۷) به مدت ۸ هفته القا شد. پس از پایان دوره القای پیری پیشرفته تجویز دی‌گالاکتوز قطع و سپس IPA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) با دوزهای ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز، به مدت ۸ هفته از طریق گاواژ خوراکی تجویز شد (۱۴، ۱۸). حیوانات به‌طور تصادفی به پنج گروه (n = ۸) شامل کنترل، D-gal، کنترل +IPA20، D-gal+IPA10 و D-gal+IPA20 تقسیم شدند. گروه کنترل در تمام مدت نرمال‌سالین دریافت کرد، درحالی‌که گروه D-gal پس از دوره القا، نرمال‌سالین دریافت کرد. در گروه کنترل +IPA20، پس از نرمال‌سالین، IPA با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز تجویز شد.

جمع‌آوری نمونه و آماده‌سازی بافت

در پایان مطالعه، حیوانات با استفاده از ترکیب کتامین

mg/kg ۱۰۰؛ (Alfasan, Woerden, The Netherlands) و زایلازین mg/kg ۱۰/۰۰؛ (Aburaihan Pharmaceutical Co. Tehran, Iran) بیهوش شدند. پس از تأیید عمق مناسب بیهوشی و عدم پاسخ به محرک‌های دردناک، حیوانات مطابق با دستورالعمل‌های اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی، با استفاده از روش یوتانازی مناسب (تزریق دوز بیش از حد ماده بیهوشی) آسان‌کشی شدند. پس از اطمینان از مرگ حیوان، نمونه‌برداری از بافت مورد نظر انجام شد. مغز به‌سرعت خارج گردید و بافت هیپوکامپ بلافاصله روی یخ تشریح شد و برای بررسی نشانگرهای آنتی‌اکسیدانی در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

هموژنیزاسیون بافت

به منظور حفظ کیفیت نمونه‌ها، کلیه مراحل بلافاصله پس از انجماد سریع در نیتروژن مایع، بر روی یخ و با سرعت بالا انجام شد. نمونه های هیپوکامپ به طور کامل با استفاده از ازت مایع در هاون چینی پودر شد. سپس پودر بافتی در محلول بافر فسفات (PBS; pH = ۷) به نسبت (w/v)۱:۵ به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه، با استفاده از هموژنایزر دستی (Heidolph, Germany) و در شرایط سرد روی یخ، هموژنیزه شدند. هموژنه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سوپرناتانت حاصل با دقت به میکروتیوب‌های جدید منتقل و به هر نمونه کوکتل آنتی‌پروتئاز (P8340، Sigma-USA) به نسبت ۱ به ۱۰۰۰ در نمونه هموژن بافتی جهت جلوگیری از تخریب پروتئین اضافه شد. پس از تعیین غلظت پروتئین، نمونه‌ها تا زمان انجام آنالیزهای بیوشیمیایی در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تعیین پروتئین کل

غلظت پروتئین کل در هموژنه‌های بافت هیپوکامپ با استفاده از کیت تجاری سنجش پروتئین به روش برادفورد (Cat. No. KBRD96; KiaZist Life Sciences, Hamedan, Iran) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده اندازه‌گیری شد. جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از میکروپلیت خوان (Microplate Reader) اندازه‌گیری شد و غلظت پروتئین بر اساس منحنی استاندارد آلبومین سرم گاوی (BSA) محاسبه شد.

نشانگرهای استرس اکسیداتیو و آنتی‌اکسیدانی

سطح MDA؛ (Cat. No. KMDA96) و فعالیت آنزیم‌های SOD؛ (Cat. No. KSOD96) و کاتالاز CAT؛ (Cat. No. KCAT96) در هموژنه‌های هیپوکامپ با استفاده از کیت‌های رنگ‌سنجی تجاری (KiaZist Life Sciences, Hamedan, Iran) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده اندازه‌گیری شدند.

MDA، SOD و CAT به‌ترتیب در طول موج‌های ۵۳۲، ۵۷۰ و ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شدند و به‌ترتیب به‌صورت nmol/mg protein ، U/mg protein و nmol/min/mg protein بیان شدند. تمام مقادیر بر اساس غلظت پروتئین کل نمونه مربوطه نرمال‌سازی شدند. اندازه‌گیری MDA بر اساس واکنش آن با اسید تیوباربیتوریک (TBA) انجام شد. فعالیت SOD با استفاده از روش مبتنی بر گزانتین/گزانتین اکسیداز ارزیابی شد و یک واحد فعالیت بر اساس معیار مهاری ارائه‌شده توسط شرکت سازنده تعریف شد. فعالیت CAT با استفاده از روش رنگ‌سنجی مبتنی بر پورپالد(Purpald) تعیین شد.

فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز (GPx)

فعالیت GPx در بافت هیپوکامپ با استفاده از کیت تجاری (Cat. No. RS505; Randox Laboratories Ltd. Crumlin, UK) و مطابق پروتوکل و بر اساس روش Paglia و Valentine (1967) اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه، در حضور گلوتاتیون ردوکتاز و NADPH، اکسیداسیون GSH توسط کومن هیدروپراکسید با اکسیداسیون استوکیومتری NADPH به $NADP^+$ انجام شد. کاهش جذب به‌صورت اسپکتروفتومتری در طول موج ۳۴۰ نانومتر پایش و فعالیت GPx به‌صورت U/mg protein بیان شد.

اندازه‌گیری گلوتاتیون احیاشده (GSH)، گلوتاتیون اکسیدشده (GSSG)و نسبت GSSG/GSH

به منظور ارزیابی وضعیت ردوکس بافت هیپوکامپ، سطوح گلوتاتیون احیاشده (GSH)، گلوتاتیون اکسیدشده (GSSG) و نسبت GSSG/GSHاندازه‌گیری شد. پس از برداشت بافت هیپوکامپ، نمونه‌ها بلافاصله در شرایط سرد آماده سازی شدند تا از تغییرات ناشی از اکسیداسیون گلوتاتیون در طی آماده‌سازی جلوگیری شود. به منظور پایدارسازی GSH و کاهش اکسیداسیون خودبه‌خودی آن به GSSG ، نمونه‌های بافتی در محلول استخراج حاوی اسید سولفوسالیسیلیک SSA (Sulphosalicylic acid) با غلظت ۵ درصد هموژنیزه شدند. استفاده از SSA علاوه بر رسوب‌دهی پروتئین‌ها، موجب حفظ پایداری گلوتاتیون و افزایش دقت لندازه‌گیری شاخص‌های مرتبط با وضعیت ردوکس می‌شود .برای استخراج گلوتاتیون، نمونه‌های هیپوکامپ با محلول ۵٪ SSA با نسبت وزن بافت به حجم محلول استخراج (w/v) ۱:۵در شرایط سرد هموژنیزه شدند. سپس هموژنات‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴°C با سرعت g ×۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و سوپرناتانت شفاف حاصل برای اندازه‌گیری GSH و GSSG مورد استفاده قرار گرفت. تمامی مراحل آماده‌سازی نمونه در دمای پایین و با حداقل زمان تماس با هوا انجام شد تا از تغییرات اکسیداسیونی ناخواسته جلوگیری شود.

سطح GSH با استفاده از روش رنگ‌سنجی مبتنی بر معرف Ellman، شامل (DTNB) (5,5′-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)، مطابق روش توصیف شده توسط Hu و همکاران (۱۹۹۴) اندازه‌گیری

شـد. در این روش، گروه سـولفیدریل موجود در GSH با DTNB واکنش داده و محصـول رنگی حاصـل در طول موج ٤١٢ نانومتر با استفاده از میکروپلیت ریدر اندازه‌گیری شد. غلظت GSH با استفاده از منحنی استاندارد تهیه شده از محلول استاندارد گلوتاتیون محاسبه و پس از نرمال‌سـازی بر اسـاس مقدار پروتئین کل نمونه، به صـورت µmol/mg protein گزارش شد.

برای تعیین مقدار گلوتاتیون تام (Total glutathione; GSH + GSSG)، ابتدا مقدار GSH موجود در نمونه‌ها اندازه‌گیری شـد. سپس ٦٠ µL از هموژنات بافتی با ١٥ µL محلول احیاکننده حاوی ٣/٥NaBH4 مولار و ١/٥NaOH مولاردر مخلوط آب- متانول ٥٠:٥٠، مخلوط و به مدت ١٥ دقیقه انکوبه شـد. این مرحله باعث احیای GSSGموجود در نمونه به GSH شده و امکان اندازه‌گیری گلوتاتیون کل را فراهم می‌کند. واکنش احیا با افزودن ١٠ میکرو لیتر ٦ HCL مولار متوقف شد و مقدار گلوتاتیون تام با استفاده از روش رنگ‌سنجی مبتنی بر DTNB و اندازه‌گیری جذب در طول موج ٤١٢ نانومتر تعیین گردید. غلظت GSSG با اسـتفاده از اختلاف بین مقدار گلوتاتیون تام و مقدار GSH اولیه و با در نظر گرفتن تبدیل اسـتوکیومتری هر مول GSSGبه دو مول GSH محاسبه شد:

$$GSSG = \frac{(Total\ glutathione - GSH)}{2}$$

مقادیر GSH و GSSG پس از نرمال‌سازی بر اساس مقدار پروتئین کل بافت، به صورت nmol/mg protein گزارش شدند (١٢).

اندازه‌گیری محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته (AGEs)

AGEs در بـافـت هیپوکـامـپ بـا اسـتـفـاده از کیـت ELISA سـاندویچی اختصـاصـی موش صـحرایی (Cat. No. SL0036Ra; SunLong Biotech, China) اندازه‌گیری شـدند. تمامی مراحل مطابق پروتکل اسـتاندارد شـرکت سـازنده انجام شـد. پس از افزودن محلول توقف، چگالی نوری چاهک‌ها در طول موج ٤٥٠ نـانومتر اندازه‌گیری شـد. حسـاسـیت کیت ٢/٥ ng/mL بود و نتایج به‌صورت ng/mg protein بیان شدند.

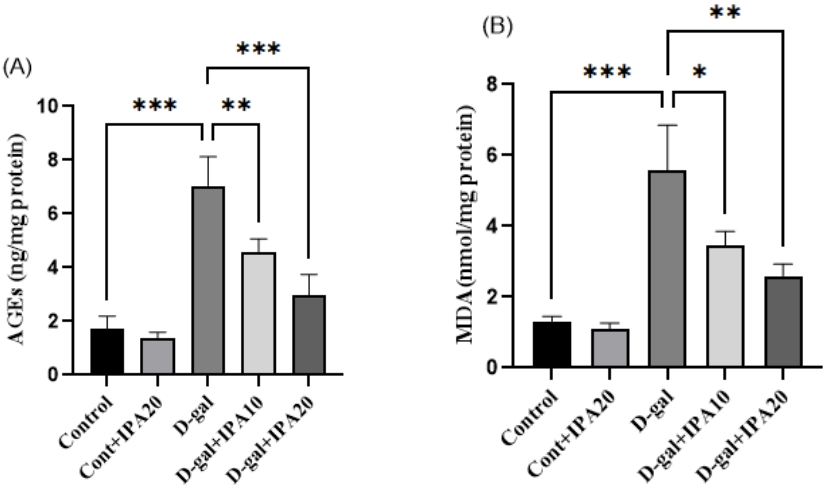
تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها با اسـتفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism نسـخه‌ی ٩ (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)تحلیل شـدند. داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شدند. نرمال بودن توزیع داده‌ها با اسـتفاده از آزمون Shapiro-Wilk ارزیابی شـد. تفاوت بین گروه‌ها با استفاده از تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و به‌دنبال آن آزمون تعقیبی Tukey برای مقایسـه‌های چندگانه بررسـی شد. مقدار P < ٠/٠٥ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

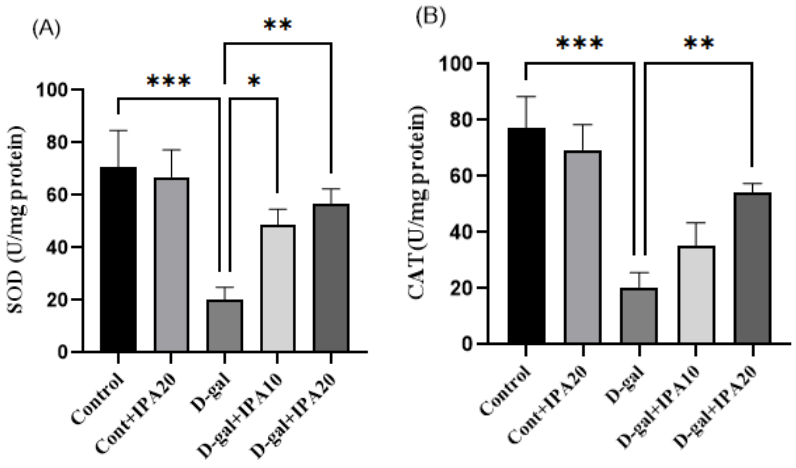
سطح AGEs و MDA

سطح AGEs و MDA در بافت هیپوکامپ گروه D-gal در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (هر دو P < ٠/٠٠١). درمان با IPA10 و IPA20 موجب کاهش معنی‌دار سطح AGEs شد (به‌ترتیب P < ٠/٠١ و P < ٠/٠٠١). همچنین، سـطح MDA در گروه‌های دریافت‌کننده IPA10 و IPA20 در مقایسه با گروه D-gal به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (به‌ترتیب P < ٠/٠٥ و P < ٠/٠١). در هر دو شـاخص، تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های D-gal+IPA10 و D-gal+IPA20و نیز بین گروه‌های کنترل و کنترل +IPA20 مشاهده نشد (شکل A،١ و B).



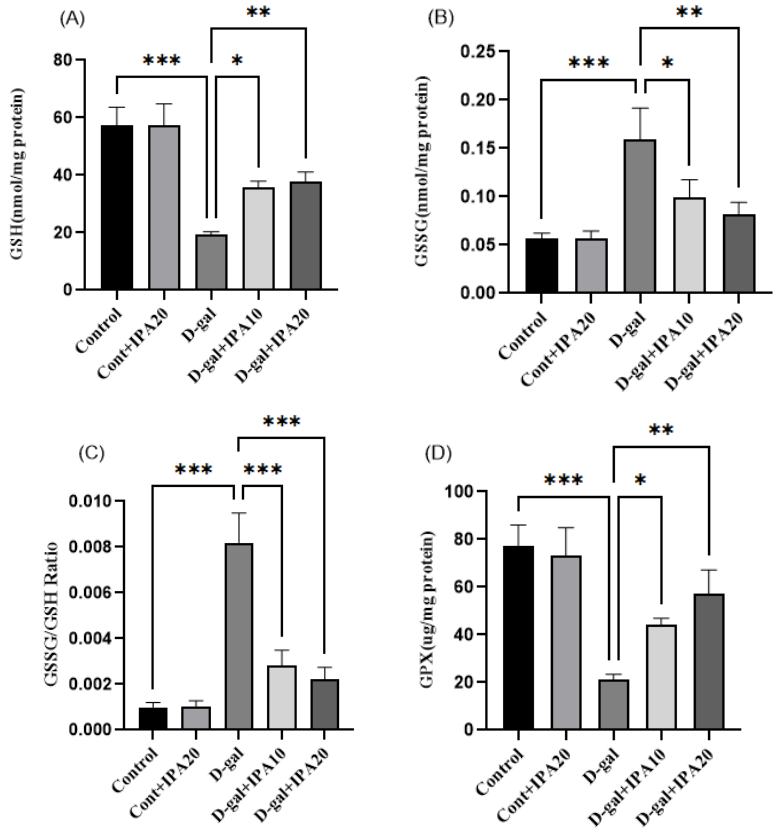
شکل ١. اثر IPA بر سطح AGEs (A) و MDA (B).

میانگین ± انحراف معیار، (n = ٨)، * شان‌دهنده‌ی میزان معنی‌داری آماری است. *P<٠/٠٥، **P<٠/٠١ و ***P<٠/٠٠١.



شکل ۲. اثر IPA بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی. (A) فعالیت SOD و (B) فعالیت CAT.

میانگین ± انحراف معیار، * نشان‌دهنده‌ی میزان معنی‌داری آماری است. *P<۰/۰۵، **P<۰/۰۱ و ***P<۰/۰۰۱.



شکل ۳. اثر IPA بر شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی مرتبط با گلوتاتیون.(A) سطح GSH، (B) سطح GSSG، (C) نسبت GSSG/GSH و(D) فعالیت GPx در بافت هیپوکامپ.

میانگین ± انحراف معیار، * نشان‌دهنده‌ی میزان معنی‌داری آماری است: *P<۰/۰۵، **P<۰/۰۱ و ***P<۰/۰۰۱.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

فعالیت SOD و CAT در گروه D-gal در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (P < ۰/۰۰۱). درمان با IPA10 و IPA20فعالیت SOD را به‌طور معنی‌داری افزایش داد (به‌ترتیب P < ۰/۰۵ و P < ۰/۰۱). در مورد CAT، تنها IPA20 موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آن در مقایسه با گروه D-gal شد (P < ۰/۰۱)، در

حالی که IPA10 تفاوت معنی‌داری ایجاد نکرد (شکل ۲، A و B).

شاخص‌های گلوتاتیون

سطح GSH در گروه D-gal در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (P < ۰/۰۰۱)، در حالی که سطح GSSG افزایش معنی‌داری نشان داد (P < ۰/۰۰۱). درمان با IPA10 و IPA20سطح GSH را به‌طور معنی‌داری افزایش داد (به‌ترتیب P < ۰/۰۵ و P < ۰/۰۱) و سطحGSSG را کاهش داد (به‌ترتیب P < ۰/۰۵ و P < ۰/۰۱) (شکل ۳، A و B).

ارزیابی نسبت گلوتاتیون اکسید به احیا (GSSG/GSH) در گروه دریافت‌کننده‌ی D-gal در مقایسه با گروه کنترل، افزایش بسیار معناداری داشته است (P < ۰/۰۰۱). همچنین، درمان با IPA در هر دو گروه D-gal+IPA10 و D-gal+IPA20 در مقایسه با گروه D-gal کاهش معناداری را نشان داد (P < ۰/۰۰۱). همچنین، تفاوت معناداری بین دو دوز درمانی مشاهده نشد و مقایسه‌ی گروه CONT+IPA20 با گروه کنترل تفاوت معناداری را نشان نداد.

فعالیت GPx نیز در گروه D-gal در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (P < ۰/۰۰۱) و پس از درمان با IPA10 و IPA20در مقایسه با گروه D-gal افزایش معنی‌داری نشان داد (به‌ترتیب P < ۰/۰۵ و P < ۰/۰۱) (شکل ۳، C و D).

در مقایسه‌های باقی‌ملنده، از جمله بین D-gal+IPA10 و D-gal+IPA20 و نیز بین کنترل و کنترل+IPA20، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

بحث

تغییرات MDA، GSSG، GSH و فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و GPx در مطالعه‌ی حاضر با گزارش‌های پیشین از اختلال دفاع آنتی‌اکسیدانی و وضعیت ردوکس در مدل‌های پیری همخوانی داشت (۱۹، ۲۰). نتایج مشاهده شده با گزارش‌های پیشین درباره‌ی افزایش AGEs و شاخص‌های آسیب اکسیداتیو در مغز و هیپوکامپ پس از مواجهه با D-gal همسو بود (۹). در همین راستا، Yu نیز تغییرات AGEs را، همراه با افزایش MDA و ROS در مغز حیوانات دریافت‌کننده‌ی D-gal گزارش کردند (۲۱). این تغییرات می‌تواند بازتاب افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و کاهش ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی در شرایط پیری القاشده با D-gal باشد.

در مقابل، درمان با IPA با کاهش سطحAGEs و پراکسیداسیون لیپیدی و بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی و گلوتاتیون همراه بود. Kuo و همکاران، پس از تجویز G. tsugae در مدل پیری القاشده با D-gal، کاهش AGEs و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی همراه بود. بهبود وضعیت اکسیداتیو پس از درمان با IPA می‌تواند در کاهش تجمع AGEs نقش داشته باشد (۲۲).

نتایج مطالعه‌ی حاضر با گزارش Chen و همکاران در مدل القای پیری مبنی بر افزایش MDA همراه با کاهش فعالیت SOD در هیپوکامپ (۲۰) و یافته‌های Lei و همکاران، افزایش MDA و NO را همراه با کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، فعالیت SOD و GSH-Pxو سطح GSH همخوانی داشت (۸). کاهش MDA پس از درمان با IPA نیز با گزارش Karbownik و همکاران، مبنی بر کاهش استرس اکسیداتیو و تجمعMDA پس از تجویز سیستمیک IPA (۲۳) و نتایج Owumi و همکاران، درباره کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و بهبود برخی اجزای دفاع آنتی‌اکسیدانی مطابقت داشت (۱۵). این اثر ممکن است تا حدی با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی IPA مرتبط باشد. با این‌حال، پاسخ MDA در مطالعه‌ی حاضر الگوی وابسته به دوز مشخصی نشان نداد.

یافته‌های مربوط به SOD و CAT با گزارش‌های پیشین از اختلال دفاع آنتی‌اکسیدانی در مدل D-gal، از جمله کاهش فعالیت SODو CAT(۱۹)، کاهش فعالیت SOD هیپوکامپ (۲۰) و تغییرات گسترده‌تر در سیستم آنتی‌اکسیدانی از جمله افزایش MDA و کاهش سطوح SOD، GPx و GSH همخوانی داشت (۸). بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پس از درمان با IPA نیز در مطالعات حیوانی مختلف، از جمله افزایش فعالیت CAT و SOD (۱۵) و GPx (۱۶) گزارش شده است. این شواهد از نقش بالقوه IPA در تعدیل دفاع آنتی‌اکسیدانی حمایت می‌کنند.

تغییرات سیستم گلوتاتیون در مطالعه‌ی حاضر با گزارش‌های پیشین در مدل‌های پیری و D-gal همخوانی داشت؛ از جمله کاهش GSHو افزایش GSSG در بافت مغز و تغییرات مشابه در مدل‌های D-gal (۸، ۱۹).

تغییر وضعیت ردوکس سلولی به سمت یک محیط اکسیدشده‌تر (که با افزایش نسبت GSSG/GSH در گروه D-gal نمایان شد) با تضعیف ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در مهار گونه‌های فعال اکسیژن، فرایند پراکسیداسیون لیپیدی و تشکیل محصولات ثانویه‌ای نظیر MDA را تسهیل می‌کند (۲۴). الگوی مشاهده شده در برهم‌خوردن تعادل گلوتاتیون با یافته‌های Zhu و همکاران در بافت مغز همسو بود (۲۵). اختلال در تنظیم سنتز گلوتاتیون و کاهش احیای مجدد آن را به‌عنوان مکانیسم‌های کلیدی آسیب مطرح کردند. در پژوهش حاضر، تجویز IPA با مهار افزایش نسبت GSSG/GSH توانست تعادل ردوکس هیپوکامپ را بهبود بخشد؛ که این اثر تنظیمی بر سیستم گلوتاتیون و تقویت سد دفاع آنتی‌اکسیدانی با نتایج مطالعات پیشین در سایر مدل‌های تجربی همخوانی داشت (۱۵، ۱۶). علاوه بر این، عدم مشاهده تفاوت معنادار در نسبت GSSG/GSH بین گروه کنترل

+IPA20 و کنترل سالم نشان می‌دهد که تجویز IPA به‌تنهایی، تداخل منفی یا اثر پرو-اکسیدانی قابل‌توجهی بر وضعیت ردوکس پایه بافت هیپوکامپ ایجاد نکرده است.

نتیجه‌گیری

مواجهه مزمن با D-gal با افزایش تجمع AGEs و پراکسیداسیون لیپیدی و همچنین اختلال در وضعیت آنتی‌اکسیدانی و گلوتاتیون در هیپوکامپ همراه بود. درمان با IPA برخی از این تغییرات، از جمله سطوح AGEs و MDA، را کاهش داد و شاخص‌های مرتبط با گلوتاتیون و آنتی‌اکسیدانی را بهبود بخشید. این یافته‌ها نشان می‌دهند که IPA ممکن است به مقابله با اختلالات اکسیداتیو و ردوکس مرتبط با مواجهه با D-gal در هیپوکامپ کمک کند. با توجه به منشأ میکروبیوتایی IPA و ارتباط آن با محور روده- مغز، یافته‌های حاضر می‌تواند مبنایی برای بررسی بیشتر نقش این متابولیت در ارتباط میان میکروبیوتای روده و تغییرات اکسیداتیو مرتبط با پیری باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از پایان‌نامه‌ی مقطع دکترای تخصصی رشته آناتومی و جنین‌شناسی مقایسه‌ای با کد ۱۲۳۸۲۲۰۰۷۶۳۴۹۳۶۵۷۰۴۴۱۶۳۳۷۱۹۸۶ می‌باشد که در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات به تصویب رسیده است.

References

1. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol 2007; 39(1): 44–84.
2. Sena CM, Leandro A, Azul L, Seiça R, Perry G. Vascular Oxidative Stress: Impact and Therapeutic Approaches. Front Physiol 2018; 9: 1668.
3. Serrano F, Klann E. Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. Ageing Res Rev 2004; 3(4): 431–43.
4. Jena AB, Samal RR, Bhol NK, Duttaroy AK. Cellular Red-Ox system in health and disease: The latest update. Biomed Pharmacother 2023; 162: 114606.
5. Wojcik M, Burzynska-Pedziwiatr I, Wozniak LA. A review of natural and synthetic antioxidants important for health and longevity. Curr Med Chem 2010; 17(28): 3262–88.
6. Wei H, Li L, Song Q, Ai H, Chu J, Li W. Behavioural study of the D-galactose induced aging model in C57BL/6J mice. Behav Brain Res 2005; 157(2): 245–51.
7. Wang Y, Wang J, Li H, Lao J, Jia D, Liu J, et al. Antioxidant effects of Bifidobacterium longum T37a in mice weight loss and aging model induced by D-galactose. BMC Microbiol 2023; 23(1): 103.
8. Lei M, Hua X, Xiao M, Ding J, Han Q, Hu G. Impairments of astrocytes are involved in the d-galactose-induced brain aging. Biochem Biophys Res Commun 2008; 369(4): 1082–7.
9. Li W, Wang S, Wang H, Wang J, Jin F, Fang F, et al. Astragaloside IV Prevents Memory Impairment in D-galactose-induced Aging Rats Via the AGEs/RAGE/NF-κB Axis. Arch Med Res 2022; 53(1): 20–8.
10. Vives-Bauza C, Starkov A, Garcia-Arumi E. Measurements of the Antioxidant Enzyme Activities of Superoxide Dismutase, Catalase, and Glutathione Peroxidase. Methods in Cell Biology. 80: Academic Press; 2007. p. 379–93.
11. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. J Nutr 2004; 134(3): 489–92.
12. Sentellas S, Morales-Ibanez O, Zanuy M, Albertí JJ. GSSG/GSH ratios in cryopreserved rat and human hepatocytes as a biomarker for drug induced oxidative stress. Toxicol In Vitro 2014; 28(5): 1006–15.
13. Wikoff WR, Anfora AT, Liu J, Schultz PG, Lesley SA, Peters EC, et al. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2009;106(10):3698–703.
14. Hwang IK, Yoo K-Y, Li H, Park OK, Lee CH, Choi JH, et al. Indole-3-propionic acid attenuates neuronal damage and oxidative stress in the ischemic hippocampus. J Neurosci Res 2009; 87(9): 2126–37.
15. Owumi SE, Najophe ES, Otunla MT. 3-Indolepropionic acid prevented chlorpyrifos-induced hepatorenal toxicities in rats by improving anti-inflammatory, antioxidant, and pro-apoptotic responses and abating DNA damage. Environ Sci Pollut Res Int 2022; 29(49): 74377–93.
16. Ding FF, Deng SQ, Fan YX, Qiao SY, Wang G. Indole-3-propionic acid enhances intestinal health and protects against Aeromonas hydrophila infection in high-fat-diet fed Nile tilapia (Oreochromis niloticus). Fish Shellfish Immunol 2026; 171: 111180.
17. Li P, Ma Y, Wang X, Li X, Wang X, Yang J, et al. The protective effect of PL 1-3 on D-galactose-induced aging mice. Front Pharmacol 2024: 14: 1304801.
18. Zhao ZH, Xin FZ ,Xue Y, Hu Z, Han Y, Ma F, et al. Indole-3-propionic acid inhibits gut dysbiosis and endotoxin leakage to attenuate steatohepatitis in rats. Exp Mol Med 2019; 51(9): 1–14.
19. Shwe T, Pratchayasakul W, Chattipakorn N, Chattipakorn SC. Role of D-galactose-induced brain aging and its potential used for therapeutic interventions. Exp Gerontol 2018; 101: 13–6.
20. Chen NY, Liu CW, Lin W, Ding Y, Bian ZY, Huang L, et al. Extract of Fructus Cannabis Ameliorates Learning and Memory Impairment Induced by D-Galactose in an Aging Rats Model. Evid Based Complement Alternat Med 2017; 2017: 4757520.

21. Yu Y, Bai F, Wang W, Liu Y, Yuan Q, Qu S, et al. Fibroblast growth factor 21 protects mouse brain against D-galactose induced aging via suppression of oxidative stress response and advanced glycation end products formation. Pharmacol Biochem Behav 2015; 133: 122–31.

22. Kuo HC, Tong SY, Chao MW, Tseng CY. Ganoderma tsugae prevents cognitive impairment and attenuates oxidative damage in d-galactose-induced aging in the rat brain. PLoS One 2022; 17(4): e0266331.

23. Karbownik M, Stasiak M, Zygmunt A, Zasada K, Lewiński A. Protective effects of melatonin and indole-3-propionic acid against lipid peroxidation, caused by potassium bromate in the rat kidney. Cell Biochem Funct 2006; 24(6): 483–9.

24. Lee R, Britz-McKibbin P. Differential rates of glutathione oxidation for assessment of cellular redox status and antioxidant capacity by capillary electrophoresis-mass spectrometry: an elusive biomarker of oxidative stress. Analytical Chemistry 2009; 81(16): 7047–56.

25. Zhu Y, Carvey PM, Ling Z. Age-related changes in glutathione and glutathione-related enzymes in rat brain. Brain Res 2006; 1090(1): 35–44.

DOI: *10.48305/jims.v44.i879.1823*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 44, No. 879, 2nd Week, November 2026**

Received: 11.09.2026 Accepted: 28.10.2026 Published: 05.11.2026?

Protective Effects of Indole-3-Propionic Acid on Oxidative Stress in a Rat Model of D-Galactose-Induced Aging

Sahar Mohammadalipour[1], Mohammadreza Paryani[2], Hossein Erik-Aghaji[3], Leila Eini[3]

Original Article

Abstract

Background: D-galactose (D-gal) is commonly used to induce aging-related changes, including oxidative stress and impaired redox homeostasis. Indole-3-propionic acid (IPA) is a gut microbiota-derived tryptophan metabolite with antioxidant properties. However, its effects on hippocampal oxidative and redox changes following D-gal exposure are not fully understood. This study evaluated the effect of IPA on oxidative markers, antioxidant defense, and glutathione status in the hippocampus of D-gal-treated rats.

Methods: Forty male Wistar rats were divided into five groups (n=8): Control, D-gal, Control+IPA, D-gal+IPA10, and D-gal+IPA20. D-gal (500 mg/kg/day) was administered intraperitoneally for 8 weeks, followed by oral administration of IPA for 8 weeks. Levels of advanced glycation end products (AGEs), malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG), GSSG/GSH ratio, and the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx) were measured in the hippocampus.

Findings: D-gal exposure increased AGEs, MDA, GSSG levels, and the GSSG/GSH ratio, while decreasing GSH levels and the activity of SOD, CAT, and GPx. IPA treatment at both doses decreased AGEs, MDA, and GSSG, while increasing GSH, SOD, and GPx. CAT activity increased only with the IPA20 dose. The GSSG/GSH ratio showed a significant decrease in the IPA-treated groups.

Conclusion: Chronic D-gal administration was associated with increased oxidative damage and impaired glutathione homeostasis. IPA reduced lipid peroxidation and improved antioxidant enzyme activity, suggesting it may play a role in modulating oxidative and redox disturbances associated with D-gal-induced aging.

Keywords: Indole-3-propionic acid; D-galactose; Oxidative stress; Redox homeostasis; Advanced glycation end products; Hippocampus

Citation: Mohammadalipour S, Paryani M, Erik-Aghaji H, Eini L. **Protective Effects of Indole-3-Propionic Acid on Oxidative Stress in a Rat Model of D-Galactose-Induced Aging.** J Isfahan Med Sch 2026; 44(879): 1823- 31.

1- PhD Student, Department of Veterinary Basic Sciences, SR.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Associate Professor, Department of Veterinary Basic Sciences, Ka. C., Islamic Azad University, Karaj, Iran
3- Assistant Professor, Department of Veterinary Basic Sciences, SR.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran
Corresponding Author: Mohammadreza Paryani, Associate Professor, Department of Veterinary Basic Sciences, Ka. C., Islamic Azad University, Karaj, Iran; Email: mrparyani@iau.ac.ir