

## تغییرات فاکتورهای التهابی سرم پس از تجویز مهارکننده گاما سکر تاز در موش

دکتر مجید خزاعی<sup>۱</sup>، هاجر سعیدی<sup>۲</sup>، نیلوفر شعبانی کیا<sup>۲</sup>، المیرا کلانتری<sup>۲</sup>، زویا طاهر گورابی<sup>۳</sup>

## مقاله پژوهشی

## چکیده

**مقدمه:** Notch signaling در بسیاری از فرایندهای رشد و نمو فیزیولوژیک و پاتولوژیک نقش دارد؛ مهارکننده‌های گاما سکر تاز می‌توانند سبب مهار Signaling آن گردند. هدف این مطالعه، بررسی اثر DAPT، به عنوان مهارکننده گاما سکر تاز، بر سطح فاکتورهای التهابی سرم در موش‌های چاق شاهد بود.

**روش‌ها:** ۲۴ موش نر نژاد C57BL/6 با سن ۵ هفته، به طور تصادفی به دو گروه چاق و شاهد تقسیم شدند. حیوانات چاق به مدت ۲۰ هفته تحت رژیم غذایی پرچرب، که شامل ۶۰ درصد چربی، ۲۰ درصد پروتئین و ۲۰ درصد کربوهیدرات بود، قرار گرفتند. حیوانات گروه شاهد در طول این مدت غذای استاندارد دریافت کردند. سپس، هر گروه به دو زیرگروه دریافت کننده DAPT (۵۰ میلی گرم به ازای کیلوگرم به صورت زیرجلدی روزانه) و عدم دریافت آن تقسیم شدند. پس از ۱۴ روز، نمونه‌ی خونی جهت تعیین سطح سرمی hs-CRP (High-sensitivity C-reactive protein) و اینترلوکین-۶ گرفته شد.

**یافته‌ها:** تفاوت معنی داری بین سطح سرمی hs-CRP بین گروه چاق و شاهد وجود نداشت ( $P > 0.05$ ) و تجویز DAPT نتوانست تغییر معنی داری در سطح سرمی hs-CRP ایجاد نماید ( $P > 0.05$ )؛ اما بررسی سطح سرمی اینترلوکین-۶ نشان داد که حیوانات چاق سطح بالاتری نسبت به گروه شاهد داشتند ( $P < 0.05$ ) و تجویز DAPT سبب کاهش معنی دار آن در هر گروه شاهد و چاق شد ( $P < 0.05$ ).

**نتیجه گیری:** داروی DAPT به عنوان یک مهارکننده آنزیم گاما سکر تاز می‌تواند با اثر بر فاکتورهای التهابی، اثرات مختلف عروقی در فرایندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک داشته باشد.

**واژگان کلیدی:** چاقی، گاما سکر تاز، التهاب

**ارجاع:** مجید خزاعی، سعیدی هاجر، شعبانی کیا نیلوفر، کلانتری المیرا، طاهر گورابی زویا. تغییرات فاکتورهای التهابی سرم پس از تجویز مهارکننده گاما سکر تاز در موش. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۳۳): ۴۸۶-۴۹۲

## مقدمه

Notch signaling در بسیاری از فرایندهای رشد و نمو فیزیولوژیک و پاتولوژیک مانند آپوپتوز، دیفرانسیاسیون سلولی، پرولیفراسیون و انکورنژ نقش دارد (۱). مطالعات بعدی نیز نشان داده است که

Notch signaling در رشد برخی تومورها نیز از طریق دخالت در فرایند آنژیوژنز نقش ایفا می‌کند (۱-۲).

گاما سکر تاز آنزیمی است که بسیاری از پروتئین‌های درگیر در فرایند آنژیوژنز را می‌شکند؛ از

۱- دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی و کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲۰ هفته تحت رژیم غذایی پرچرب که شامل ۶۰ درصد چربی، ۲۰ درصد پروتئین و ۲۰ درصد کربوهیدرات بود، قرار گرفتند. غذای پرچرب از شرکت Bioserve کشور آمریکا تهیه گردید. حیوانات گروه شاهد به مدت ۲۰ هفته غذای استاندارد که از انستیتو پاستور تهیه شده بود، دریافت کردند. در طول مطالعه، حیوانات دسترسی کامل به آب و غذا داشتند و وزن آن‌ها هر هفته اندازه‌گیری شد.

آن گاه، هر گروه به دو زیر گروه تقسیم شدند: گروهی که DAPT را به عنوان مهار کننده‌ی گاما سکرناز دریافت می‌کردند و گروهی که حلال آن (Dimethyl sulfoxide یا DMSO) را دریافت نمودند (۹). طول مدت درمان ۱۴ روز بود. DAPT روزانه، با دوز ۵۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم به صورت زیرجلدی تزریق گردید (۸، ۱۰).

پس از این مدت، حیوانات کشته و نمونه‌ی خونی آن‌ها جهت تعیین سطح سرمی hs-CRP (High-sensitivity C-reactive protein) و ایترلوکین-۶ گرفته شد. نمونه‌های خونی با دور ۱۰۰۰۰ در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد و سرم آن جدا گردید؛ نمونه‌ها در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

سطح سرمی hs-CRP با استفاده از کیت شرکت Biovender (آمریکا) به شماره کاتالوگ RH971CRP01MR به روش الیزا اندازه‌گیری گردید؛ بدین ترتیب که سرم موش‌ها پس از رقیق شدن به چاهک‌ها اضافه شد. پس از انکوبه شدن و شستشوی پروتئین‌های سرمی که واکنش نداده بودند، آنتی CRP کونژوگه و سپس سوبسترای Urea peroxidase اضافه گردید. تغییر رنگ یا شدت

جمله‌ی این پروتئین‌ها می‌تواند به Notch اشاره کرد که مهار آن می‌تواند با بلوک شکستن بخش داخل سلولی Notch، سبب مهار Signaling آن گردد (۳-۴). نشان داده شده است که موش‌های فاقد فعالیت گاما سکرناز، اختلال شدید عروقی دارند و در معرض خطر خون‌ریزی‌های مغزی می‌باشند (۵).

چاقی از جمله‌ی بیماری‌هایی است که با افزایش خطر ابتلا به بسیاری از سرطان‌ها همراه است و شاید یکی از دلایل آن، تغییرات در فرایند آنژیوژنز توموری باشد (۶-۷). در مطالعات قبلی نشان داده شده است که داروهای مهار کننده‌ی گاما سکرناز می‌تواند تغییراتی در سطح سرمی فاکتورهای رشد ایجاد نماید (۸).

ما در این مطالعه از داروی DAPT *N-[N-(3,5-Difluorophenylacetyl-L-alanyl)]-S-* (phenylglycine t-Butyl Ester) به عنوان مهار کننده‌ی گاما سکرناز استفاده نمودیم و هدف ما در این مطالعه، بررسی اثر این دارو بر سطح فاکتورهای التهابی سرم در موش‌های شاهد و چاق تغذیه شده با رژیم غذایی پرچرب بود.

## روش‌ها

این مطالعه بر روی ۲۴ موش نر نژاد C57BL6 با سن ۵ هفته انجام شد. موش‌ها از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند و پس از انتقال، به مدت یک هفته در لانه‌ی حیوانات گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان جهت تطابق با شرایط محیطی در دمای بین ۲۵-۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و سیکل روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته قرار گرفتند.

سپس، حیوانات به طور تصادفی به دو گروه چاق و شاهد تقسیم شدند. حیوانات چاق به مدت

آزمایش مشخص شد که حیوانات دریافت کننده‌ی رژیم غذایی پرچرب به وضوح وزن بالاتری نسبت به گروه شاهد داشتند ( $24/1 \pm 5/5$ ،  $P < 0/05$ ) (شکل ۱).

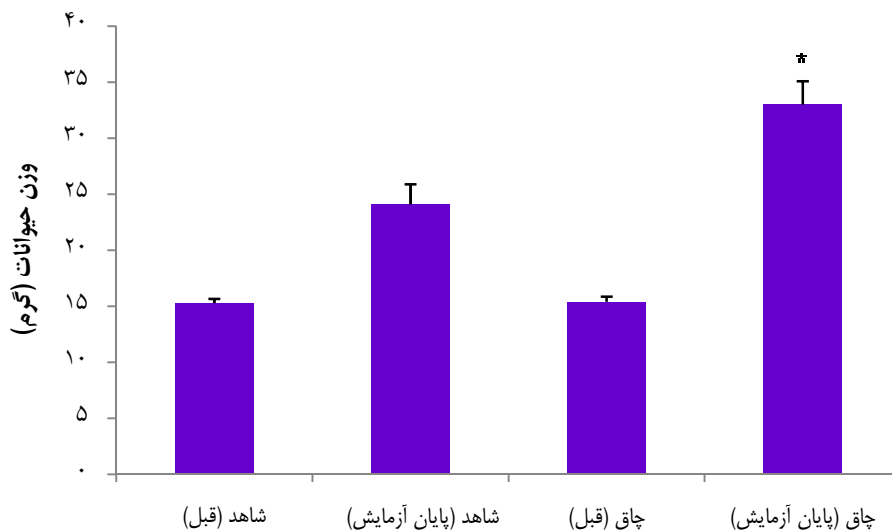
بررسی نتایج سطح سرمی hs-CRP نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین سطح سرمی این فاکتور التهابی بین گروه چاق و شاهد وجود نداشت ( $P > 0/05$ ); تجویز DAPT نیز نتوانست تغییر معنی‌داری را در سطح سرمی hs-CRP ایجاد نماید ( $P > 0/05$ ). تغییرات سطح سرمی hs-CRP در گروه‌های مختلف، در شکل ۲ نشان داده شده است.

بررسی سطح سرمی اینترلوکین-۶ نشان داد که حیوانات چاق سطح بالاتری نسبت به گروه شاهد داشتند ( $P < 0/05$ ). تجویز DAPT موجب شد سطح سرمی اینترلوکین-۶ در هر دو گروه شاهد و چاق به طور معنی‌داری کاهش یابد ( $P < 0/05$ ) (شکل ۳).

رنگ در طول موج ۴۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه ELISA reader اندازه‌گیری شد و از روی مقایسه آن با منحنی استاندارد، سطح سرمی CRP معلوم گردید. اندازه‌گیری سطح سرمی اینترلوکین-۶ با استفاده از کیت شرکت BD Bioscience (آمریکا) بر اساس تکنیک الیزا صورت گرفت. بدین صورت که سرم موش‌ها و استانداردها به چاهک‌های حاوی آنتی‌بادی افزوده شد. پس از شستشو، آنتی‌بادی Anti-mouse IL-6 اضافه گردید و پس از اضافه کردن محلول متوقف کننده‌ی واکنش، شدت رنگ در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و از روی مقایسه‌ی آن با استانداردها، سطح سرمی نمونه‌ها به دست آمد.

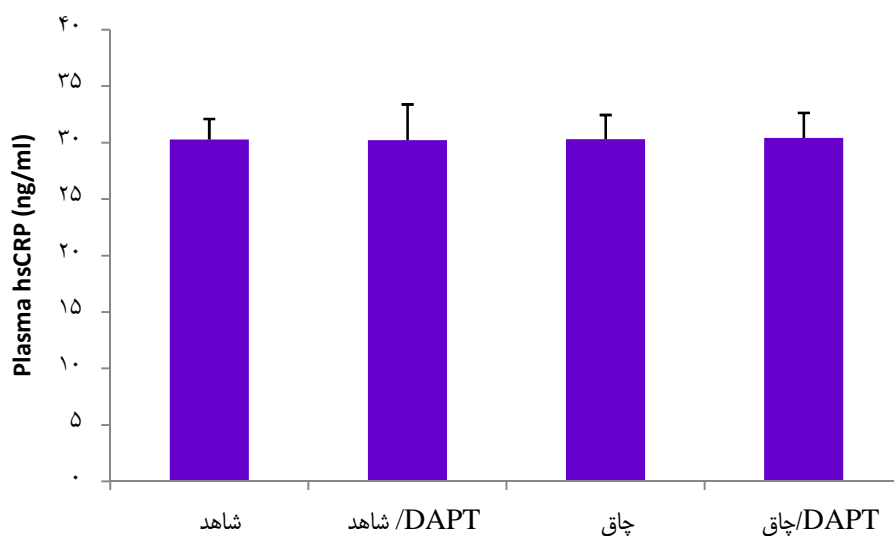
### یافته‌ها

در بررسی هفتگی وزن حیوانات و وزن انتهایی

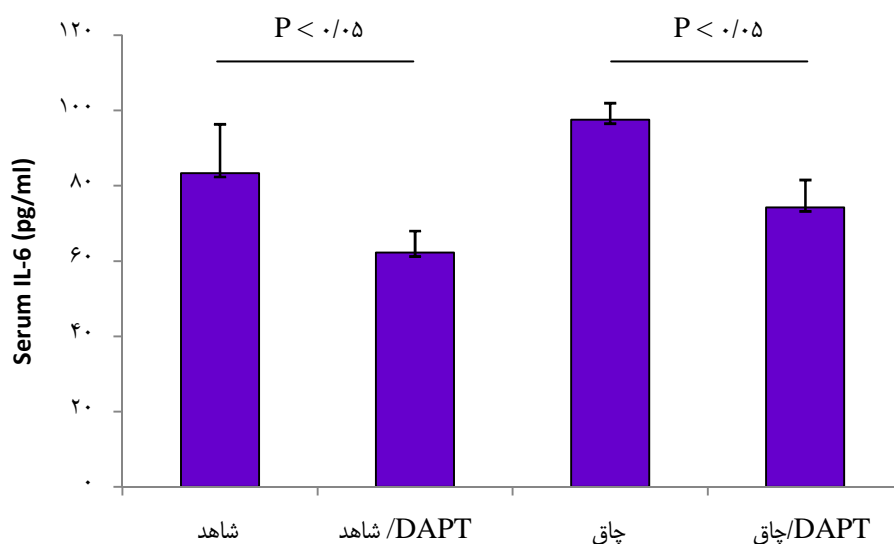


شکل ۱. تغییرات وزن حیوانات مورد بررسی در ابتدا و انتهای آزمایش (۲۰ هفته رژیم غذایی خاص)

\*: تفاوت معنی‌دار با سایر گروه‌ها



شکل ۲. سطح سرمی hs-CRP در گروه‌های مختلف در پایان آزمایش



شکل ۳. تغییرات سطح سرمی اینترلوکین-۶ در گروه‌های مختلف در پایان آزمایش

به آترواسکلروز هستند؛ آترواسکلروز نیز یک پدیده‌ی مزمن التهابی است. به نظر می‌رسد که افزایش نسبی یا معنی‌دار فاکتورهای التهابی سرم در حیوانات چاق، نشانگر یک فرایند التهاب مزمن در این حیوانات باشد. این موضوع در مطالعات قبلی نیز نشان داده شده است (۱۱).

### بحث

نتایج مطالعه‌ی ما نشان داد که حیوانات تغذیه شده با رژیم غذایی پرچرب سطح اینترلوکین-۶ بالاتری نسبت به گروه شاهد داشتند؛ هر چند که سطح سرمی hs-CRP آن‌ها تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نداشت. افراد چاق در معرض خطر بیشتری برای ابتلا

پاسخ‌های التهابی وابسته به میکروگلیاها در مغز را پس از ایسکمی مغزی افزایش می‌دهد؛ این مطالعه پیشنهاد نموده است که داروهای مهار کننده‌ی Notch می‌توانند به عنوان یک مکمل در پروتکل درمانی بیماران مبتلا به استروک یا بیماری‌های نورودژنراتیو مرتبط با پدیده‌ی التهاب به کار روند (۱۴).

### نتیجه‌گیری

داروی DAPT، به عنوان یک مهار کننده‌ی آنزیم گاما سکریتاز، می‌تواند با اثر بر فاکتورهای التهابی، اثرات مختلف عروقی در فرایندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک داشته باشد.

### تشکر و قدردانی

از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان بابت تأمین هزینه‌های طرح تشکر و قدردانی می‌گردد.

یافته‌های ما همچنین نشان داد که DAPT به عنوان یک مهار کننده‌ی گاما سکریتاز توانست سبب کاهش معنی‌دار در سطح سرمی اینترلوکین-۶ در موش‌های چاق و شاهد شود. Notch signaling نقش مهمی در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک بدن نظیر آپوپتوز، دیفرانسیاسیون سلولی، پرولیفراسیون، انکوژنز و آنژیوژنز دارد (۱) و DAPT می‌تواند با مهار آن بر این فرایندها اثرگذار باشد.

فاکتورهای التهابی CRP و اینترلوکین-۶ اثرات متعدد عروقی دارند و در بسیاری از بیماری‌های قلبی-عروقی نقش ایفا می‌کنند (۱۲)؛ از جمله‌ی این آثار می‌توان به اثرات بر فرایند آنژیوژنز اشاره داشت (۱۳). به نظر می‌رسد که استفاده از داروهای مهار کننده‌ی گاما سکریتاز می‌تواند با کاهش سطح فاکتورهای التهابی، اثرات مختلف عروقی از خود بروز دهد. از سوی دیگر، یک مطالعه‌ی جدید نشان داده است که فعال شدن مسیر Notch signaling

### References

1. Rehman AO, Wang CY. Notch signaling in the regulation of tumor angiogenesis. *Trends Cell Biol* 2006; 16(6): 293-300.
2. Leong KG, Karsan A. Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis. *Blood* 2006; 107(6): 2223-33.
3. Cao L, Arany PR, Wang YS, Mooney DJ. Promoting angiogenesis via manipulation of VEGF responsiveness with notch signaling. *Biomaterials* 2009; 30(25): 4085-93.
4. Wang M, Wu L, Wang L, Xin X. Down-regulation of Notch1 by gamma-secretase inhibition contributes to cell growth inhibition and apoptosis in ovarian cancer cells A2780. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 393(1): 144-9.
5. Nakajima M, Yuasa S, Ueno M, Takakura N, Koseki H, Shirasawa T. Abnormal blood vessel development in mice lacking presenilin-1. *Mech Dev* 2003; 120(6): 657-67.
6. Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(8): 579-91.
7. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407(6801): 249-57.
8. Saeidi H, Shabani Kia N, Kalantari E, Tahergorabi Z, Khzaei M. Effects of DAPT on serum vascular endothelial growth factor and its soluble receptor in obese BALB/C mice. *J Isfahan Med Sch* 2013; 30(214): 1942-8. [In Persian].
9. Paris D, Quadros A, Patel N, DelleDonne A, Humphrey J, Mullan M. Inhibition of angiogenesis and tumor growth by beta and gamma-secretase inhibitors. *Eur J Pharmacol* 2005; 514(1): 1-15.
10. Portelius E, Zhang B, Gustavsson MK, Brinkmalm G, Westman-Brinkmalm A, Zetterberg H, et al. Effects of gamma-secretase inhibition on the amyloid beta isoform pattern in

- a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis* 2009; 6(5-6): 258-62.
- 11.** Rodriguez-Hernandez H, Simental-Mendia LE, Rodriguez-Ramirez G, Reyes-Romero MA. Obesity and inflammation: epidemiology, risk factors, and markers of inflammation. *Int J Endocrinol* 2013; 2013: 678159.
- 12.** Bisoendial RJ, Boekholdt SM, Vergeer M, Stroes ES, Kastelein JJ. C-reactive protein is a mediator of cardiovascular disease. *Eur Heart J* 2010; 31(17): 2087-91.
- 13.** Slevin M, Krupinski J. A role for monomeric C-reactive protein in regulation of angiogenesis, endothelial cell inflammation and thrombus formation in cardiovascular/cerebrovascular disease? *Histol Histopathol* 2009; 24(11): 1473-8.
- 14.** Wei Z, Chigurupati S, Arumugam TV, Jo DG, Li H, Chan SL. Notch activation enhances the microglia-mediated inflammatory response associated with focal cerebral ischemia. *Stroke* 2011; 42(9): 2589-94.

## Changes of Serum Inflammatory Markers after Gamma-Secretase Inhibitor Administration Mice

Majid Khazaei MD, PhD<sup>1</sup>, Hajar Saeidi<sup>2</sup>, Niloofar Shabanikia<sup>2</sup>,  
Elmira Kalantari<sup>2</sup>, Zoya Tahergorabi<sup>3</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Notch signaling is involved in physiological and pathological processes and gamma-secretase inhibitors can suppress it. The aim of this study was to evaluate the effect of DAPT, a gamma secretase inhibitor, on serum inflammatory markers in mice.

**Methods:** 24 C57BL6 mice (age: 5 weeks old) were randomly divided into control and obese groups. Obese group received high-fat diet (60% fat, 20% protein, and 20% carbohydrate) for 20 weeks. Control group received standard diet during this time. Then, each group was divided into receiving and non-receiving DAPT (50mg/kg; Subcutaneous). After 14 days, blood samples were taken for measurements of serum high-sensitive C-reactive protein (hs-CRP) and interleukin-6 (IL-6).

**Findings:** There was no significant difference in serum hs-CRP concentration between control and obese groups ( $P > 0.05$ ). Administration of DAPT did not alter serum hs-CRP level in both groups ( $P > 0.05$ ). Serum IL-6 was significantly higher in obese animals compare to controls ( $P < 0.05$ ) and administration of DAPT reduced serum IL-6 in control and obese animals ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** DAPT, as a gamma secretase inhibitor, could affect several physiological and pathological vascular changes by alteration of serum inflammatory markers.

**Keywords:** Obesity, Gamma-secretase, Inflammation

**Citation:** Khazaei M, Saeidi H, Shabanikia N, Kalantari E, Tahergorabi Z. **Changes of Serum Inflammatory Markers after Gamma-Secretase Inhibitor Administration Mice.** J Isfahan Med Sch 2013; 31(233): 486-92

1- Associate professor, Department of Physiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Students Research Committee, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- PhD Student, Department of Physiology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Majid Khazaei MD, PhD, Email: khazaei@med.mui.ac.ir