



## Investigation the Anti-inflammatory Effect of Astaxanthin on Inhibiting TLR4 and Some Inflammatory Cytokines in macrophages cell

Mojiri-Forushani H<sup>a\*</sup>, Zolgharnein H<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacology, School of Medicine, Abadan University of Medical Sciences, Abadan, Iran.

<sup>b</sup> Department of Marine Biology, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran

### Original Article

Use your device to scan and



read the article online

**Citation** Mojiri-Forushani H, Zolgharnein H. Investigation the Anti-inflammatory Effect of Astaxanthin on Inhibiting TLR4 and Some Inflammatory Cytokines in macrophages cell. Journal of Cell and Tissue . 2023; 14(4): 309-324

<https://10.61186/JCT.14.4.309>

### KEYWORDS

Astaxanthin  
Anti-inflammatory  
TLR4  
Inflammatory cytokine

### ABSTRACT

**Aim:** Inflammation is a protective physiologic response against pathogens, trauma and injury (1, 2). Inflammation pathway are different in human body and some main pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  have key role in pathogenesis of inflammation (3). Current anti-inflammatory drugs including corticosteroids and non-steroid anti-inflammatory drugs have serious side effects (6), so, research on new compounds with anti-inflammatory property is necessary. Astaxanthin is a natural carotenoid with various pharmacological effects. *Haematococcus Algae* is one of the marine sources of astaxanthin. Anti-inflammatory and antioxidant effects of astaxanthin were reported in previous studies (8-10), but the molecular mechanism of the anti-inflammatory effect of astaxanthin on the peripheral cells of the immune system is not clear. The aim of this study was to evaluate anti-inflammatory effects of astaxanthin on TLR4 gene expression and secretion of key inflammatory cytokines including IL-1, IL-6, and TNF $\alpha$  in RAW264.7 macrophage cells.

**Methods and Material:** The RAW264.7 macrophage cells was used in this study. Astaxanthin was extracted from *Haematococcus Algae*, then different doses of 25, 50, 100  $\mu$ M of astaxanthin were used to treat the cells. Cells divided to three groups: one group received LPS (1 $\mu$ g/ml), Treatment group received LPS (1 $\mu$ g/ml) in combination to different dose of astaxanthin (25, 50, 100  $\mu$ M) and control group without LPS astaxanthin. After 24 hour incubation, cell viability was assay with MMT test. TLR4 gene expression was measured by RT-PCR at 24 and 48 hours after induction with LPS.  $\beta$ -actin was considered as housekeeping gene. The levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF $\alpha$  cytokines were measured with a commercial sandwich ELISA kit. The optic absorbance was read at 45 nm. Descriptive statistics and one-way ANOVA test were used to analyze the data. To analysis the fold change of gene expression, formula  $2^{-\Delta\Delta CT}$  was used.

\* Corresponding author. Tel.: 06153384004

E-mail address: [h.mojiriforushani@abadanums.ac.ir](mailto:h.mojiriforushani@abadanums.ac.ir)

DOI: <https://10.61186/JCT.14.4.309>

Received: 21 Oct. 2023; Received in revised form: 25 Nov. 2023; Accepted: 18 Dec. 2023

Original Article

©Author



**Results:** None of different doses of astaxanthin (25, 50, 100  $\mu\text{M}$ ) and LPS (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) had no toxicity effect on macrophages cell. ( $P > 0.05$ ). LPS increased TLR 4 gene expression at both 24 and 48 hours after induction, ( $P < 0.001$ ) in compare to control group. Astaxanthin at (25, 50, 100  $\text{Mm}$ ) doses significantly reduced the TLR4 gene expression in compare to LPS group. ( $P < 0.001$ ). The levels of cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF $\alpha$  were increased in macrophage cells induced by LPS in compare to control group ( $p < 0.05$ ), and doses of 50 and 100  $\mu\text{M}$  astaxanthin significantly decreased the levels of cytokine in macrophage cell ( $p < 0.01$ ) ( $p < 0.001$ ), but the low dose (25  $\mu\text{M}$ ) of astaxanthin had no significant anti-inflammatory effect on inflammatory cytokines level.

**Conclusion:** Astaxanthin as a natural carotenoid reduced the expression level of TLR 4 in macrophages cell and the secretion of main inflammatory cytokines IL-1, IL-6, and TNF $\alpha$  in its signaling transduction. TLR4 gene expression increases in inflammatory condition and alter the inflammatory cytokine level via activation of NF- $\kappa\text{B}$  (15-17). It seems that inhibition of TLR4 in macrophage cell exert anti-inflammatory effect that reduction of some main inflammatory cytokines, may have critical role. Finally, Because of the anti-inflammatory effect of astaxanthin and the side effects of current anti-inflammatory drugs, this compound has a high potential to be introduced in the treatment of inflammatory disease such as arthritis rheumatoid. Although more molecular and clinical studies must be done to clarify the exact mechanisms and efficacy of astaxanthin.



## بررسی اثر ضد التهابی آستاگزانتین بر مهار TLR4 و برخی سایتوکاین‌های التهابی در سلول ماکروفاژی

هدا مجیری فروشانی<sup>۱\*</sup>، حسین ذوالقرنین<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> استادیار فارماکولوژی، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آبادان، آبادان، ایران. [h.mojiri@abadanums.ac.ir](mailto:h.mojiri@abadanums.ac.ir)  
<sup>۲</sup> استاد بیولوژی مولکولی و مهندسی ژنتیک، گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران.

[zolgharnein@kmsu.ac.ir](mailto:zolgharnein@kmsu.ac.ir)

چکیده	واژگان کلیدی
<p><b>هدف:</b> آستاگزانتین کاروتنوئید طبیعی با آثار فارماکولوژیک مختلف می باشد. مکانیسم مولکولی اثر ضد التهاب این ترکیب چندان مشخص نیست. هدف این مطالعه، بررسی نقش TLR4 و سایتوکاین‌های التهابی <math>IL-1</math>, <math>IL-6</math>, <math>TNF\alpha</math> در بروز اثر ضد التهابی آستاگزانتین در ماکروفاژها می باشد. <b>مواد و روش ها:</b> سلول‌های ماکروفاژی RAW264.7 با LPS اقای التهاب شدند. دوزهای ۰.۲۵، ۰.۵۰، ۱.۰ میکرو مولار از آستاگزانتین برای تیمار سلول‌ها به کار برده شد. میزان بیان ژن TLR4 به روش RT-PCR در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از القا با LPS اندازه گیری شد. سطح سایتوکاین‌های <math>IL-1</math>, <math>IL-6</math>, <math>TNF\alpha</math> با کیت الایزای ساندویچی اندازه گیری شد. از آزمون‌های آماری و تست ANOVA یک طرفه برای آنالیز داده ها استفاده شد. <b>نتایج:</b> LPS باعث افزایش میزان بیان ژن TLR4 در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از القا شد (<math>p &lt; 0.001</math>) که آستاگزانتین با هر سه دوز به طور معنی داری آن را کاهش داد (<math>p &lt; 0.001</math>). سطح سایتوکاین‌های <math>IL-1</math>, <math>IL-6</math>, <math>TNF\alpha</math> در سلول‌های ماکروفاژی القا شده با LPS افزایش یافته بود (<math>p &lt; 0.05</math>) که دوزهای ۰.۵۰ و ۱.۰ میکرومولار آستاگزانتین باعث کاهش معنی دار سطح سایتوکاین‌ها شد. <b>نتیجه گیری:</b> آستاگزانتین با کاهش میزان بیان TLR4 که در شرایط التهابی افزایش بیان می کند باعث کاهش تولید سایتوکاین‌های التهابی <math>IL-1</math>, <math>IL-6</math>, <math>TNF\alpha</math> که در مسیر سیگنالینگ آن قرار دارند، می شود. با توجه به اثر ضد التهابی آستاگزانتین و عوارض داروهای ضد التهاب کنونی، آستاگزانتین دارای پتانسیل بالا جهت در مان بیماری‌های التهابی مزمن می باشد.</p>	<p>آستاگزانتین ضد التهاب TLR4 سایتوکاین التهابی</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۲۹ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۱۰/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۲۷</p>

### ۱- مقدمه

التهاب یک پاسخ حفاظتی و فیزیولوژیک در برابر آسیب به سلول و بافت می باشد و با علائم بالینی گرما، قرمزی، تورم و درد بروز می کند. التهاب در ابتدا باعث التیام و ترمیم مناطق آسیب دیده می شود ولی در صورت تداوم پروسه‌های التهابی، منجر به آسیب به بافت‌های بدن و بروز علائم مخصوصا درد می شود (۱، ۲). مسیرهای منجر به التهاب و درد در بدن انسان متنوع می باشند و در تمام مسیرها، آنزیم‌ها، فاکتورهای رونویسی کننده، تولید و ترشح واسطه‌های شیمیایی التهابی نقش اساسی دارند. ماکروفاژها به عنوان یکی از اجزای مهم سیستم ایمنی بدن، نقش کلیدی در شروع و تدام التهاب در بدن دارند. ماکروفاژها از طریق تغییر در میزان ترشح سایتوکاین‌های التهابی و پیش التهابی، باعث پیشرفت پروسه‌های التهابی در بدن

می شوند. همچنین ماکروفاژها در پاتوژن بیماری های التهابی مزمن، مانند آرتریت روماتوئید، بیماری های التهابی دستگاه گوارش، التهاب بافت های کبدی و... نقش اساسی دارند (۳، ۴).

سایتوکاین های  $IL-1\beta$  (Interlukine 1 $\beta$ ),  $TNF\alpha$  (Tumor necrosis factor  $\alpha$ ),  $IL-6$  (Interlukin 6) از مهم ترین سایتوکاین های پیش التهابی هستند که افزایش ترشح و غلظت آن ها در بیماری های التهابی مختلف مانند آرتریت روماتوئید، دیده می شود (۵).

TLR (Toll like receptor) ها نقش مهمی در عملکرد سیستم ایمنی بدن در شرایط مواجهه با عوامل بیماری زا و به ویژه التهاب دارند. این گیرنده ها به طور وسیعی در سلول های ایمنی در شرایط التهاب زا بیان می شوند و باعث فعال کردن برخی سلول های وابسته به سیستم ایمنی، آنزیم ها و سایتوکاین های التهابی می شوند. از بین آن ها TLR4 در بروز پاسخ های التهابی القا شده توسط لیپوپولی ساکاریدها نقش دارد و از طریق فعال کردن  $NF-\kappa B$  (Nucleular factor kappa B) باعث افزایش ترشح سایتوکاین های التهابی  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ,  $TNF\alpha$  می شود. لذا مداخله در مسیر ترشح سایتوکاین های التهابی می تواند منجر به بروز اثرات ضد التهابی شود (۶، ۷).

درمان های رایج برای کنترل درد و التهاب در سه دسته اصلی قرار می گیرند: داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی که از پرمصرف ترین داروهای ضد درد و ضد التهاب می باشند ولی عارضه های جانبی مهم آن بروز مشکلات گوارشی جدی می باشد. داروهای کورتیکواستروئیدها نیز خواص ضد التهاب قوی دارند ولی گسترده ای از عوارض جانبی این ترکیبات مصرف آن ها را محدود کرده است. افزایش بروز پوکی استخوان، افزایش سطح لیپیدها و گلوکز خون و کاهش سطح ایمنی بدن از مهم ترین عوارض جانبی آن ها می باشد. داروهای مخدر با اثر ضد دردی قوی، جایگاه ویژه ای در درمان ضد درد دارند ولی مهم ترین چالش آن ها ایجاد تحمل دارویی و بروز وابستگی های جسمی و روانی می باشد، به همین دلیل مصرف این دسته از ترکیبات در شرایط خاص و با احتیاط انجام می شود (۸).

از این رو همواره یافتن داروهای ضد التهاب جدید با اثر بخشی مناسب و کم بودن عوارض جانبی مورد توجه محققین بوده است. اقیانوس ها به عنوان منبع منشا حیات، دارای گنجینه ای ارزشمند از ترکیبات غنی و زیستی فعال می باشند. انواع موجودات دریایی با داشتن ترکیباتی مانند کاروتنوئیدها، ترپن ها، تری ترپن ها، آلکالوئیدها، سزکویی ترپن ها و... دارای خواص فارماکولوژیک متنوعی مانند ضد باکتری، ضد قارچ، ضد سرطان، ضد درد و التهاب و... می باشند (۹). آستاگزانتین ترکیب کاروتنوئیدی گزانتوفیلی طبیعی می باشد که در منابع مختلفی مانند آبزیان، ماهی سالمون، جلبک و... یافت می شود. این ترکیب دارای خواص ضد التهاب، آنتی اکسیدانسی، ضد دیابت، محافظت کننده ی بیماری های قلبی و عروقی و اثرات ضد سرطان می باشد. اثرات ضد التهابی این ترکیب و مفید بودن آن در برخی بیماری های التهابی عصبی مخصوصا بیماری های نورودژنراتیو مانند پارکینسون و مولتیپل اسکلروزیس بررسی شده است (۱۰-۱۲). مطالعات بر روی مدل های حیوانی و مطالعات درون تنی، اثرات ضد التهابی این ترکیب را نشان داده اند (۱۳، ۱۴). همچنین بررسی مولکولی آستاگزانتین بر روی سلول های دندریتیک دستگاه ایمنی، حاکی از اثر محافظتی و ضد التهابی این ترکیب می باشد (۱۵). با این وجود بررسی های مولکولی اثر ضد التهابی این ترکیب بر روی سلول های ماکروفاژی به عنوان یکی از مهم ترین سلول های دستگاه ایمنی بدن که نقش مهم و کلیدی در بروز پاسخ های التهابی دارند، محدود می باشد. آستاگزانتین به همراه ترکیب طبیعی توکوترینول با کاهش سطح اینترلوکین ۶ و ۱۲ باعث مهار و کاهش التهاب در سلول های ماکروفاژی می شود (۱۶). همچنین مهار فعال شدن

NF- $\kappa$ B و کاهش تولید PGE2 (Prostaglandin E2), NO (Nitric oxide) و مهار آنزیم سیکلواکسیژناز از مکانیسم های اثر ضد التهابی آستاگزانتین بر روی سلول های ماکروفاژی RAW264.7 بیان شده است (۱۷).

با این وجود نقش سایر واسطه های التهابی و سایتوکاین های پیش التهابی و التهابی بر روی سلول های ماکروفاژی در بروز اثر ضد التهابی آستاگزانتین چندان مشخص نیست، لذا با توجه به نقش TLR4 در ترشح سایتوکاین های التهابی و پیش التهابی و مطالعات محدود در زمینه ی اثرات ضد التهابی آستاگزانتین در ماکروفاژها و نقش آنها در التهاب مزمن، هدف این مطالعه، بررسی اثرات ضد التهابی ترکیب طبیعی آستاگزانتین بر میزان ترشح سایتوکاین های التهابی و بیان ژن TLR4 بر سلول های ماکروفاژی می باشد.

## ۲- مواد و روش ها

آستاگزانتین از *Haematococcus Algae* توسط پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان استخراج شد. رده سلولی ماکروفاژ RAW 264.7 از بانک سلولی موسسه انیستیتو پاستور ایران خریداری شد. متانول، استونیتریل از شرکت مرک آلمان، دی میتل سولفوکساید (DMSO (Dimethyl sulfoxide) و LPS (Lipopolysaccharide) (لیپولی ساکارید استخراج شده از باکتری *Escherichia coli* 0127:B8) از شرکت سیگما آلدریج آمریکا تهیه شد. PRMI و محیط کشت DMEM، سرم جنین گاوی (FBS (Fetal bovine serum) از شرکت ایده زیستی ایران خریداری شد. پلیت های کوت شده با فیبرونکتین و کلاژن از شرکت پادگین طب در ایران تهیه شد. کیت اندازه گیری TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 از شرکت کارمانیا پارس ژن ایران خریداری شد. کیت استخراج RNA از شرکت سیناژن ایران و کیت سنتز cDNA از شرکت TAKARA ژاپن تهیه شد. سایر مواد و معرف ها از منابع معتبر خریداری شدند.

**روش استخراج آستاگزانتین از *Haematococcus Algae*** استخراج آستاگزانتین از میکرو جلبک هماتوکوکوس به روش استخراج توسط حلال های اسیدکلریدریک و استون انجام شد، در این روش حدود ۱۰ میلی گرم از پودر هماتوکوکوس در یک میلی لیتر حلال اسیدکلریدریک ۴ نرمال قرار گرفت و این مخلوط به مدت یک ساعت در بن ماری با دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از خنک شدن، به مدت ۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفوژ گردید. سپس با آب مقطر شستشو انجام شد و این مراحل دو بار تکرار شد. رسوب به دست آمده با ۴ میلی لیتر استون سوسپانسیون شده و پس از یک ساعت هم زدن در دمای اتاق، توسط امواج فراصوت، فرآیند سونیکاسیون در فرکانس ۲۰ کیلوهرتز انجام شد، این مراحل دو بار تکرار شد. سپس سانتریفیوژ با دور ۳۵۰۰ به مدت ۶ دقیقه انجام شد و استون حاوی محلول رویی جدا سازی شد. از محلول رویی برای شناسایی آستاگزانتین توسط HPLC (High performance liquid chromatography) استفاده شد. در این روش میزان ۱۵ میکرولیتر از محلول به دستگاه تزریق شد، فاز متحرک شامل متانول و استونیتریل به نسبت حجمی/حجمی ۷۰ به ۳۰ در نظر گرفته شد (۱۸، ۱۹).

**کشت سلولی:** سلول های RAW264.7 در محیط DMEM، و ۱۰ درصد سرم جنین گوساله غیرفعال شده با حرارت و ۱ درصد پنی سیلین / استرپتومایسین کشت داده شدند. سلول ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و هوا ی مرطوب با ۵ درصد CO<sub>2</sub> و ۹۵ درصد هوا در دستگاه کشت سلولی نگهداری شدند.

**تست MMT توان حیاتی سلول ها:** تست سنجش میزان زنده ماندن سلول ها در حضور LPS و غلظت های مختلف آستاگزانتین به منظور بررسی سمیت LPS و آستاگزانتین انجام شد. در این تست برای ارزیابی سلول های زنده از پودر

MTT استفاده می شود MTT، توسط سلول ها جذب شده و سپس توسط دهیدروژناز میتوکندری به فورمازان تبدیل می شود. تجمع فورمازان منعکس کننده فعالیت میتوکندری به طور مستقیم و زنده ماندن سلول به طور غیر مستقیم است. در این تست محلول زرد رنگ تهیه شده از پودر MTT، توسط سلول های زنده و فعال از نظر متابولیکی در طی مدت تقریبی ۴ ساعت به بلورهای ارغوانی رنگ فورمازان تبدیل می شود. کریستال های فورمازان ساخته شده به کمک حلال DMSO حل شده و جذب نوری محلول ارغوانی رنگ به وسیله الیزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده می شود.

در ابتدا، سوسپانسیون های سلولی تهیه شد و با استفاده از لام نیو بار، شمارش سلولی انجام شد. سپس از پلیت های ۹۶ خانه ای ته صاف با محیط کشت کامل استفاده شد و سلول ها به میزان  $10^4$  در هر چاهک قرار داده شد.

در این مطالعه ۳ نوع تیمار سلولی انجام شد:

الف. سلول های ماکروفاژی RAW ۲۶۴.۷ (به عنوان کنترل)

ب. سلول های ماکروفاژی رده RAW ۲۶۴.۷ کشت داده شده در حضور LPS به عنوان ماده القا کننده التهاب

ج. سلول های ماکروفاژی رده RAW ۲۶۴.۷ کشت داده شده در حضور LPS به عنوان ماده القا کننده التهاب که غلظت های متفاوت آستاگزانتین (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) به آن ها اضافه شد. آزمایش ها سه بار به طور مجزا انجام شد و در هر بار برای هر بررسی سه بار تکرار انجام شد.

به جز سلول هایی که به عنوان کنترل در نظر گرفته شده بودند، در هر چاهک LPS به میزان  $1\mu\text{g/ml}$  اضافه شد و در گروه تیمار شده با آستاگزانتین، غلظت های مختلف آستاگزانتین (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) اضافه شدند سپس سلول ها به مدت ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت در انکوباتور  $\text{CO}_2$  انکوبه شدند. پس از آن محیط کشت تعویض شد و  $10$  میکرولیتر از محلول MMT با غلظت ۱۲ میلی مولار در تاریکی به هر چاهک اضافه شد و پلیت با فویل پوشیده شد و در دمای  $37^\circ\text{C}$  درجه سانتی گراد به مدت ۴ ساعت انکوبه شد. پس از این مدت ۵۰ میکرولیتر محلول DMSO به منظور حل کردن کریستال های فوروزمان به هر چاهک اضافه شد و در نهایت میزان جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه الیزا ریدر خوانده شد.

**محاسبه درصد سلول های زنده در تست سمیت سلول:** درصد سلول های زنده یا میزان بقای سلولی در بررسی سمیت سلولی، بر اساس رابطه زیر محاسبه می شود.

$$100 \times \text{جذب متوسط نمونه های کنترل} / \text{جذب متوسط نمونه های تیمار شده} = \text{درصد سلول های زنده}$$

**اندازه گیری غلظت سایتوکاین های  $IL-1\beta$ ,  $IL6$ ,  $TNF\alpha$  در سلول RAW264.7** سلول های ماکروفاژی RAW264.7 به میزان  $10^4$  در هر چاهک قرار داده شد. یک ساعت قبل از اضافه کردن  $LPS(1\mu\text{g/ml})$  به هر سلول، غلظت های مختلف آستاگزانتین (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $37^\circ\text{C}$  درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سپس محیط کشت جمع آوری شد و سلول ها با دور ۸۰۰ سانتریفوژ شدند و محلول رویی جدا شد و طبق دستورالعمل کیت ها و با تکنیک الیزا انجام شد و جذب نوری چاهک ها در طول موج  $450$  نانومتر به دست آمد.

**RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction):** این تست جهت بررسی میزان بیان ژن به کار برده می شود. ابتدا در هر چاهک به میزان  $5 \times 10^5$  سلول قرار داده شد و سلول ها برای ۱۲ ساعت انکوبه شدند. سپس سه مرتبه با محیط شستشو داده شد و بعد از آن  $LPS$  به میزان  $1\mu\text{g/ml}$  به تنهایی یا در ترکیب با غلظت های مختلف

آستاگزانتین (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولا) به مدت ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس با بافر PBS شست‌و شسته داده شدند و RNA با استفاده از کیت استخراج RNA شرکت سیناکلون و طبق دستورالعمل استخراج شدند و در دمای ۸۰- نگه‌داری شدند. برای تعیین غلظت و کیفیت RNA های استخراج شده از اسپکتروفوتومتر در طول موج ۲۱۰ تا ۲۸۰ نانومتر استفاده شد.

برای تهیه cDNA از RNA از کیت سنتز cDNA ساخت شرکت Takara و طبق پروتکل انجام شد و در دمای ۲۰- نگه‌داری شدند. در مرحله ی بعد cDNA جهت تکثیر توسط RT-PCR در شرایط ۴۲ درجه به مدت ۶۰ دقیقه و حرارت ۹۴ به مدت ۵ دقیقه انجام شد. در این مطالعه پرایمرهای اختصاصی که قبلا سکانس آن‌ها مشخص و تایید شده بود (جدول شماره ۱) مورد استفاده قرار گرفت. همچنین از  $\beta$ actin به عنوان ژن کنترل استفاده شد. اندازه گیری میزان بیان نسبی mRNA ژن‌های مورد نظر با استفاده از مقایسه CT(Threshold cycle) بین ژن مورد نظر و ژن کنترل انجام شد.

جدول ۱: توالی ژن‌های مورد بررسی

نام ژن	توالی
$\beta$ -actin F	5'-ATCACTATTGGCAACGAGCG-3'
$\beta$ -actin R	5'-TCAGCAATGCCTGGGTACAT-3'
TLR-4 F	5'-CGATTCTAGAACAAAACCAA-3'
TLR-4 R	5'-CTGGAAAGGAAGGTGTCA-3'

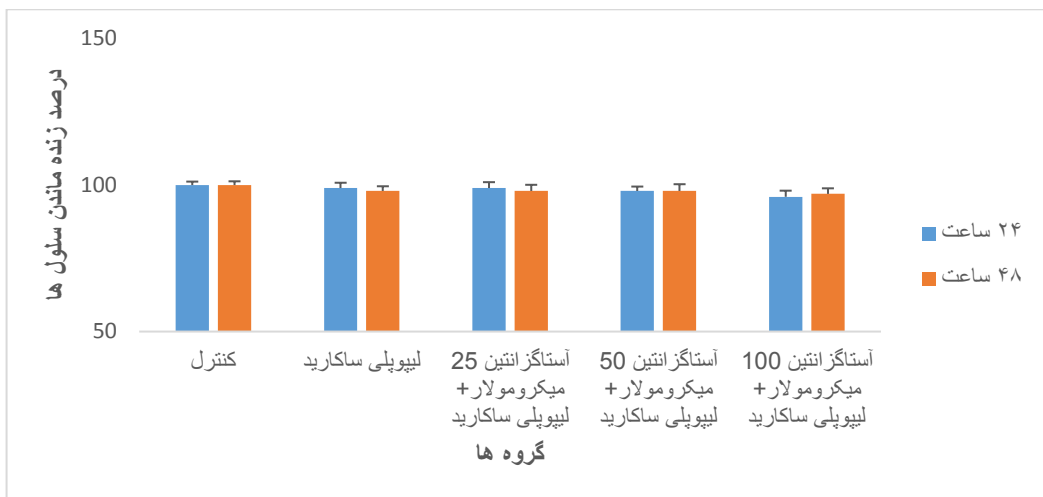
### ۳- آنالیز آماری

داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS ۲۲ تجزیه و تحلیل شدند. داده‌های این مطالعه به صورت میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد بیان گردید. آزمون کولموگروف-اسمیرنف جهت تعیین طبیعی بودن توزیع داده‌ها استفاده شد. از آزمون‌های One way ANOVA و تست تعقیبی TUKEY برای مقایسه‌ی بین گروه‌ها استفاده شد. جهت بررسی میزان بیان نسبی ژن از فرمول  $\Delta\Delta CT$  - استفاده شد. سطح معنی‌داری کمتر یا مساوی ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

### ۴- نتایج

#### اثرات آستاگزانتین و LPS بر زنده ماندن سلول‌های ماکروفاژی

نتایج بررسی سمیت سلولی نشان داد که LPS با غلظت 1  $\mu$ g/ml به تنهایی و در ترکیب با غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار آستاگزانتین در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت اثر سمیت بر سلول‌های ماکروفاژی RAW264.7 نسبت به گروه کنترل که فاقد LPS و آستاگزانتین بوده است، نداشته است (  $p > 0.05$  )، (نمودار شماره ۱).

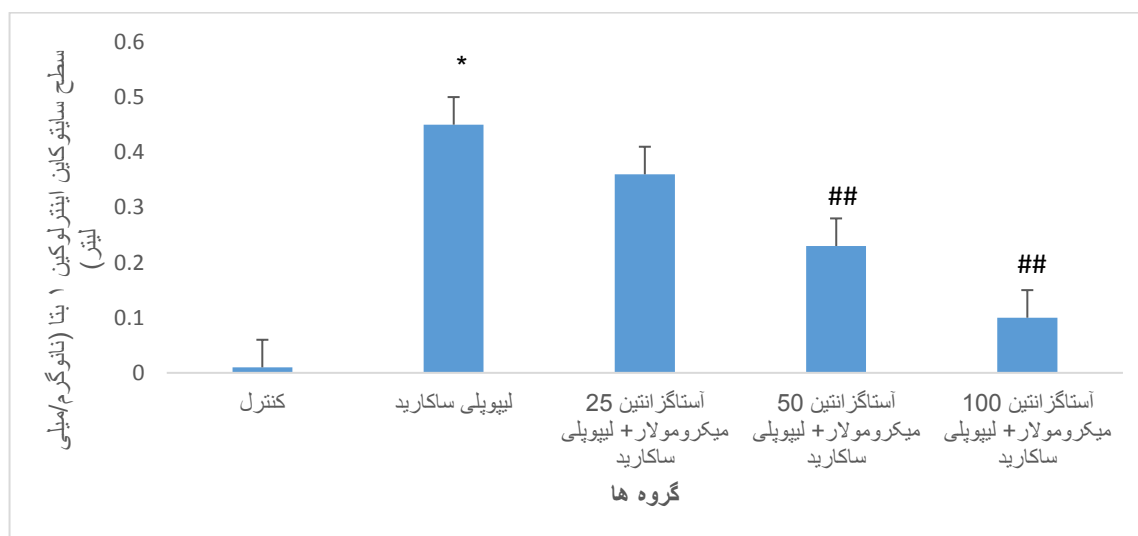


نمودار : درصد زنده ماندن سلول های RAW246.7 با و بدون حضور لیپوپلی ساکارید و آستاگزانتین

سلول های دریافت کننده ی لیپوپلی ساکارید به تنهایی و در ترکیب با غلظت های ۲۵،۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار آستاگزانتین، نسبت به سلول های کنترل که فاقد لیپوپلی ساکارید و آستاگزانتین هستند، تفاوتی در میزان زنده ماندن سلول ها نشان ندادند ( $p>0.05$ ).

#### اثر آستاگزانتین بر سطح سایتوکاین IL-1 $\beta$ در سلول ماکروفاژی

همان گونه که در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است. LPS باعث افزایش غلظت IL-1 $\beta$  به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل شده است ( $p<0.05$ ). آستاگزانتین با غلظت ۵۰ میکرومولار، باعث کاهش معنی داری در سطح IL-1 $\beta$  نسبت به گروه دریافت کننده ی LPS شده است ( $p<0.05$ ). همچنین غلظت بالای آستاگزانتین ۱۰۰ میکرومولار نیز باعث کاهش در میزان سطح IL-1 $\beta$  شده است. غلظت ۲۵ میکرومولار آستاگزانتین قادر به کاهش سطح IL-1 $\beta$  نبوده است.

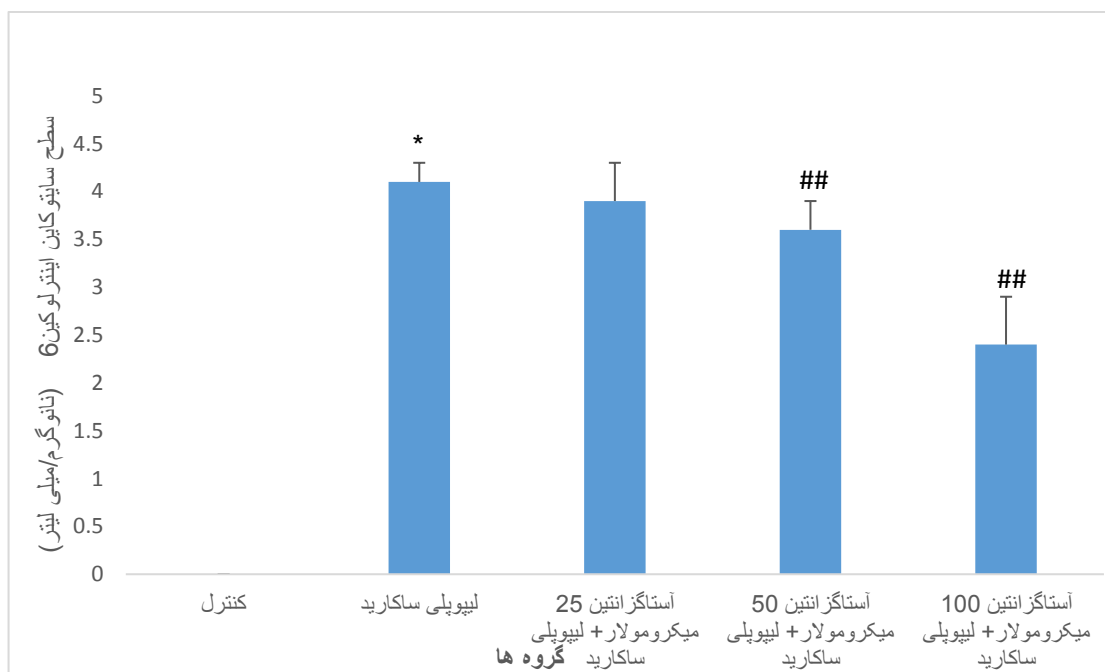


نمودار ۲: اثر لیپوپلی ساکارید و غلظت های مختلف آستاگزانتین بر سطح سایتوکاین اینترلوکین ۱ بتا بر سلول های RAW 246.7

در سلول‌های دریافت کننده لیپوپلی ساکارید ( $1\mu\text{g/ml}$ )، نسبت به سلول‌های کنترل که فاقد لیپوپلی ساکارید و آستاگزانتین بودند، افزایش سطح در میزان اینترلوکین ۱ بتا مشاهده شد ( $p<0.05$ ). سلول‌های دریافت کننده لیپوپلی ساکارید و غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار از آستاگزانتین، سطح افزایش یافته‌ی سایتوکاین اینترلوکین ۱ بتا را در مقایسه با سلول‌های دریافت کننده‌ی لیپوپلی ساکارید به تنهایی، کاهش داده است ( $p<0.01$ )###. سلول‌های تیمار شده با غلظت ۲۵ میکرومولار آستاگزانتین، غلظت سایتوکاین اینترلوکین ۱ بتا را در مقایسه با سلول‌های دریافت کننده‌ی لیپوپلی ساکارید به تنهایی، کاهش نداده است.

### اثر آستاگزانتین بر سطح سایتوکاین IL-6 در سلول ماکروفاژی

لیپوپلی ساکارید باعث افزایش معناداری در سطح سایتوکاین IL-6 نسبت به گروه کنترل شده است ( $P<0.05$ ). این افزایش در سطح IL-6 با غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار آستاگزانتین به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است. در حالی که غلظت ۲۵ میکرومولار آستاگزانتین، سطح سایتوکاین IL-6 را کاهش نداده است (نمودار ۳).

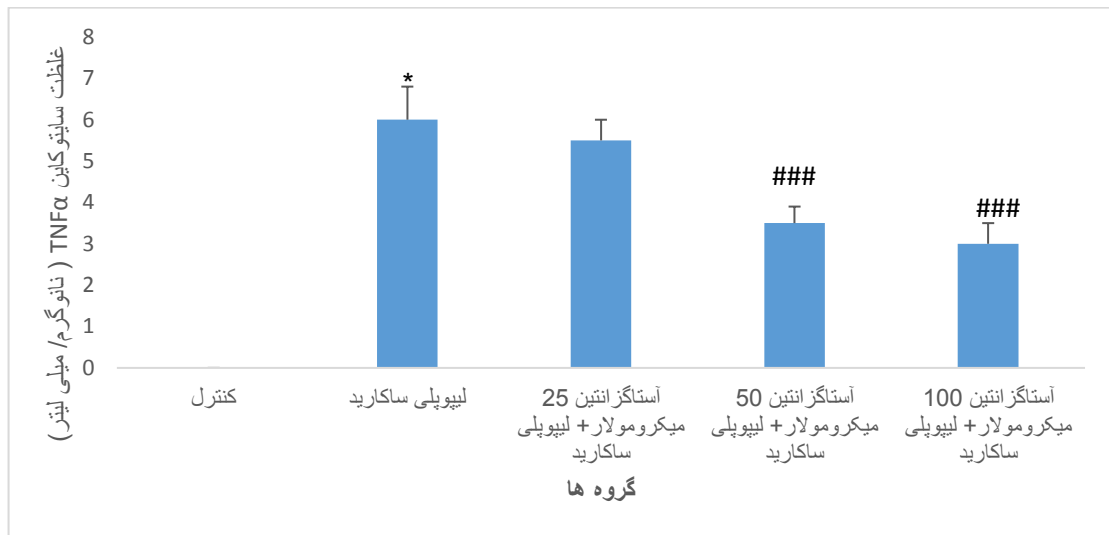


نمودار ۳: اثر لیپوپلی ساکارید و غلظت‌های مختلف آستاگزانتین بر سطح سایتوکاین اینترلوکین ۶ بر سلول‌های RAW246.7

در سلول‌های دریافت کننده لیپوپلی ساکارید ( $1\mu\text{g/ml}$ )، نسبت به سلول‌های کنترل که فاقد لیپوپلی ساکارید و آستاگزانتین بودند، افزایش سطح در میزان اینترلوکین ۶ مشاهده شد ( $p<0.05$ ). سلول‌های دریافت کننده‌ی لیپوپلی ساکارید و غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار از آستاگزانتین، سطح افزایش یافته‌ی سایتوکاین اینترلوکین ۶ را در مقایسه با سلول‌های دریافت کننده‌ی لیپوپلی ساکارید به تنهایی، کاهش داده است ( $p<0.01$ )###. سلول‌های تیمار شده با غلظت ۲۵ میکرومولار آستاگزانتین، غلظت سایتوکاین اینترلوکین ۶ را در مقایسه با سلول‌های دریافت کننده‌ی لیپوپلی ساکارید به تنهایی، کاهش نداده است.

### اثر آستاگزانتین بر سطح سایتوکاین TNF $\alpha$ در سلول ماکروفاژی

لیپوپلی ساکارید سطح TNF $\alpha$  را به طور معناداری افزایش داده است ( $p < 0.05$ ). غلظت ۲۵ میکرومولار کاهش معنی داری را نسبت به گروه القا شده با LPS ایجاد نکرده است. آستاگزانتین با غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار باعث کاهش معنی داری در سطح TNF $\alpha$  نسبت به گروه LPS شده است ( $p < 0.001$ ) ( نمودار ۴).

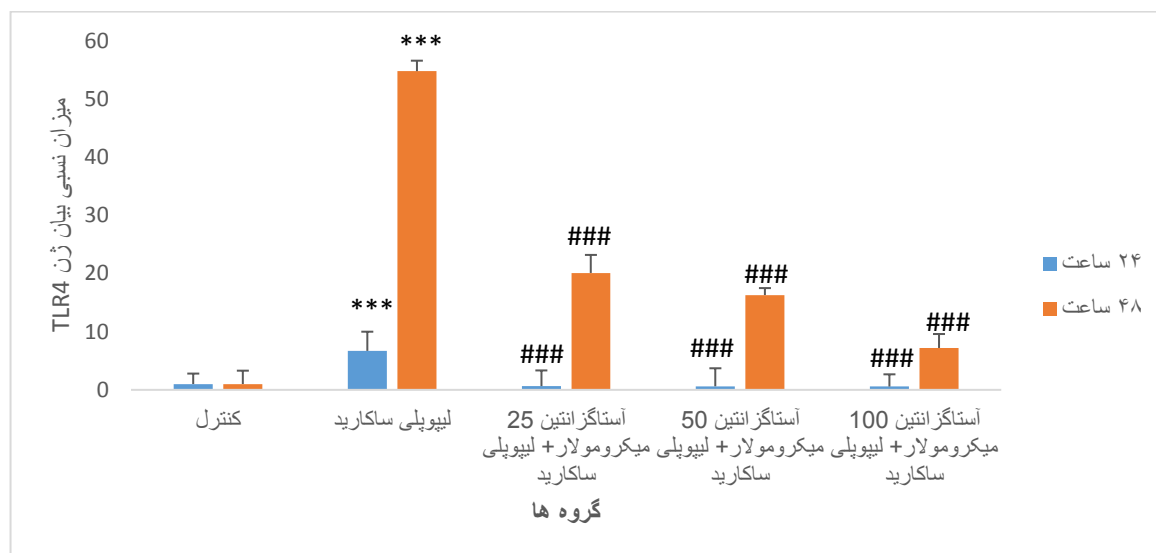


نمودار ۴: اثر لیپوپلی ساکارید و غلظت های مختلف آستاگزانتین بر سطح سایتوکاین TNF $\alpha$  بر سلول های RAW246.7

در سلول های دریافت کننده لیپوپلی ساکارید (1  $\mu\text{g/ml}$ ) ، نسبت به سلول های کنترل که فاقد لیپوپلی ساکارید و آستاگزانتین بودند ، افزایش سطح در میزان سایتوکاین TNF $\alpha$  مشاهده شد ( $p < 0.05^*$ ). سلول های دریافت کننده لیپوپلی ساکارید و غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار از آستاگزانتین، سطح افزایش یافته ی سایتوکاین TNF $\alpha$  را در مقایسه با سلول های دریافت کننده ی لیپوپلی ساکارید به تنهایی، کاهش داده است ( $p < 0.01###$ ). سلول های تیمار شده با غلظت ۲۵ میکرومولار آستاگزانتین، غلظت سایتوکاین TNF $\alpha$  را در مقایسه با سلول های سلول های دریافت کننده ی لیپوپلی ساکارید به تنهایی، کاهش نداده است.

### اثر آستاگزانتین بر میزان بیان ژن TLR4 در سلول ماکروفاژی

نتایج بررسی میزان بیان نسبی ژن در نمودار ۵ نشان داده شده است. LPS باعث افزایش میزان بیان ژن TLR4 نسبت به گروه کنترل در زمان های ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت پس از انکوباسیون شده است ( $p < 0.001$ ) تیمار سلول ها با غلظت های مختلف آستاگزانتین (۲۵ و ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) ، در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت ، باعث کاهش معنی داری در میزان بیان ژن TLR4 نسبت به گروه LPS شده است ( $p < 0.001$ ).



نمودار ۵: اثر لیپوپولی ساکارید و غلظت های مختلف آستاگزانتین بر میزان بیان ژن TLR4 بر سلول های RAW246.7

در سلول های دریافت کننده لیپوپولی ساکارید ( 1 µg/ml ) ، نسبت به سلول های کنترل که فاقد لیپوپولی ساکارید و آستاگزانتین بودند ، افزایش در میزان بیان ژن TLR4 مشاهده شد (p<0.05\*\*\*). سلول های دریافت کننده لیپوپولی ساکارید و غلظت های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار از آستاگزانتین، سطح افزایش یافته ی بیان ژن TLR4 را در مقایسه با سلول های دریافت کننده ی لیپوپولی ساکارید به تنهایی، کاهش داده است (p<0.01###).

## ۵- بحث

بیماری های التهابی سیستمیک و موضعی مانند آرتریت روماتوئید، استوآرتریت، بیماری های التهابی دستگاه گوارش و... از مهم ترین بیماری های التهابی با نسبت شیوع نسبتا بالا می باشند (۲۰). همچنین التهاب یکی از عوامل بسیار مهم در پاتوژنز بیماری های نورودژنراتیو مانند آلزایمر، پارکینسون ، مولتیپل اسکلروزیس و سایر بیماری ها مانند دیابت، آترواسکلروزیس و ... می باشد (۲۱).

درمان های کنونی برای کنترل درد و التهاب همواره با عوارضی همراه هستند که مصرف آن ها را به دلیل بروز عوارض جانبی محدود کرده است (۸). از طرفی برخی از مطالعات، اثرات فارماکولوژیکی متنوعی از ترکیبات استخراج شده از ماهی ها ، جلبک ها، مرجان ها و سایر موجودات دریایی را گزارش کرده اند (۹، ۲۲).

در این بررسی، خواص ضد التهابی کاروتنوئید طبیعی استخراج شده از *Haematococcus Algae* مورد بررسی قرار گرفت. آستاگزانتین با کاهش میزان بیان ژن TLR 4 و کاهش سطح سایتوکاین های التهابی IL-1β,IL-6,TNFα بر رده سلولی ماکروفاژی، اثرات ضد التهابی خوبی را نشان داد.

TLR4 به دسته ای از خانواده های پروتئینی تعلق دارند که بر روی سطح سلول قرار گرفته اند و در ایجاد پاسخ های اولیه ی دفاع میزبان در برابر پاتوژن ها نقش دارند. TLR4 باعث فعال کردن مسیرهای سیگنالی می شوند که در نهایت باعث القای ژن های التهابی می شود (۲۳).

LPS به عنوان ترکیب اصلی غشای خارجی دیواره سلولی باکتری های گرم منفی می باشد که توسط TLR4 ها که بر سطح ماکروفاژها قرار دارند، شناسایی می شوند. فعال شدن TLR4 منجر به افزایش تولید و ترشح سایتوکاین های پیش التهابی IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  می شود که نقش اساسی در پاتوژنز بیماری های التهابی دارند (۲۴).

مسیر پیام رسانی TLR از دومین های داخل سیتوپلاسمی منشا می گیرد که در میان همه TLR ها حفاظت شده است. همه TLR های یک مسیر مشترک پیام رسانی را فعال می کند. همه TLR ها از طریق مسیر وابسته به پروتئین MyD 88 پیام رسانی می کنند. در این مسیر چندین واسطه و آنزیم قرار دارند که در نهایت منجر به فعال شدن فاکتورهای رونویسی کننده (JNK (c-Jun N-terminal Kinase) و Nuclear Factor kappa B (NF- $\kappa$ B) می شود که به هسته سلول وارد شده و روی بیان ژن تاثیر می گذارند. فعال شدن NF- $\kappa$ B منجر به تنظیم بیان سایتوکاین های التهابی مانند اینترلوکین ۱، اینترلوکین ۶ و TNF $\alpha$  می شود (۲۳-۲۶).

در این بررسی نشان داده شد که LPS منجر به افزایش بیان TLR 4 در سلول های ماکروفاژی شده است. این افزایش میزان بیان ژن در ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت پس از القا با LPS، به ترتیب ۶.۷ و ۵۴.۸ بوده است. همچنین تیمار سلول های ماکروفاژی القا شده با LPS، با آستاگزانتین منجر به کاهش سطح سایتوکاین های IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  شد. یافته های این تحقیق با مطالعات مشابه در بررسی اثرات ضد التهابی آستاگزانتین در ماکروفاژها، همخوانی دارد. نتایج تحقیقات قبلی نشان داد که آستاگزانتین با مهار INOS (Inducible nitric oxide synthase) ، NF- $\kappa$ B باعث مهار تولید و ترشح آنزیم های التهابی مهم مانند سیکلواکسیژناز و سایتوکاین های التهابی مانند IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  می شود (۱۷). همچنین ترکیب آستاگزانتین و توکونرینول با اثر بر سلول های ماکروفاژی RAW264.7 و مهار ترشح سایتوکاین های التهابی اینترلوکین ۶ و اینترلوکین ۱۲، باعث کاهش و مهار التهاب می شوند (۱۶). در جدیدترین یافته ها اثر ضد التهابی آستاگزانتین در بیماری های التهابی استخوان و مفاصل بررسی شده است و اثرات ضد التهابی این ترکیب بر مهار بیان ژن های دخیل در مسیر التهابی مانند NF- $\kappa$ B و RSPO2 (R- spondin 2) در ماکروفاژها نشان داده شده است (۲۷، ۲۸).

در مطالعه کنونی دیده شد که آستاگزانتین از طریق مهار TLR4 در سلول های ماکروفاژی باعث کاهش التهاب شده است. این یافته با مطالعات مشابه تایید می شود. آستاگزانتین با مهار TLR4 بر سلول های میکروگلیای مغزی از بروز پاسخ های التهابی و پیش التهابی در خونریزی های زیر عنکبوتیه جلوگیری کرده است. کاهش بیان TLR4 و متعاقب آن NF- $\kappa$ B مکانیسم احتمالی این اثر بیان شده است (۲۹). مهار مسیر سیگنالینگ TLR4/NF- $\kappa$ B توسط آستاگزانتین در بروز اثرات محافظت قلبی این ترکیب نیز دیده شده است (۳۰). اثرات ضد التهابی آستاگزانتین بر سلول های کبدی *channa argus* که با LPS دچار التهاب شده بودند، نشان می دهد که مهار مسیر TLR4/NF- $\kappa$ B و متعاقب آن کاهش ترشح سایتوکاین های التهابی را در بروز اثرات ضد التهابی این ترکیب نقش دارند (۳۱). در جدیدترین مطالعه، اثر مفید آستاگزانتین بر انتروکولیت نکروزیس در رات بواسطه ی مهار TLR4 گزارش شده است (۳۲).

بر اساس نتایج این مطالعات و مطالعه حاضر، TLR4 به عنوان یکی از مهم ترین اهداف درمانی در کاهش التهاب در بیماری های التهابی می تواند در نظر گرفته شود و بررسی دقیق تر مسیر سیگنالینگ آن و سایتوکاین ها کلیدی در این مسیر، اطلاعات دقیق تر و جامع تری را ارائه خواهد کرد.

همچنین، آستاگزانتین اثر ضد دردی و ضد التهابی بر دردهای نوروپاتیکی در مدل‌های حیوانی دارد. مهار  $IL-1\beta$  و  $TNF\alpha$  در بروز این اثر نقش بسزایی دارد (۳۳). به‌علاوه، آستاگزانتین از طریق اثر مهاری بر مسیر  $NR2B(n\text{-methyl-d-aspartate receptor subunit } 2B)$  ,  $p\text{-p}38MAPK$  (Mitogen-activated protein kinase) و مهار تولید  $TNF\alpha$  اثر ضد التهابی بر دردهای نوروپاتیک دارد (۳۴).

نتایج مطالعه‌ی حاضر با مطالعات بیان شده بر روی اثر ضد التهابی همسویی دارد هر چند که مکانیسم مسئول متفاوتی دارند. در مطالعات پیشین مهار تولید سایتوکاین‌های التهابی به‌عنوان عامل کلیدی در بروز اثر ضد التهابی بیان شده است ولی درگیری  $TLR4$  و اثر بر ترشح سایتوکاین‌ها در سلول‌های ماکروفاژی به‌عنوان سلول‌های محیطی سیستم ایمنی بدن بررسی نشده است. در این مطالعه هم‌زمان با کاهش میزان بیان ژن  $TLR4$  در سلول‌های ماکروفاژی تیمار شده با آستاگزانتین، کاهش سطح سایتوکاین‌های التهابی نیز دیده شد که همراهی و ارتباط بین این عوامل را در بروز اثر ضد التهابی آستاگزانتین در ماکروفاژها نشان می‌دهد.

داروهای ضد التهاب کنونی با مکانیسم‌هایی مانند مهار آنزیم سیکلواکسیژناز یا آنزیم فسفولیپاز از تولید پروستاگلاندین‌ها و برخی سایتوکاین‌های التهابی جلوگیری می‌کند. ترکیب ضد التهابی که ژن مسئول تولید سایتوکاین‌های التهابی و ترشح آن‌ها را مورد هدف قرار دهد و آن‌ها را مهار کند، نتایج امیدوارکننده‌تری را به‌همراه خواهد داشت (۱۷). چنانچه نتایج این مطالعه، نیز همین رویکرد را دنبال می‌کند.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که احتمالاً کاهش میزان بیان ژن  $TLR4$  در سلول‌های ماکروفاژی که توسط  $LPS$  القای التهاب شده اند، می‌تواند منجر به کاهش میزان تولید و ترشح سایتوکاین‌های  $IL-1\beta, IL-6, TNF\alpha$  شود هر چند بررسی و اندازه‌گیری میزان بیان ژن و سطح پروتئین سایر پیام‌رسان‌ها و واسطه‌های شیمیایی در این مسیر به روشن شدن بهتر مکانیسم دقیق اثر ضد التهابی این ترکیب کمک خواهد کرد.

خواص آنتی‌اکسیدانتی بسیار بالای آستاگزانتین نیز در بروز اثرات ضد التهابی آن نیز نقش دارد و سرکوب گونه‌های اکسیژن فعال ( $ROS$  (Reactive oxygen species) بوسیله آستاگزانتین که القاکننده بیان هسته ای  $NF-\kappa B$  می‌باشد، باعث کاهش تولید سایتوکاین‌های التهابی می‌شود (۳۵). این ترکیب از طریق برقراری تعادل بین عوامل اکسیدانتی و آنتی‌اکسیدانتی قادر به بروز اثرات محافظتی در برابر عوامل التهابی می‌باشد (۳۶).

آستاگزانتین به‌عنوان یک ترکیب کاروتنوئیدی طبیعی که آبزیان و به‌ویژه، ماهی سالمون و جلبک و... از مهم‌ترین منابع آن هستند، نسبت به سایر ترکیبات کاروتنوئیدی دیگر مانند لوتئین و کاروتن، خواص زیستی فعال بیشتری دارد و دارای خواص فارماکولوژیک مختلفی مانند اثرات آنتی‌اکسیدانتی، ضد سرطانی، ضد دیابت، ضد التهابی و... می‌باشد (۳۷-۳۹). به‌دلیل ساختار شیمیایی آستاگزانتین و لیپوفیل بودن این ترکیب و قابلیت عبور آن از سد خونی و مغزی و ورودش به مغز، (۴۰، ۴۱) عمدتاً مطالعاتی در خصوص اثرات ضد التهابی این ترکیب بر روی بیماری‌های نورودژنراتیو و سلول‌های دستگاه عصبی بررسی شده است. اسماعیلی و همکاران (۴۲) نشان دادند که اثرات ضد التهابی آستاگزانتین در شرایط برون تنی و درون تنی بر سلول‌های دوپامینرژیک منجر به بهبودی غلایم پارکینسون می‌شود.

آستاگزانتین با مهار و کاهش سطح سایتوکاین‌های التهابی  $IL-23$  و افزایش سایتوکاین‌های پیش التهابی  $IL-4$ ، اثرات مفیدی در بهبود غلایم مولتیپل اسکلروزیس در مدل‌های حیوانی دارد (۴۳). آستاگزانتین با مهار سایتوکاین‌های التهابی  $IL-1\beta$  و  $IL-$

6 در هیپوکامپ، اثرات مفیدی در درمان افسردگی نیز داشته است (۴۴). همچنین، آستاگزانتین با اثر مهار بر تولید سایتوکاین های التهابی IL-6, 1L-17, INF $\gamma$  در مدل های حیوانی مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس، اثر پیشگیری کننده و حتی درمانی بر بیماری مولتیپل اسکلروزیس دارد (۴۵).

در بیماری آلزایمر به عنوان یک بیماری نورودژنراتیو با پیش زمینه التهاب و وقایع استرس اکسیداتیو نیز، اثرات آستاگزانتین بر کاهش سطح سایتوکاین های التهابی و سطح اکسیدانت ها و افزایش فعالیت آنتی اکسیدانتی در بدن، نشان داده شده است (۴۶, ۴۷). هر چند این مطالعات نیز بر بروز آثار ضد التهابی آستاگزانتین حکایت دارند ولی محل اثر آستاگزانتین در این بیماری ها، سیستم عصبی مرکزی می باشد که با توجه به ساختار آستاگزانتین و عبورش از سدخونی-مغزی قابل توجه و انتظار می باشد. در حالی که مطالعات بر روی اثرات آستاگزانتین بر سلول های محیطی و التهاب سیستمیک محدود می باشد، این مطالعه اثر ضد التهابی آستاگزانتین بر ماکروفاژها به عنوان سلول های محیطی سیستم ایمنی و موثر بر التهاب مزمن را نشان داد. با این وجود، عدم اندازه گیری میزان سطح پروتئین TLR4 با کمک روش وسترن بلات و تایید میزان فعالیت این مولکول، از محدودیت های این مطالعه در نظر گرفته می شود، لذا پیشنهاد می شود که تحقیقات پایه و مولکولی بیشتری بر آستاگزانتین با تکیه بر اندازه گیری سطح پروتئین ها و واسطه های شیمیایی دخیل در مسیر TLR4، بر ماکروفاژها و سایر سلول های سیستم ایمنی صورت گیرد.

## ۶- نتیجه گیری

اثرات مفید ضد التهابی آستاگزانتین در بیماری های التهابی عصبی در مقالات متعددی گزارش شده است ولی تحقیقات در زمینه اثرات ضد التهابی این ترکیب بر سلول های محیطی محدود می باشد. در این مطالعه اثرات ضد التهابی بر روی سلول های ماکروفاژی به عنوان سلول های محیطی دستگاه ایمنی بدن، بررسی شد و با توجه به نتایج امیدوار کننده این مطالعه، آستاگزانتین را به عنوان ماده ای با پتانسیل بالا برای درمان بیماری های التهابی سیستمیک مزمن مانند آرتریت ها در آینده معرفی می کند، هر چند تحقیقات بیشتر و به ویژه مطالعات بالینی جهت مشخص شدن اثرات بالینی این ترکیب پیشنهاد می شود. همچنین نگاهی نو و رویکردی جدید به ترکیبات بسیار ارزشمند که در دل دریاها و اقیانوس ها قرار گرفته است، چشم انداز جدید و امیدوارکننده ای را در درمان بیماری ها و سلامتی انسان پیش روی محققین و درمان گران قرار می دهد چنانچه تا کنون چندین ترکیب دارویی با منابع دریایی به کلینیک معرفی شده است و برخی ترکیبات دارویی دیگر نیز در حال طی کردن مراحل آخر کارآزمایی بالینی می باشد (۹). در نهایت، با توجه به نقش ها و عملکردهای مختلف سایر سلول های دستگاه ایمنی، محققین بررسی های مولکولی دقیق تر و تاثیر این ترکیب بر سایر سلول های سیستم ایمنی و همچنین مطالعات در مدل های حیوانی با تکیه بر مسیرهای التهابی سیستمیک و بر هم کنش عوامل التهابی بر این ترکیب و کارآزمایی های بالینی را در مطالعات آینده پیشنهاد می کنند.

## ۷- تشکر و قدردانی

این تحقیق پژوهشی با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی آبادان با شماره طرح ۱۷۳۳ انجام شده است این تحقیق دارای تاییدیه اخلاقی از کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی آبادان با کد اخلاق IR.ABADANUMS.REC.1402.118 می باشد.

## ۸- منابع

1. Zhang C, Tong T, Miao D chao, Wang L feng. Vitamin D inhibits TNF- $\alpha$  induced apoptosis of human 1. Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. Cell. 2010;140(6):771-6.

2. Nathan C, Ding A. Nonresolving inflammation. *Cell*. 2010;140(6):871-82.
3. Oishi Y, Manabe I. Macrophages in inflammation, repair and regeneration. *International immunology*. 2018;30(11):511-28.
4. Ross EA, Devitt A, Johnson JR. Macrophages: the good, the bad, and the gluttony. *Frontiers in immunology*. 2021;12:708186.
5. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 2018;9(6):7204.
6. Layoun A, Santos MM. Bacterial cell wall constituents induce hepcidin expression in macrophages through MyD88 signaling. *Inflammation*. 2012;35:1500-6.
7. Dearman RJ, Cumberbatch M, Maxwell G, Basketter DA, et al. Toll-like receptor ligand activation of murine bone marrow-derived dendritic cells. *Immunology*. 2009;126(4):475-84.
8. BERTRAM G KATZUNG K, editor *Basic & clinical pharmacology* 2021: EGC.
9. Mohebbi GH, Nabipour I, Vazirizadeh A. The Sea, the Future Pharmacy. *Iranian South Medical Journal*. 2014;17(4):748-88( in persian).
10. Ekpe L, Inaku K, Ekpe V. Antioxidant effects of astaxanthin in various diseases—A review. *J Mol Pathophysiol*. 2018;7(1):1-6.
11. Ambati RR, Phang S-M, Ravi S, Aswathanarayana RG. Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications—A review. *Marine drugs*. 2014;12(1):128-52.
12. Mularczyk M, Michalak I, Marycz K. Astaxanthin and other nutrients from *Haematococcus pluvialis*—Multifunctional applications. *Marine drugs*. 2020;18(9):459.
13. Kohandel Z, Farkhondeh T, Aschner M, Pourbagher-Shahri AM, et al. Anti-inflammatory action of astaxanthin and its use in the treatment of various diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022;145:112179.
14. Davinelli S, Saso L, D'Angeli F, Calabrese V, et al. Astaxanthin as a modulator of Nrf2, NF- $\kappa$ B, and their crosstalk: molecular mechanisms and possible clinical applications. *Molecules*. 2022;27(2):502.
15. Yin Y, Xu N, Shi Y, Zhou B, et al. Astaxanthin protects dendritic cells from lipopolysaccharide-induced immune dysfunction. *Marine Drugs*. 2021;19(6):346.
16. Radzun K, Rusmidi M, Norisam I, Iran N, et al. Anti-inflammatory Effects of Astaxanthin Extracted from Microalgae *Haematococcus pluvialis* and Combinations with Palm Tocotrienol Rich-Fraction in RAW 264.7 Macrophages. *Pharmacognosy Journal*. 2022;14(1).
17. Lee S-J, Bai S-K, Lee K-S, Namkoong S, et al. Astaxanthin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing IkappaB kinase-dependent NF-kappaB activation. *Molecules and cells*. 2003;16(1):97-105.
18. Dong S, Huang Y, Zhang R, Wang S, et al. Four different methods comparison for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. *The Scientific World Journal*. 2014;2014.
19. Krępska M, Siczynska K, Lasoń-Rydel M. Determination of astaxanthin and canthaxanthin in food products by HPLC method. *Technologia i Jakość Wyróbów*. 2022;67.
20. Radu A-F, Bungau SG. Management of rheumatoid arthritis: an overview. *Cells*. 2021;10(11):2857.
21. Freeman LC, Ting JPY. The pathogenic role of the inflammasome in neurodegenerative diseases. *Journal of neurochemistry*. 2016;136:29-38.
22. Mohseni R, Zamani Sedehi A, Arab Sadeghabadi Z, Safaei M, et al. Dietary supplement based on microalgae, as a new therapeutic approach in the future. *New Cellularand Molecular Biotechnology Journal*. 2021;11(42):31-54.(in persian).

23. Rahimifard M, Maqbool F, Moeini-Nodeh S, Niaz K, et al. Targeting the TLR4 signaling pathway by polyphenols: a novel therapeutic strategy for neuroinflammation. *Ageing research reviews*. 2017;36:11-9.
24. Mojiri-Forushani H, Khajehali E, Adelipour M, Mohammadi A. Inhibitory effects of fluoxetine on the secretion of inflammatory mediators and JAK/STAT3 and JNK/TLR4 gene expression. *Molecular Biology Reports*. 2023;50(3):2231-41.
25. Bode JG, Ehltng C, Häussinger D. The macrophage response towards LPS and its control through the p38MAPK–STAT3 axis. *Cellular signalling*. 2012;24(6):1185-94.
26. Kuzmich NN, Sivak KV, Chubarev VN, Porozov YB, et al. TLR4 signaling pathway modulators as potential therapeutics in inflammation and sepsis. *Vaccines*. 2017;5(4):34.
27. Zhu C, Liu G, Cui W, Yu Z, et al. Astaxanthin prevents osteoarthritis by blocking Rspo2-mediated Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in chondrocytes and abolishing Rspo2-related inflammatory factors in macrophages. *Aging (Albany NY)*. 2023;15(12):5775.
28. Mamun-Or-Rashid A, Lucy TT, Yagi M, Yonei Y. Inhibitory Effects of Astaxanthin on CML-HSA-Induced Inflammatory and RANKL-Induced Osteoclastogenic Gene Expression in RAW 264.7 Cells. *Biomedicines*. 2021;10(1):54.
29. Zhang X, Lu Y, Wu Q, Dai H, et al. Astaxanthin mitigates subarachnoid hemorrhage injury primarily by increasing sirtuin 1 and inhibiting the Toll-like receptor 4 signaling pathway. *The FASEB Journal*. 2019;33(1):722-37.
30. Zaafan M, Abdelhamid A. The cardioprotective effect of astaxanthin against isoprenaline-induced myocardial injury in rats: involvement of TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*. 2021;25(11).
31. Li M-Y, Sun L, Niu X-T, Chen X-M, et al. Astaxanthin protects lipopolysaccharide-induced inflammatory response in *Channa argus* through inhibiting NF- $\kappa$ B and MAPKs signaling pathways. *Fish & shellfish immunology*. 2019;86:280-6.
32. Zhang X, Luo Y, Gu R, Jiang Z. Astaxanthin Alleviates Inflammatory Response in Neonatal Necrotizing Enterocolitis Rats by Regulating NOD2/TLR4 Pathway. *Gastroenterology Research and Practice*. 2023;2023.
33. Jiang X, Yan Q, Liu F, Jing C, et al. Chronic trans-astaxanthin treatment exerts antihyperalgesic effect and corrects co-morbid depressive like behaviors in mice with chronic pain. *Neuroscience Letters*. 2018;662:36-43.
34. Fakhri S, Dargahi L, Abbaszadeh F, Jorjani M. Astaxanthin attenuates neuroinflammation contributed to the neuropathic pain and motor dysfunction following compression spinal cord injury. *Brain Research Bulletin*. 2018;143:217-24.
35. Speranza L, Pesce M, Patruno A, Franceschelli S, et al. Astaxanthin treatment reduced oxidative induced pro-inflammatory cytokines secretion in U937: SHP-1 as a novel biological target. *Marine drugs*. 2012;10(4):890-9.
36. Franceschelli S, Pesce M, Ferrone A, De Lutiis MA, et al. Astaxanthin treatment confers protection against oxidative stress in U937 cells stimulated with lipopolysaccharide reducing O<sub>2</sub><sup>-</sup> production. *PLoS One*. 2014;9(2):e88359.
37. Galasso C, Orefice I, Pellone P, Cirino P, et al. On the neuroprotective role of astaxanthin: new perspectives? *Marine drugs*. 2018;16(8):247.
38. Davinelli S, Nielsen ME, Scapagnini G. Astaxanthin in skin health, repair, and disease: A comprehensive review. *Nutrients*. 2018;10(4):522.
39. Yuan JP, Peng J, Yin K, Wang JH. Potential health-promoting effects of astaxanthin: a high-value carotenoid mostly from microalgae. *Molecular nutrition & food research*. 2011;55(1):150-65.

40. Ying C-j, Zhang F, Zhou X-y, Hu X-t, et al. Anti-inflammatory effect of astaxanthin on the sickness behavior induced by diabetes mellitus. *Cellular and molecular neurobiology*. 2015;35:1027-37.
41. Sarada R, Vidhyavathi R, Usha D, Ravishankar G. An efficient method for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2006;54(20):7585-8.
42. MafyEsmaeili M, khosravi m, Esmaeili MH, Bananej M, et al. In-vitro and in-vivo evaluation of the anti-Parkinson activity of Astaxanthin. *medical journal of mashhad university of medical sciences*. 2022;65(3):1387-400. (in persian).
43. Kerishchi Khiabani P, Bidaran S. The effect of natural Astaxanthin on the prevention and treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Developmental Biology*. 2022;14(1):39-48.
44. Zhou X-y, Zhang F, Hu X-t, Chen J, et al. Depression can be prevented by astaxanthin through inhibition of hippocampal inflammation in diabetic mice. *Brain research*. 2017;1657:262-8.
45. Bidaran S, Ahmadi A, Yaghmaei P, Sanati M, et al.. Astaxanthin effectiveness in preventing multiple sclerosis in animal model. *Bratislavske Lekarske Listy*. 2018;119(3):160-6. (in persian).
46. Taksima T, Chonpathompikunlert P, Sroyraya M, Hutamekalin P, et al. Effects of astaxanthin from shrimp shell on oxidative stress and behavior in animal model of Alzheimer's disease. *Marine drugs*. 2019;17(11):628.
47. Che H, Li Q, Zhang T, Wang D, et al. Effects of astaxanthin and docosahexaenoic-acid-acylated astaxanthin on Alzheimer's disease in APP/PS1 double-transgenic mice. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2018;66(19):4948-57.