مقاله

بررسی آثار کرستین برتغییرات رفتاری و بافتی سیستم نیگرواستریاتال در مدل آزمایشی پارکینسون در موش بالغ

رویا آریان پور M.Sc*، محمدتقی جغتائی Ph.D، ✉ مهدی مهدی زاده Ph.D**، مهرداد روغنی Ph.D**،**

ملیحه نوبخت Ph.D، حمید رضا عسگری M.Sc.**

* گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج

** گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

وصول: تیرماه ۸۵، پذیرش: مهرماه ۸۵

چکیده

هدف: بررسی تأثیرحفاظتی داروی کرستین بر تغییرات رفتاری و بافتی سیستم نیگرواستریال در مدل آزمایشی بیماری پارکینسون در موش صحرائی بالغ.

مواد و روشها: پژوهش حاضر روی ۸۰ سر موش صحرایی نر نژاد Wistar با وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم انجام شد. با تزریق ۱۲/۵ میکروگرم نوروتوکسین (٦ـ هیدروکسی دوپامین) در داخل استریاتال مدل آزمایشی بیماری پارکینسون ساخته شد. یک ساعت قبل از عمل توسط کرستین (۲۰mg) به فرم داخل صفاقی پیش درمان شده و درمان آنها (بعد از عمل جراحی) با دو دوز مختلف mg/kg ۲۰ و ۱۰mg/kg کرستین یک بار در روز به مدت یک ماه ادامه یافت. چرخش القا شده به دنبال تجویز آگونیست آپومرفین طی هفته پنجم پس از جراحی به‌عنوان شاخص میزان کارایی درمان با کرستین در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: بررسی‌های رفتاری در هفته پنجم نشان می‌دهد که آپومرفین موجب چرخش کونترا لترال (سمت راست) بارز در موشهای گروه تخریب ($p<0/001$) در مقایسه با گروه شاهد می‌شود، درحالی که چرخش در مورد گروه‌های درمان بسیار کمتر ($p<0/01$) است. در مقایسه گروه تخریب با گروه‌های درمان،کاهش در تعداد دفعات چرخش دیده می‌شود ($p<0/01$) با مقایسه دو گروه تحت درمان mg/kg ۲۰ و mg/kg ۱۰ نسبت به هم هیچگونه تفاوت معنی داری را نشان نداد. دربررسی شمارش تعداد نورونهای طرف چپ و راست بخش متراکم جسم سیاه در گروه‌های مختلف، هیچگونه اختلاف معنی دار آماری بین دو طرف راست و چپ در گروه شاهد مشاهده نشد. درحالی که در گروه‌های تخریب ($p<0/001$) و درمانهای۲۰mg/kg و mg/kg ۱۰ ($p<0/01$) طرف چپ کاهش معنی دار آماری را در مقایسه با طرف راست نشان داد. چنان‌که این میزان کاهش در مورد گروه‌های درمان کمتر می‌باشد.

نتیجه‌گیری: به طور کلی نتایج رفتاری و بافتی نشان می‌دهد که تجویز داخل صفاقی و کوتاه مدت کرستین در درمان حفاظتی فرم اولیه بیماری پارکینسون در یک معیار کمی مؤثر بوده و می‌تواند سبب افزایش طول عمر نورونهای دوپامنرژیک نیگرال شود.

کلیدواژه‌ها: بیماری پارکینسون، آنتی اکسیدانت، ٦ـ هیدروکسی دوپامین، کرستین

✉ **آدرس مکاتبه:** تهران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، گروه علوم تشریح

E-mail: maranaoo@yahoo.com

مقدمه

نئواستریاتوم نقش مهمی در تنظیم اعمال حرکتی بدن به عهده دارد و یکی از آورانهای اصلی آن سیستم دوپامنرژیک نیگرواستریاتال است که ۱۵ ـ۱۰ درصد پایانه‌های موجود در نئواستریاتوم را تشکیل داده و آسیب آن اثر بارزی در اعمال حرکتی بدن بجا می‌گذارد [۱]. بیماری پارکسینون یک اختلال نورودژنراتیو در انسان است که با تخریب تدریجی و وسیع نورونهای دوپامنرژیک جسم سیاه همراه می‌باشد [۲]. عوامل دژنراسیون نورونهای DA هنوز ناشناخته است به هر حال می‌توان چنین فرض کرد که بین توکسینهای خارجی (ناشی از محیط، رژیم غذایی و سبک زندگی Lifestyle)، توکسینهای داخلی ناشی از متابولیسم نورونها و ژنتیک (ژنهای هسته ای) و اپی ژنتیک اجزاء نورونها (میتوکندریها، غشاها و پروتئینها) پیوسته واکنشهای متقابل رخ می‌دهد.

یکی از مکانیسمهای مشترک فعال این نوروتوکسینها به‌واسطه استرس اکسیداتیو ناشی از تولید زیاد گونه‌های فعال اکسیژن (ROS:Reactive Oxygen Specie)، گونه‌های فعال نیتروژن (Reactive Nitrogen Specie) صورت می‌گیرد [۳]. بنابراین یک تعادل مناسب بین رادیکال آزاد و آنتی اکسیدانها برای بقاء نورونها ضروری است [٤]. در بررسیهای انجام شده به این نتیجه دست یافتند که آنتی اکسیدانهای اندروژن و یا تأمین شده ازخارج می‌توانند در پیشگیری یا به تأخیر انداختن بیماری مؤثر باشند [۵]. کرستین جزیی از ترکیبات فلاونوئید (پلی فنولیک) است که در گیاهان و منابع غذایی گیاهی فراوان یافت می‌شود [٦]. فلاونوئیدها باعث ایجاد سه مکانیسم محافظتی می‌شوند که عبارتند از: ۱ــ افزایش Glotation درنتیجه کاهش تجمع ROS ۲ـ پایین آوردن سطح ROS ۳ـ جلوگیری از جریان Ca+2 علیرغم بالا بودن سطح ROS [۷].

در بین همه فلاونوئیدهای موجود درصد فراوانی کرستین از همه بیشتر می‌باشد [۸]. کرسیتن آثار مفیدی را بر روی سلامتی انسان دارد که این آثار شامل حفاظت دستگاه قلبی- عروقی (Cardiovascular)، فعالیت ضد سرطانی (Anti-Cancerous)، فعالیت ضد حساسیت (Anti-Allergic)، جلوگیری از آب مروارید ،فعالیت ضد ویروسی و آثار ضد التهابی است [۹]. همچنین جذب کننده رادیکال آزاد می‌باشد [۱۰]. از شاخصهای دیگر آثار آنتی اکسیدانتی آن مهار کننده اکسیداسیون LDL در In vivo است. این مهار LDL (Low Desity Lipoprotein) احتمالاً بوسیله اکسیدسیون خودش و یا از طریق ممانعت از اکسیداسیون ویتامین E موجود در LDL انجام می‌شود [۱۱]. با درنظر گرفتن مطالب فوق در تحقیق حاضر آثار تجویز مکرر کرستین به فرم داخل صفاقی برای بررسی قدرت حفاظتی آن بر نورونهای جسم سیاه در مدل یک طرفه و اولیه بیماری پارکینسون در موش صحرایی بررسی شد.

مواد و روشها

در بررسی حاضر ۸۰ سر موش صحرایی نر نژاد Wistar به وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم موشهای پس از اینکه مشخص شد که علایم اولیه پارکیسون را نشان نمی دهند انتخاب شدند. بدین منظور با تجویز داخل صفاقی آپومرفین هیدروکلراید (Apomorphine hydrochloride) به میزان ۱۲/۵ mg/kg و سپس آزمون چرخش، حیواناتی که چرخش کمتر از ۳۰ دور کامل در ساعت داشتند، انتخاب شده و به‌طور تصادفی به ٦ گروه زیر تقسیم شدند.

۱ ـ کنترل (Control)

۲ ـ شاهد (sham operated, SH)

۳ ـ شاهد پیش درمان شده با کرستین با دوز ۱۰ mg/kg (Quercetin pretreated sham oprated group)

٤ ـ تخریب (Lesion, L)

۵ ـ تخریب پیش درمان شده با کرسیتن با دوز ۱۰mg/kg (Quercetn pretreated Lesion group L+C)

٦- تخریب پیش درمان با کرستین با دوز ۲۰ mg/kg (Quercetin pretreated lesion group L+C)

حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی ۱۲ ساعت روشنایی و

دمای ۲۲درجه سانتی‌گراد نگهداری شده ، به آب آشامید نی و غذای مخصوص (Pelleted) بدون هیچ محدودیتی دسترسی داشتند و حداقل دو هفته قبل از انجام آزمایش به حیوانخانه منتقل شدند. موشها با دریافت مخلوطی از کتامین (۱۰۰mg/kg) و گزیلازین (۵ mg/kg) به‌صورت داخل صفاقی بیهوش شده و پس از قرار دادن آنها در دستگاه استریوتاکسی و تراشیدن موهای بخش فوقانی جمجمه آنها با استفاده از تیغ جراحی شکافی طولی در امتداد خط میانی سر از فاصله بین دو چشم تا مجاور گردن ایجاد شده با کمک قیچی پوست سر را از بافتهای زیرین جدا نموده و با استفاده از گیرهای مخصوص لبه‌های پوست کنار کشیده شد. محل تزریق به خوبی تمیز شد و نوروتوکسین به داخل جسم مخطط چپ موشها انجام شد.

مختصات محل تزریق نسبت به خط بین دو گوش؛ ۹/۲+ میلی متر قدامی ـ خلفی ۳ ـ میلی متر جانبی و ٤/٥ میلی متر شکمی (از سطح دوراماتر) مطابق اطلس پاکسینوس (Paxinos &Watson) تعیین شد. همچنین میله دندانی استریوتاکس ۳/۳ میلی متر زیر سطح افق تنظیم شده بود [۱۲و۱۳]. پس از پیدا کردن نقطه مورد نظر روی جمجمه و سوراخ کردن آن با مته ؛ تزریق نوروتوکسین توسط سرنگهامیلتون ۱۰ میکرولیتری انجام گرفت. از این طریق به داخل جسم مخطط سمت چپ هر حیوان ۵ میکرولیتر از محلول سالین ۰/۹درصد که حاوی ۲/۵ میکرولیتر نوروتوکسین 6-OHDA و اسید اسکوربیک ۰/۲درصد بود تزریق شد.

گروه SH+Q علاوه برمحلول سالین اسکوربات ، کرستین (Quercetin) حل شده در نرمال سالین ۰/۹درصد و DMSO (Dimethyl Sulfoxide) به میزان ۲۰mg/kg را به فرم داخل صفاقی (IT) [١٤] یک ساعت قبل از عمل جراحی و یک بار در روز به میزان ۲۰mg در فواصل زمانی ثابت به مدت یکماه دریافت نمود.

به حیوانات گروه تخریب (L) ۵ میکرولیتر از محلول نرمال سالین ۰/۹درصد حاوی ۲/۵ mg/kg از نوروتوکسین 6-OHDA (Sigma) و اسید اسکوربیک ۱۲درصد تزریق شد. یک گروه پیش درمان شده با کرستین (L+Q) علاوه بر 6-OHDA در نرمال سالین حاوی اسید اسکوربیک ۰/۲درصد به میزان ۲۰ mg/kg کرستین یک ساعت قبل از عمل جراحی،و بعد از عمل یک بار در روز کرستین به میزان ۱۰mg/kg با همان جدول زمانی گروه SH+Q دریافت نمود.

گروه دیگر پیش درمان شده با کرسیتن (L+Q) علاوه بر 6-OHDA در سالین اسکوربات ۰/۹درصد به میزان۲۰mg/kg کرستین یک ساعت قبل از عمل جراحی و همچنین یک بار در روز بعد از عمل به میزان ۲۰mg/kg با همان جدول زمانی گروهSH+Q دریافت نمود.سرعت تزریق به داخل استریاتوم به میزان یک میکرو لیتر در دقیقه بود. سوزن تزریق ۵ الی ۱۰ دقیقه بعد از پایان تزریق از محل تزریق خارج شد.

نحوه آماده کردن نوروتوکسین برای تزریق

در محیطی که از حداقل روشنایی برخوردار بوده، ۲۰۰ میکروگرم از پودر نوروتوکسین 6-OHDA (6-hydroxydo Pamine) را برداشته و در میکروتیوبی که حاوی ۸۰ میکرولیتر نرمال سالین و اسید اسکوربیک بود، حل شد. به دلیل حساسیت بالای دارو به نور، میکروتیوب در فویل پیچانده شده بود. در صورت سالم بودن نوروتوکسین رنگ محلول به‌دست آمده شفاف است و می‌توان آن را تا زمان استفاده در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد. چنانچه نوروتوکسین خراب شده باشد پس از حل شدن رنگ محلول متمایل به قرمز می‌شود. غلظت محلول به دست آمد µ g/ µl ۲/۵ است.

روش ارزیابی رفتاری

بررسی رفتار چرخشی توسط داروی آپومرفین هیدروکلراید (Sigma) با غلظت ۲/۵mg/kg یک هفته قبل و ۵ هفته بعد از جراحی انجام پذیرفت. برای اندازه‌گیری تعداد دفعات چرخش از یک روش استاندارد استفاده شد [۱۵] به این

ترتیب که موشها ۱۰ دقیقه قبل از شروع ارزیابی به منظور سازگاری با محفظه استوانه ای به داخل محفظه منتقل شدند. قطر استوانه ۳۳ سانتی متر و ارتفاع ۲۵ سانتی متر با سطح داخلی مدرج انتخاب شد، موشها چند دقیقه پس از تزریق در داخل استوانه، در جهت عکس سمت ضایعه دیده شروع به چرخش کرده و تعداد چرخشها کامل (۳٦۰ درجه) آنها به مدت یکساعت توسط شمارش گر دستی شمارش شد.

تعداد چرخش کونترالترال (چرخش به سمت راست) برای آپومرفین هیدروکلراید به‌عنوان عدد مثبت و چرخش اپسی لترال (چرخش به سمت چپ) به‌عنوان عدد منفی در نظر گرفته شد. تعداد خالص چرخش به صورت تفاضل چرخش‌ها در دو جهت بیان گردید [۱٦].

شمارش نورون SNC (ارزیابی کمی)

مطالعات میکروسکوپی در مورد کلیه نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ Zeiss انجام شد. در مورد هر حیوان برشهای مغز میانی (۲/٤ mmInteraural ـ ۲/۹) طبق روش بیان شده توسط Blandini و همکاران بررسی شدند [٤]. شمارش نورونهای واقع در بخش متراکم جسم سیاه substantia Nigra Pars Compacta (SNC) در برش‌های منطبق با چهار سطح ۲/۹، ۳/۲، ۳/۸، ٤/۲ اطلس پاکسینوس (Paxinos) نسبت به مرکز خط بین دو گوش انجام گرفت. (میکروسکوپ ٤۰۰ ×) شمارش نورونی به‌صورت یک سوکور انجام شد.

روشهای آماری

نتایج حاصل از بررسی رفتار چرخشی القا شده توسط داروی آپومورفین در دو دوره بررسی یک هفته قبل و پنج هفته پس از جراحی از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) و درموردتغییرات رفتار چرخشی طی هفته پنجم در هر گروه نسبت به قبل از جراحی از آزمون Paired-t-Test برای مقایسه استفاده شد.

یافته‌ها

برای ارزیابی توان حفاظتی کرستین روی نورونها، رفتار چرخشی حیوان (تعداد دفعات چرخشی در طی یکساعت) به‌دنبال تزریق داخل صفاقی آپومرفین هیدروکلراید (آگونیست دوپامینرژیکی) و همچنین شمارش کمی نورونها در ناحیه بخش متراکم جسم سیاه بررسی شد. سلولهای ناحیه SNC با روش رنگ آمیزی نیسل (کرزیل ویوله) مطالعه شدند.

بررسی رفتار چرخشی

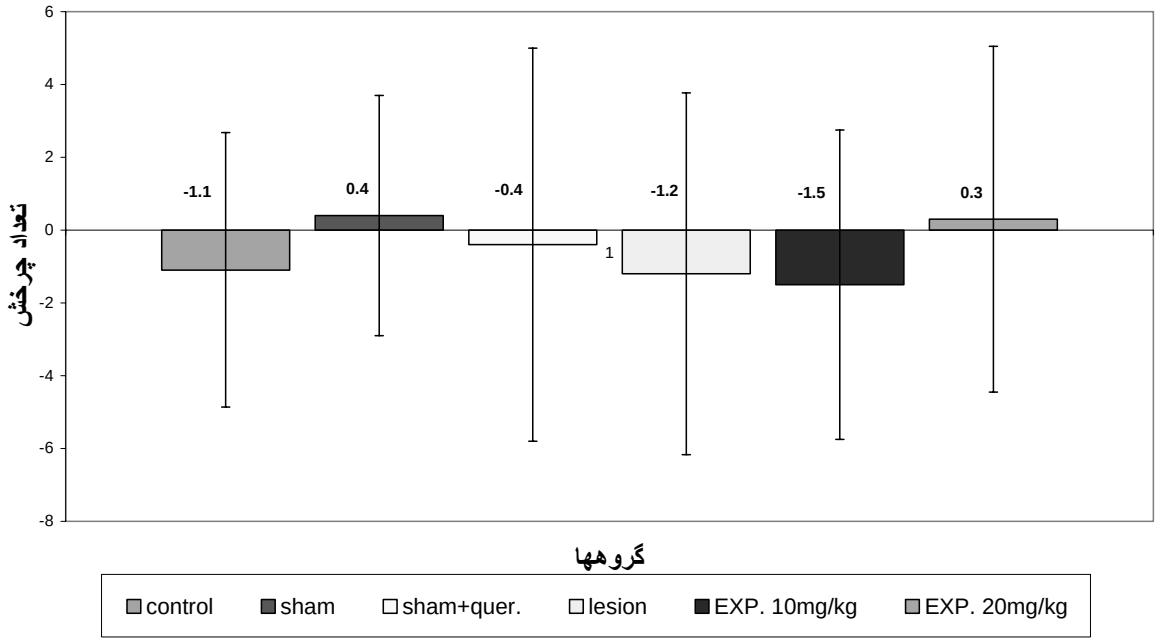
در این قسمت در تمام گروه‌ها آثار کرستین بر تعداد دفعات چرخشی القا شده به‌دنبال تزریق آپومورفین ارزیابی شد. در هفته قبل از انجام عمل جراحی (baseline) هیچ‌گونه اختلاف معنی داری در بین موشهایی که برای انجام آزمایش انتخاب شده بودند وجود نداشت (نمودار ۱).

بعد از مقایسه گروه طبیعی بعنوان کنترل منفی با دو گروه sham۱ (کنترل مثبت یک) به‌عنوان نمونه‌هایی که تمام عملیات جراحی روی آنها انجام شد و به‌جای نوروتوکسین 6-OHDA محلول سالین اسکوربات تزریق شده و گروه sham2 (گروه کنترل مثبت دو) بعد از تزریق سالین اسکوربات به مدت یک ماه تحت دوز ۱۰ mg/kg کرستین قرار گرفته است؛ بین این سه گروه از نظر رفتاری هچگونه اختلاف معنی دار دیده نشده است (نمودار ۲).

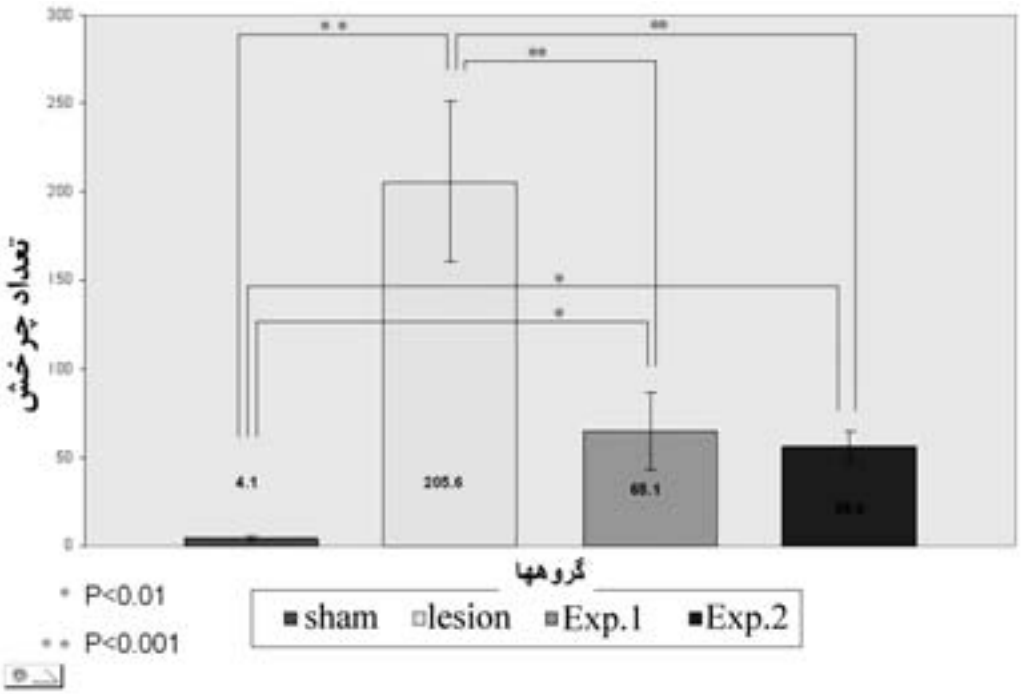
با انجام آنالیزآماری paired-t test مشخص شد، که تعداد چرخش القا شده بر اثر آپومورفین طی هفته پنجم در مورد هریک از سه گروه ذکر شده، هیچگونه تفاوت معنی داری را نسبت به هفته قبل از جراحی نشان نمی دهد. بنابراین با یکی کردن نتایج، تنها گروه sham را برای مقایسه با سه گروه آزمایشی، تخریب (L) و دو گروه تحت درمان با دو دوز مختلف کرستین ۱۰و ۲۰ mg/kg استفاده شد.

بررسی تعداد کل دفعات چرخش در طی مدت یک ساعت در هفته پنجم پس از جراحی نشان داد که در مقایسه با گروه شاهد، آپومورفین موجب چرخش کونترالترال بارز در

موشهای گروه تخریب ($p<0.001$) می‌شود درحالی که چرخش در مورد گروه‌های درمان بسیار کمتر ($p<0.01$) بود. در مقایسه با گروه تخریب، گروه‌های درمان کاهش معنی داری را در تعداد دفعات چرخش نشان داد ($p<0.01$). با مقایسه دو گروه تحت درمان ۱۰ و ۲۰ mg/kg نسبت به هم هیچ‌گونه تفاوت معنی‌دار آماری مشاهده نشد (نمودار ۲-۳).



نمودار ۱. مقایسه میانگین تعداد چرخش هفته قبل از جراحی در گروههای مختلف



نمودار ۲. مقایسه میانگین تعداد چرخش هفته پنجم بعد از جراحی در گروههای مختلف

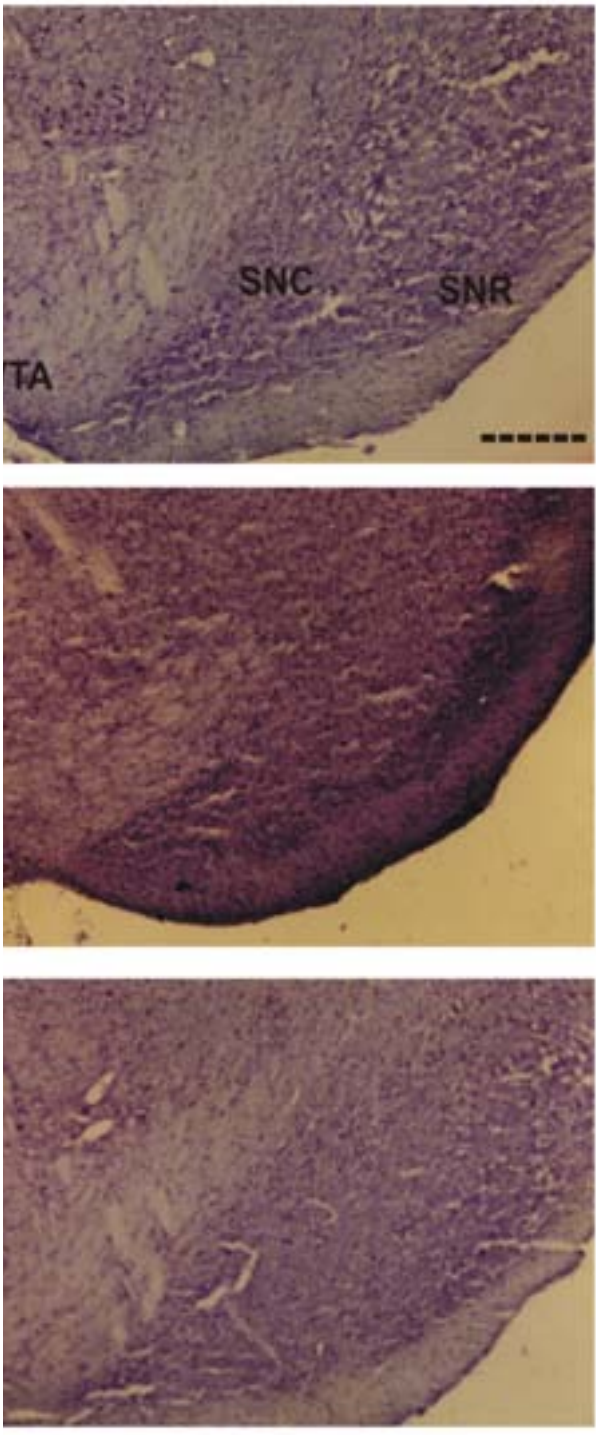
بررسی بافتی (شمارش نورونی)

در این بخش آثار دو دوز داروی کرستین بر تعداد نورونهای بخش متراکم جسم سیاه در هر ٤ گروه شاهد، تخریب و گروه‌های درمانی ۱۰ و ۲۰ mg/kg بررسی شد (شکلهای ۱ و ۲).

بررسیهای آماری هیچ‌گونه اختلاف معنی داری بین دو طرف راست و چپ SNC، در گروه شاهد نشان نداد. درحالی که در طرف چپ گروه‌های تخریب ($p<0.001$) و درمانهای ۱۰ و ۲۰ mg/kg، ($p<0.01$) کاهش معنی داری را در مقایسه با طرف راست نشان داد (نمودار۳).

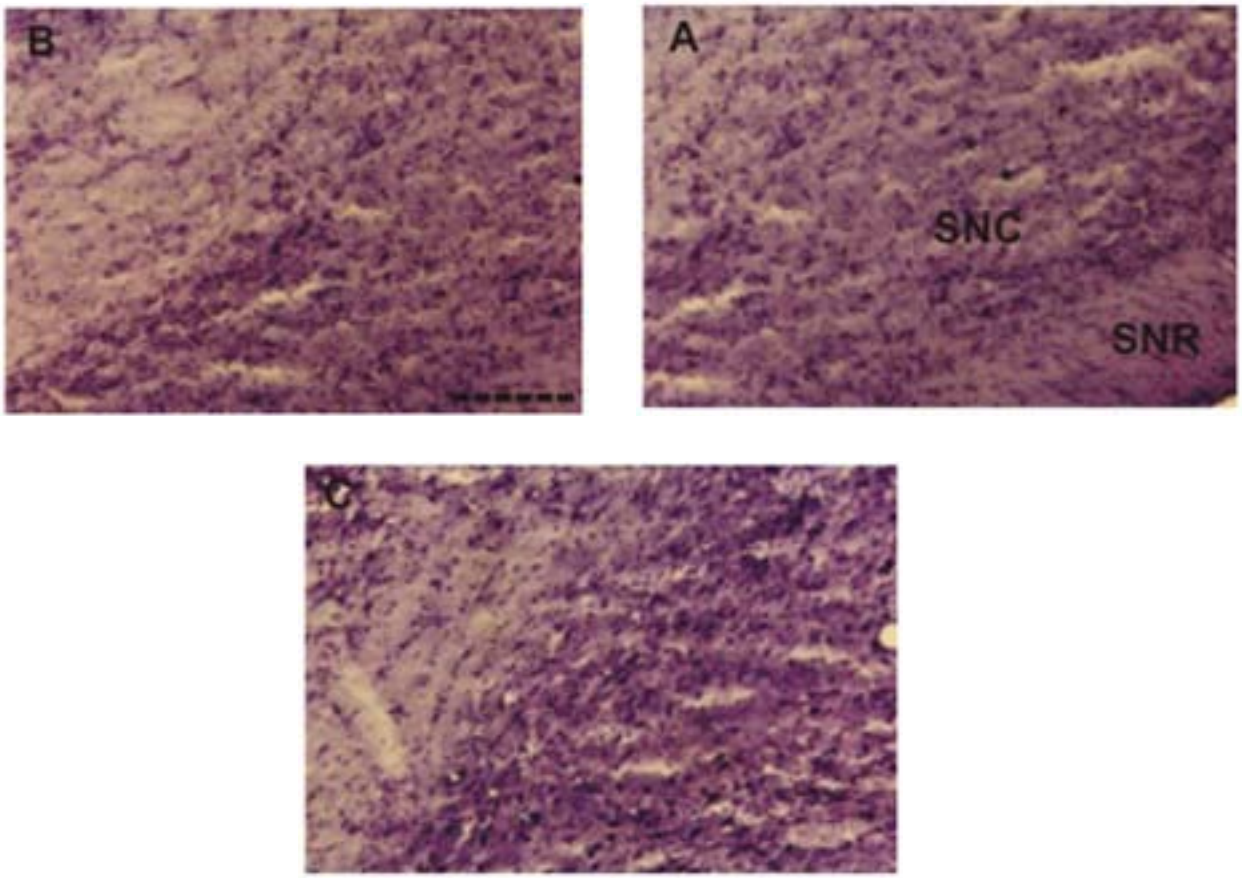
نتایج بررسی در مورد تعداد متوسط نورونها در طرف چپ SNC (همطرف با تخریب استریاتوم)؛ در گروه تخریب در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی داری آماری مشاهده شد ($p<0.001$). در حالی که در گروه‌های درمان در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری ($p<0.01$) دیده نشد. با مقایسه گروه تخریب با درمان تعداد متوسط نورونها در گروه‌های درمان بیشتر بوده و تفاوت معنی دار از نظر آماری ($p<0.01$) نشان داد (نمودار ٤).

همانگونه که درنمودارهای (۵ تا ۸) مشاهده می‌شود با مقایسه میانگین تعداد نورونها در طرف چپ SNC در کل چهار سطح مشخص می‌شود که کاهش تعداد نورونها در تمامی سطوح گروه تخریب در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی دار آماری ($p<0.001$) نشان داد. همچنین در مقایسه گروه تخریب با دو گروه درمان نیز تفاوت معنی دار آماری ($p<0.01$) دیده شد. با توجه به نمودارهای (٦ و ۷) مشاهده شد که گروه‌های درمان در سطوح ۳/۲ و ۳/۸ دارای تفاوت معنی دار آماری با گروه شاهد نبودند. اما با توجه به نمودارهای (۵ و ۸) هر دو گروه درمان با گروه شاهد در سطوح ۲/۹ و ٤/۲ دارای تفاوت معنی دار ($p<0.01$) بود. همچنین با توجه به نمودارهای چهار سطح بررسی شده، با مقایسه گروه‌های درمان نسبت به همدیگر هیچ‌گونه تفاوت معنی‌دار آماری مشاهده نشد.

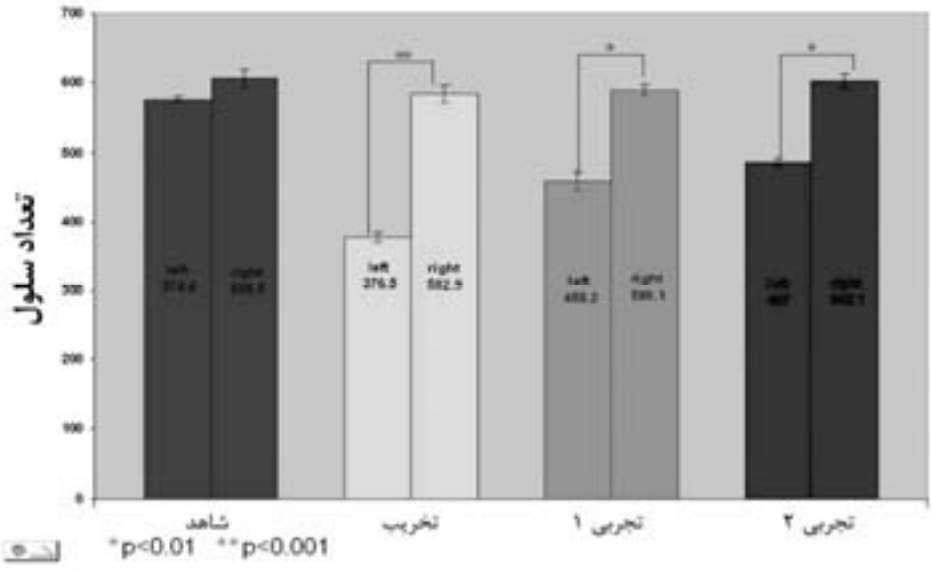


شکل ۱. اشکال ناحیه جسم سیاه را به ترتیب در سه گروه شاهد، تخریب و درمان به روش رنگ آمیزی نیسل و (کرزیل ویوله) نشان می‌دهد به دلیل اینکه بین گروه درمان ۲۰ mg/kg و ۱۰ تفاوت معنی‌داری وجود نداشت بنابراین از عکس گروه ۲۰ mg/kg استفاده شد. خط مقیاس ۲۵۰ میکرومتر.

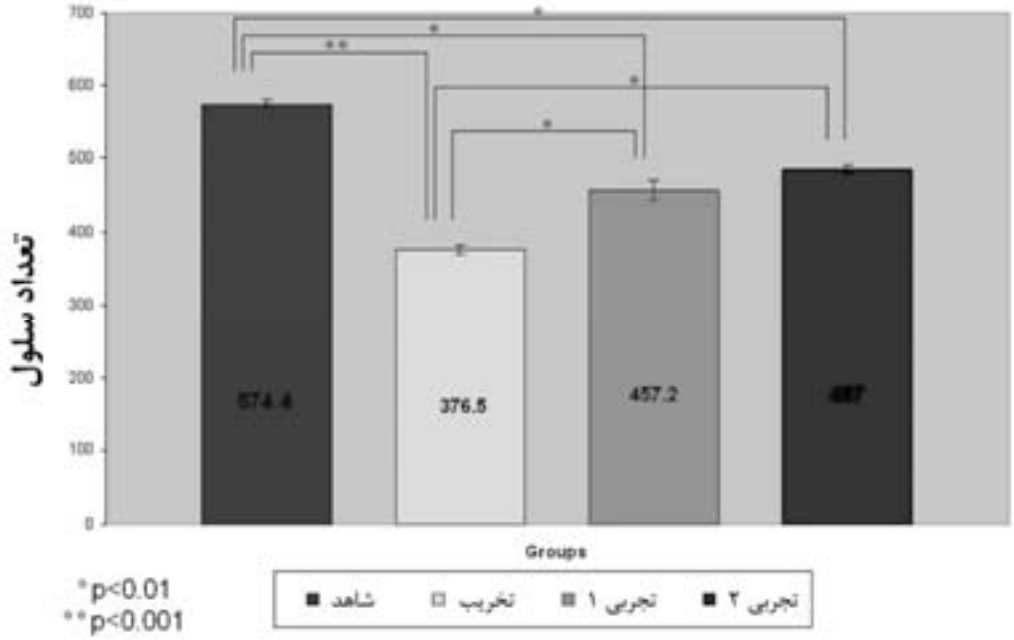
SNC: Substatntia nigra pars compact
SNR: Substantia ningra pars reticulata



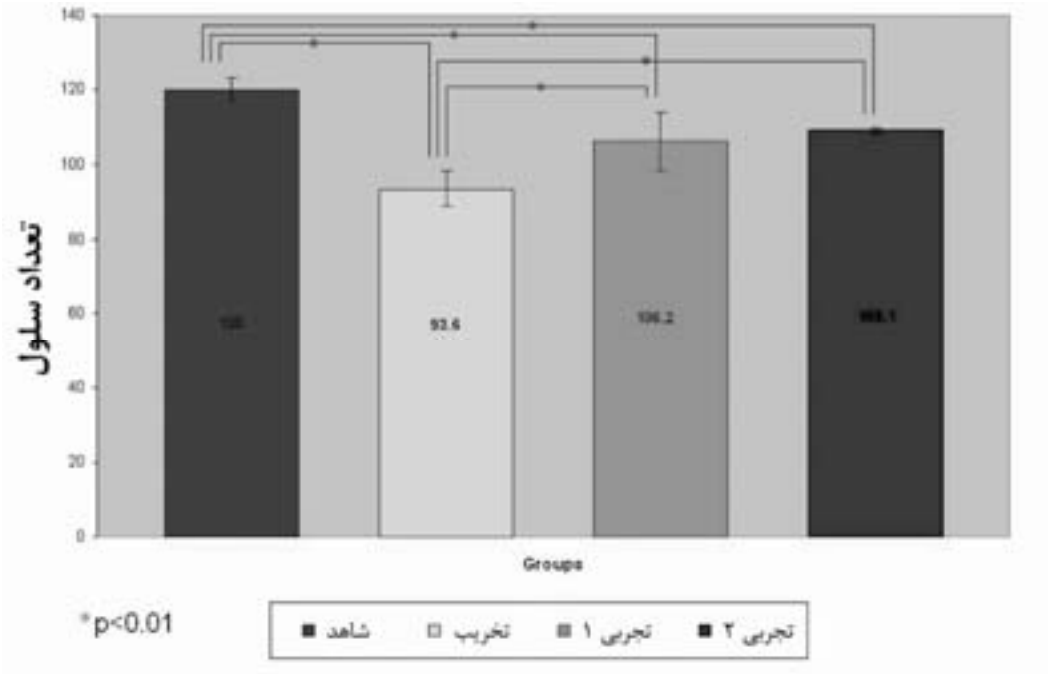
شکل ۲. اشکال ناحیه جسم سیاه را به ترتیب در گروه تخریب و درمانهای ۱۰ mg/kg و ۲۰ نشان می‌دهد. خط مقیاس ٤٥٠ میکرومتر.
SNC: Substantia nigra pars compact



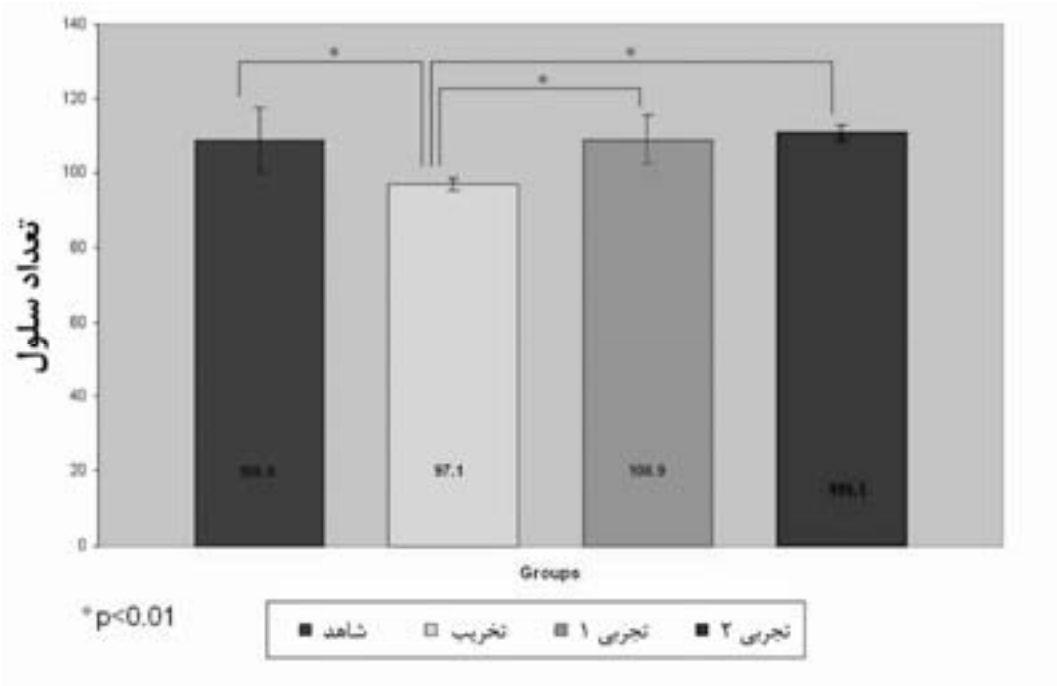
نمودار ۳. مقایسه میانگین تعداد سلولهای جسم سیاه در چهار سطح چپ و راست



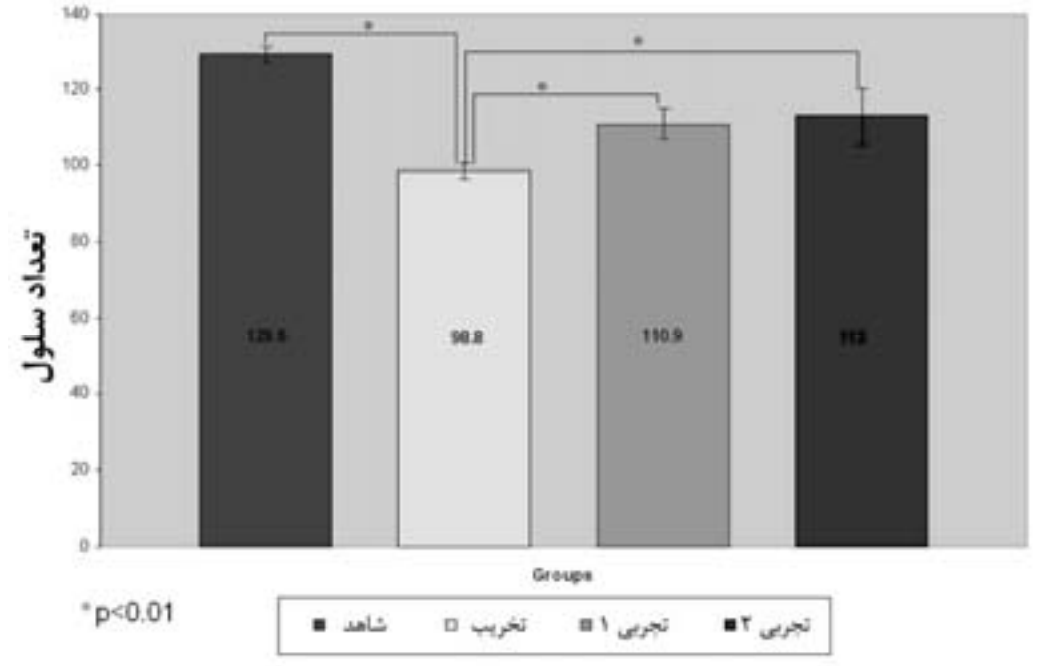
نمودار ۴. مقایسه میانگین سلولهای جسم سیاه چهار سطح در طرف چپ در چهار گروه



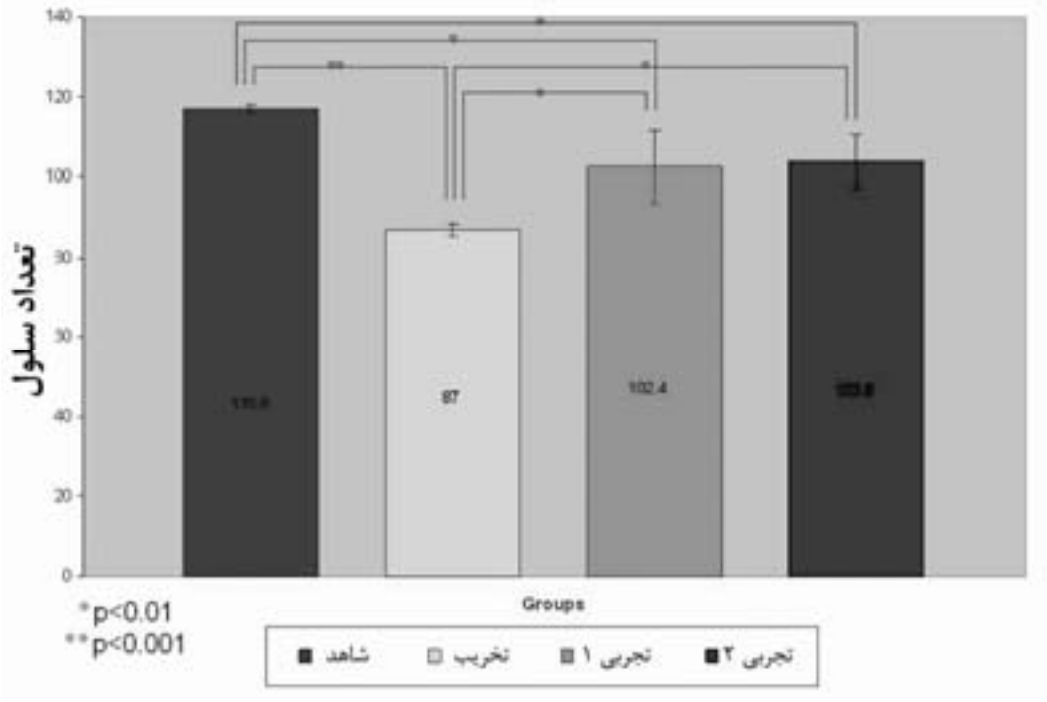
نمودار ۵. مقایسه میانگین سلولهای بخش متراکم جسم سیاه (SNC) در سطح ۲/۹ طرف چپ در چهار گروه



نمودار ۶. مقایسه میانگین سلولهای بخش متراکم جسم سیاه در سطح ۳/۲ طرف چپ در چهار گروه



نمودار ۷. مقایسه میانگین سلولهای بخش متراکم جسم سیاه (SNC) در سطح ۳/۸ طرف چپ در چهار گروه



نمودار ۸. مقایسه میانگین سلولهای بخش متراکم جسم سیاه در سطح ٤/٢ طرف چپ در چهار گروه

بحث

مدل حیوانی بیماری پارکینسون که طی سالیان اخیر استفاده می‌شود ازطریق تزریق داخل استریاتال نوروتوکسین 6-OHDA ایجاد می‌شود [۱۷]. استریاتوم به احتمال زیاد محل اولیه دژنراسیون در بیماری پارکینسون است که به دنبال آن سلولهای دوپامنرژیک نیگرال دچار مرگ سلولی می‌شوند، در مدل تجربی این بیماری، محل تزریق نوروتوکسین الزاماً می‌بایست در داخل استریاتوم باشد [۱۸]. نوروتوکسین اخیر از طریق حاملهای انتخابی دوپامین وارد پایانه‌های دوپامنرژیک واقع در نئواستریاتوم شده و با تولید پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل مشتق از آن موجب تخریب این نواحی می شود. [۱۹]. بنابراین با توجه به مطالب بالا و آثار آنتی اکسیدانتی کرستین در پژوهش حاضر، آثار تزریق داخل صفاقی و مکرر کرستین بر حفاظت نورونهای واقع در جسم سیاه در مدل اولیه بیماری پارکینسون بررسی شد.

رفتار حرکت چرخشی

ارزیابی این پژوهش شامل چرخشهای القا شده بوسیله آپومورفین یکساعت قبل و ۵ هفته بعد از عمل جراحی و درمان به‌وسیله کرستین بود این دارو به شکل آگونیست دوپامین عمل کرده و قادر است همانند دوپامین به گیرنده‌های دوپامینی متصل شود. هنگام ایجاد مدل آزمایشگاهی پارکینسون به کمک نوروتوکسین 6-OHDA، پایانه‌های آکسونی مسیر نیگرواستریاتال که مابین جسم سیاه و جسم مخطط برقرار هستند توسط رادیکال آزاد OH آسیب دیده و روند آزادسازی دوپامین مختل می‌شود. در چنین شرایطی تعداد گیرنده‌های دوپامینی جسم مخطط به شکل جبرانی افزایش یافته و بنابراین آپومرفین تزریق شده به‌عنوان یک داروی آگونیست دوپامینی قادر است به گیرنده‌های افزایش یافته متصل شده و باعث افزایش واکنش جسم مخطط در سمت ضایعه دیده و در نهایت چرخش حیوان در جهت عکس ضایعه شود [۲۰]. در این رابطه مشخص شده است که

چرخش بسیار واضح، در موشهای با تخریب تقریباً کامل سیستم نیگرواستریاتال مشاهده می‌شود در حالی که در موشهای با چرخش کم، میزان تخریب سیستم دوپامنرژیک ملایم و جزیی است [۲۱]. در این بررسی آثار تجویز کرستین بر تعداد چرخش القا شده بر اثر آپومورفین بررسی شد.

باتوجه به نتایج بررسیهای قبلی که نشان می‌دهد تخریب سیستم نیگرواستریاتال در موشهایی که چرخش واضحی را بعد از تجویز آپومرفین نشان می‌دهند کامل بوده، درحالی که در موشهای با تخریب کمتر و ناقص تعداد این چرخش کمتر است. می‌توان چنین نتیجه گرفت که کاهش بیشتر تعداد چرخش در گروه درمان می‌تواند علت توان حفاظتی کرستین و احتمالاً بروز مکانیسمهای مربوط به بازگشت عملکردی باشد [۲۲,۱۳].

Cheng و همکاران (۱۹۹۸) مشخص نمودند که به دنبال آسیب یکطرفه موش بالغ بازگشت عملکردی تا حدودی از طریق جایگزینی سیناپسی (synaptic replacement) که نوعی سیناپس زایی ری اکتیو (Reactive synaptogenesis) به حساب می‌آید، به انجام می‌رسد [۲۳]. بنابراین با توجه به نتایج فوق مشخص میشودکه کرستین از طریق حفاظت در برابر آسیب اکسیداتیو و هموار نمودن راه برای بروز مکانیسم مربوط به بازگشت عملکردی می‌تواند موجب کاهش عدم تقارن رفتاری در گروه درمان شود.

در نتایج بررسیهای قبلی نشان داده شده که هرچند سیستم عصبی توانایی کمتری را برای ترمیم (رژنراسیون) نورونهای آسیب دیده نشان می‌دهد اما ظرفیت بالایی را در جهت سازمانبندی مجدد در مدارهای عصبی خود در پاسخ به آسیب فیزیکی دارا است. این سازمانبندی در نورونهای سالم باقیمانده رخ می‌دهد، که در رابطه با آن، افزایش حساسیت (Supersensitivity)، افزایش تعداد گیرنده‌ها (Up-regulation)، ریشه زدن (Sporuting) و بروز تغییرات در حوزه‌های دریافتی پیام و چند مکانیسم دیگر ایجاد می‌شود. به‌علاوه سیستم عصبی توانایی جبران ناقص ضعف رفتاری را ازطریق به‌کارگیری آن گروه از مدارهای عصبی که در حالت طبیعی در کنترل رفتار حرکتی مورد نظر نقش ندارند را دارد. پس می‌توان نتیجه گرفت که یکی از مکانیسمهای کاهش چرخش می‌تواند ناشی از آثار کرستین بر عوامل سازماندهی نورونهای سالم و مکانیسمهای مربوط به آن باشد [۱۸و۲۰].

مطالعات بافتی

با تخریب نورونهای دوپامنرژیک جسم سیاه تغییرات مورفولوژیکی بارز در نئواستراتوم با استفاده از میکروسکوپهای نورونی و الکترونی قابل مشاهده است. تزریق داخل استریال 6-OHDA، در ابتدا موجب تخریب پایانه‌های دوپامنرژیک و سپس بصورت رتروگراد موجب تحلیل رفتن اجسام سلولهای نورونهای دوپامنرژیک در جسم سیاه می‌شود. سطح دوپامین و متابولیتهای آن (Homovanillic acid , dihydroxyphenylacetic acid) به‌طور اختصاصی چهار هفته پس از تزریق داخل اسریاتال نوروتوکسین 6-OHDA در نواحی جسم سیاه و استریاتوم همطرف با تخریب شدیداً کاهش می‌یابد [۱۲].

اکسیداسیون به‌طور معمول درنتیجه انتقال یک الکترون از فلزات انتقالی (Transition) نظیر آهن، مس منگنز به ملکول اکسیژن رخ می‌دهد. این گونه عناصر الکترون باند شده سست داشته و به حالت چند ظرفیتی در بدن وجود دارند. آهن فراوانترین فلز انتقالی در بدن محسوب می‌شود و موجب تسریع واکنشهای اکسیداسیون در بدن می‌شود میزان آسیب و سمیت واکنشهای اکسیداسیون عمدتاً ناشی از رادیکال آزاد هیدروکسیل بوده و مستقیماً با غلظت موضعی آهن در ارتباط است [۲٤]. فلاونوئیدهایی مانند کرستین توانایی پایدار کردن الکترونهای آزاد به‌دست آمده از رادیکالهای آزادی مانند ROS در in vitro را دارا هستند. همچنین کرستین با کلاته کردن یونهای فلزی از تولید ROS جلوگیری به عمل می‌آورد، چرا که این یونهای فلزی در طول واکنشهای فانتومی (Fentom) برای تولید ROS شرکت می‌نمایند [۲۵]. بنابراین می‌توان

اشاره نمود که بیشتر بودن نورونها پس از یکماه درمان با کرستین در مقایسه با گروه تخریب می‌تواند به‌علت خنثی شدن اکسیژن فعال توسط این ماده باشد.

این احتمال وجود دارد که نوروتوکسین 6-OHDA ازطریق القای آب اکسیژنه و رادیکالهای آزاد و بسیار فعال هیدروکسیل مشتق شده از آن و احتمالاً حضور آهن موجب آسیب مسیر دوپامنرژیک سیستم نیگرواستریاتال می‌شود. بافت مغز دارای غلظت بالایی از لیپیدهای اشباع نشده است که نسبت به استرس اکسیداتیو ناشی از رادیکالهای آزاد بسیار حساس بوده و به‌عنوان ماده اولیه پراکسیداسیون بکار می‌رود [۲۵و۲۶]. متابولیتهای فعال اکسیژن بر باند شدن لیگاندها به گیرنده‌های غشایی (بخش لیپد) نظیر گیرنده‌های آلفا و بتا آدرنرژیک، کولینرژیک (موسکارینی)، آدنوزینی، هیستامنیرژیک و سرتونرژیک اثر می‌گذارند. پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی (lipid peroxides) امکان دارد منجر به کاهش تراکم گیرنده و یا تغییر ویسکوزیته غشا شود که این خود بر مکانیسم کوپلینگ اثر می‌گذارد. LPO همچنین با تغییر دادن فعالیت فسفولیپاز A2 همراه است که این به‌طور غیر مستقیم بر عمل گیرنده اثر می‌گذارد [۲۸]. علاوه بر این رادیکالهای فعال اکسیژن و LPO در پاتوژنز تعدادی از بیماریهای نورولوژیکی مانند ایسکمیا و بیماریهای نورودژنراتیوی نقش دارد [۲۹]. بنابراین توانایی عوامل فارماکولوژیکی در جذب رادیکالهای آزاد و با مهار LPO می‌تواند برای جلوگیری یا درمان این بیماریهای نورودژنراتیو مفید باشد. در تحقیق حاضر اثر داروی کرستین بر روی بیماری پارکینسون (بیماری نرودژنراتیو) بررسی شد که در این بررسی درمان با کرستین به مدت یکماه این تشخیص داده شد که تعداد نورونهای تحت درمان با کرستین بیشتر از نورونهای تخریب شده با 6-OHDA می باشد. بنابراین می توان به این نتیجه احتمالی رسید که این بهبودی بدلیل خواص آنتی اکسیدانتی قوی کرستین و یا احتمالاً بدلیل خواص جذب جلوگیری به‌عمل آورد. با توجه به این موضوع و اینکه رادیکالهای آزاد و درنتیجه کاهش پراکسیداسیون لیپیدی آن باشد (30,31). از مکانیسمهای احتمالی دیگر توان حفاظتی کرستین می‌توان به خاصیت مهار COMAT و MAO اشاره نمود که این عمل باعث افزایش میزان دوپامین در مغز می‌شود. تأثیر بعضی ازعوامل فارماکولوژیکی مانند MPTP، رزرپین و پری فنازول باعث بلوکه شدن گیرنده‌های دوپامینی خواهد شد. این بلوکه شدن می‌تواند منجر به افزایش میزان سنتز دوپامین در نورونهای دوپامنرژیک باقیمانده از آسیب دژنراتیو شود. در جریان متابولیسم اکسیداتیو توسط آنزیم MAO، آب اکسیژنه تولید می‌شود. الکترونهای این ملکول برخلاف اکسیژن جفت بوده و درنتیجه به‌عنوان یک رادیکال آزاد درنظر گرفته نمی شود. این ماده به‌طور طبیعی در بافت مغزی توسط سیستم گلوتاتیون حذف می‌شود. با این وجود در حضور آهن یا رادیکال آزاد سوپراکسید، آب اکسیژنه احیاء شده و رادیکال بسیار سمی هیدروکسیل تشکیل می‌شود. شواهد متعدد دال بر این موضوع وجود دارد که فعالیت مداوم آنزیم MAO-B منجر به تولید مقادیر زیاد آب اکسیژنه می‌شود که در ورای توانایی سیستم حفاظتی گلوتاتیون قرار دارد. کرستین دارای خواص مهاری هر دو آنزیم Monoamineoxidase و Catechol-methyltransferase است. بنابراین ازطریق مهار این دو از افزایش سنتز دوپامین جلوگیری نموده و در نتیجه از تولید آب اکسیژنه که منجر به آسیب سلول می‌شود [28, 32] جلوگیری می‌نماید.

Standstron Buttke، (۱۹۹۴)در بررسی خود از استرس اکسیداتیو بعنوان یک واسطه برای آپوپتوز به دلایل زیر ذکر کردند:

۱ـ افزایش انواع فعال اکسیژن (ROS) و یا تخلیه سلول از عوامل آنتی اکسیدانت منجر به ایجاد آپوپتوز می‌شود.

۲ـ آپوپتوز در رابطه با القای تولید انواع فعال اکسیژن در سلول ایجاد می‌شود.

۳ـ با افزایش ترکیبات آنتی اکسیدانت می‌توان از آپوپتوز کرستین دارای خواص آنتی اکسیدانتی است و همچنین نقش

حفاظتی خود را در برابر القـای آپوپتـوزیس از طریـق القـای بیان ژن محافظت سلول از آپوپتوز انجام می‌دهد [۳۳].
این مکانیسم ممکـن اسـت دال بـر آن باشـد کـه کرسـتین در حفاظت سلولها نقش مؤثری ایفاء می‌نماید.
باتوجه به مطالب فوق می‌توان نتیجه گرفت که افزایش تعـداد سلولها در گروه‌های تحت درمان با کرستین می‌تواند نتیجه در قدرت آنتی اکـسیدانتی بـالای کرسـتین باشـد. براسـاس ایـن یافته‌ها می‌توان نتیجه گرفت که، تجویز داخل صفاقی و مکـرر کرسـتین بـه مـدت یکمـاه پـس از تزریـق داخـل صـفاقی نوروتوکسین ٦-هیدروکسی دوپامین در مدل تجربـی بیمـاری پارکینسون عدم تقارن حرکتی (رفتار چرخشی) ظاهر شده بـر اثر تجـویز آگونیـست دوپـامینرژیکی آپـومرفین را بـه میـزان متوسط کاهش می‌دهد.
تجـویز داخـل صـفاقی و مکـرر کرسـتین موجـب حفاظـت نورونهای بخش متراکم جسم سیاه و پایانه‌هـای دوپامنرژیـک در ناحیه نئواستریاتوم، در برابـر آثـار سـمی نوروتوکـسین ٦-هیدروکسی دوپامین می‌شود.

تقدیر وتشکر

نویسندگان این مقالـه بـر خـود لازم مـی داننـد کـه از مرکـز تحقیقات بیولوژی سلولی وملکولی و آزمایشگاه نوروسـاینس دانشگاه علوم پزشکی ایران مراتـب تـشکر خـود را بـه عمـل آورند.

References

1. **Miller R, Beninger RJ**. On the interpretation of asymmetries of posture and locomotion produced with dopamine agonists in animals with unilateral depletion of striatal dopamine. progress in Neurobiobgy 1991; 36: 229-56
2. **Kopin IJ**. Parkinson s disease past present and future. Neuropsycho pharmacol 1993; 9: 1-12
3. **Kedar N, William C, Bipin Kumar**. Multiple Antioxidants in the prevention and treatment of parkinson's Disease. J Am Coll Nutr 1999; 18 (5) : 413-23.
4. **Blandini F, Porter RH, Greenamyre JT**. Glutamate and Parkinson's disease.Mol Neurobiol1996 ;12(1): 73-94
5. **Morens DM, Grandinetti A, Waslien CI, Park CB, Ross GW, White LR**. Case 5–Control Study of idiopathic parkinson's disease and dietary vitamin E intake. Neurology 1996; 46(5): 1270-4.
6. **Lamson DW, Brignall MS**. Antioxidant and cancer, part 3: Quercetin. Altern Med Rev 2000; 5(3): 196-208
7. **Ihige K, Schuert D, Sagara Y**.Flavonoids Protect Nuronal Cell Oxidative By Three Distinect Mechanisms,Free Radical Biology &Medicine 2001; 12: 433-48
8. **Morel I, Lescoat G, Cogrel P, Pasdeloup N, Brissot P, Collard J**.Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin,quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures.Biochem phamacol 1993; 7: 45(1): 13-9
9. **Miller AL** .Antioxidant flavonoids: structure.function and clinical usage. Alt Med Rev 1996:1:103-11.
10. **Chang Jung WS, Lee YJ, LU FJ, Chancg**

HC. Inhibitory effectes of flavonoids on xanthin oxidase .Anticancer Res1993:1 3:2165-7.

11. **de Whalley CV, Rankin SM, Hoult JR, Jessup W, Leake DS**.. Flavonoids inhibit the oxidative modification of Iow density lipoproteins by macrophages. Biochem pharmacol 1990;39(11):1743-50.

۱۲.**روغنی م.** اثر حفاظتی ویتامین E برسیستم نیگرو استریاتال در مدل تجربی بیماری پارکینسون وپایان نامه دکتری فیزیولوژی . تهران. دانشگاه شهیدبهشتی. ۱۳۷۹

13. **Olanow CW, Tatton WG.** .Biology and pathogenesis of Parkinson’s disease .Annu Rev Neurosci 1999; 22: 123-49.

14. **Cho J, Joo NE, Kong JY, Jeong DY, Lee KD, Kang BS**. Inhibition of excitotoxic neuronal death by methanol extract of Acori graminei rhizoma in cultured rat cortical neurons. J Ethnopharmacol 2000; 73(1-2) : 31-7.

15. **Casas M , Ferre S, Coboso A, Cadafalch J, Grau JM, Jan F**. Comparison between apomorphine and amphetamine-induced rotational behavioral in rats with a unilateral nigrostriatal pathway. Neuropharmacol 1998, 27; 657-9.

16. **College K, Campus L, London SE.** Flavonoids Antioxidants or signaling Molecules . Free Radical Biology and Medicine 1 Aprile 2004; 7 (36): 838-49.

17. **Perese DA , Ulman J, Viola J , Ewing SE , Bankiewicz KS.** 6-hydroxydopamine- induced selective parkinsonian rat model . Brain Res 1989; 494 14(2) : 285-93.

18. **lchitani Y, Okamura H, Nakahara D, Nagatsu I , Ibata Y**. Biochemical and immunocytochemical changes induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine injection in the rat nigrostriatal dopamine neuron system: evidence for cell death in substantia nigra. Exp Neurol 1994 Dec; 130(2)**:** 269-78

19. **Youdim MB , Riederer P** . Understanding parkinson's disease . sci Am 1997 ; 276(1) 52-9.

20. Chwrting RK, Huston JP. The Unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research analysis of functional deficits recovery and Treatments. Prog Aeurobiol 1996; 50(2-3):257-331

21. **Ziegler MG , Szechtman H**. Relation between motor asymmetry and direction of rotational behavior under amphetamine and apomorphine in rats with unilateral degeneration of the nigrostriatal dopamine system. Behav Brain Res 1990; 39: 123-33.

22. **Robinson TE, whishaw IQ**. Normalization of extracellular dopamine in striatum Following recovery from a partial unilateral 6-OHDA lesion of the substantia nigra a microdialysis study in freely moving rats.

Brain Res 1998; 450: 209-24.

23. **Cheng HW, Tong J, McNeill TH**. Lesion-induced axon sprouting in the deafferented striatum of adult rat. Neurosci Lett 1998; 242(2): 69-72.
24. **Leroy E , Boyer R, Auburger G , Leube Ulm G, Mezey E, Hrta G, Brownstein MJ**. The Ubiquitin Pathway in Parkinson's disease .Nature 1998; 395 (6701) : 451-2.
25. **Chan PH, Fishman RA**. Transient formation of superoxide radicals in polyunsaturated fatty acid-induced brain swelling. J Neurochem 1980; 35(4): 1004-7.
26. **Studer L, Csete M , Lee SH, Kabbani N, Walkinkonis J, Wold B,Mckay R**. Enhanced proliferation survival and dopamineergic differentiation of CNS precursor in lowered oxygen. J Neurosci 2000 ; 20 (19):7377-83.
27. **Youdim MB,Ben-Schachar D,Riederer P**. Is Parkinson's disease a progressive siderosis of substantia nigra resulting in iron and melanin induced neurodegeneration?. Acta Neural Scand Suppl 1989;126:47-54.
28. **Ebadi M, Srinivasan SK, Baxi MD**.Oxidative Steress and antioxidant therapy in parkinson's disease. Prog Neurobiol 1996; 48(1) :1-19.
29. **Arenase E , Bulltin D**. Stem cells in the treatment of Parkinson's disease .Brain Research 2002 ;57(6):759- 808.
30. **Mena I, Houriuchi k, Burke K, Cotzia GC**. chronic manganese Poisoning. Individual Susceptibility and absorption of iron. Neurology 1969 ; 19(6): 1000-6.
31. **Smith TS, Parker WD Jr, Bennett JP Jr.** L-dopa increases nigral production of hydroxyl radicals in vivo: potential L-dopa toxicity?. Neuroreport 1994 14; 5(8): 1009-11.
32. **Zheng RL ,Wang PF, Li J, Liu ZM, Jia ZJ**. Inhibition of the autoxidation of linoleic acid by phenylpropanoid glygosides.Chem Phys Lipids 1993; 65(2): 151-4.
33. **Chan V, Paloy E**. Asam,Alternation in catecholamine neurons of locus coeruleus in senile dementia of Alzheimer’s type,and in parkinson’s disease with and with out dementia .J Comp Neurol.1989.287,pp:373-92.