DOI: 10.1234/knh.v0i0.411

مقاله پژوهشی

مجله دانش و تندرستی، دوره ۹، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۳
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

مدل اختلال حافظه در بیماری پارکینسون با تخریب دوطرفه بخش متراکم جسم سیاه در موش صحرایی

رسول آرش‌پور[۱]، محمدتقی قربانیان[۲]، مریم حاجی‌قاسم‌کاشانی[*۲]، تقی لشکر بلوکی[۲]، مهدیه تمدنی[۱]

۱- دانشگاه دامغان- دانشکده زیست‌شناسی- گروه زیست‌شناسی -کارشناس ارشد زیست‌شناسی سلولی- تکوینی.

۲- دانشگاه دامغان- دانشکده زیست‌شناسی و پژوهشکده علوم زیستی- گروه زیست‌شناسی- استادیار.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۹/۱۳، **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۲/۱۱/۲۹

چکیده

مقدمه: *تا مدت‌ها پیش تنها اختلالات حرکتی بیماری پارکینسون مورد توجه محققین بود، لیکن اختلالات شناختی و حافظه از علائم غیرحرکتی این بیماری است که قبل از علائم کلینیکال ظاهر می‌گردند. لذا در این تحقیق تزریق نوروتوکسین ۶-هیدروکسی دوپامین (6-OHDA) در مناطق متراکم جسم سیاه دو طرف مغز انجام شدکه باتوجه به ارتباط عصبی بین جسم سیاه مغز میانی و هیپوکمپ، منجر به استرس اکسیداتیو در هیپوکمپ گردیده متعاقب آن مدل اختلال حافظه پارکینسون ایجاد گردید.*

مواد و روش‌ها: *۶ میکروگرم نوروتوکسین 6-OHDA به بخش متراکم جسم سیاه به‌صورت دوطرفه تزریق شد (گروه آسیب). به گروه شم نیز نرمال سالین به جای نوروتوکسین تزریق شد. آزمون فراگیری در روزهای ۹ تا ۱۲ پس از جراحی، با آزمون ماز آبی موریس ارزیابی شد و سپس ۲۴ ساعت بعد از آخرین آموزش، آزمون پروب گرفته شد. سرانجام حیوانات قربانی شده و پس از جدا سازی هیپوکمپ، فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) و کاتالاز (CAT) مورد بررسی قرار گرفت.*

نتایج: *اختلاف معنی‌داری در کل مسافت پیموده شده بین دو گروه مشاهده نشد، که نشان‌دهنده‌ی عدم‌وجود اختلالات حرکتی در گروه آسیب بود. در روز پروب افزایش معنی‌داری در زمان رسیدن به محل سکو در گروه آسیب نسبت‌به گروه شم مشاهده شد ($P<۰/۰۰۱$). درصد زمان حضور در ربع هدف در گروه آسیب نسبت‌به گروه شم کاهش معنی‌داری پیدا کرده بود ($P<۰/۰۰۲$). آنالیز واریانس یک طرفه، کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم SOD در گروه آسیب نسبت‌به گروه شم را نشان داد ($P<۰/۰۵$)، ولی این کاهش در رابطه با آنزیم‌های GPX و CAT معنی‌دار نبود.*

نتیجه‌گیری: *تخریب دوطرفه بخش متراکم جسم سیاه به‌عنوان یک مدل حیوانی در مراحل اولیه‌ی بیماری پارکینسون می‌تواند برای بررسی اثر نوروپروتکتیو بسیاری از داروهای آنتی‌اکسیدان و روش‌های درمانی مناسب مورد آزمون قرار گیرد.*

واژه‌های کلیدی: بیماری پارکینسون، ۶ هیدروکسی دوپامین، جسم سیاه، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، حافظه.

[*] **نویسنده مسئول:** دانشگاه دامغان- مجتمع اساتید- کوچه اول- پلاک ۶ **تلفن:** ۰۹۱۲۶۲۶۱۵۸۴، **Email:** Kashani@du.ac.ir

ارجاع: آرش‌پور رسول، قربانیان محمدتقی، حاجی‌قاسم‌کاشانی مریم، لشکر بلوکی تقی، تمدنی مهدیه. مدل اختلال حافظه در بیماری پارکینسون با تخریب دوطرفه بخش متراکم جسم سیاه در موش صحرایی. مجله دانش و تندرستی ۱۳۹۳؛۹(۴):۸-۱۶.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

جیمز پارکینسون در سال ۱۸۱۷ برای اولین بار، توصیف دقیقی از علائم بالینی بیماری پارکینسون ارائه داد و آن را فلج حرکتی (Shaking palsy) نامید. بیماری پارکینسون شایع‌ترین بیماری نورودژنراتیو بعد از آلزایمر به‌شمار می‌رود که تقریباً ۱٪ افراد بالای ۵۰ سال به آن مبتلا می‌شوند، این بیماری با تخریب نورون‌های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه (SNc) در مغز میانی و به‌دنبال آن کاهش دوپامین در جسم مخطط همراه است. علائم بیماری پارکینسون در دو مرحله ظاهر می‌شود: ۱- مرحله ابتدایی یا مرحله قبل از بروز علائم بالینی بیماری (Presymptomatic stage) ۲- مرحله‌ای که طی آن علائم بالینی بیماری آغاز می‌شود. این مرحله با تأخیر شروع شده و زمانی علائم بیماری آشکار می‌شوند که میزان تخریب نورون‌های دوپامینرژیک جسم سیاه ۵۰ تا ۶۰ درصد و کاهش دوپامین در جسم مخطط ۷۰ تا ۸۰ درصد باشد و بدین ترتیب منجر به شروع دوره‌ی حاد بیماری می‌گردد (۱-۵). اکثر علائم بالینی بیماری پارکینسون مربوطبه اختلالات حرکتی شامل لرزش درحال استراحت (Resting tremor)، کندی حرکات، سفتی عضلانی (Resting tremor) و اختلال در رفلکس‌های وضعیتی می‌باشد. باتوجه به اینکه در طول مراحل اولیه بیماری پارکینسون بیشترین تخریب نورونی در SNc صورت می‌گیرد، بنابراین اختلال حافظه مشکلی را برای بیمار ایجاد نخواهد کرد ولی در مراحل پیشرفته بیماری که با تخریب بخش شکمی تگمنتوم مغز میانی (VTA) که در سمت داخل SNc قرار دارد، همراه است و با توجه به اینکه خروجی‌هایی از مناطق SNc و VTA به هیپوکمپ فرستاده می‌شود، دوپامین ترشح شده از این مسیر در منطقه هیپوکمپ برروی حافظه به‌خصوص حافظه موقعیت‌یابی فضایی Spatial memory و یادگیری تأثیر می‌گذارد. کاهش دوپامین در هیپوکمپ با کاهش نوروژنزیس، سیناپتوژنزیس و به‌دنبال آن اختلال حافظه شدیدی همراه خواهد بود، به‌طوری‌که بیمار در زندگی روزمره‌اش دچار مشکل می‌گردد تغییرات شناختی در بیماری پارکینسون می‌تواند زندگی روزمره بیماران را تحت تأثیر قرار دهد و حتی با عملکرد شغلی و اجتماعی آنها تداخل کند، به‌عنوان مثال منجر به از دست دادن شغل یا ایجاد تعارضات خانوادگی گردد (۶-۹) و با این تصور که هسته‌های قاعده‌ای و مسیر نیگرواستریاتال منحصراً مسیرهای حرکتی را کنترل می‌کنند و در بیماری پارکینسون با تخریب این مسیر و حذف دوپامین، بخش ونترال جسم مخطط آسیب می‌بینند و اختلالات حرکتی در بیمار ظاهر می‌شود، به‌طوری‌که تمامی‌روش‌های درمانی بر پایه کاهش علائم حرکتی بیماری بود. ولی تحقیقات اخیر نشان داده ورودی‌هایی که به بخش پشتی جسم مخطط و هیپوکمپ فرستاده می‌شوند با آزاد کردن دوپامین در این مناطق نقش مهمی را در افزایش سیناپس‌های بین نورونی و تقویت حافظه ایفاء می‌کنند (۱۰ و ۱۱). ارتباطات عصبی در این مسیر توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرده به‌طوری‌که از آن به‌عنوان سیستم‌های حافظه استریاتال و هیپوکمپال نام برده شده گیرنده‌های دوپامینی در این مناطق شناسایی شده‌اند و حتی با تزریق آگونیست و یا آنتاگونیست‌های دوپامینی در این مناطق، تقویت و یا اختلال حافظه را ایجاد کرده‌اند (۱۲ و ۱۳).

ازآنجاکه افزایش مصرف اکسیژن با استرس اکسیداتیو همراه خواهد بود، مغز بافتی است که به‌علت نیاز زیاد به اکسیژن، بیشتر در معرض آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو قرار می‌گیرد. استرس اکسیداتیو یکی از عواملی است که در تخریب نورون‌های دوپامینرژیک در بیماری پارکینسون نقش دارد. مطالعات نشان داده است که صدمات ناشی از استرس اکسیداتیو و رادیکال‌های آزاد نقش مهمی در تخریب نورون‌های جسم سیاه دارد (۱۴). به‌علت آنکه متابولیسم دوپامین در نورون‌ها با تولید گونه‌های واکنشگر اکسیژنی، Reactive oxygen ROS:species، از جمله پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل همراه می‌باشد بنابراین نورون‌های دوپامینرژیک در مغز بیشتر در معرض مرگ سلولی ناشی از استرس اکسیداتیو قرار می‌گیرند (۱۵). میتوکندری‌ها در سلول، هدف اصلی ROS می‌باشند و این ماده با صدمه به غشاء میتوکندری موجب مرگ نورون‌ها می‌گردد (۳ و ۱۲). بررسی‌های انجام شده برروی مغز بیماران پارکینسونی بعد از مرگ، نشان می‌دهد که تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد عامل پیشرفت این بیماری بوده است. آزمایشات انجام شده برروی سرم و مایع مغزی نخاعی بیماران پارکینسونی، میزان بالای استرس اکسیداتیورا تنها عامل مرگ سلولی در این بیماری معرفی کرده است (۱۴ و ۱۵). همچنین به‌دلیل غنی بودن سیستم عصبی مرکزی از لیپید، مصرف اکسیژن زیاد و سطح پایین آنزیم‌های آنتی اکسیدانت، سیستم عصبی مرکزی حساسیت بالایی نسبت‌به استرس اکسیداتیو دارد، به‌ویژه هیپوکمپ، جسم سیاه و جسم مخطط از حساس‌ترین بخش‌ها نسبت‌به استرس اکسیداتیو می‌باشند (۱۶ و ۱۷). فرآیندهای پلاستیسیتی در مغز می‌تواند به‌وسیله استرس اکسیداتیو تغییر کند که باعث صدمات اکسیداتیو، تخریب سیناپس‌ها، کاهش فرآیندهای پلاستیسیتی و تغییر شکل سلول‌های جدید شود (۱۸).

آنتی‌اکسیدانت‌ها نقش حفاظت سلول‌ها را در برابر اکسیدانت‌های بیماری‌زا دارند، که از این آنتی اکسیدانت‌ها می‌توان به سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز، سروپلاسمین، ویتامین E و C اشاره کرد (۱۹).

نورون‌های دوپامینرژیک درجسم سیاه عملکردهای مختلفی همچون یادگیری، فرآیندهای حافظه و کنترل حرکتی دارند، با تخریب نورون‌های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه و VTA به‌وسیله

Archive of SID
www.SID.ir

نوروتوکسین ۶- هیدروکسی دوپامین از طریق دو مکانیسم مهار کمپلکس I میتوکندری و ایجاد استرس اکسیداتیو می‌توان ورودی‌های دوپامینی هیپوکمپ را حذف کرد و حیوان مدل پارکینسونی با اختلال حافظه را به‌وجود آورد (۲۰ و ۲۱). روش‌های مختلفی برای ایجاد مدل پارکینسونی وجود دارد که از این روش‌ها می‌توان به‌روش ایجاد مدل از طریق سموم و مدل‌های ژنتیکی اشاره کرد. ایجاد مدل از طریق سموم قدیمی‌ترین روش برای ایجاد مدل پارکینسونی می‌باشد که باعث ایجاد تغییرات پاتولوژیکی و رفتاری در جوندگان و پریمات‌ها می‌شود. استفاده از سموم می‌تواند سیستمیک یا موضعی باشد که به نوع ماده توکسیک و گونه بستگی دارد. مدل پایه تزریق نوروتوکسین برای ایجاد مدل پارکینسونی تزریق موضعی ۶ هیدروکسی دوپامین می‌باشد که اولین مدل حیوانی پارکینسونی از این طریق به‌وجود آمده است. ۶ هیدروکسی دوپامین آنالوگ دوپامین هیدورکسیله می‌باشد که میل ترکیبی زیادی با دوپامین (ناقل توکسین به داخل نورون‌های دوپامینرژیک) دارد. ۱۲ ساعت پس از تزریق نوروتوکسین، مرگ سلولی در نورون‌های بخش متراکم جسم سیاه شروع شده و در طول ۳-۲ روز فقدان دوپامین مشاهده می‌شود. در این فرآیند سطح بسیار بالایی از مرگ سلولی در جسم سیاه و کاهش دوپامین مشاهده می‌شود (حدود ۱۰۰٪-۹۰٪). مکانیسم عملکرد این نوروتوکسین به خصوصیت پراکسیدانت آن بستگی دارد. ۶ هیدروکسی دوپامین ابتدا در سیتوسول تجمع یافته و سریعاً دچار اتواکسیداسیون شده و هیدروژن پراکسید تولید می‌شود. علاوه براین، نوروتوکسین در میتوکندری نیز تجمع یافته و از فعالیت کمپلکس I میتوکندری جلوگیری می‌کند (۲۲).

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از موش‌های صحرایی نر نژاد Wistar با وزن ۲۸۰-۲۲۰ گرمی استفاده شده است. حیوانات پس از خریداری و انتقال به حیوانخانه به‌مدت یک هفته جهت سازش با محیط جدید در شرایط استاندارد با درجه حرارت ۱۸-۲۲ درجه سانتی‌گراد، ۱۲ ساعت تاریکی ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شدند. آب و غذا آزادانه در اختیار حیوانات قرار گرفت. ۷ روز پس از آنکه حیوانات به شرایط حیوانخانه عادت کردند به دو گروه هفت تایی تقسیم شدند. گروه اول: شم که به آنها ۲ میکرولیتر نرمال سالین و با سرعت ۰/۳۳ میکرولیتر در دقیقه به صورت دو طرفه درنواحی SNc تزریق شد و به گروه دوم، نوروتوکسین-6 OHDA(هیدرو برومید - سیگما) به میزان ۶ میکروگرم در ۲ میکرولیتر نرمال سالین به‌صورت دو طرفه، در مناطق SNc تزریق شد.

موش‌ها با کتامین ۱۰۰۰mg/kg و زایلازین ۱۰۰mg/kg به‌صورت داخل صفاقی بیهوش شده و سر حیوان به کمک میله دهانی جلویی و میله‌های داخل گوشی در دستگاه استریوتاکس ثابت شد. مختصات محل تزریق باتوجه به اطلس Paxinos و Watson بر این اساس بود: ۵.۰- میلی‌متر از برگما، ۷.۷- میلی‌متر پشتی-شکمی و ۲/۱± میلی‌متر داخلی-خارجی (۲۰). پس از سوراخ کردن محل موردنظر به کمک دریل دندانپزشکی، ۶ میکروگرم نوروتوکسین 6-OHDA در ۲ میکرولیتر محلول نمکی ۰/۹ درصد حاوی ۰/۲mg/ml اسید اسکوربیک به‌صورت دو طرفه درون SNc با استفاده از سرنگ‌هامیلتون ۵۰ میکرولیتری که به پمپ تزریق نصب شده بود تزریق شد، سرعت تزریق ۰/۳۳ میکرولیتر در دقیقه بود. به‌منظور جلوگیری از بازگشت محلول به درون سرنگ و برای انتشار بهتر محلول در منطقه‌ی SNc، سرسوزن به‌مدت ۵ دقیقه پس از تزریق در جای خود باقی ماند. سپس سر موش‌های صحرایی بخیه شده، پس از اتمام عمل جراحی، حیوانات جراحی شده تا زمان به هوش آمدن به اطاقی با دمای مناسب انتقال یافته و پس ازبه هوش آمدن در قفس نگهداری شدند.

در این مطالعه برای بررسی حافظه موقعیت‌یابی فضایی از ماز آبی موریس استفاده شد. ماز آبی از یک استخر دایره‌ای شکل به قطر ۱۲۰cm و ارتفاع ۶۰cm تشکیل شده است. سکوی مخفی دروسط یکی از ربع‌های آن و ۱/۵ سانتی‌متر زیر سطح آب قرار دارد. دیوارها، کف استخر و سکو، به رنگ سیاه است. علائم خارجی بر دیوار اتاق نصب بوده و سقف اتاق مجهز به دوربین فیلم‌برداری است. به‌منظور ثبت داده‌ها و تجزیه و تحلیل اطلاعات، دوربین به رایانه‌ای مجهز به نرم‌افزار Ethovision متصل است که حرکات مختلف حیوان چون جابجا شدن، سرعت، چرخش سر و غیره به کمک نرم‌افزار ثبت می‌گردد.

آزمون فراگیری (Training) در روزهای ۹ تا ۱۲ بعد از جراحی روزانه چهار آزمون و در مجموع ۱۶ آزمون برای حیوانات هرگروه انجام شد. موش‌ها از هر چهار موقعیت به‌صورت تصادفی داخل آب رها شدند و به آنها اجازه داده شد که برای جستجوی سکوی مخفی به‌مدت ۶۰ ثانیه شنا کنند. اگر موش‌ها قادر به یافتن سکو پس از ۶۰ ثانیه نبودند به سمت سکو هدایت شده و به آنها اجازه داده می‌شد که ۲۰ ثانیه روی سکو بمانند.

۲۴ ساعت بعد از آخرین آموزش، آزمون پروب انجام شد و پارامترهای ارزیابی حافظه حیوان بررسی گردید. به این صورت که سکو از ماز خارج شده حیوان از ناحیه‌ای در وسط ربع هدف و ربع متضاد رها شده و به‌مدت ۶۰ ثانیه در آب شنا می‌کرد. زمان سپری شده (Escape latency) و کل مسیر طی شده (Distance traveled) برای رسیدن به سکوی مخفی و مدت زمانی که موش در منطقه‌ی هدف حرکت می‌کرد (Duration) به‌وسیله سیستم ثبت شد.

پس از پایان آزمون پروب، حیوانات بیهوش شده و سر آنها توسط گیوتین جدا و هیپوکمپ حیوان برای انجام سنجش آنزیمی خارج و داخل فریزر ۷۰- ذخیره و نگهداری شد.

Archive of SID
www.SID.ir

برای هموژن کردن از بافر Tris HCL ۵۰ میلی‌مولار با PH= ۸ استفاده شد. ۱۰۰ میکرولیتر بافر داخل میکروتیوب ۱/۵ mL که نمونه داخل آن قرار داشت ریخته شد و با هموژنایزر دستی به‌مدت ۵ دقیقه هموژن شد، سپس ۴۰۰ میکرولیتر بافر را داخل میکروتیوب ریخته و ۵ بار از داخل سرنگ عبور داده در نهایت سانتریفیوژ با rcf ۸۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. همچنین برای سنجش آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ابتدا مواد واکنش به این ترتیب آماده گردید: بافر تریس Tris HCL ۵۰ میلی‌مولار با PH=۸، EDTA ۵ میلی‌مولار (PH=۸)، EDTA (Triplex) (۰/۱ مولار)، متیونین (۱۴/۳ میلی مولار)، NBT (۸۲/۵ میکرومولار)، ریبوفلاوین (۲/۲ میکرومولار). پلیت ۹۶ خانه‌ای حاوی محلول‌های بالا به‌مدت ۱۰ دقیقه با فاصله ۳۰ سانتی‌متر از لامپ فلورسنت قرار داده و جذب در طول موج ۵۶۰nm بررسی شد. از طرفی واکنش تاریکی به‌عنوان بلانک استفاده شد. همچنین، واکنش روشنایی نیز انجام شد. یک واحد SOD (U) به‌عنوان مقداری از آنزیم که ۵۰ درصد مانع از احیاء NBT تحت شرایط سنجش می‌شود، تعیین شد. فعالیت GPx نیز با استفاده از Tert-butyl hydroperoxide به‌عنوان سوبسترا و مصرف NADPH در طول موج ۳۴۰nm، به‌مدت ۵ دقیقه اندازه‌گیری شد. ابتدا مواد واکنش به‌ترتیب زیر آماده گردید:

گلوتاتیون احیاء (۲۰ میلی مولار)، آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز (u/ml ۰/۱۵)، سدیم آزید (۴۰ میلی مولار)، تترابوتیل هیدروپراکسید (۵۰ میلی مولار)، بافر Tris HCL (۵۰ میلی مولار).

فعالیت GPx براساس میزان NADPH مصرفی می‌باشد؛ بنابراین یک واحد GPx به‌عنوان یک میکرومول از NADPH مصرف شده در دقیقه تعریف می‌شود و فعالیت اختصاصی به شکل تغییرات جذب در دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بیان می‌گردد.

فعالیت کاتالاز با ناپدید شدن H2o2 در 240nm سنجیده شد. یک واحد کاتالاز به‌عنوان یک میکرومول از H2o2 مصرف شده در دقیقه تعریف می‌گردد. محیط واکنش حاوی: H2o2 %0/1 تریتون X-100، بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار با PH=7 بود. آنالیز آماری با نرم‌افزار SPSS16 به تناسب نوع آزمایش از آنالیز واریانس یک طرفه، آزمون تی زوجی و Repeated Measure استفاده شد و آزمون تکمیلی با Tukey صورت گرفت.

نتایج

سه متغیر مهم زمان شنا کردن، مسافت شنا کردن و سرعت شنادر روزهای آموزش مورد ارزیابی قرار گرفت.

زمان شنا کردن: ابتدا میانگین مدت زمانی که حیوانات بعداز قرار داده شدن در آب خود را به سکو می‌رساندند، در هر گروه و در روزهای آموزش محاسبه شد. آزمون آماری تی زوجی بین روزهای اول و چهارم آموزش حاکی از وجود تفاوت معنی‌داری بین روزهای آموزش در هردو گروه بود (P<۰/۰۵). مقایسه بین گروهی زمان یافتن سکو در روزهای اول و دوم بین دو گروه، کاهش معنی‌داری را نشان نداد. زمان یافتن سکو در روز سوم، بین دو گروه آسیب و شم (P<۰/۰۵) و همچنین در روز چهارم بین گروه‌های آسیب و شم کاهش معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۵) (نمودار ۱).

مسافت طی شده برای یافتن سکو: یافته‌های مربوطبه مسافت طی شده با آزمون تی زوجی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بیان‌گر وجود اختلاف معنی‌دار بین جلسات اول و چهارم آموزش، در هردو گروه بود (P<۰/۰۵). مقایسه بین گروهی نشان داد که گروه آسیب در روز اول، دوم، سوم و چهارم از نظر مسافت طی شده برای یافتن سکو با گروه شم تفاوت معنی‌داری دارد (P<۰/۰۵) (نمودار ۲).

سرعت شنا: پس از قرارگیری حیوانات در داخل ماز، سرعت شنای حیوانات در گروه‌های مختلف در طی روزهای آموزش اندازه‌گیری شد. میانگین سرعت شنا در آزمون فراگیری نشان‌دهنده عدم‌وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی بود (نمودار ۳).

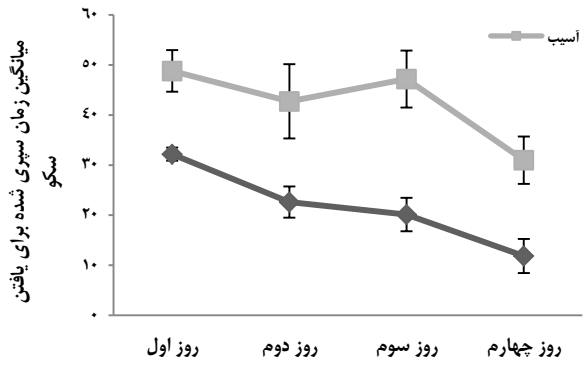
در کل نتایج آزمایش‌های روزهای آموزش نشان‌دهنده نقش آموزش بر فرآیند یادگیری حیوانات می‌باشد و اینکه همه موش‌ها قادر به یادگیری ماز بودند و با پیشروی آموزش زمان رسیدن به سکو و مسافت کل طی شده کاهش معنی‌داری یافته همچنین عدم‌وجود اختلاف معنی‌دار در سرعت شنا نشان‌دهنده عدم‌وجود اختلالات حرکتی در تمام گروه‌های آزمایشی بود.

در روز به‌خاطرآوری سه متغیر: ۱- کل مسافت طی شده ۲- سرعت شنای حیوان ۳- زمان رسیدن به سکو ۴- درصد زمان گذرانده شده در ناحیه هدف مورد ارزیابی قرار گرفت.

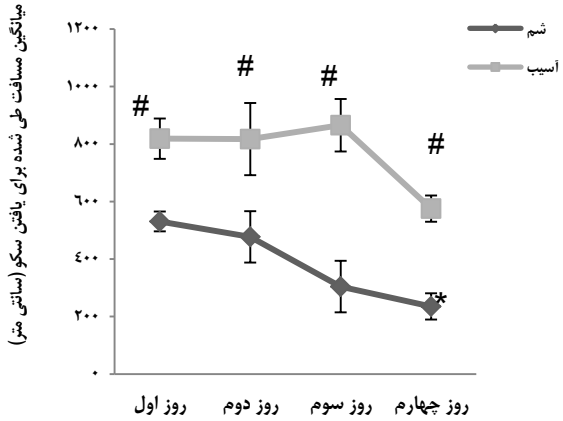
کل مسیر پیموده شده در آزمون به‌خاطرآوری: آنالیز واریانس یک طرفه برای کل مسافت طی شده در روز آزمون به‌خاطرآوری نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مختلف آزمایشی است (P=۰/۴۲۱)؛ بنابراین کارایی حرکتی موش‌ها در آزمون به‌خاطرآوری تفاوت معنی‌داری نداشته است (نمودار ۴ الف). این موضوع نشان می‌دهد که کارایی حرکتی حیوانات در آزمون به‌خاطرآوری تغییری پیدا نکرده است.

سرعت شنا: به‌منظور بررسی توانایی حرکتی آنها انجام شد. میانگین سرعت شنا کردن در آزمون به‌خاطرآوری در هیچکدام از گروه‌ها (P=۰/۳۳) اختلاف معنی‌داری نشان نداد که این نشان‌دهنده عدم‌اختلال در توانایی حرکتی حیوانات گروه‌های آزمایشی است (نمودار ۴ ب).

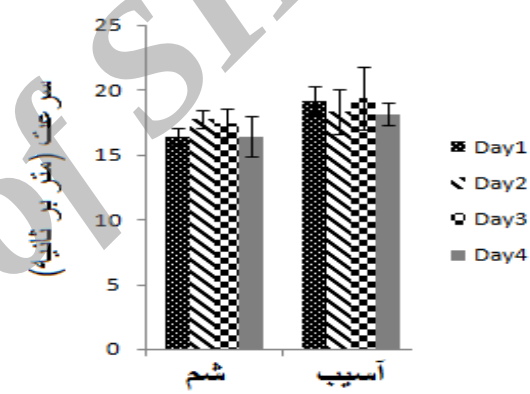
Archive of SID
www.SID.ir



نمودار ۱- مقایسه درون گروهی میانگین زمان سپری شده برای یافتن سکو در روزهای مختلف آزمون فراگیری



نمودار ۲- مقایسه میانگین مسافت طی شده برای یافتن سکو



نمودار ۳- میانگین سرعت شنا در آزمون فراگیری

زمان رسیدن به محل سکو: آنالیز واریانس یک طرفه حاکی از وجود تفاوت معنی‌دار بین دو گروه است (P=۰/۰۰۱). آنالیز تکمیلی توکی افزایش معنی‌داری در زمان رسیدن به محل سکو در گروه آسیب نسبت‌به گروه شم را نشان داد (P<۰/۰۰۱) (نمودار ۴ ج). کاهش زمان رسیدن به محل سکو نشان‌دهنده افزایش قدرت شناسایی محیط یا حافظه فضایی است.

درصد زمان حضور در ربع هدف: منظور از ربع هدف، ربعی از ماز آبی است که در روزهای آموزش سکو در آن ربع قرار داشت. آنالیز واریانس یک طرفه حاکی از وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها است (P=۰/۰۰۱). آزمون تکمیلی نشان داد که زمان طی شده در گروه آسیب نسبت‌به گروه شم کاهش معنی‌داری داشته است (P<۰/۰۰۲) (نمودار ۵). افزایش درصد زمان طی شده در ربع هدف نشان‌دهنده افزایش حافظه شناختی است.

بررسی‌های آنزیمی

۲- ۱ تغییرات آنزیم سوپراکسید دیسموتاز:

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گروه آسیب نسبت‌به گروه شم کاهش نشان می‌دهد و این کاهش معنی‌دار می‌باشد (نمودار۶).

۲-۲ تغییرات آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز

فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز نیز در گروه آسیب نسبت‌به گروه شم کاهش نشان می‌دهد امااین کاهش معنی‌دار نمی‌باشد (نمودار ۷).

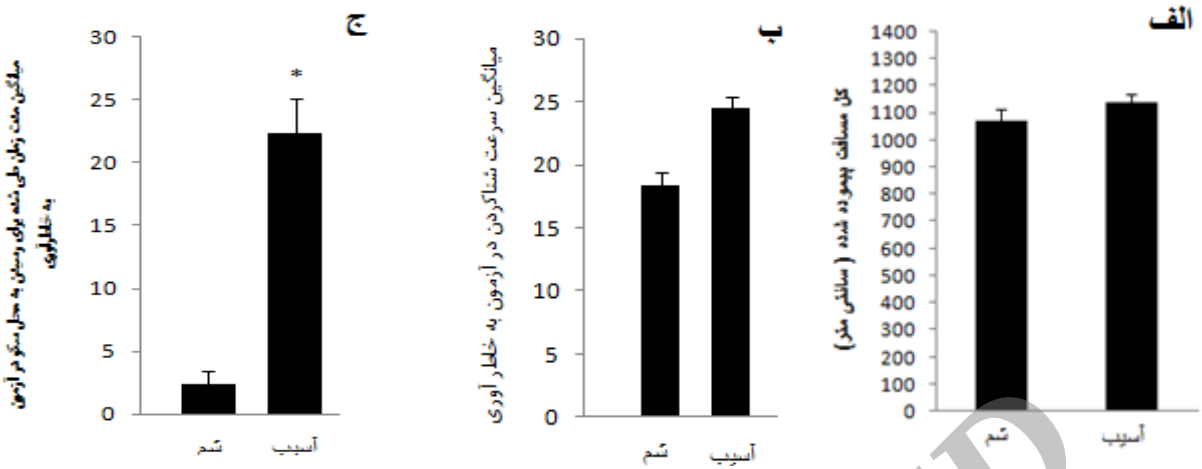
۲-۳ تغییرات آنزیم کاتالاز:

فعالیت آنزیم کاتالاز نیز در گروه آسیب نسبت‌به گروه شم کاهش نشان می‌دهد اما این کاهش معنی‌دار نمی‌باشد (نمودار ۸).

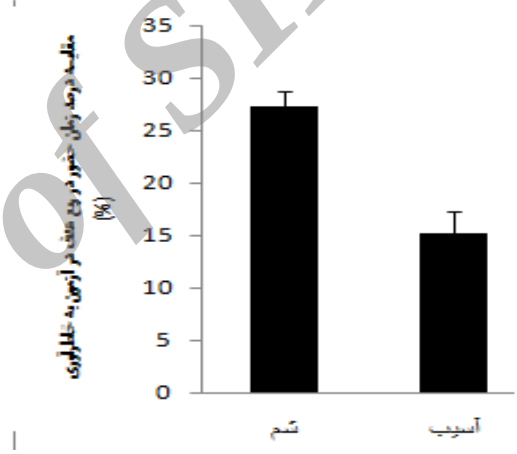
بحث

در این تحقیق باتوجه به اینکه هدف تخریب مسیر نیگرواستریاتال بوده، بنابراین از تزریق دوطرفه نوروتوکسین 6-OHDA به داخل بخش متراکم جسم سیاه استفاده شد. تحقیقات نشان داده در مواردی که از نوروتوکسین MPTP استفاده می‌شود سه هفته بعد از تزریق در حیوانات اختلال حافظه ظاهر می‌شود، درحالی‌که در تحقیق حاضر یک هفته پس از تزریق توانستیم اختلال حافظه مشابه با فاز اولیه پارکینسون را ایجاد کنیم (نمودارهای ۱، ۲، ۶ و ۷). تحقیقات نشان داده تزریق یک طرفه ۶-OHDA به بخش متراکم جسم سیاه باعث تخریب کامل نورون‌های دوپامینرژیک و کاهش شدید دوپامین گردیده و به‌دنبال آن حرکات مزاحم مانند رفتارهای چرخشی در حیوانات مدل پارکینسونی مشاهده می‌گردد که این علائم نشان‌دهنده مدل پیشرفته بیماری پارکینسون است که با اختلالات حرکتی همراه می‌باشد. چون‌ها در سال ۲۰۰۲ از تزریق دو طرفه نوروتوکسین MPTP به ناحیه‌ی جسم سیاه مغز میانی برای تهیه مدل پارکینسونی استفاده کرد. در این مدل ۷۰-۴۰ درصد سلول‌های TH+ بخش متراکم جسم سیاه کاهش یافته و میزان دوپامین درنواحی پشتی جسم مخطط و کورتکس پری فرونتال تا حدود ۵۰-۳۰ درصد کاهش پیدا کرده بود، بدون آنکه میزان دوپامین

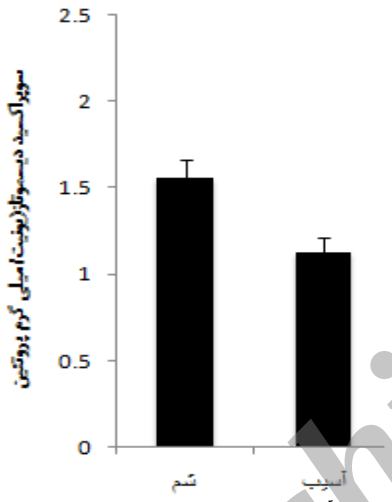
Archive of SID
www.SID.ir



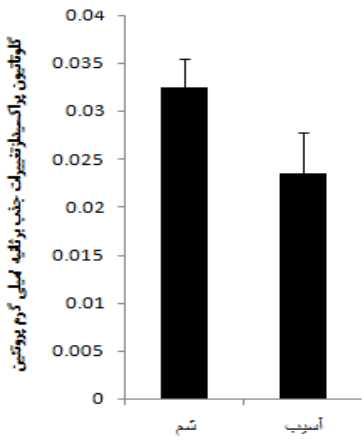
نمودار ٤- میانگین داده‌ها در آزمون به خاطرآوری، الف: مسافت پیموده شده. ب: سرعت شنا کردن. ج: مدت زمان طی شده برای رسیدن به محل سکو



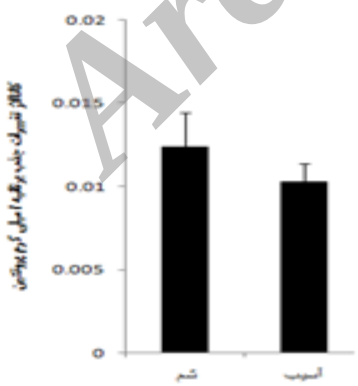
نمودار ٥- مقایسه درصد زمان حضور در ربع هدف در آزمون به‌خاطرآوری



نمودار ٦- تغییرات آنزیم سوپراکسید دیسموتاز



نمودار ٧- فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز



نمودار ٨- فعالیت آنزیم کاتالاز

Archive of SID
www.SID.ir

در هیپوکمپ، آمیگدال و بخش ونترال جسم مخطط تغییری کرده باشد (۷، ۲۳ و ۲۴).

برای تهیه فاز اولیه حیوان مدل پارکینسونی که با اختلال حافظه همراه باشد، بهترین شرایط زمانی است که کمتر از ۷۰ درصد نورون‌های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه تخریب شده باشند. بررسی‌ها نشان داده‌اند که در تزریق یک طرفه ۶-OHDA هرچه محل تزریق در نواحی پشتی‌تر و میانی بخش متراکم جسم سیاه باشد رفتارهای چرخشی در مدل ایجاد شده، دیده نخواهد شد (۱۸ و ۱۹). در این تحقیق که از تزریق دوطرفه ۶-OHDA استفاده شد هیچگونه رفتار چرخشی مشاهده نشد (نمودارهای ۳، ۴ و ۵). چنانچه Ferror در سال ۲۰۰۵ نیز گزارش کرد که در روش تزریق دوطرفه ۶-OHDA به بخش میانی SNC، میزان کاهش دوپامین در جسم مخطط کمتر شده و در نهایت هیچگونه رفتار چرخشی در حیوانات مشاهده نمی‌شود (۲۵). گزارشات زیادی مبنی بر ایجاد مدل‌های اختلال حافظه و یادگیری در موش‌های صحرایی با تزریق ۶-OHDA مشاهده شده است (۲۶-۲۸).

۶-هیدروکسی دوپامین نورون‌های کته کولامینرژیک را مورد هدف قرار داده و ساختاری شبیه به دوپامین و نوراپی نفرین دارد و مانند دوپامین رفتار کرده به‌طوری‌که از طریق ناقل‌های دوپامینی (DAT) از غشاء نورون‌ها عبور کرده و با سه مکانیسم تولید ROS، پراکسید هیدروژن و مهار زنجیره تنفسی میتوکندری از طریق مهار مستقیم کمپلکس‌های I و II در میتوکندری عمل کرده و باعث تخریب نورون‌های دوپامینرژیک می‌گردد. البته باتوجه به اینکه متابولیسم اکسیداتیو دوپامین در نورون‌های دوپامینرژیک SNc با تولید رادیکال آزاد همراه است این گروه از نورون‌ها در مقایسه با سایر نورون‌های مناطق دیگر مغز در مواجه با استرس اکسیداتیو آسیب‌پذیرترند (۱۲ و ۱۳).

دوپامین سنتز شده توسط عامل مونو آمین اکسیداز، اکسید شده یا توسط مکانیسم اتواکسیداسیون باعث تولید H2O2 در نورون می‌گردد، H2O2 تولید شده به‌صورت مستقیم یا غیرمستقیم باعث ایجاد رادیکال‌های هیدروکسیل در حضور آهن و در نهایت آسیب نورونی می‌گردد. یکی دیگر از عواملی که در آسیب‌پذیری نورون‌های دوپامینرژیک نقش دارد نور و ملانین می‌باشد که این ماده جایگاهی برای انباشته کردن و یا برداشت آهن در نورون‌ها فراهم می‌کند، آهن ایجاد استرس اکسیداتیو را در سلول فعال کرده و به‌دنبال آن لیپیدپراکسیداسیون و در نهایت منجر به مرگ سلولی می‌گردد (۲۹ و ۳۰).

باتوجه به اینکه هیپوکمپ نقش مهمی در حافظه، موقعیت‌یابی و جهت‌یابی دارد از آزمون MWM برای سنجش میزان حافظه و یادگیری حیوانات مورد آزمایش استفاده شد، این آزمون به‌عنوان بهترین روش برای تشخیص حافظه و یادگیری شناخته شده است (۳۰ و ۳۱). آنالیز آماری نتایج MWM مربوطبه پارامترهای مسافت طی شده برای یافتن سکو و سرعت شنا، در روزهای آموزش و روز به‌خاطرآوری، اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های آسیب و شم را نشان نداد؛ بنابراین مدل به‌دست آمده مدل مناسبی بود که اختلال حرکتی بیماری پارکینسون را نشان نمی‌داد، همچنین افزایش معنی‌داری در زمان رسیدن به سکو، در گروه آسیب نسبت‌به گروه شم مشاهده شد (نمودار ۶)؛ بنابراین این مدل، تنها اختلال حافظه پارکینسونی بدون اختلال حرکتی را نشان می‌دهد که از مزیت‌های این تحقیق است.

در مدل ماز آبی موریس از ویژگی‌های مدت زمان لازم و مسافت طی شده برای رسیدن به سکوی پنهان در طی روزهای آموزش به‌عنوان شاخص‌های یادگیری فضایی استفاده شد. بر این اساس چنانچه حیوانات آزمایشگاهی در روز آخر آموزش نسبت‌به روز اول بتوانند سکوی پنهان در آب را در مدت زمان کمتر و طی مسافت کمتری پیدا کنند، روند یادگیری فضایی در آنها مثبت ارزیابی می‌شود (۳۲).

نتایج روزهای آموزش نشان داد که حیوانات تمام گروه‌ها قادر به یادگیری مدل ماز آبی موریس بودند. به‌طوری‌که مسافت طی شده و مدت زمان رسیدن به سکو از روز اول تا چهارم کاهش معنی‌داری را در تمام گروه‌ها نشان داد (نمودار ۱).

مقایسه مسافت طی شده در روز آزمون به‌خاطرآوری نشان‌دهنده عدم‌تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها بود. حیوانات به‌مدت یک دقیقه داخل ماز قرار می‌گرفتند و به‌علت عدم‌وجود اختلال حرکتی، تفاوت معنی‌داری بین گروه آسیب و شم مشاهده نشد؛ بنابراین حیوانات تمام گروه‌ها مسافت تقریباً یکسانی را در آزمون به‌خاطرآوری طی کردند (نمودار ۴ الف).

مقایسه زمان رسیدن به سکو بین گروه‌ها نشان داد که گروه آسیب نسبت‌به گروه شم افزایش معنی‌داری داشته است. به این معنی که تزریق 6-OHDA منجر به ایجاد اختلال حافظه و در واقع اختلال در پیدا کردن جایگاه فرضی سکو شده است (نمودار ۴ ج).

حیوانات گروه آسیب مدت زمان کمتری در ربع هدف در مقایسه با گروه شم سپری کردند. کاهش این مدت نشان‌دهنده اختلال حافظه در پیدا کردن جایگاه فضایی مربوطبه سکو است (نمودار ۵).

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت نیز در گروه آسیب نسبت‌به گروه شم مشاهده می‌شود اما این کاهش فعالیت آنزیم فقط در آنزیم سوپراکسیددیسموتاز مشاهده شد که این کاهش فعالیت نشان می‌دهد که استرس اکسیداتیو در گروه آسیب به‌وجود آمده است (نمودارهای ۶، ۷ و ۸).

Archive of SID
www.SID.ir

با ایجاد این مدل می‌توان حتی قبل از شروع اختلالات حرکتی که برای فرد بیمار مشکل‌ساز است بسیاری از روش‌های درمانی پروتکتیو را آزمایش کرد و بهترین روشی را که بتواند علائم بیماری را کاهش دهد انتخاب کرد. همچنین با ایجاد مدل مناسب بیماری پارکینسون در موش‌های صحرایی می‌توان عوامل نوروپروتکتیو و استراتژی‌هایی که برای درمان این بیماری مناسب‌تر هستند را شناخت و آزمایش کرد.

References

1. Kozina EA, Khaindrava VG, Kudrin VS, Kucherianu VG, Klodt PD, Bocharov EV, et al. Experimental modeling of functional deficiency of the nigrostriatal dopaminergic system in mice. Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova 2010;96(3):270-82.
2. Martig AK, Mizumori SJ. Ventral tegmental area and substantia nigra neural correlates of spatial learning. Learn Mem 2011;18(4):260-71.
3. Pienaar IS, Chinnery PF. Existing and emerging mitochondrial-targeting therapies for altering Parkinson's disease severity and progression. Pharmacology & Therapeutics 2013;137:1-21.
4. Docherty MJ, Burn DJ. Parkinson's disease dementia. Curr Neurol Neurosci Rep 2010;10:292-298.
5. Tansey MG, Goldberg MS. Neuroinflammation in parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. Neurobiol Dis 2010;37(3):510-8.
6. Hansen N, Manahan-Vaughan D. Dopamine D1/D5 receptors mediate informational saliency that promotes persistent hippocampal long-term plasticity. Cereb Cortex 2012;18(4):260-71.
7. Da Cunha C, Angelucci ME, Canteras NS, Wonnacott S, Takahashi RN. The lesion of the rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons as a model for Parkinson's disease memory disabilities. Cell Mol Neurobiol 2002;22(3):227-37.
8. Ingrid Bethus, Tse D, Morris R. Dopamine and memory: modulation of the persistence of memory for novel hippocampal NMDA receptor-dependent paired associates. The Journal of Neuroscience 2010;30(5):1610-18.
9. HamiltonTJ, Wheatley BM, Sinclair DB, BachmannM, Larkum ME. Dopamine modulates synaptic plasticity in dendrites of rat and human dentate granule cells. PNAS 2010;107(42):18185-190.
10. Nai Q, Li S, Wang SH, Liu J, Lee F, Frankland P. Uncoupling the D1–N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor complex promotes NMDA-dependent long-term potentiation and working memory. Biol Psychiatry 2010;67(3):246-54.
11. Elbaz A, Moisan F. Parkinson's disease: Is there a strong environmental contribution? Rev Neurol (Paris) 2010;166(10):757-63.
12. Rivas-Arancibia S, Guevara-Guzmán R, Lopez-Vidal Y, Rodríguez-Martínez E, Zanardo-Gomes M, Angoa-Perez M, et al. Oxidativestress caused by ozone exposure induces loss of brain repair in the hippocampus of adult rats. Toxicol Sci 2010;113(1):187-97.
13. Santiago-Lopez D, Bautista-Martínez JA, Reyes-Hernandez CI, Aguilar-Martínez M, Rivas-Arancibia S. Oxidative stress, progressive damage in the substantia nigra and plasma dopamine oxidation, in rats chronically exposed to ozone. Toxicol Lett 2010;197(3):193-200.
14. Wirdefeldt K, Adami HO, Cole P, Trichopoulos D, Mandel J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. Eur J Epidemiol 2011;26:1-58.
15. Zhuang X, Mazzoni P, Kang UJ. The role of neuroplasticity in dopaminergic therapy for Parkinson disease. Nat Rev Neurol 2013; 9(5):248-56.
16. Suzuki K, Okada K, Wakuda T, Shinmura C, Kameno Y, Iwata K, et al. Destruction of dopaminergic neurons in the midbrain by 6-hydroxydopamine decreases hippocampal cell proliferation in rats: reversal by fluoxetine. PLoS One 2010;5(2):e9260.
17. Sriraksa N, Wattanathorn J, Muchimapura S, Tiamkao S, Brown K, Chaisiwamongkol K. Cognitive-enhancing effect of quercetin in a rat model of parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamin. Evid Based Complement Alternat Med 2012;28:1-9.
18. Redgrave P, Mitchell I. Functional validation of projection topography in the nigrostriatal dopamine system. Neuroscience 1982;7(4):885-94.
19. Pezze M, Bast T. Dopaminergic modulation of hippocampus-dependent learning: blockade of hippocampal D1-class receptors during learning impairs 1-trial place memory at a 30-min retention delay. Neuropharmacology 2012;63(4):710-8.
20. Ferro MM, Bellissimo MI, Anselmo-Franci JA, Angellucci ME, Canteras NS. Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: histological, neurochemical, motor and memory alterations. J Neurosci Methods 2005;148(1):78-87.
21. Mura A, Feldon J. Spatial learning in rats is impaired after degeneration of the nigrostriatal dopaminergic system. Mov Disord 2003;18(8):860-71.
22. Gasbarri A, Sulli A, Innocenzi R, Pacitti C, Brioni JD. Spatial memory impairment induced by lesion of the mesohippocampal dopaminergic system in the rat. Neuroscience 1996;74(4):1037-44.
23. Park JH, Enikolopov G. Transient elevation of adult hippocampal neurogenesis after dopamine depletion. Exp Neurol 2010;222(2):267-76.
24. Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. Ann Neurol 2003; 53(3):26-36.
25. D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the morris water maze in the study of learning and memory. Brain Res Brain Res Rev 2001; 36(1):60-90.
26. Mahmoudi A, Hosseini-Sharifabad A, Monsef-Esfahani HR, Yazdinejad AR, Khanavi M, Roghani A, et al. Evaluation of systemic administration of Boswellia papyriferaextracts on spatial memory retention in male rats. J Nat Med 2011;65:519-525.
27. McNamara RK, Skelton RW. The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the Morris water maze. Brain Res Brain Res Rev1993;18(1):33-49.
28. Costa C, Sgobio C, Siliquini S, Tozzi A, Tantucci M, Ghiglieri V, et al. Mechanisms underlying the impairment of hippocampal long-term potentiation and memory in experimental Parkinson's disease. Brain 2012;135(6):1884-99.
29. Miyazaki I, Asanuma M. Dopaminergic neuron-specific oxidative stress caused by dopamine itself. Acta Med Okayama 2008;62(3):141-50.
30. He AY, Qiu LJ, Gao Y, Zhu Y, Xu ZW, Xu JM. The role of oxidative stress in neuromelanin synthesis in PC12 cells. Neuroscience 2011;189:43-50.
31. Bromley-Brits K, Deng Y, Song W. Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice. J Vis Exp 2011;20(4):53-62.
32. Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. Nat Protoc 2006;1(2):848-58.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Knowledge & Health 2015; Vol 9, No 4
Shahroud University of Medical Sciences

DOI: 10.1234/knh.v0i0.411
Original Article

Bilaterl Substantia Nigra Pars Compacta-Lesioned as a Model for Memory Impairment of Parkinson's Disease in Rats

Rasoul Arashpour (M.Sc.)[1], Mohammad Taghi Ghorbanian (Ph.D.)[2], Maryam Haji Ghasem Kashani (Ph.D.)[2*], Taghi Lashkar bolouki (Ph.D.)[2], Mahdieh Tamadoni (M.Sc.)[1]

1- Dept. of Biology, School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran.
2- Dept. of Biology, School of Biology and Institute of Life Sciences, Damghan University, Damghan, Iran.

Received: 4 April 2013**, Accepted:** 18 February 2014

Abstract:

Introduction: *Long ago, only the movement disorder of Parkinson's disease (PD) was considered by researchers, but non-motor symptoms such as cognitive and memory disorder precedes the clinical symptoms. In the present study, a 6-hydroxydopamine (6-OHDA) rat memory impairment model of PD was used to investigate in vivo production of oxidative stress and memory disorder.*

Methods: *6-OHDA (6µg/2µl of saline) was bilaterally injected in the substantia nigra pars compacta (SNC). The sham-operated rats were injected with saline. Spatial memory was evaluated in morris water maze (MWM). 6 days after neurosurgery the rats were killed and hippocampal tissues were separated on an ice-cold surface. Analysis of superoxid dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) and catalase (CAT) activity were performed.*

Results: *There was no significant difference in total traveled distance between groups therefore, injured animals had no problem in movement. There was also a significant increase in the escape latency in lesioned group as compared to the sham (P<0.000). The time spent in quadrant target zone of injured rats was significantly shorter than sham rats (P<0.002). One way ANOVA analyses showed a significant reduction in SOD antioxidant activity in the hippocampus of injured rats as compared to sham (P<0.05). Moreover this reduction was not significant in GPX and CAT enzymes.*

Conclusion: *Bilaterl substantia nigra pars compacta-lesioned as a model in early phase of Parkinson's disease would allow us to test new neuroprotective agents and treatment strategies.*

Keywords: Parkinson's disease, 6-Hydroxydopamine, Substantia nigra, Antioxidative enzymes, Memory.

Conflict of Interest: No

***Corresponding author:** M. Haji Ghasem Kashani**, Email:** Kashani@du.ac.ir*

Citation: Arashpour R, Ghorbanian MT, Haji Ghasem Kashani Ma, Lashkar bolouki T, Tamadoni M. Bilaterl substantia nigra pars compacta-lesioned as a model for memory impairment of Parkinson's disease in rats. Journal of Knowledge & Health 2015;9(4):8-16.

Archive of SID
www.SID.ir