

## بررسی آثار کرسستین بر تغییرات 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 تأثیر حفاظتی داروی کرسستین بر تغییرات رفتاری و بافتی سیستم نیگرواستریاتال در مدل آزمایشی بیماری پارکینسون در موش صحرائی بالغ.

**مواد و روشها:** پژوهش حاضر روی ۸۰ سر موش صحرائی نر نژاد Wistar با وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم انجام شد. با تزریق ۱۲/۵ میکروگرم نوروتوکسین (۶- هیدروکسی دوپامین) در داخل استریاتال مدل آزمایشی بیماری پارکینسون ساخته شد. یک ساعت قبل از عمل توسط کرسستین (۲۰ mg) به فرم داخل صفاقی پیش درمان شده و درمان آنها (بعد از عمل جراحی) با دو دوز مختلف ۲۰ mg/kg و ۱۰ mg/kg کرسستین یک بار در روز به مدت یک ماه ادامه یافت. چرخش القا شده به دنبال تجویز آگونیست آپومرفین طی هفته پنجم پس از جراحی به عنوان شاخص میزان کارایی درمان با کرسستین 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، در حالی 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 ۲۰ mg/kg و ۱۰ mg/kg نسبت به هم هیچگونه تفاوت معنی داری را نشان نداد. در بررسی شمارش تعداد نوروئهای 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. در حالی که در گروه‌های تخریب ( $p < 0/001$ ) و درمان‌های ۲۰ mg/kg و ۱۰ mg/kg ( $p < 0/01$ ) 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 کرسستین در درمان حفاظتی فرم اولیه بیماری پارکینسون در یک معیار کمی مؤثر بوده و می‌تواند سبب افزایش طول عمر نوروئهای دوپامینرژیک نیگرا شود.

**کلیدواژه‌ها:** بیماری پارکینسون، آنتی اکسیدانت، ۶- هیدروکسی دوپامین، کرسستین

## مقدمه

نئواستریاتوم نقش مهمی در تنظیم اعمال حرکتی بدن به عهده دارد و یکی از آورانهای اصلی آن سیستم دوپامنژیک نیگرواستریاتال است که ۱۵-۱۰ درصد پایانه‌های موجود در نئواستریاتوم را تشکیل داده و آسیب آن اثر بارزی در اعمال حرکتی بدن بجا می‌گذارد [۱]. بیماری پارکینسون یک اختلال نورودژنراتیو در انسان است که با تخریب تدریجی و وسیع نورونهای دوپامنژیک 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 به واسطه 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 [۴]. در بررسیهای انجام شده به این نتیجه دست یافتند که آنتی اکسیدانهای اندروژن و یا تأمین شده از خارج می‌توانند در پیشگیری یا به تأخیر انداختن بیماری مؤثر باشند [۵]. کرسیتین جزئی از ترکیبات فلاونوئید (پلی فنولیک) است که در گیاهان و منابع غذایی گیاهی فراوان یافت می‌شود [۶]. فلاونوئیدها باعث ایجاد سه مکانیسم محافظتی می‌شوند که عبارتند از: ۱- افزایش Glotation در نتیجه کاهش تجمع ROS ۲- پایین آوردن سطح ROS ۳- جلوگیری از جریان  $Ca^{2+}$  علی‌رغم بالا بودن سطح ROS [۷].

در بین همه فلاونوئیدهای موجود درصد فراوانی کرسیتین از همه بیشتر می‌باشد [۸]. کرسیتین 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 کننده (Low Desity Lipoprotein) LDL احتمالاً بوسیله اکسیداسیون خودش و یا از طریق ممانعت از اکسیداسیون ویتامین E موجود در LDL انجام می‌شود [۱۱]. با در نظر گرفتن مطالب فوق در تحقیق حاضر آثار تجویز مکرر کرسیتین 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 علائم اولیه پارکینسون را نشان نمی‌دهند 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 ۶ گروه زیر تقسیم شدند.

۱- کنترل (Control)

۲- شاهد (sham operated, SH)

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

۴- تخریب (Lesion, L)

۵- تخریب پیش درمان شده با کرسیتین با دوز ۱۰ mg/kg (Quercetin pretreated Lesion group L+C)

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

حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی ۱۲ ساعت روشنایی و

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

گروه دیگر پیش درمان شده با کرسستین (L+Q) علاوه بر 6-OHDA در سالین اسکوربات ۰/۹ درصد به میزان ۲۰ mg/kg کرسستین یک ساعت قبل از عمل جراحی و همچنین یک بار در روز بعد از عمل به میزان ۲۰ mg/kg با همان جدول زمانی گروه SH+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 میکرو لیتر 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 به دست آمده شفاف است و می توان آن را تا زمان استفاده در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری کرد. چنانچه نوروتوکسین خراب شده باشد پس از حل شدن رنگ محلول متمایل به قرمز می شود. غلظت محلول به دست آمد  $\mu\text{g}$  /  $\mu\text{l}$  ۲/۵ است.

### روش ارزیابی رفتاری

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

دما ۲۲ درجه سانتی گراد نگهداری شده، به آب آشامیدنی 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 (۱۰۰ mg/kg) و گزیلازین (۵ mg/kg) به صورت 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 لبه های 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 - خلفی ۳ - میلی متر جانبی و ۴/۵ میلی متر شکمی (از سطح دورامتر) مطابق اطلس پاکسینوس (Paxinos & Watson) تعیین شد. همچنین میله دندان استریوتاکس ۳/۳ میلی متر زیر سطح افق تنظیم شده بود [۱۳ و ۱۲]. پس از پیدا کردن نقطه مورد نظر روی جمجمه و سوراخ کردن آن با مته؛ تزریق نوروتوکسین توسط سرنگهایمیلون ۱۰ میکرو لیتری انجام گرفت. از این طریق به داخل جسم مخطط سمت چپ هر حیوان ۵ میکرو لیتر از محلول سالین ۰/۹ درصد که حاوی ۲/۵ میکرو لیتر نوروتوکسین 6-OHDA و اسید اسکوربیک ۰/۲ درصد بود تزریق شد.

گروه SH+Q علاوه بر محلول سالین اسکوربات، کرسستین (Quercetin) حل شده در نرمال سالین ۰/۹ درصد و DMSO (Dimethyl Sulfoxide) به میزان ۲۰ mg/kg را به فرم داخل صفاقی (IT) [۱۴] یک ساعت قبل از عمل جراحی و یک بار در روز به میزان ۲۰ mg در فواصل زمانی ثابت به مدت یکماه دریافت نمود.

به حیوانات گروه تخریب (L) ۵ میکرو لیتر از محلول نرمال سالین ۰/۹ درصد حاوی ۲/۵ mg/kg از نوروتوکسین 6-OHDA

## یافته‌ها

برای ارزیابی توان حفاظتی کرسستین روی نورونها، رفتار چرخشی حیوان (تعداد دفعات چرخشی در طی یکساعت) به دنبال تزریق داخل صفاقی آپومورفین هیدروکلراید (آگونست دوپامینرژیک) 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 کرسستین بر تعداد دفعات چرخشی القا شده به دنبال 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 sham ۱ (کنترل مثبت یک) به عنوان نمونه‌هایی که تمام عملیات جراحی روی آنها انجام شد و به جای نوروتوکسین 6-OHDA محلول سالین اسکوربات تزریق شده و گروه sham 2 (گروه کنترل مثبت دو) بعد از تزریق سالین اسکوربات به مدت یک ماه تحت دوز ۱۰ mg/kg کرسستین قرار گرفته است؛ بین این سه گروه از نظر رفتاری هیچ‌گونه اختلاف معنی دار دیده نشده است (نمودار ۲).

با انجام آنالیز آماری 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 کرسستین ۱۰ و 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

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 (۳۶۰ درجه) آنها به مدت یکساعت توسط شمارش گر دستی شمارش شد.

تعداد چرخش کونترالترال (چرخش به سمت راست) برای آپومورفین هیدروکلراید به عنوان عدد مثبت و چرخش اپسی لترال (چرخش به سمت چپ) به عنوان عدد منفی در نظر گرفته شد. تعداد خالص چرخش به صورت تفاضل چرخشها در دو جهت بیان گردید [۱۶].

## شمارش نورون SNC (ارزیابی کمی)

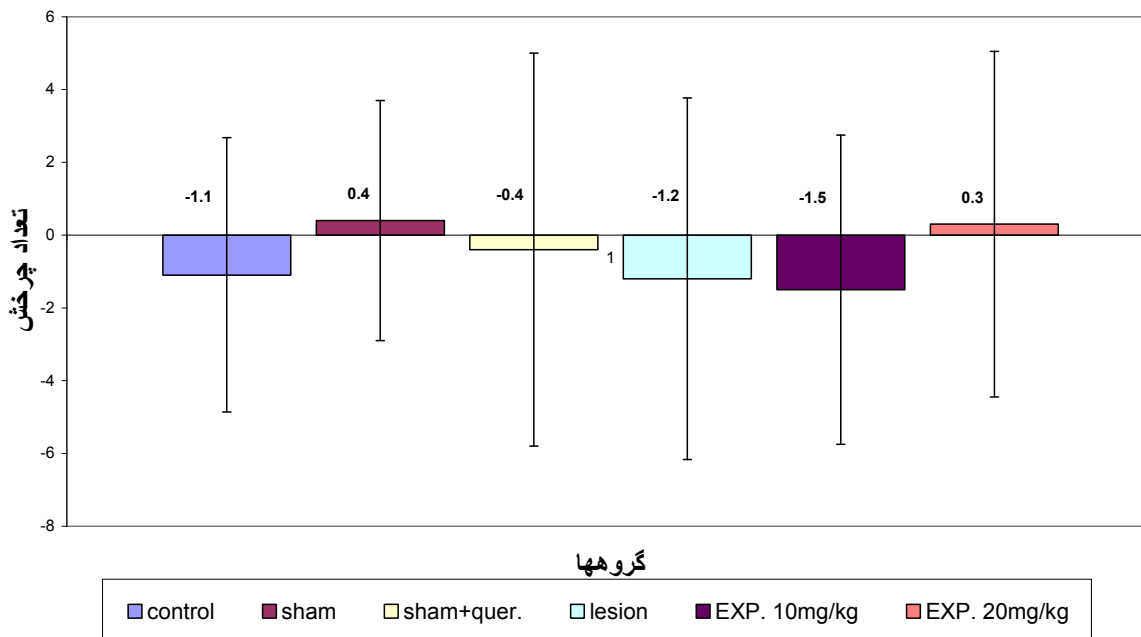
مطالعات میکروسکوپی در مورد کلیه نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ Zeiss انجام شد. در مورد هر حیوان برشهای مغز میانی (mm Interaural ۲/۴ - ۲/۹) طبق روش بیان شده توسط Blandini و همکاران بررسی شدند [۴]. شمارش نورونهای واقع در بخش متراکم جسم سیاه substantia nigra Pars Compacta (SNC) در برشهای منطبق با چهار سطح ۲/۹، ۳/۲، ۳/۸، ۴/۲ اطلس پاکسینوس (Paxinos) نسبت به مرکز خط بین دو گوش انجام گرفت. (میکروسکوپ ۴۰۰×) شمارش نورونی به صورت یک سوکور انجام شد.

## روشهای آماری

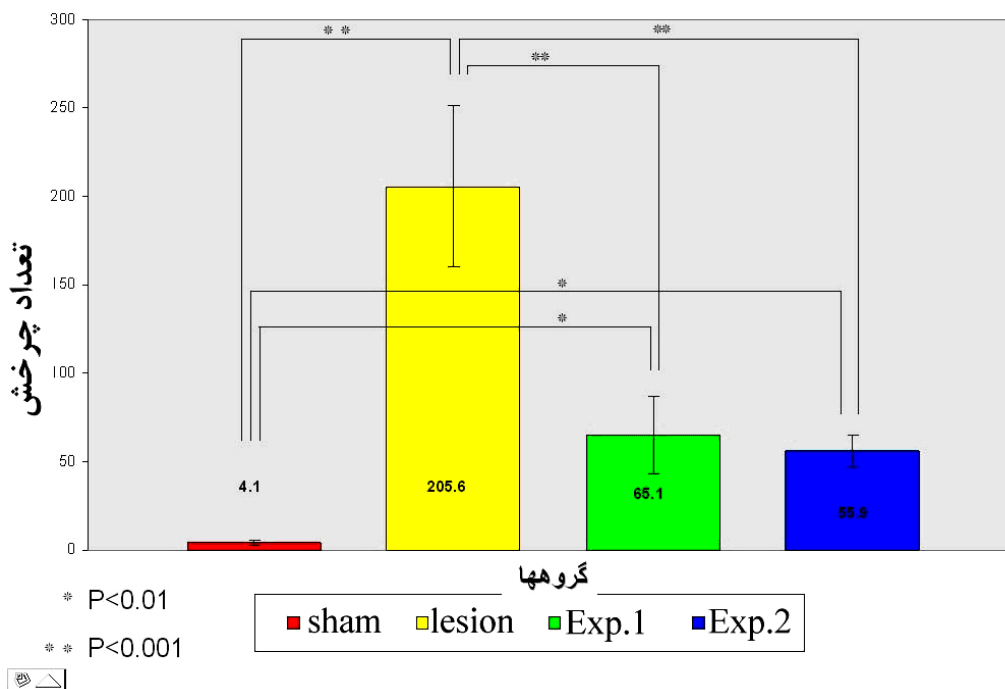
نتایج حاصل از بررسی رفتار چرخشی القا شده توسط داروی آپومورفین در دو دوره بررسی یک هفته قبل و پنج هفته پس از جراحی از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) و در مورد تغییرات رفتار چرخشی طی هفته پنجم در هر گروه نسبت به قبل از جراحی از آزمون Paired-t-Test برای مقایسه استفاده شد.

تعداد دفعات چرخش نشان داد ( $p < 0.01$ ). با مقایسه دو گروه تحت درمان ۱۰ و ۲۰ mg/kg نسبت به هم هیچ گونه تفاوت معنی دار آماری مشاهده نشد (نمودار ۲-۳).

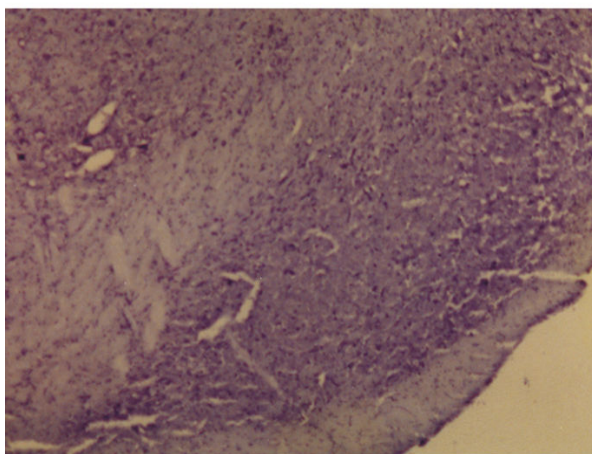
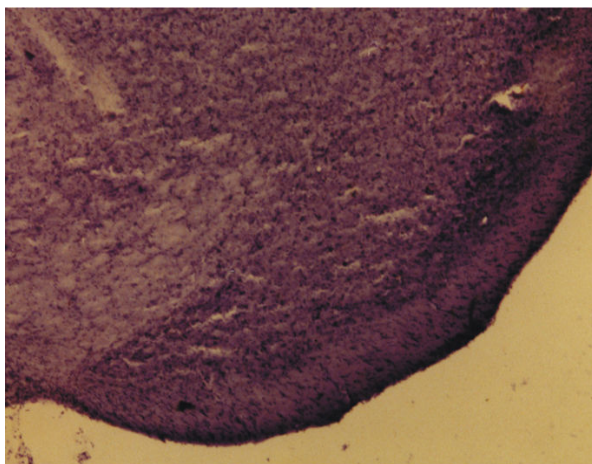
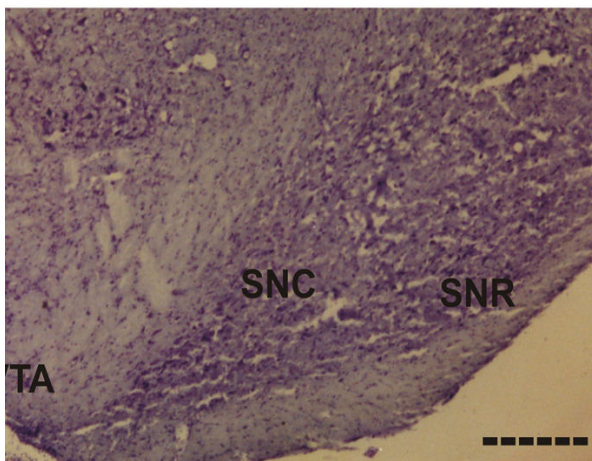
موشهای گروه تخریب ( $p < 0.001$ ) می شود درحالی که چرخش در مورد گروه های درمان بسیار کمتر ( $p < 0.01$ ) بود. در مقایسه با گروه تخریب، گروه های درمان کاهش معنی داری را در



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



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



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: Substantia nigra pars compact  
SNR: Substantia nigra pars reticulata

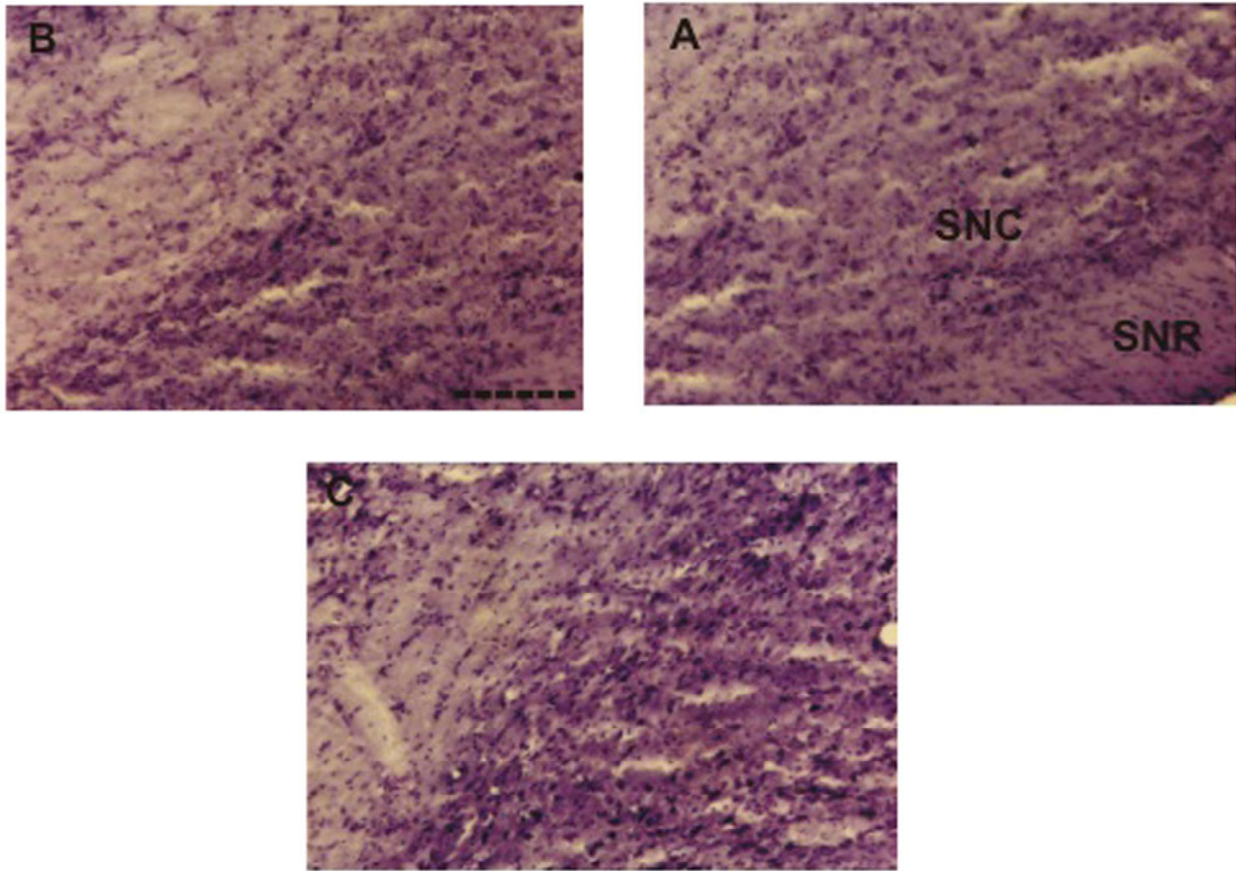
### بررسی بافتی (شمارش نورونی)

در این بخش آثار دو دوز داروی کرسنتین بر تعداد نورونهای بخش متراکم جسم سیاه در هر ۴ گروه شاهد، تخریب و گروه‌های درمانی ۱۰ و ۲۰ mg/kg بررسی شد (شکل‌های ۱ و ۲).

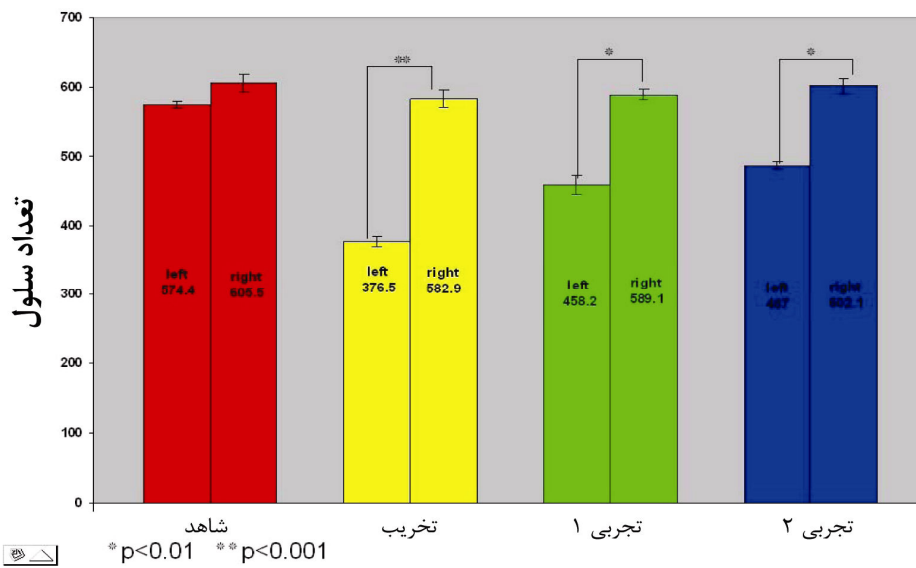
بررسیهای آماری هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین دو طرف راست و چپ SNC، در گروه شاهد نشان نداد. در حالی که در طرف چپ گروه‌های تخریب ( $p < 0.001$ ) و درمانهای ۱۰ و ۲۰ mg/kg، کاهش معنی‌داری را در مقایسه با طرف راست نشان داد (نمودار ۳).

نتایج بررسی در مورد تعداد متوسط نورونها در طرف چپ SNC (همطرف با تخریب استریاتوم)؛ در گروه تخریب در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری 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 معنی‌داری از نظر آماری ( $p < 0.01$ ) نشان داد (نمودار ۴).

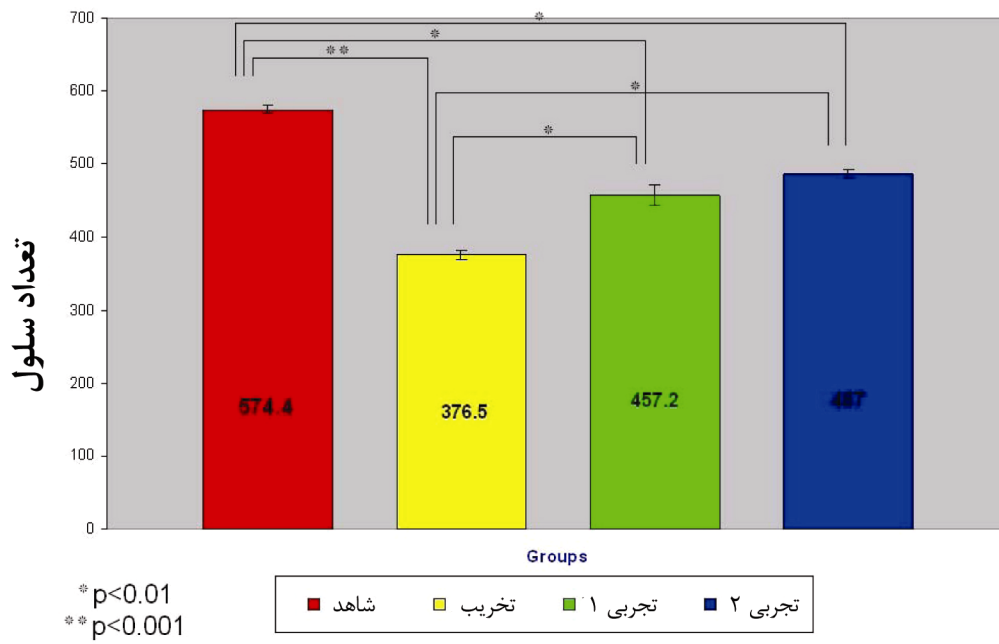
همانگونه که در نمودارهای (۵ تا ۸) مشاهده می‌شود با مقایسه میانگین تعداد نورونها در طرف چپ SNC در کل چهار سطح مشخص می‌شود که کاهش تعداد نورونها در تمامی سطوح گروه تخریب در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری ( $p < 0.001$ ) نشان داد. همچنین در مقایسه گروه تخریب با دو گروه درمان نیز تفاوت معنی‌داری ( $p < 0.01$ ) دیده شد. با توجه به نمودارهای (۶ و ۷) مشاهده شد که گروه‌های درمان در سطوح ۳/۲ و ۳/۸ دارای تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نبودند. اما با توجه به نمودارهای (۵ و ۸) هر دو گروه درمان با گروه شاهد در سطوح ۲/۹ و ۴/۲ دارای تفاوت معنی‌داری ( $p < 0.01$ ) بود. همچنین با توجه به نمودارهای چهار سطح بررسی شده، با مقایسه گروه‌های درمان نسبت به همدیگر هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری آماری مشاهده نشد.



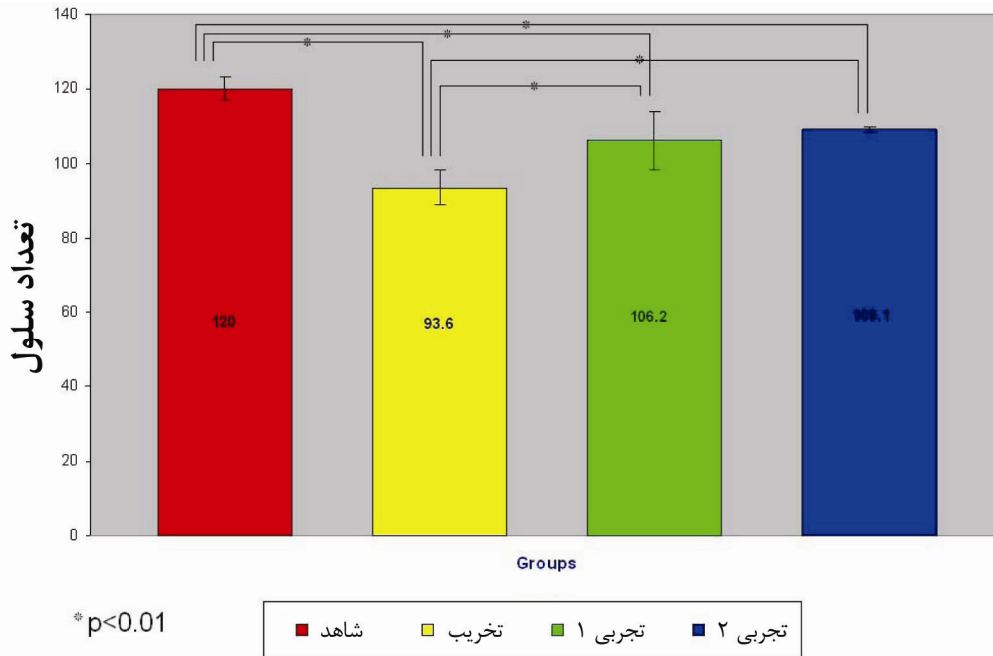
شکل ۲. اشکال ناحیه جسم سیاه را به ترتیب در گروه تخریب و درمانهای ۱۰ mg/kg و ۲۰ نشان می‌دهد. خط مقیاس ۴۵۰ میکرومتر.  
SNC: Substantia nigra pars compact



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

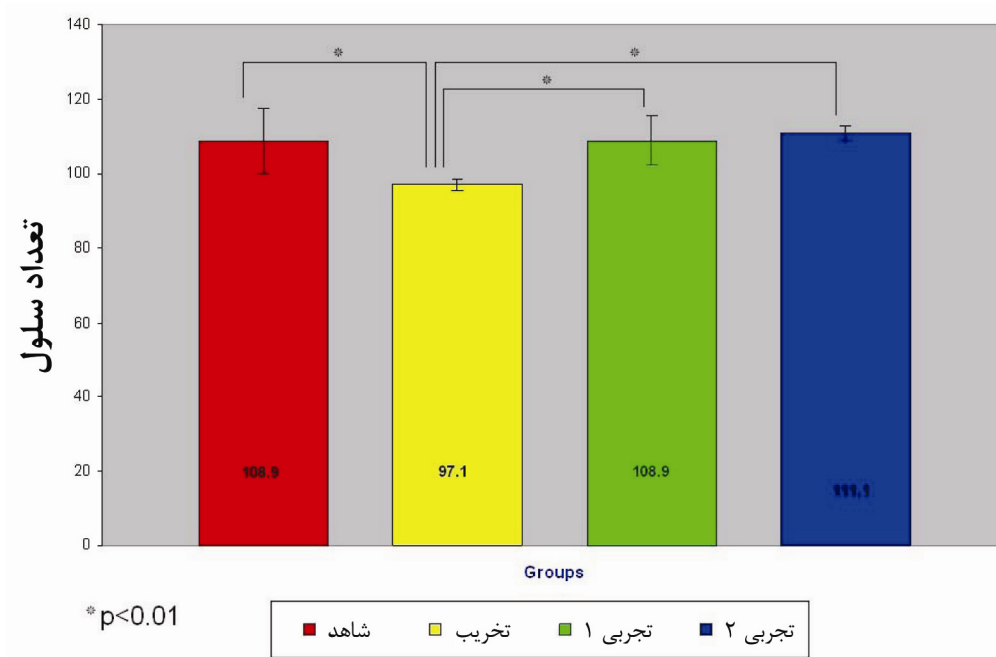


نمودار ۴. مقایسه میانگین سلولهای جسم سیاه چهار سطح در طرف چپ در چهار گروه

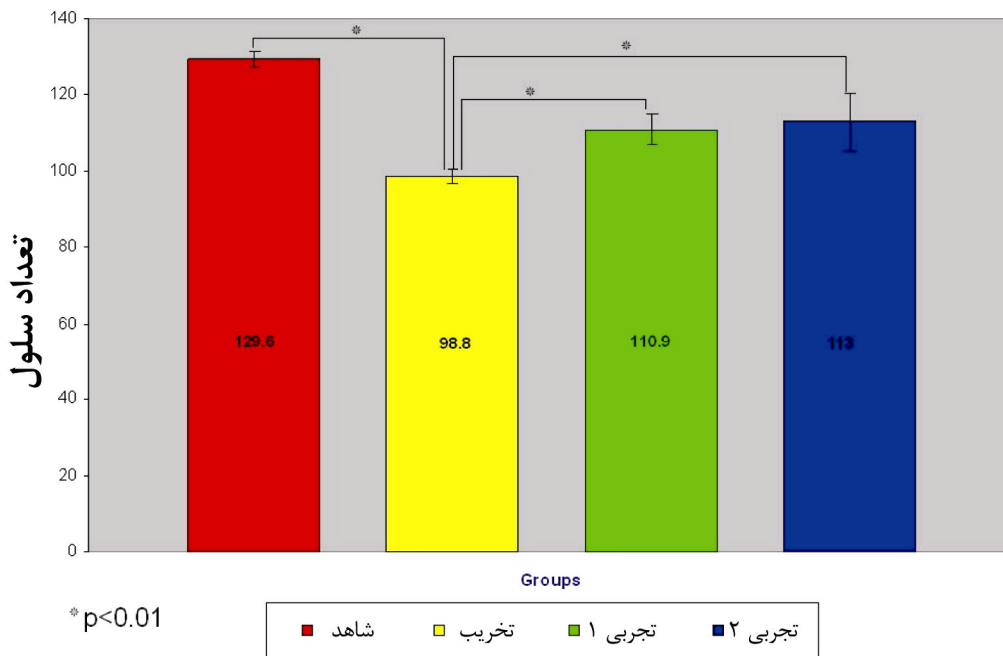


نمودار ۵. مقایسه میانگین سلولهای بخش متراکم جسم سیاه (SNC) در سطح ۲/۹ طرف چپ در چهار گروه

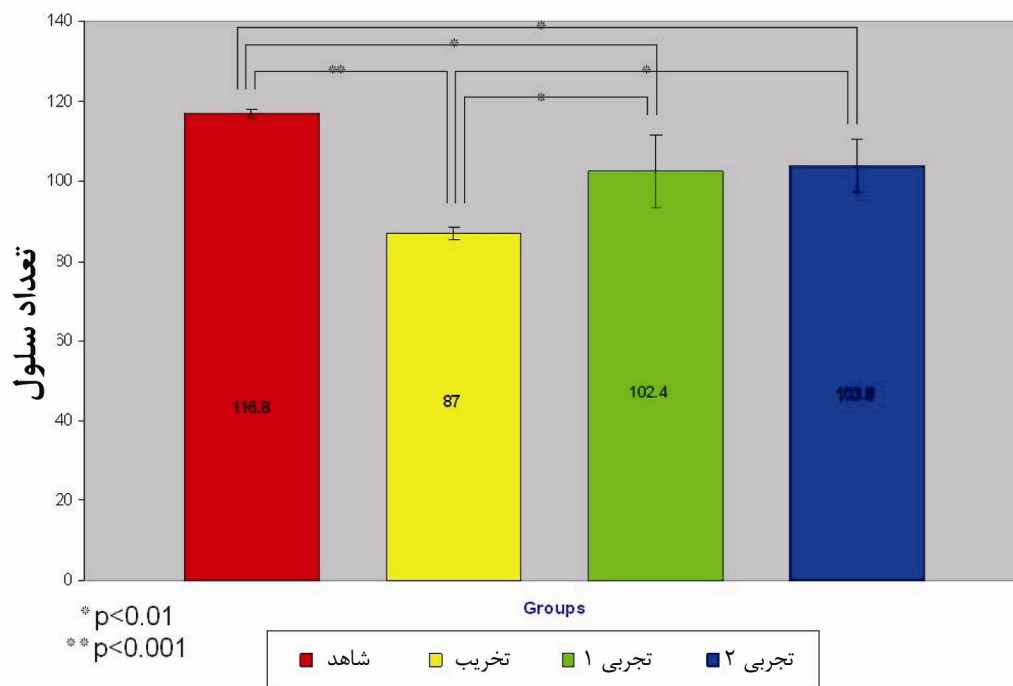




نمودار ۶. مقایسه میانگین سلولهای بخش متراکم جسم سیاه در سطح ۲/۲ طرف چپ در چهار گروه



نمودار ۷. مقایسه میانگین سلولهای بخش متراکم جسم سیاه (SNC) در سطح ۲/۸ طرف چپ در چهار گروه



نمودار ۸. مقایسه میانگین سلولهای بخش متراکم جسم سیاه در سطح ۴/۲ طرف چپ در چهار گروه

### رفتار حرکت چرخشی

ارزایی این پژوهش شامل چرخشهای القا شده بوسیله آپومورفین یکساعت قبل و ۵ هفته بعد از عمل جراحی و درمان به وسیله کرسستین بود این دارو به شکل آگونیسست 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 آپومورفین تزریق شده به‌عنوان یک داروی آگونیسست 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

### بمٹ

مدل حیوانی بیماری پارکینسون که طی سالیان اخیر استفاده می‌شود از طریق 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 دوپامنژیک 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 دوپامنژیک واقع در نئواستریاتوم شده و با تولید پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل مشتق از آن موجب تخریب این نواحی می‌شود. [۱۹]. بنابراین با توجه به مطالب بالا و آثار آنتی اکسیدانته کرسستین در پژوهش حاضر، آثار تزریق داخل صفاقی و مکرر کرسستین بر حفاظت نورونهای واقع در جسم سیاه در مدل اولیه بیماری پارکینسون بررسی شد.

به کارگیری آن گروه از مدارهای عصبی که در حالت طبیعی در کنترل رفتار حرکتی مورد نظر نقش ندارند را دارد. پس می توان نتیجه گرفت که یکی از مکانیسمهای کاهش چرخش می تواند ناشی از آثار کرسستین بر عوامل سازماندهی نورونهای سالم و مکانیسمهای مربوط به آن باشد [۱۸ و ۲۰].

### مطالعات بافتی

با تخریب نورونهای دوپامینرژیک جسم سیاه تغییرات مورفولوژیکی بارز در نئو استراتوم با استفاده از میکروسکوپیهای نورونی و الکترونی قابل مشاهده است. تزریق داخل استریال 6-OHDA، در ابتدا موجب تخریب پایانه های دوپامینرژیک و سپس بصورت رتروگراد موجب تحلیل رفتن اجسام سلولهای نورونهای دوپامینرژیک در جسم سیاه می شود. سطح دوپامین و متابولیت های آن (Homovanillic acid, dihydroxyphenylacetic acid) به طور اختصاصی چهار هفته پس از تزریق داخل اسریاتال نوروتوکسین 6-OHDA در نواحی جسم سیاه و استریاتوم همطرف با تخریب شدیداً کاهش می یابد [۱۲].

اکسیداسیون به طور معمول در نتیجه انتقال یک الکترون از فلزات انتقالی (Transition) نظیر آهن، مس منگنز به ملکول اکسیژن رخ می دهد. این گونه عناصر الکترون باند شده سست داشته و به حالت چند ظرفیتی در بدن وجود دارند. آهن فراوانترین فلز انتقالی در بدن محسوب می شود و موجب تسریع واکنشهای اکسیداسیون در بدن می شود میزان آسیب و سمیت واکنشهای اکسیداسیون عمدتاً ناشی از رادیکال آزاد هیدروکسیل بوده و مستقیماً با غلظت موضعی آهن در ارتباط است [۲۴]. فلاونوئیدهایی مانند کرسستین توانایی پایدار کردن الکترونهای آزاد به دست آمده از رادیکالهای آزادی مانند ROS در *in vitro* را دارا هستند. همچنین کرسستین با کلاته کردن یونهای فلزی از تولید ROS جلوگیری به عمل می آورد، چرا که این یونهای فلزی در طول واکنشهای فانتومی (Fenton) برای تولید ROS شرکت می نمایند [۲۵]. بنابراین می توان

چرخش بسیار واضح، در موشهای با تخریب تقریباً کامل سیستم نیگرواستریاتال مشاهده می شود در حالی که در موشهای با چرخش کم، میزان تخریب سیستم دوپامینرژیک ملایم و جزئی است [۲۱]. در این بررسی آثار تجویز کرسستین بر تعداد چرخش القا شده بر اثر آپومرفین بررسی شد.

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

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 می آید، به انجام می رسد [۲۳]. بنابراین با توجه به نتایج فوق مشخص میشود که کرسستین از طریق حفاظت در برابر آسیب اکسیداتیو و هموار نمودن راه برای بروز مکانیسم مربوط به بازگشت عملکردی می تواند 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 می دهد 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 می دهد، که در رابطه با آن، افزایش حساسیت (Supersensitivity)، افزایش تعداد گیرنده ها (Up-regulation)، ریشه زدن (Sporuting) و بروز تغییرات در حوزه های دریافتی پیام و چند مکانیسم دیگر ایجاد می شود. به علاوه سیستم عصبی توانایی جبران ناقص ضعف رفتاری را از طریق

رادیکالهای آزاد و در نتیجه کاهش پراکسیداسیون لیپیدی آن باشد (30,31). از مکانیسمهای احتمالی دیگر توان حفاظتی کرسیتین می‌توان به خاصیت مهار COMAT و MAO اشاره نمود که این عمل باعث افزایش میزان دوپامین در مغز می‌شود. تأثیر بعضی از عوامل فارماکولوژیکی مانند MPTP، رزپین و پری فنازول باعث بلوکه شدن گیرنده‌های دوپامینی خواهد شد. این بلوکه شدن می‌تواند منجر به افزایش میزان سنتز دوپامین در نورونهای دوپامنژیک باقیمانده از آسیب دژنراتیو شود. در جریان متابولیسم اکسیداتیو توسط آنزیم MAO، آب اکسیژنه تولید می‌شود. الکترونهای این ملکول برخلاف اکسیژن جفت بوده و در نتیجه به عنوان یک رادیکال آزاد در نظر گرفته نمی‌شود. 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. کرسیتین دارای خواص مهاری هر دو آنزیم Monoamineoxidase و Catechol-methyltransferase است. بنابراین از طریق 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:

- ۱- افزایش انواع فعال اکسیژن (ROS) و یا تخلیه سلول از عوامل آنتی اکسیدانت منجر به ایجاد آپوپتوز می‌شود.
- ۲- آپوپتوز در رابطه با القای تولید انواع فعال اکسیژن در سلول ایجاد می‌شود.
- ۳- با افزایش ترکیبات آنتی اکسیدانت می‌توان از آپوپتوز کرسیتین دارای خواص آنتی اکسیدانتی است و همچنین نقش

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

این احتمال وجود دارد که نوروکسین 6-OHDA از طریق القای آب اکسیژنه و رادیکالهای آزاد و بسیار فعال هیدروکسیل مشتق شده از آن و احتمالاً حضور آهن موجب آسیب مسیر دوپامنژیک 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 به عنوان ماده اولیه پراکسیداسیون بکار می‌رود [۲۵ و ۲۶]. متابولیت‌های فعال اکسیژن بر باند شدن لیگاندها به گیرنده‌های غشایی (بخش لپید) نظیر گیرنده‌های آلفا و بتا آدرنژیک، کولینژیک (موسکارینی)، آدنوزینی، هیستامینژیک و سرتونژیک 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 کرسیتین بر روی بیماری پارکینسون (بیماری نورودژنراتیو) بررسی شد که در این بررسی درمان با کرسیتین به مدت یکماه این تشخیص داده شد که تعداد نورونهای تحت درمان با کرسیتین بیشتر از نورونهای تخریب شده با 6-OHDA می‌باشد. بنابراین می‌توان به این نتیجه احتمالی رسید که این بهبودی بدلیل خواص آنتی اکسیدانتی قوی کرسیتین و یا احتمالاً بدلیل خواص جذب جلوگیری به عمل آورد. با توجه به این موضوع و اینکه

متوسط کاهش می‌دهد.

تجویز داخل صفاقی و مکرر کرسستین موجب حفاظت نورونهای بخش متراکم جسم سیاه و پایانه‌های دوپامینرژیک در ناحیه نئواستریاتوم، در برابر آثار سمی نوروٹوکسین ۶-هیدروکسی دوپامین می‌شود.

### تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند که از مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و ملکولی و آزمایشگاه نوروساینس دانشگاه علوم پزشکی ایران مراتب تشکر خود را به عمل 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. *Neuropsychopharmacol* 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 Neurobiol* 1996 ;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;

حفاظتی خود را در برابر القای آپوپتوزیس از طریق القای بیان ژن محافظت سلول از آپوپتوز انجام می‌دهد [۳۳]. این مکانیسم ممکن است دال بر آن باشد که کرسستین در حفاظت سلولها نقش مؤثری ایفاء می‌نماید. باتوجه به مطالب فوق می‌توان نتیجه گرفت که افزایش تعداد سلولها در گروه‌های تحت درمان با کرسستین می‌تواند نتیجه در قدرت آنتی اکسیدانتی بالای کرسستین باشد. براساس این یافته‌ها می‌توان نتیجه گرفت که، تجویز داخل صفاقی و مکرر کرسستین به مدت یکماه پس از تزریق داخل صفاقی نوروٹوکسین ۶-هیدروکسی دوپامین در مدل تجربی بیماری پارکینسون عدم تقارن حرکتی (رفتار چرخشی) ظاهر شده بر اثر تجویز آگونیسست دوپامینرژیک آپومرفین را به میزان

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 Nuroal Cell Oxidative By Three Distinct Mechanisms, *Free Radical Biology & Medicine* 2001; 12: 433-48
8. **Morel I, Lescoat G, Cogrel P, Padeloup 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 effects of flavonoids on xanthin oxidase. *Anticancer Res* 1993; 13(3):2165-7.
11. **de Whalley CV, Rankin SM, Hoult JR, Jessup W, Leake DS.** Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem pharmacol* 1990; 39(11):1743-50.  
۱۲. روغنی م. اثر حفاظتی ویتامین E بر سیستم نیگرو استریاتال در مدل تجربی بیماری پارکینسون و پایان 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 behavior 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. **Ichitani Y, Okamura H, Nakahara D, Nagatsu I, Iyata 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. **Chwrtng RK, Huston JP.** The Unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research analysis of functional deficits recovery and Treatments. *Prog Neurobiol* 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 Stress 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, Hourichi 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 glycosides. *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.