

القای مدل بیماری پارکینسون توسط روتنون در موش صحرایی

آرمان رحیمی^۱، دکتر فرنوش خسروبخش^۲، دکتر اسماعیل ایزدپناه^۳، دکتر کامبیز حسنزاده^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: از دیرباز محققین برای شناخت بهتر بیماری پارکینسون و یافتن راهکارهای درمانی، اقدام به ایجاد مدل‌های حیوانی نموده‌اند و از آن جایی که به طور کلی تکرار پذیری آزمایش‌ها در حیوانات آزمایشگاهی همیشه با مشکلاتی همراه است، با آزمایش‌های رفتاری صحت مدل را تأیید می‌کنند. از این رو، هدف از پژوهش حاضر ایجاد یک مدل حیوانی صحیح و با قابلیت تکرار از بیماری پارکینسون می‌باشد.

روش‌ها: موش‌های صحرایی نر با وزن 400 ± 50 g و سن ۱۲-۱۰ ماه، دوزهای مختلف روتنون (۱، ۲، ۳ mg/kg) یا حامل آن را به صورت زیرجلدی هر ۴۸ ساعت یک بار دریافت نمودند. به منظور بررسی ایجاد مدل سه آزمایش رفتاری روتارود، ریرینگ و بار انجام شد.

یافته‌ها: دادن سم روتنون (۲ mg/kg) با فواصل زمانی ۴۸ ساعت، روشی کارآمد با میزان مرگ و میر پایین بود؛ به طوری که در این روش، القای مدت زمان حفظ تعادل در آزمایش روتارود و مهارت‌های حرکتی در آزمایش ریرینگ به طور معنی‌داری ($P < 0/050$) کاهش یافت. از طرفی، میزان جمود عضلانی در آزمایش بار در حیوانات دریافت‌کننده روتنون در مقایسه با گروه دریافت‌کننده حامل به طور معنی‌داری ($P < 0/050$) افزایش نشان داد. به علاوه، میزان همبستگی بین آزمایش‌های رفتاری، از لحاظ آماری مؤید ایجاد علائم رفتاری مدل بود.

نتیجه‌گیری: در میان دوزهای به کار رفته جهت القای پارکینسون، سم روتنون (۲ mg/kg) با فواصل زمانی ۴۸ ساعت بهترین روش با قابلیت تکرار بود.

واژگان کلیدی: بیماری پارکینسون، روتنون، روتارود، آزمایش

ارجاع: رحیمی آرمان، خسروبخش فرنوش، ایزدپناه اسماعیل، حسنزاده کامبیز. القای مدل بیماری پارکینسون توسط روتنون در موش

صحرایی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۹۶): ۱۲۵۸-۱۲۵۰

مقدمه

بیماری پارکینسون یکی از رایج‌ترین اختلالات مربوط به تخریب سیستم اعصاب مرکزی و دومین بیماری رایج در دسته‌ی بیماری‌های تحلیل‌برنده‌ی اعصاب می‌باشد که در ۱ درصد افراد بالای ۶۰ سال و ۴ درصد افراد بالای ۸۰ سال رخ می‌دهد (۱). این بیماری به صورت کلاسیک با از دست رفتن

نورون‌های دوپامینرژیک مشخص می‌شود که در مغز میانی از ناحیه‌ی توده‌ی سیاه به جسم مخطط امتداد می‌یابند و آن را عصب‌دهی می‌کنند. در خلال بیماری پارکینسون، این سلول‌ها دچار مرگ سلولی و آپوپتوز می‌شوند (۲). نشانه‌های حرکتی بیماری پارکینسون نیز ناشی از مرگ همین سلول‌های تولیدکننده‌ی دوپامین در ناحیه‌ی توده‌ی سیاه است که از جمله‌ی

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم زیستی و بیوتکنولوژی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

۲- استادیار، گروه علوم زیستی و بیوتکنولوژی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

۳- استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

۴- استادیار، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

نکته‌ی حایز اهمیت در ایجاد مدل، تکرار پذیری و میزان موفقیت آن است و محقق باید شرایط ایجاد مدل را تا حد امکان بهینه نماید. در رابطه با مدل‌های القا شونده با سموم عصبی، این بهینه سازی باید در مواردی همچون دوز تزریق، تعداد تزریق‌ها، فواصل بین تزریق‌ها، طول دوره‌ی تزریق و سن حیوانات انجام شود. از این رو، محقق برای این که بدانند در مسیر درستی حرکت می‌کند، باید به منظور تأیید مدل، آزمایش‌های رفتاری اختصاصی را بر روی حیوانات انجام دهد. در میان مدل‌های حیوانی، مدل سیستمیک سم روتنون علایم رفتاری و فیزیوپاتولوژی بیماری پارکینسون را به طور نسبی شبیه‌سازی می‌کند (۱۱-۱۲). اما از آن جایی که به کارگیری این سم در مطالعات مختلف به روش‌های متفاوتی است و از یک پروتکل منسجم و استاندارد پیروی نمی‌کند، هدف از مطالعه‌ی حاضر ایجاد یک مدل حیوانی از بیماری پارکینسون توسط روتنون با اعتبار و تکرار پذیری بالا بود.

روش‌ها

حیوانات: در این آزمایش، ۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن 400 ± 50 g و سن ۱۰-۱۲ ماه به صورت تصادفی انتخاب شدند. حیوانات در قفس‌هایی از جنس پلکسی گلاس (۲ موش در هر قفس) و در سیکل شبانه‌روزی طبیعی نگهداری می‌شدند. غذای استاندارد و آب به مقدار کافی در دسترس حیوانات قرار داشت و دمای محیط 23 ± 2 °C بود.

گروه‌بندی حیوانات: گروه‌های مورد شامل گروه دریافت‌کننده‌ی روتنون با دوز ۱ mg/kg/۴۸h، گروه

آن‌ها می‌توان به رعشه، سفتی عضلات، کندگی و دشواری حرکت و گام برداشتن اشاره کرد (۳).

در مراحل بعدی و با پیشرفت بیماری، مشکلات شناختی و رفتاری و حتی زوال عقل نیز ممکن است بروز یابد (۳). پارکینسون بیماری مزمنی است که ممکن است پس از تشخیص، ۲۰-۱۰ سال به طول بینجامد و به تدریج پیشرفت کند و در نهایت، موجب مرگ بیمار شود (۳). با توجه به شیوع رو به گسترش این بیماری، یافتن راهکارهای درمانی مناسب جهت کنترل این بیماری از اهمیت به‌سزایی برخوردار است.

به منظور مطالعه‌ی بیماری پارکینسون و مکانیسم‌های مولکولی آن و نیز تغییرات رفتاری و پاتولوژیک در این بیماری، در دست داشتن مدل‌های حیوانی این بیماری ضروری است. از این رو، محققین اقدام به ایجاد مدل بیماری پارکینسون در حیوانات آزمایشگاهی نموده‌اند. روش‌های ایجاد مدل پارکینسونی به سه گروه اصلی مدل‌های ژنتیکی (۴)، مدل‌های ویروسی (۵-۷) و مدل‌های القا شده با سموم عصبی (۸) تقسیم‌بندی می‌شود.

روش اخیر نسبت به دو روش دیگر ارزان‌تر و ساده‌تر است و به همین دلیل، کاربرد بیشتری در بین محققین دارد. مهم‌ترین سموم این گروه عبارت از MPTP (1-methyl-2,3,4,5-tetrahydropyridine-1-phenyl) یا 6-OHDA (6-hydroxydopamine)، پاراکوات (Paraquat) و روتنون هستند. بر اساس مطالعات پیشین، استفاده از مدل‌های پاراکوات و روتنون به علت نزدیک‌تر بودن به شرایط واقعی گسترش یافته است (۹-۱۰).

در دقیقه بود که در آخرین روز، آموزش به ۱۵ دور در دقیقه رسید. آزمایش روتارود پیش از انجام تزریقات در روز اول و هر ۴۸ ساعت یک بار از روز پنجم به بعد اجرا شد (۱۳).

آزمایش ریرینگ: این آزمایش به منظور سنجش مهارت های حرکتی در موش ها اجرا شد. به طور طبیعی هنگامی که موش در یک محیط جدید و بسته قرار می گیرد، بر اساس رفتار جستجوگرانه ای که دارد، روی دو پا بلند می شود و با اندام های جلویی دیوارهای محیط را لمس می کند. عملکرد موش های مبتلا به پارکینسون در این آزمایش دچار افت می شود. برای انجام این آزمایش هر یک از موش ها جداگانه به مدت ۵ دقیقه در یک استوانه ی شیشه ای شفاف (۲۰ cm قطر و ۴۰ cm ارتفاع) قرار گرفتند و برای هر موش، تعداد دفعاتی را که روی دو پا بلند شد و یک یا هر دو دست را بالاتر از سطح شان هایش قرار داد و دیواره ها را لمس نمود، شمارش شد. عملکرد موش ها در زیر نور قرمز و یک محیط آرام، با یک دوربین ویدیویی فیلم برداری شد و بررسی و امتیازدهی آن توسط شخصی که نسبت به گروه های آزمایشی بی اطلاع بود، به انجام رسید (۱۱).
آزمایش بار: این آزمایش نیز به منظور سنجش جمود عضلانی در موش ها به انجام رسید. برای انجام آن، دو اندام جلویی حیوان بر روی میله ای به ارتفاع ۱۰ cm قرار داده شد (به عبارت دیگر، نصف ارتفاعی که حیوان در موقعیت ریرینگ دارد) و زمان تا هنگامی که حیوان یک یا هر دو دستش را از روی میله بر می داشت، نگه داشته می شد. نهایت زمانی که برای انجام این آزمایش در نظر گرفته شد (Cut-off time) ۱۸۰ ثانیه بود (۱۴).

دریافت کننده ی روتنون با دوز ۲ mg/kg/۴h، گروه دریافت کننده ی روتنون با دوز ۳ mg/kg/۴h و گروه دریافت کننده ی حامل روتنون با دوز ۱ ml/kg/۴h (گروه شاهد) بودند. در تمامی گروه ها، تزریقات به صورت زیرجلدی انجام شد و در هر گروه، ۸ سر موش قرار داشت.

مواد شیمیایی: جهت القای مدل پارکینسون از روتنون، روغن آفتابگردان و دی متیل سولفوکساید (شرکت سیگما، آمریکا) استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا روتنون در دی متیل سولفوکساید حل گردید و سپس در روغن آفتابگردان رقیق شد تا با دوزهای (۱، ۲، ۳ mg/kg) قابل تزریق باشد.

روش کار: به منظور القای بیماری پارکینسون، حیوانات سم روتنون را به صورت زیرجلدی با دوزهای (۱، ۲، ۳ mg/kg) با فواصل زمانی ۴۸ ساعت به مدت ۱۹ روز دریافت نمودند (۱۱). گروه شاهد نیز تنها حامل روتنون (ترکیب دی متیل سولفوکساید و روغن آفتابگردان) را با دوز ۱ ml/kg/۴h دریافت نمود.

روش انجام آزمایش های رفتاری

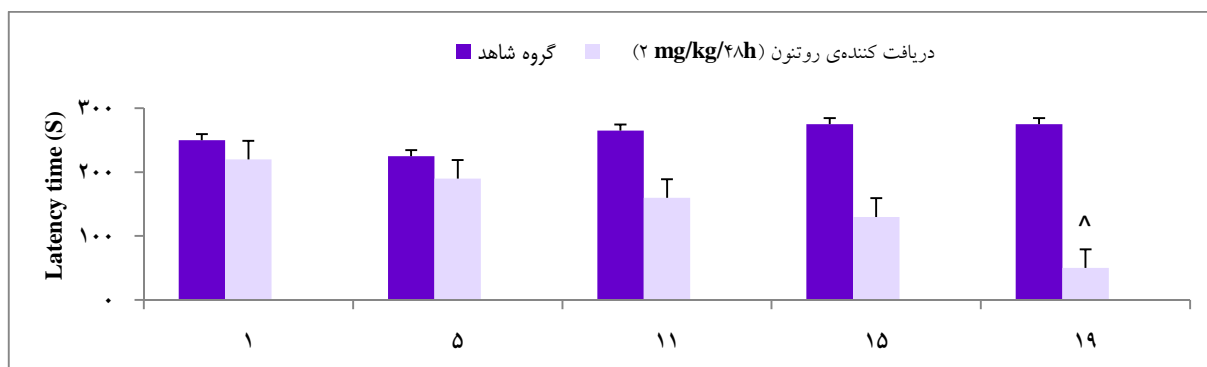
آزمایش روتارود: این آزمایش، یک آزمایش معتبر جهت ارزیابی آسیب های عصبی در جوندگان است و می تواند بارها برای یک حیوان تکرار شود تا قدرت عضلانی، هماهنگی اندام های قدامی و خلفی و تعادلش را سنجش نماید. در این مطالعه، تمامی موش ها قبل از شروع مطالعه تحت یک برنامه ی آموزشی ۵ روزه قرار گرفتند تا به یک عملکرد ثابت برسند. به این ترتیب که در هر روز، ۴ نوبت و هر نوبت به مدت ۳۰۰ ثانیه بر روی دستگاه در حال چرخش قرار می گرفتند. سرعت چرخش محور دستگاه در روز اول آموزش، ۱۱ دور

عضلانی و تعادل می‌باشد ($P < 0/050$). همچنین بر اساس شکل ۲، نتایج گویای افت معنی‌دار عملکرد در دو آزمایش ریرینگ ($P < 0/010$) و بار ($P < 0/001$) بود، که به ترتیب نشان دهنده‌ی کاهش مهارت‌های حرکتی و افزایش معنی‌دار جمود عضلانی در گروه دریافت‌کننده‌ی روتنون در مقایسه با گروه شاهد است. به علاوه، بررسی همبستگی بین دو این آزمایش رفتاری با آزمایش روتارود، در آزمون Spearman نشان داد که نتایج حاصل از آزمایش‌های رفتاری در این مدل با هم هماهنگ و مؤید همدیگر می‌باشند (شکل ۳-الف و ب)؛ به طوری که مشاهده می‌شود، با کاهش میزان تعادل و قدرت عضلانی در آزمایش روتارود، میزان مهارت‌های حرکتی نیز کاهش می‌یابد (شکل ۳-الف) و به موازات آن، میزان جمود عضلانی در آزمایش بار افزایش می‌یابد (شکل ۳-ب). همچنین بین سطح مهارت‌های حرکتی در آزمایش ریرینگ و جمود عضلانی در آزمایش بار، رابطه‌ی معکوسی وجود دارد؛ به این ترتیب که با کاهش مهارت‌های حرکتی میزان جمود عضلانی افزایش می‌یابد و بالعکس (شکل ۳-ج).

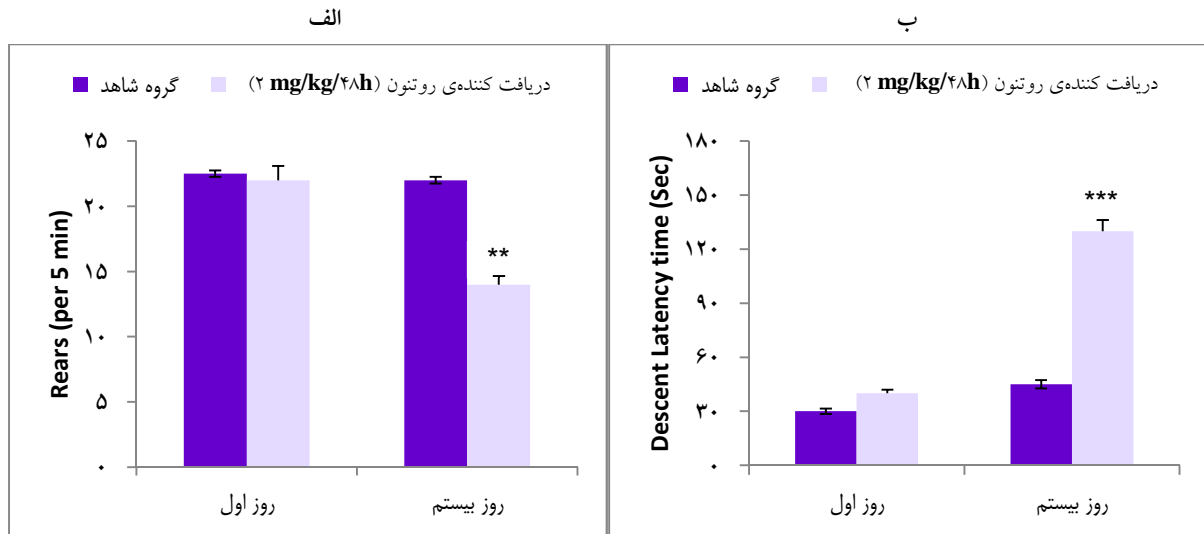
مقادیر یافته‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار تعریف شده‌اند. با توجه به این که توزیع داده‌ها طبیعی بود (نتایج آزمون Kolmogorov-Smirnov)، جهت آنالیز آماری نتایج گروه روتنون در هر روز با روز اول توسط آزمون t زوجی مقایسه شد. روزی که در آن تفاوت معنی‌دار با روز اول مشاهده شد، به عنوان زمان ایجاد مدل تلقی گردید و در این روز، نتایج با گروه حامل روتنون از طریق آزمون t مستقل مورد مقایسه قرار گرفت. به علاوه، میزان همبستگی آزمایش‌های رفتاری با استفاده از آزمون Spearman مورد بررسی قرار گرفت. $P < 0/050$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. تنها داده‌های مربوط به حیواناتی که تا پایان دوره زنده ماندند، در محاسبات لحاظ شدند.

یافته‌ها

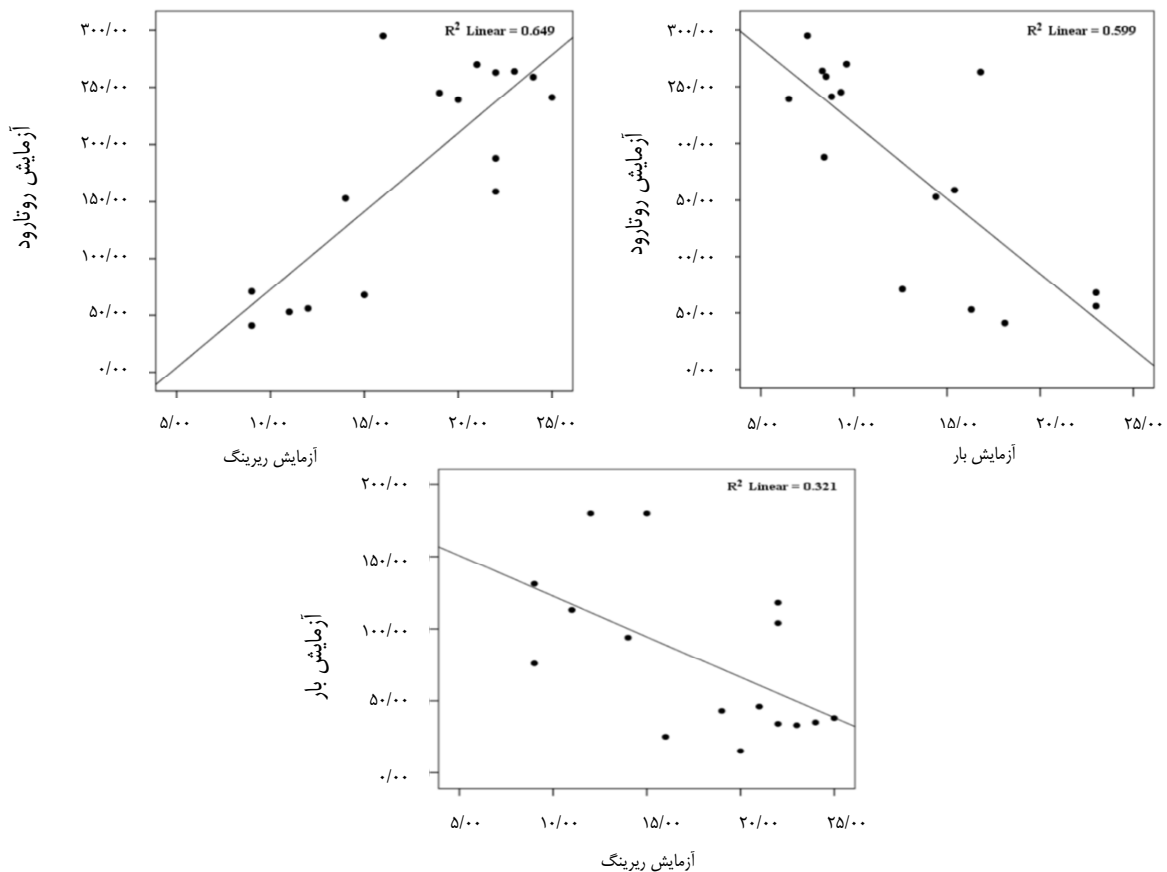
همان‌گونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، نتایج حاکی از افت عملکرد گروه دریافت‌کننده‌ی روتنون در آزمایش روتارود در مقایسه با گروه شاهد بود؛ که به نوبه‌ی خود نشان دهنده‌ی کاهش معنی‌دار قدرت



شکل ۱. مقایسه‌ی عملکرد دو گروه شاهد و دریافت‌کننده‌ی روتنون با دوز ۲ mg/kg/۴۸h در آزمایش روتارود. $P < 0/010$ نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار گروه دریافت‌کننده‌ی روتنون در آن روز با روز اول در همان گروه می‌باشد. $P < 0/001$ نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد (دریافت‌کننده‌ی حامل روتنون) می‌باشد.



شکل ۲. مقایسه‌ی عملکرد دو گروه شاهد و دریافت کننده روتنون با دوز ۲ mg/kg/۴۸h، الف) آزمایش ریرینگ ب) آزمایش بار. عملکرد دو گروه در روزهای ۱ و ۲۰ با همدیگر مقایسه شد. $P < 0/010$ *** و $P < 0/001$ ** نشان دهنده اختلاف معنی دار گروه دریافت کننده روتنون با گروه شاهد (دریافت کننده حامل روتنون) است



شکل ۳. نمودار پراکندگی نشان دهنده میزان همبستگی بین آزمایش‌های رفتاری: الف) روتارود- روتارود ب) روتارود- بار ج) ریرینگ- بار که همبستگی آنها به ترتیب در سطح معنی داری $P < 0/010$ **، $P < 0/010$ * و $P < 0/050$ * مثبت بود

نتایج مربوط به دوزهای دیگر

با تزریق زیرجلدی روتنون (1 mg/kg/4h) و با گذشت زمانی ۲ برابر زمانی که مدل با دوز ۲ mg/kg/4h ایجاد شد، هنوز هیچ‌گونه افت معنی‌داری در عملکرد حیوانات در آزمایش‌های رفتاری نسبت به روز اول خودشان و نیز گروه شاهد نشان نداد و از سویی، نتایج آزمایش‌های رفتاری بسیار متغیر و غیر قابل اعتماد بود و از این رو، از ادامه‌ی آن صرف نظر شد. با تزریق زیرجلدی روتنون (۳ mg/kg/4h) نیز میزان مرگ و میر به قدری بود که در همان هفته‌ی نخست، بیش از ۶۰ درصد حیوانات تلف شدند و علاوه بر افت شدید و ناگهانی عملکرد در آزمایش‌های رفتاری - که ناشی از اثرات غیر اختصاصی و محیطی سم روتنون بر دیگر اندام‌ها و دستگاه‌های بدن حیوانات بود و نتایج را نامعتبر می‌ساخت -، به علت پایین آمدن جامعه‌ی آماری و مسایل اخلاقی مربوط به کار با حیوانات آزمایشگاهی، از ادامه‌ی تزریقات با این دوز مذکور خودداری گردید.

بحث

نتایج مطالعه‌ی حاضر به طور کلی نشان داد که روتنون با دوز (۲ mg/kg/4h) سبب بروز اختلال حرکتی مشابه پارکینسون در حیوانات می‌شود. نتایج آزمایش‌های رفتاری حاکی از آن بود که تفاوت معنی‌داری بین گروه شاهد و گروه دریافت‌کننده‌ی روتنون (۲ mg/kg/48h) در روزهای ۱۹ و ۲۰ وجود داشت. همچنین بین داده‌های به دست آمده از آزمایش روتارود در گروه شاهد در روز ۱۹ با داده‌های پایه (Baseline) در نخستین روز انجام

آزمایش تفاوت معنی‌داری وجود داشت که در مجموع، نشان می‌دهد که مدل پارکینسونی با موفقیت ایجاد شده است.

در مطالعه‌ی حاضر، از تزریق زیرجلدی و دراز مدت روتنون استفاده شد؛ چرا که این رویکرد، علاوه بر کاهش مرگ و میر در مقایسه با دیگر روش‌های سیستمیک، سبب بروز تدریجی علائم حرکتی بیماری پارکینسون و به حداقل رساندن تأثیرات غیر اختصاصی روتنون می‌شود (۱۵). به علاوه، در این بررسی موش‌های با سن بالا به کار برده شدند؛ چرا که نسبت به سم روتنون حساس‌تر بودند و مدل آن‌ها شباهت بیشتری با روند ایجاد بیماری در انسان داشت (۱۶).

مدل‌های حیوانی زیادی برای بیماری پارکینسون وجود دارد که هر کدام مزایا و معایبی دارند؛ اما مدل ایده‌آلی که بتواند تمامی ویژگی‌های کلینیکی و پاتولوژیک بیماری را شبیه‌سازی کند و به درستی تأثیر داروها و عوامل نوروپروتکتیو را پیش‌بینی کند، هنوز گزارش نشده است. از میان مدل‌های موجود، مدل روتنونی از مزایای خاصی برخوردار است؛ از جمله این که با تخریب اختصاصی نورون‌های دوپامینژیک مسیر نیگرو-استریاتال، ویژگی‌های پاتولوژیک کلیدی پارکینسون را شبیه‌سازی می‌نماید (۱۱).

به علاوه، در مدل روتنونی بسیاری از مسیرهای مولکولی شناخته شده در بیماری پارکینسون مانند استرس اکسیداتیو، آگراگاسیون پروتئینی و نارسایی سیستم پروتئازومی فعال هستند (۱۷). از دیگر مزایای مدل سیستمیک روتنونی، سهولت اجرا، تکرار پذیری و موفقیت بالا بدون عمل جراحی، تدریجی بودن روند و قابلیت سنجش داروهای نوروپروتکتیو می‌باشد (۱۸، ۱۴). تنها محدودیت اصلی مدل

(۱۴، ۱۱). اما تا کنون از این سه آزمایش به صورت همزمان در یک مطالعه استفاده نشده بود. در مطالعه‌ی حاضر با استفاده‌ی همزمان از این سه آزمایش، علاوه بر این که ثابت گردید مدل ایجاد شده جنبه‌های حرکتی مختلف بیماری پارکینسون را شبیه‌سازی نموده است، وجود همبستگی بین آن‌ها با استفاده از آزمون Spearman نشان داده شد، که این خود اثباتی برای راهبردی بودن و هماهنگی بین این سه آزمایش در مدل ایجاد شده است و به نوبه‌ی خود، صحت ایجاد مدل را با اطمینان بیشتر تأیید می‌نماید.

نتایج مطالعه‌ی حاضر در مجموع نشان داد که به کارگیری روتنون با دوز ۲ mg/kg/48h، سبب بروز اختلال حرکتی و ایجاد مدل پارکینسونی گردید. هر چند از میان دوزهای به کار رفته در مطالعه‌ی حاضر، این دوز مناسب‌تر از بقیه بود؛ اما به نظر می‌رسد در تأیید این مدل، انجام مطالعات بافت‌شناسی و بررسی مسیرهای مولکولی به تأیید آن به عنوان یک مدل استاندارد کمک شایانی می‌کند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بدین‌وسیله مراتب تشکر و سپاس خود را از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کردستان به دلیل حمایت‌های مالی اعلام می‌دارند.

روتنونی متغیر بودن آن در دو مورد «درصد حیواناتی که مدل در آن‌ها ایجاد می‌شود» و «شدت مدل بیماری» است.

در مطالعه‌ی حاضر که از تزریق زیرجلدی و مزمن روتنون (۲ mg/kg/48h) استفاده شد، مدل به طور تقریبی در تمامی حیوانات ایجاد شد و نیز اختلاف کمی میان عملکرد حیوانات در گروه دریافت‌کننده‌ی روتنون وجود داشت که حاکی از تکرار پذیری، ثبات و موفقیت مدل است و آن را برای مطالعات نوروپروتکتیو مناسب می‌سازد (۱۱).

آزمایش روتارود یک آزمایش معتبر برای ارزیابی آسیب‌های عصبی در جوندگان است و می‌تواند به طور مکرر برای سنجش تعادل و هماهنگی میان اندام‌های قدامی و خلفی مورد استفاده قرار گیرد (۱۳). همچنین مطالعات پیشین ثابت می‌کنند زمانی که موش‌ها قادرند بر روی دستگاه روتارود در حال چرخش تعادل خود را حفظ کنند، با از دست رفتن نورون‌های دوپامینرژیک، این وضعیت معکوس می‌شود و این توانایی از دست می‌رود (۱۹). از این رو، این آزمایش مبنای اصلی برای تشخیص زمان ایجاد مدل قرار گرفت. دو آزمایش ریرینگ و بار نیز از جمله آزمایش‌های رفتاری معتبر برای سنجش علایم حرکتی در مدل‌های پارکینسونی هستند

References

1. de Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2006; 5(6): 525-35.
2. Choi WS, Palmiter RD, Xia Z. Loss of mitochondrial complex I activity potentiates dopamine neuron death induced by microtubule dysfunction in a Parkinson's disease model. *J Cell Biol* 2011; 192(5): 873-82.
3. Thomas B, Beal MF. Molecular insights into Parkinson's disease. *F1000 Med Rep* 2011; 3: 7.
4. Potashkin JA, Blume SR, Runkle NK. Limitations of animal models of Parkinson's disease. *Parkinsons Dis* 2010; 2011: 658083.
5. Ogata A, Tashiro K, Nukuzuma S, Nagashima K, Hall WW. A rat model of Parkinson's disease induced by Japanese encephalitis virus. *J Neurovirol* 1997; 3(2): 141-7.
6. Fishman PS, Gass JS, Swoveland PT, Lavi E,

- Highkin MK, Weiss SR. Infection of the basal ganglia by a murine coronavirus. *Science* 1985; 229(4716): 877-9.
7. Takahashi M, Yamada T, Nakajima S, Nakajima K, Yamamoto T, Okada H. The substantia nigra is a major target for neurovirulent influenza A virus. *J Exp Med* 1995; 181(6): 2161-9.
 8. Bove J, Prou D, Perier C, Przedborski S. Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx* 2005; 2(3): 484-94.
 9. Shen WB, McDowell KA, Siebert AA, Clark SM, Dugger NV, Valentino KM, et al. Environmental neurotoxin-induced progressive model of parkinsonism in rats. *Ann Neurol* 2010; 68(1): 70-80.
 10. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 2003; 39(6): 889-909.
 11. Cannon JR, Tapias V, Na HM, Honick AS, Drolet RE, Greenamyre JT. A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2009; 34(2): 279-90.
 12. Newhouse K, Hsuan SL, Chang SH, Cai B, Wang Y, Xia Z. Rotenone-induced apoptosis is mediated by p38 and JNK MAP kinases in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *Toxicol Sci* 2004; 79(1): 137-46.
 13. Urbach YK, Bode FJ, Nguyen HP, Riess O, von HS. Neurobehavioral tests in rat models of degenerative brain diseases. *Methods Mol Biol* 2010; 597: 333-56.
 14. Xiong N, Xiong J, Khare G, Chen C, Huang J, Zhao Y, et al. Edaravone guards dopamine neurons in a rotenone model for Parkinson's disease. *PLoS One* 2011; 6(6): e20677.
 15. Fleming SM, Zhu C, Fernagut PO, Mehta A, DiCarlo CD, Seaman RL, et al. Behavioral and immunohistochemical effects of chronic intravenous and subcutaneous infusions of varying doses of rotenone. *Exp Neurol* 2004; 187(2): 418-29.
 16. Phinney AL, Andringa G, Bol JG, Wolters EC, van Muiswinkel FL, van Dam AM, et al. Enhanced sensitivity of dopaminergic neurons to rotenone-induced toxicity with aging. *Parkinsonism Relat Disord* 2006; 12(4): 228-38.
 17. Betarbet R, Canet-Aviles RM, Sherer TB, Mastroberardino PG, McLendon C, Kim JH, et al. Intersecting pathways to neurodegeneration in Parkinson's disease: effects of the pesticide rotenone on DJ-1, alpha-synuclein, and the ubiquitin-proteasome system. *Neurobiol Dis* 2006; 22(2): 404-20.
 18. Sherer TB, Betarbet R, Testa CM, Seo BB, Richardson JR, Kim JH, et al. Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 2003; 23(34): 10756-64.
 19. Iancu R, Mohapel P, Brundin P, Paul G. Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. *Behav Brain Res* 2005; 162(1): 1-10.

Induction of Parkinson's Disease Model in Rat by Rotenone

Arman Rahimmi¹, Farnoosh Khosrobakhsh PhD², Esmael Izadpanah PhD³,
Kambiz Hassanzadeh PhD⁴

Original Article

Abstract

Background: Many efforts have been made to find a proper animal model for Parkinson's disease, in order to improve our knowledge about this disorder and to find therapeutic approaches. Generally, the reproducibility of experiments in laboratory animals is accompanied by some troubles. Therefore, the validity of model is certified via certain behavioral tests. The present study aimed to find an accurate and reproducible rat model of inducing Parkinson's disease by rotenone.

Methods: Male Wistar rats weighting 400 ± 50 g (10-12 months of age) received several doses of rotenone (1, 2, or 3 mg/kg) or its vehicle subcutaneously every 48 hours. Three behavioral tests (rotarod, rearing and bar) were run in order to check the development of model.

Findings: Rotenone (2 mg/kg/48h) was an efficient dose beside its low mortality. The latency time of rotarod test and movement skills in rearing test decreased significantly in rotenone (2 mg/kg/48h) treated animals ($P < 0.05$). In addition, the results of bar test showed the augmentation of catalepsy in rotenone group compared to vehicle-treated animals ($P < 0.05$). In addition, the statistical correlation between behavioral tests justified the development of movement disorders in the model.

Conclusion: According to the results, it was concluded that rotenone (2 mg/kg/48h) was the best approach with reproducible capacity for induction of Parkinson's disease model.

Keywords: Parkinson's disease, Rotenone, Rotarod test

Citation: Rahimmi A, Khosrobakhsh F, Izadpanah E, Hassanzadeh K. **Induction of Parkinson's Disease Model in Rat by Rotenone.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(296): 1250-58

1- MSc Student, Department of Biological Science and Biotechnology, School of Basic Sciences, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

2- Assistant Professor, Department of Biological Science and Biotechnology, School of Basic Sciences, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

3- Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran

4- Assistant Professor, Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran

Corresponding Author: Kambiz Hassanzadeh, Email: kambizhassanzadeh@gmail.com