مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۳۶/هفته چهارم تیر ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۳/۱۸

اثر کروسین بر رفتار چرخشی، میزان پراکسیداسیون لیپیدی و نیتریت در ناحیه‌ی استریاتوم مغز موش‌های صحرایی در مدل تجربی بیماری پارکینسون

مریم حسینی[۱]، دکتر زیبا رجائی[۲]، دکتر حجت‌اله علائی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: دژنراسیون سیستم دوپامینرژیک نیگرواستریاتال، مهم‌ترین ویژگی پاتوفیزیولوژیکی بیماری پارکینسون است که منجر به بروز اختلالات حرکتی می‌گردد. شواهد متعددی نشان می‌دهد که استرس اکسیداتیو، نقش مهمی در دژنراسیون نورون‌های دوپامینی جسم سیاه در بیماری پارکینسون ایفا می‌کند. در سال‌های اخیر، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها در کاهش اثرات زیانبار استرس اکسیداتیو و رادیکال‌های آزاد در بیماری پارکینسون مورد توجه قرار گرفته است. در این مطالعه، اثر کروسین –آنتی‌اکسیدان قوی موجود در گیاه زعفران– بر رفتار چرخشی و آسیب اکسیداتیو در ناحیه‌ی استریاتوم مغز موش‌های صحرایی در مدل تجربی بیماری پارکینسو ن مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی، تعداد ۳۲ سر موش صحرایی نر از نژاد ویستار به طور تصادفی به ۴ گروه (n = ۸) تقسیم شدند: گروه شم، گروه مبتلا به پارکینسون و گروه‌های مبتلا به پارکینسون تیمار شده با کروسین در دوزهای ۳۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم. ضایعه‌ی یک‌طرفه با میکروانجکشن ۶- هیدروکسی دوپامین (۱۶µg/۴µl) به داخل باندل میانی مغز جلویی سمت چپ ایجاد گردید. تزریق داخل صفاقی کروسین و یا سالین از ۳ روز قبل از جراحی شروع شد و به مدت ۶ هفته ادامه یافت. رفتار چرخشی با تزریق آپومورفین (۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی) در پایان هفته‌های ۲، ۴ و ۶ و میزان پراکسیداسیون لیپیدی و نیتریت در ناحیه‌ی استریاتوم در پایان هفته‌ی ۶ اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: میانگین تعداد کل چرخش‌های ناشی از تزریق آپومورفین در پایان هفته‌های ۲، ۴ و ۶ در گروه مبتلا به پارکینسون نسبت به گروه شم افزایش معنی‌داری (P < ۰/۰۰۱) نشان داد. تیمار با کروسین با دوزهای ۳۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تغییری در تعداد کل چرخش‌ها در حیوانات مبتلا به پارکینسون ایجاد نکرد. در پایان هفته‌ی ۶، میزان پراکسیداسیون لیپیدی و نیتریت در ناحیه‌ی استریاتوم حیوانات گروه مبتلا به پارکینسون نسبت به حیوانات گروه شم به طور معنی‌داری (P < ۰/۰۵۰) افزایش یافت. تیمار با کروسین با دوز ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، میزان نیتریت استریاتوم حیوانات مبتلا به پارکینسون را به طور معنی‌داری (P < ۰/۰۵۰) کاهش داد، اما تغییری در میزان پراکسیداسیون لیپیدی در ناحیه‌ی استریاتوم ایجاد نکرد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد کروسین با دوز ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در پیشگیری از آسیب نیتروزاتیو در ناحیه‌ی استریاتوم مؤثر است. با این حال، تأثیری در بهبود رفتار چرخشی در مدل بیماری پارکینسون ندارد.

واژگان کلیدی: کروسین، ۶- هیدروکسی دوپامین، آسیب اکسیداتیو، رفتار چرخشی، بیماری پارکینسون

ارجاع: حسینی مریم، رجائی زیبا، علائی حجت‌اله. **اثر کروسین بر رفتار چرخشی، میزان پراکسیداسیون لیپیدی و نیتریت در ناحیه‌ی استریاتوم مغز موش‌های صحرایی در مدل تجربی بیماری پارکینسون.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۳۶): ۷۹۱-۷۸۰

۱- دانشجوی کارشناس ارشد، گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- استاد، مرکز تحقیقات علوم اعصاب و گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر زیبا رجائی
Email: rajaeiz@med.mui.ac.ir

مقدمه

بیماری پارکینسون، دومین بیماری شایع نورودژنراتیو بعد از آلزایمر است که در آن دژنراسیون پیش‌رونده‌ی نورون‌های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه و پایانه‌های آن واقع در استریاتوم به وجود می‌آید و موجب کاهش دوپامین می‌گردد. به دنبال کاهش دوپامین، اختلالات حرکتی ناتوان کننده‌ی متعددی از قبیل برادی کینزیا، لرزش، سخت شدگی عضلانی و عدم تعادل وضعیتی ایجاد می‌گردد که از مشخصه‌های ویژه‌ی بیماری پارکینسون است (۱). عوامل متعددی مانند استرس اکسیداتیو و نیتروزاتیو، اختلال در عملکرد میتوکندری، آپوپتوز، التهاب و سموم در بروز این بیماری دخالت دارند (۵-۲).

مطالعات نشان داده‌اند که از بین عوامل پیش‌گفته، استرس اکسیداتیو نقش کلیدی در دژنراسیون نورون‌های دوپامینرژیک در بیماری پارکینسون دارد (۶). آسیب پذیری بالای سلول‌های دوپامینرژیک جسم سیاه در برابر استرس اکسیداتیو، به دلیل داشتن محتوای قابل اکسید شدن (دوپامین، اسیدهای چرب غیر اشباع و آهن) و محتوای آنتی‌اکسیدانی به نسبت پایین آن می‌باشد (۷). علاوه بر این، استرس اکسیداتیو موجب اختلال در عملکرد میتوکندری می‌شود که به دنبال آن کاهش خروجی انرژی این اندامک به طور غیر مستقیم و تحریک مسیرهای آپوپتوز به طور مستقیم، منجر به مرگ سلول‌های دوپامینرژیک در بخش متراکم جسم سیاه می‌گردد (۹-۸). چندین مدل حیوانی بیماری پارکینسون از جمله مدل ناشی از نوروتوکسین ۶- هیدروکسی دوپامین، می‌تواند در رسیدن به درک مکانیسم‌های دخیل در پاتوژنز این بیماری سودمند باشد.

مطالعات نشان می‌دهند که نوروتوکسیسیتی ۶- هیدروکسی دوپامین ناشی از اکسیداسیون این ماده و تولید رادیکال‌های آزاد سمی است که این خود نقش اساسی در دژنراسیون سیستم دوپامینی نیگرواستریاتال ایفا می‌کند (۱۱-۱۰).

اگر چه پیشرفت‌های زیادی در درمان بیماری پارکینسون صورت گرفته است، اما اکثر داروهای مورد استفاده تنها کنترل کننده‌ی علایم بیماری می‌باشند و توقف و یا تأخیر در انحطاط نورون‌های دوپامینرژیک ایجاد نمی‌کنند (۱۲). علاوه بر این، گزارش شده است که متابولیسم بالای دوپامین به واسطه‌ی درمان با عوامل جایگزین کننده‌ی دوپامین مانند لوودوپا، می‌تواند منجر به افزایش استرس اکسیداتیو و در نتیجه سرعت بخشیدن به دژنراسیون سلول‌های دوپامینرژیک در بیماران مبتلا به پارکینسون گردد (۱۳). بر این اساس، رویکردهای درمانی جدید با عوامل آنتی‌اکسیدان در جهت کاهش اثرات منفی استرس اکسیداتیو و رادیکال‌های آزاد در این بیماری مطرح می‌باشند.

کاروتنوئیدها از جمله آنتی‌اکسیدان‌های بیولوژیک هستند که با محافظت سلول‌ها و بافت‌ها، از اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد، نقش مهمی در سلامت انسان ایفا می‌کنند (۱۴). کروسین جزء فعال گیاه زعفران و یک کاروتنوئید محلول در آب است (۱۵) و دارای خواص فارماکولوژیک متعددی همچون حفاظت در برابر بیماری‌های قلبی- عروقی (۱۶)، مهار تکثیر سلول‌های سرطانی (۱۷)، محافظت نورونی (۲۰-۱۸)، محافظت کبد و کلیه در دیابت (۲۱)، اثرات ضد التهابی (۲۲) و بهبود حافظه می‌باشد (۲۳، ۲۰).

همچنین، گزارش شده است که کروسین آسیب اکسیداتیو را در هموژنات‌های کلیه (۲۴) و عضله‌ی اسکلتی در جریان ایسکمی ری پرفیوژن مهار می‌کند (۲۵). علاوه بر این، اثرات آنتی‌اکسیدانی و پاک کنندگی رادیکال‌های آزاد توسط کروسین در چندین مطالعه‌ی برون‌تنی نیز گزارش شده است (۲۷-۲۶).

در همین راستا، مطالعه‌ی حاضر جهت بررسی اثر نوروپروتکتیو کروسین در مدل تجربی بیماری پارکینسون با سنجش رفتار چرخشی و آسیب اکسیداتیو در ناحیه‌ی استریاتوم طراحی و اجرا گردید.

روش‌ها

در این مطالعه‌ی تجربی از تعداد ۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده‌ی وزنی ۳۰۰-۲۵۰ گرم استفاده شد. حیوانات از انستیتو پاستور تهران خریداری شدند و در محل نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تحت شرایط استاندارد دما (۲۲ ± ۲ °C)، سیکل روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته و دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. لازم به ذکر است که ملاحظات اخلاقی بر اساس پروتکل‌های نگهداری و کار با حیوانات آزمایشگاهی مورد تأیید این دانشگاه، در تمام مراحل رعایت شد.

در این مطالعه، حیوانات به طور تصادفی به ۴ گروه (n = ۸) تقسیم‌بندی شدند: ۱- گروه شم: تزریق سالین- آسکوربات به داخل باندل میانی مغز جلویی (MFB یا Medial forebrain bundle) و دریافت کننده‌ی سالین به صورت داخل صفاقی، ۲- گروه مبتلا به پارکینسون: ایجاد ضایعه با تزریق ۶- هیدروکسی دوپامین به داخل MFB و دریافت سالین به صورت داخل صفاقی، ۳ و ۴- گروه‌های مبتلا به پارکینسون تیمار شده با کروسین: ایجاد ضایعه با تزریق ۶- هیدروکسی دوپامین به داخل MFB و دریافت کروسین به صورت داخل صفاقی با دوزهای ۳۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم. تزریق داخل صفاقی کروسین و یا سالین در حیوانات مورد آزمایش از ۳ روز قبل از جراحی به مدت ۶ هفته و به صورت روزانه انجام شد.

جهت القای بیماری پارکینسون، از نوروتوکسین ۶- هیدروکسی دوپامین به عنوان یک مدل رایج شناخته شده در اکثر گونه‌های جوندگان استفاده شد (۱۰). به این منظور، هر یک از حیوانات پس از بیهوشی با تزریق داخل صفاقی کلرال هیدرات (۴۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در دستگاه استریوتاکس (Stoelting, USA) قرار گرفتند. تزریق یک‌طرفه‌ی ۶- هیدروکسی دوپامین در سمت چپ MFB با مختصات ۴/۵- میلی‌متر قدامی- خلفی، ۱/۷ میلی‌متر جانبی و ۸/۲ میلی‌متر شکمی نسبت به سخت شامه (۲۸) با سرعت ۱ میکرولیتر در دقیقه با استفاده از پمپ میکرواینجکشن (Kd Scientific, USA) انجام شد.

در پایان تزریق، به منظور جلوگیری از بازگشت مجدد مایع به داخل سرنگ و انتشار بهتر آن در داخل MFB، سرسوزن به مدت ۵ دقیقه در جای خود باقی ماند. سپس با سرعت ۱ میلی‌متر در دقیقه خارج گردید. حیوانات گروه مبتلا به پارکینسون مقدار ۱۶ میکروگرم ۶- هیدروکسی دوپامین در ۴ میکرولیتر محلول سالین- آسکوربات ۰/۲ درصد دریافت نمودند. علاوه بر این، به حیوانات گروه شم، به همان حجم، سالین آسکوربات تزریق شد.

رفتار چرخشی حیوانات با تزریق آپومورفین

(۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی) در انتهای هفته‌های ۲، ۴ و ۶ سنجش شد. به این منظور، حیوانات به یک محفظه‌ی شیشه‌ای (۵۰ × ۲۸ × ۲۸ سانتی‌متر مکعب) جهت آشنایی به مدت ۱۰ دقیقه منتقل شدند. یک دقیقه پس از تزریق آپومورفین، هر حیوان به مدت ۱ ساعت داخل محفظه‌ی شیشه‌ای قرار داده شد و تعداد چرخش‌ها در فواصل ۱۰ دقیقه‌ای در شرایط آرام شمارش گردید. در پایان، تعداد خالص چرخش‌ها به صورت تفاضل تعداد کل چرخش‌ها به سمت ناحیه‌ی آسیب از تعداد کل چرخش‌ها در خلاف جهت ناحیه‌ی آسیب محاسبه گردید (۲۹).

آنالیز بیوشیمیایی: در انتهای آزمایش، حیوانات بیهوش شدند و سر آن‌ها توسط گیوتین جدا شد. پس از خارج کردن کامل مغز از جمجمه، به سرعت استریاتوم مغز هر حیوان جدا شد و تا انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی در دمای ^{o}C ۸۰- نگهداری شد. در زمان آزمایش، نمونه‌ها در محلول سالین ۰/۹ درصد هموژن گردیدند.

میزان لیپید پراکسیداسیون با اندازه‌گیری مالون دی‌آلدئید که آخرین محصول پراکسیداسیون لیپیدی است، سنجش شد. مالون دی‌آلدئید با تیوباربیتوریک اسید به عنوان TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) واکنش می‌دهد و یک مجموعه‌ی رنگی قرمز با حداکثر جذب در طول موج ۵۳۲ نانومتر را تولید می‌نماید. به طور خلاصه، ۲ میلی‌لیتر از مخلوط تیوباربیتوریک اسید، تری کلرواستیک اسید و اسید کلریدریک به ۱ میلی‌لیتر از هموژن بافتی در یک لوله‌ی سانتریفوژ اضافه شد و به مدت ۴۵ دقیقه در حمام آب جوش حرارت داده شد. پس از خنک شدن، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور g × ۱۰۰۰ سانتریفوژ شدند. لایه‌ی رنگی شفاف هر یک از نمونه‌ها به کووت منتقل گردید و جذب آن (A) در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان TBARS با استفاده از فرمول $(M) = A/ 1/65 \times 10^{5}$ C محاسبه گردید (۳۰).

اندازه‌گیری میزان نیتریت- متابولیت پایدار NO- بر اساس واکنش Griess انجام شد. به این ترتیب که حجم برابری از نمونه‌های هموژن شده با محلول سولفانیل آمید مخلوط شدند. سولفانیل آمید به صورت مخلوطی از سولفانیل آمید ۱ درصد و اسید فسفریک ۵ درصد تهیه شده بود. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند و سپس محلول Naphthyl ethylene diamine ۰/۱ درصد به مخلوط اضافه گردید و بار دیگر انکوبه شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد و در پایان، با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت نیتریت هر یک از نمونه‌ها محاسبه گردید.

داده‌ها به صورت میانگین ± خطای معیار بیان شد و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۰ (version 20, SPSS Inc., Chicago, IL)و آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA یا One-way analysis of variance) و آزمون تعقیبی Tukey آنالیز شد. $P < ۰/۰۵۰$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

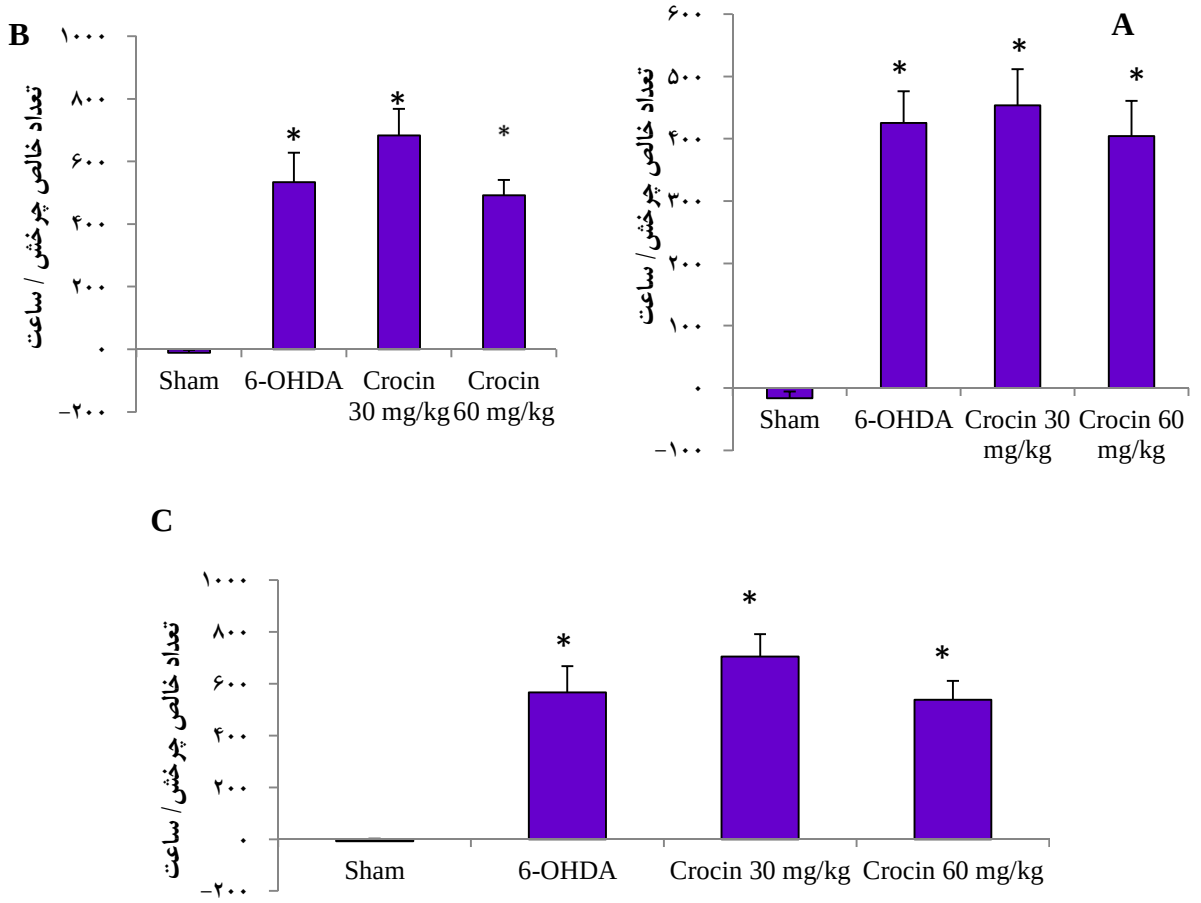
رفتار چرخشی

در پایان هفته‌ی ۲ تعداد کل چرخش‌ها پس از تزریق آپومورفین در حیوانات مبتلا به پارکینسون در مقایسه با حیوانات گروه شم، به طور معنی‌داری ($P < ۰/۰۰۱$)

افزایش یافت (شکل ۱، A). در بررسی یافته‌ها در انتهای هفته‌های ۴ و ۶ همچنان افزایش معنی‌داری ($P < ۰/۰۰۱$) در تعداد کل چرخش‌ها در گروه‌های مبتلا به پارکینسون در مقایسه با گروه شم مشاهده گردید (شکل ۱، B و C). تزریق داخل صفاقی کروسین به حیوانات مبتلا به پارکینسون با دوزهای ۳۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در پایان هفته‌های ۲، ۴ و ۶ تغییر معنی‌داری در تعداد کل چرخش‌ها نسبت به گروه مبتلا به پارکینسون ایجاد نکرد (شکل ۱).

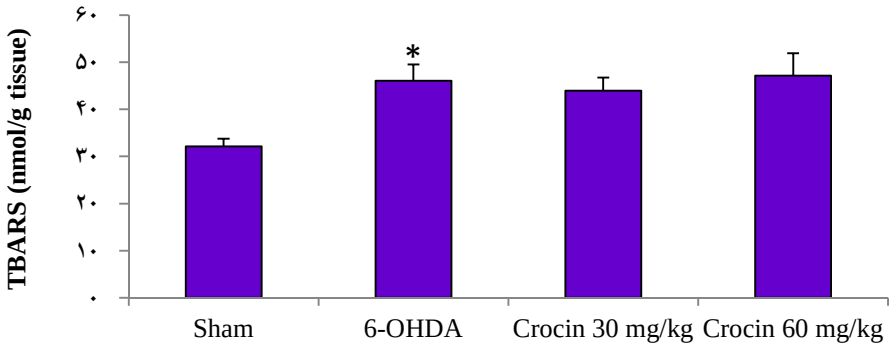
پراکسیداسیون لیپیدی در استریاتوم

نتایج به دست آمده در پایان هفته‌ی ۶ نشان داد که میزان TBARS در ناحیه‌ی استریاتوم مغز حیوانات گروه مبتلا به پارکینسون در مقایسه با حیوانات گروه شم به صورت معنی‌داری ($P < ۰/۰۵۰$) افزایش یافت. تیمار با کروسین با دوزهای ۳۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تغییری در میزان TBARS استریاتوم مغز این حیوانات نسبت به حیوانات گروه مبتلا به پارکینسون ایجاد نکرد (شکل ۲).



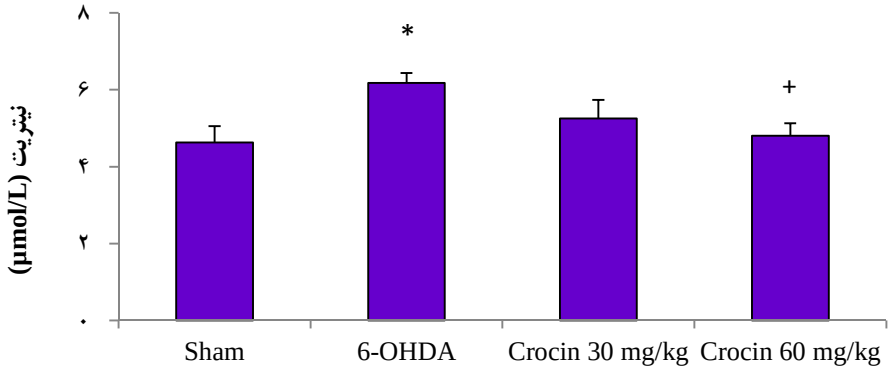
شکل ۱. مقایسه‌ی تعداد خالص چرخش‌های القا شده توسط آپومورفین در گروه‌های شم، مبتلا به پارکینسون و مبتلا به پارکینسون تیمار شده با کروسین در دوزهای ۳۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در پایان هفته‌های ۲ (A)، ۴ (B) و ۶ (C) آزمایش. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شدند و آنالیز آماری با استفاده از آزمون One-way ANOVA (One-way analysis of variance) و آزمون تعقیبی Tukey صورت گرفت ($^{*}P < ۰/۰۰۱$ در مقایسه با گروه شم، $n = ۸$).

6OHDA: 6-Hydroxy-dopamine



شکل ۲. مقایسه‌ی میزان TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) در ناحیه‌ی استریاتوم مغز حیوانات گروه‌های شم، مبتلا به پارکینسون و مبتلا به پارکینسون تیمار شده با کروسین در دوزهای ۳۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در پایان هفته‌ی ۶ آزمایش. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شدند و آنالیز آماری با استفاده از آزمون One-way ANOVA (One-way analysis of variance) و آزمون تعقیبی Tukey صورت گرفت ($P^{*} < ۰/۰۵۰$ در مقایسه با گروه شم، $n = ۸$).

6OHDA: 6-Hydroxy-dopamine



شکل ۳. مقایسه‌ی میزان نیتریت در ناحیه‌ی استریاتوم مغز حیوانات گروه‌های شم، مبتلا به پارکینسون و مبتلا به پارکینسون تیمار شده با کروسین در دوزهای ۳۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در پایان هفته‌ی ۶ آزمایش. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شدند و آنالیز آماری با استفاده از آزمون One-way ANOVA (One-way analysis of variance) و آزمون تعقیبی Tukey صورت گرفت ($P^{*} < ۰/۰۵۰$ در مقایسه با گروه شم و $P^{+} < ۰/۰۵۰$ در مقایسه با گروه مبتلا به پارکینسون، $n = ۸$).

6OHDA: 6-Hydroxy-dopamine

میزان نیتریت استریاتوم

میزان نیتریت در ناحیه‌ی استریاتوم مغز حیوانات گروه مبتلا به پارکینسون در مقایسه با حیوانات گروه شم، به طور معنی‌داری ($P < ۰/۰۵۰$) افزایش یافت. تیمار حیوانات مبتلا به پارکینسون با کروسین با دوز ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، تغییری در میزان نیتریت استریاتوم نسبت به گروه مبتلا به پارکینسون ایجاد نکرد؛ اما تیمار با کروسین با دوز ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم میزان نیتریت استریاتوم را در مقایسه با گروه مبتلا به پارکینسون به طور معنی‌داری ($P < ۰/۰۵۰$) کاهش داد (شکل ۳).

بحث

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که تزریق داخل صفاقی کروسین با دوزهای ۳۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به حیوانات مبتلا به پارکینسون تغییری در رفتار چرخشی و نیز میزان TBARS در ناحیه‌ی استریاتوم ایجاد نکرد؛ در حالی که تیمار با کروسین با دوز ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم میزان نیتریت استریاتوم را به صورت معنی‌داری کاهش داد.

در این مطالعه، اثر کروسین بر پارامترهای رفتاری و بیوشیمیایی با استفاده از مدل ۶- هیدروکسی دوپامین ارزیابی گردید. چون این مدل ویژگی‌های پاتولوژیک و بیوشیمیایی بیماری پارکینسون مانند استرس اکسیداتیو، اختلال عملکرد میتوکندری و آپوپتوز را به خوبی تقلید می‌کند (۳۱). آسیب یک‌طرفه‌ی سیستم دوپامینرژیک نیگرواستریاتال به دنبال تزریق ۶- هیدروکسی دوپامین به داخل MFB، موجب کاهش آزادسازی دوپامین در استریاتوم می‌گردد و به دنبال آن، تعداد گیرنده‌های پس‌سیناپسی دوپامین در سمت ضایعه به شکل جبرانی افزایش می‌یابد. این تغییرات، یک نامتقارنی در حرکت حیوان ایجاد می‌کند که با آگونیست‌های دوپامینی مانند آپومورفین قابل ارزیابی می‌باشد؛ به طوری که پس از تزریق آپومورفین، حیوان در جهت عکس ضایعه شروع به چرخش می‌کند (۱۰). این چرخش‌ها، معیار قابل قبولی برای کاهش میزان دوپامین سیستم نیگرواستریاتال به شمار می‌رود (۳۲) و این حالت، وقتی اتفاق می‌افتد که بیش از ۷۴ درصد نورون‌های مسیر دوپامینرژیک نیگرواستریال آسیب دیده باشند (۳۳).

در مطالعه‌ی حاضر نیز تزریق آپومورفین به حیوانات مبتلا به پارکینسون موجب افزایش چرخش حیوان به سمت مقابل ضایعه گردید. اما تزریق کروسین با دوزهای ۳۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۶ هفته، تغییری در رفتار چرخشی در حیوانات مبتلا به پارکینسون ایجاد نکرد و در واقع، نتوانست از آسیب مسیر دوپامینرژیک نیگرواستریال جلوگیری کند یا آسیب آن را کاهش دهد. با توجه به بررسی‌های انجام شده، به نظر می‌رسد این اولین مطالعه‌ای بود که اثر کروسین بر پارامترهای رفتاری و بیوشیمیایی را در مدل تجربی بیماری پارکینسون مورد بررسی قرار داد.

اما شواهد متعددی نشان می‌دهند که استرس اکسیداتیو نقش کلیدی در دژنراسیون نورون‌های دوپامینرژیک سیستم نیگرواستریاتال ایفا می‌کند (۶). گزارش شده است که در بیماری پارکینسون اتواکسیداسیون دوپامین و همچنین، متابولیسم آنزیمی دوپامین که توسط آنزیم منو آمین اکسیداز B انجام می‌شود، موجب تولید گونه‌های اکسیژن فعال می‌گردد (۷). علاوه بر این، رسوب آهن و پراکسیداسیون لیپیدی القا شده به وسیله‌ی رادیکال‌های آزاد، منجر به آسیب اکسیداتیو در سلول‌های دوپامینرژیک سیستم نیگرواستریاتال می‌گردد (۳۵-۳۴). در شرایط فیزیولوژیک، غلظت‌های پایینی از پراکسیداسیون لیپیدی در بافت‌ها یافت می‌شود، اما در شرایط بیماری، میزان پراکسیداسیون لیپیدی در جسم سیاه و استریاتوم مغز بیماران مبتلا به پارکینسون و در نمونه‌های حیوانی افزایش می‌یابد (۳۷-۳۶). در مدل تجربی بیماری پارکینسون نیز تزریق ۶- هیدروکسی دوپامین، با تولید رادیکال‌های هیدروکسیل در جریان اتوکسیداسیون و با مهار کمپلکس I میتوکندریایی، منجر به آسیب اکسیداتیو در این سلول‌های

دوپامینرژیکی می‌گردد (۳۸). در این مطالعه نیز افزایش میزان TBARS (شاخص پراکسیداسیون لیپیدی) در ناحیه‌ی استریاتوم مغز حیوانات مبتلا به پارکینسون مشاهده شد که در راستای مطالعات قبلی می‌باشد. همچنین، یافته‌های مطالعه‌ی حاضر نشان داد که تیمار با کروسین در دوزهای ۳۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۶ هفته، میزان TBARS را در ناحیه‌ی استریاتوم کاهش نداد. این نتایج بر خلاف مطالعات قبلی است که اثرات مفید آنتی‌اکسیدان‌ها را در مدل‌های ۶- هیدروکسی دوپامین بیماری پارکینسون گزارش کردند (۴۱-۳۹).

علاوه بر این، اثرات آنتی اکسیدانی کروسین در گذشته در مدل‌های مختلفی گزارش شده است. به عنوان مثال، نتایج مطالعه رجائی و همکاران نشان داد که کروسین، آسیب اکسیداتیو کبد و کلیه را در مدل دیابت ناشی از استرپتوزوتوسین کاهش می‌دهد که به صورت کاهش میزان TBARS و افزایش میزان گروه‌های تام‌تیول در این بافت‌ها مشخص بود (۲۱).

همچنین، گزارش شده است که کروسین میزان لیپید پراکسیداسیون را در هموژنات‌های کلیه و عضله‌ی اسکلتی در مدل ایسکمی ری‌پرفیوژن کاهش می‌دهد (۲۵-۲۴). علاوه بر این، خواص آنتی‌اکسیدانی و پاک کنندگی رادیکال‌های آزاد کروسین در مطالعات برون‌تنی هم گزارش شده است (۲۷-۲۶). اما نتایج مطالعه‌ی حاضر، اثر نوروپروتکتیو کروسین را در مدل ۶- هیدروکسی دوپامین بیماری پارکینسون تأیید نکرد. دلیل این اختلاف، بین نتایج پژوهش حاضر و سایر مطالعات مشخص نیست، اما علت آن می‌تواند مربوط به دوز کروسین باشد.

مطالعات نشان می‌دهد که ضایعه‌ی ایجاد شده در سیستم نیگرواستریاتال با تزریق ۶- هیدروکسی دوپامین به داخل MFB، به طور تقریبی کامل است؛ به طوری که تنها تعداد کمی از نورون‌های دوپامینرژیک در بخش متراکم جسم سیاه زنده باقی می‌مانند و بیش از ۹۵ درصد محتوی دوپامینی در استریاتوم کاهش می‌یابد (۱۰). از این رو، به نظر می‌رسد که دوز کروسین به کار رفته در این پژوهش، به عنوان یک آنتی‌اکسیدان جهت جلوگیری و یا کاهش آسیب نورون‌های دوپامینرژیک نیگرواستریاتال در مدل پیشرفته‌ی این بیماری، جوابگوی شدت بیماری القا شده نبوده است.

اما در عین حال، مطالعات نشان می‌دهند که بیماری پارکینسون یک بیماری چند عاملی است و استرس نیتروزاتیو علاوه بر استرس اکسیداتیو در پاتوژنز آن نقش دارد (۴۲، ۵). در بیماری پارکینسون، بیان آنزیم نیتریک اکسید سنتتاز در سلول‌های گلیال ناحیه‌ی استریاتوم و جسم سیاه به مقدار زیادی افزایش می‌یابد. وجود رادیکال آزاد در این ناحیه، باعث تبدیل نیتریک اکسید به پراکسی نیتریت می‌شود که بسیار واکنش پذیر با لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA است و از این طریق، باعث تخریب نورون‌ها می‌گردد (۴۲). نیتریک اکسید، ماهیت بی‌ثباتی دارد و می‌تواند به نیتریت، پراکسی نیتریت و دیگر گونه‌های نیتروژن فعال تبدیل شود. این عوامل، موجب استرس نیتروزاتیو در سیستم نیگرواستریاتال و تخریب نورون‌های این ناحیه می‌گردند (۴۳).

مطالعات تجربی بر روی بیماری پارکینسون نشان داده‌اند که میزان نیتریت در مغز میانی و استریاتوم در حیوانات مبتلا به پارکینسون افزایش می‌یابد (۴۵-۴۴). در مطالعه‌ی حاضر، به دنبال تزریق

۶- هیدروکسی دوپامین، میزان نیتریت در استریاتوم مغز حیوانات گروه مبتلا به پارکینسون نسبت به حیوانات گروه شم افزایش یافت که با نتایج مطالعات پیشین مطابقت دارد. علاوه بر این، نتایج نشان داد که تزریق داخل صفاقی کروسین با دوز ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۶ هفته، میزان نیتریت در ناحیه‌ی استریاتوم مغز حیوانات مبتلا به پارکینسون را کاهش داد که می‌تواند نشان دهنده‌ی اثر کروسین در پیشگیری از آسیب نیتروزاتیو در این بیماری باشد.

نتیجه‌گیری

در مجموع به نظر می‌رسد کروسین با دوز ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، در پیشگیری از آسیب نیتروزاتیو در ناحیه‌ی استریاتوم در مدل تجربی بیماری پارکینسون مؤثر باشد. با این حال، اثر قابل توجهی بر بهبود رفتار چرخشی و آسیب اکسیداتیو ندارد. پیشنهاد می‌شود جهت رسیدن به اثرات سودمند کروسین در محافظت نورون‌ها در بیماری پارکینسون، اثر دوزهای بالاتر کروسین بر پارامترهای رفتاری، بیوشیمیایی و هیستولوژیک در مدل تجربی بیماری پارکینسون بررسی گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد مریم حسینی به شماره‌ی ۳۹۳۴۴۰ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد. بدین وسیله مراتب سپاسگزاری از مسؤولین این دانشگاه اعلام می‌گردد.

References

1. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. Neuron 2003; 39(6): 889-909.
2. Olanow CW. The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease--2007. Mov Disord 2007; 22(Suppl 17): S335-S342.
3. Abou-Sleiman PM, Muqit MM, Wood NW. Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. Nat Rev Neurosci 2006; 7(3): 207-19.
4. Tansey MG, McCoy MK, Frank-Cannon TC. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. Exp Neurol 2007; 208(1): 1-25.
5. Tsang AH, Chung KK. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. Biochim Biophys Acta 2009; 1792(7): 643-50.
6. Dias V, Junn E, Mouradian MM. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. J Parkinsons Dis 2013; 3(4): 461-91.
7. Semchuk KM, Love EJ, Lee RG. Parkinson's disease: a test of the multifactorial etiologic hypothesis. Neurology 1993; 43(6): 1173-80.
8. Schapira AH. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. Adv Neurol 1993; 60: 288-91.
9. Lin TK, Cheng CH, Chen SD, Liou CW, Huang CR, Chuang YC. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress promote apoptotic cell death in the striatum via cytochrome c/caspase-3 signaling cascade following chronic rotenone intoxication in rats. Int J Mol Sci 2012; 13(7): 8722-39.
10. Deumens R, Blokland A, Prickaerts J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. Exp Neurol 2002; 175(2): 303-17.
11. Truong L, Allbutt H, Kassiou M, Henderson JM. Developing a preclinical model of Parkinson's disease: a study of behaviour in rats with graded 6-OHDA lesions. Behav Brain Res 2006; 169(1): 1-9.
12. Prasad KN, Cole WC, Kumar B. Multiple antioxidants in the prevention and treatment of Parkinson's disease. J Am Coll Nutr 1999; 18(5): 413-23.
13. Kostrzewa RM, Kostrzewa JP, Brus R. Neuroprotective and neurotoxic roles of levodopa (L-DOPA) in neurodegenerative disorders relating to Parkinson's disease. Amino Acids 2002; 23(1-3): 57-63.
14. Jomova K, Valko M. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other

biological antioxidants. Eur J Med Chem 2013; 70: 102-10.
15. Rios JL, Recio MC, Giner RM, Manez S. An update review of saffron and its active constituents. Phytother Res 1996; 10(3): 189-93.
16. He SY, Qian ZY, Tang FT, Wen N, Xu GL, Sheng L. Effect of crocin on experimental atherosclerosis in quails and its mechanisms. Life Sci 2005; 77(8): 907-21.
17. Magesh V, Singh JP, Selvendiran K, Ekambaram G, Sakthisekaran D. Antitumour activity of crocetin in accordance to tumor incidence, antioxidant status, drug metabolizing enzymes and histopathological studies. Mol Cell Biochem 2006; 287(1-2): 127-35.
18. Zheng YQ, Liu JX, Wang JN, Xu L. Effects of crocin on reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to cerebral microvessels after global cerebral ischemia. Brain Res 2007; 1138: 86-94.
19. Ochiai T, Shimeno H, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Tanaka H, et al. Protective effects of carotenoids from saffron on neuronal injury in vitro and in vivo. Biochim Biophys Acta 2007; 1770(4): 578-84.
20. Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR, Ghaeni FA, Motamedshariaty VS, Mohajeri SA. Effects of saffron (Crocus sativus L.) and its active constituent, crocin, on recognition and spatial memory after chronic cerebral hypoperfusion in rats. Phytother Res 2012; 26(3): 381-6.
21. Rajaei Z, Hadjzadeh MA, Nemati H, Hosseini M, Ahmadi M, Shafiee S. Antihyperglycemic and antioxidant activity of crocin in streptozotocin-induced diabetic rats. J Med Food 2013; 16(3): 206-10.
22. Tamaddonfard E, Farshid AA, Eghdami K, Samadi F, Erfanparast A. Comparison of the effects of crocin, safranal and diclofenac on local inflammation and inflammatory pain responses induced by carrageenan in rats. Pharmacol Rep 2013; 65(5): 1272-80.
23. Naghizadeh B, Mansouri MT, Ghorbanzadeh B, Farbood Y, Sarkaki A. Protective effects of oral crocin against intracerebroventricular streptozotocin-induced spatial memory deficit and oxidative stress in rats. Phytomedicine 2013; 20(6): 537-42.
24. Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR, Ziaee T, Danaee A. Protective effect of aqueous saffron extract (Crocus sativus L.) and crocin, its active constituent, on renal ischemia-reperfusion-induced oxidative damage in rats. J Pharm Pharm Sci 2005; 8(3): 387-93.
25. Hosseinzadeh H, Modaghegh MH, Saffari Z. Crocus sativus L. (Saffron) extract and its active constituents (crocin and safranal) on ischemia-reperfusion in rat skeletal muscle. Evid Based Complement Alternat Med 2009; 6(3): 343-50.
26. Chen Y, Zhang H, Tian X, Zhao C, Cai L, Liu Y, et al. Antioxidant potential of crocins and ethanol extracts of Gardenia jasminoides ELLIS and Crocus sativus L.: A relationship investigation between antioxidant activity and crocin contents. Food Chemistry 2008; 109(3): 484-92.
27. Mousavi SH, Tayarani NZ, Parsaee H. Protective effect of saffron extract and crocin on reactive oxygen species-mediated high glucose-induced toxicity in PC12 cells. Cell Mol Neurobiol 2010; 30(2): 185-91.
28. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5th ed. London, UK: Academic Press; 2005.
29. Fujita M, Nishino H, Kumazaki M, Shimada S, Tohyama M, Nishimura T. Expression of dopamine transporter mRNA and its binding site in fetal nigral cells transplanted into the striatum of 6-OHDA lesioned rat. Brain Res Mol Brain Res 1996; 39(1-2): 127-36.
30. Sharma JB, Sharma A, Bahadur A, Vimala N, Satyam A, Mittal S. Oxidative stress markers and antioxidant levels in normal pregnancy and pre-eclampsia. Int J Gynaecol Obstet 2006; 94(1): 23-7.
31. Ungerstedt U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. Eur J Pharmacol 1968; 5(1): 107-10.
32. Shapiro RM, Glick SD, Camarota NA. A two-population model of rat rotational behavior: effects of unilateral nigrostriatal 6-hydroxydopamine on striatal neurochemistry and amphetamine-induced rotation. Brain Res 1987; 426(2): 323-31.
33. Schwarting 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): 275-331.
34. Wypijewska A, Galazka-Friedman J, Bauminger ER, Wszolek ZK, Schweitzer KJ, Dickson DW, et al. Iron and reactive oxygen species activity in parkinsonian substantia nigra. Parkinsonism Relat Disord 2010; 16(5): 329-33.
35. Dexter DT, Holley AE, Flitter WD, Slater TF, Wells FR, Daniel SE, et al. Increased levels of lipid hydroperoxides in the parkinsonian substantia nigra: an HPLC and ESR study. Mov Disord 1994; 9(1): 92-7.
36. Venkateshappa C, Harish G, Mythri RB, Mahadevan A, Bharath MM, Shankar SK. Increased oxidative damage and decreased antioxidant function in aging human substantia nigra compared to striatum: implications for

Parkinson's disease. Neurochem Res 2012; 37(2): 358-69.
37. Esposito E, Rotilio D, Di M, V, Di GC, Cacchio M, Algeri S. A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. Neurobiol Aging 2002; 23(5): 719-35.
38. Glinka YY, Youdim MB. Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. Eur J Pharmacol 1995; 292(3-4): 329-32.
39. Roghani M, Niknam A, Jalali-Nadoushan MR, Kiasalari Z, Khalili M, Baluchnejadmojarad T. Oral pelargonidin exerts dose-dependent neuroprotection in 6-hydroxydopamine rat model of hemi-parkinsonism. Brain Res Bull 2010; 82(5-6): 279-83.
40. Mansouri MT, Farbood Y, Sameri MJ, Sarkaki A, Naghizadeh B, Rafeirad M. Neuroprotective effects of oral gallic acid against oxidative stress induced by 6-hydroxydopamine in rats. Food Chem 2013; 138(2-3): 1028-33.
41. Khan MM, Ahmad A, Ishrat T, Khan MB, Hoda MN, Khuwaja G, et al. Resveratrol attenuates 6-hydroxydopamine-induced oxidative damage and dopamine depletion in rat model of Parkinson's disease. Brain Res 2010; 1328: 139-51.
42. Li M, Dai FR, Du XP, Yang QD, Chen Y. Neuroprotection by silencing iNOS expression in a 6-OHDA model of Parkinson's disease. J Mol Neurosci 2012; 48(1): 225-33.
43. Reynolds MR, Berry RW, Binder LI. Nitration in neurodegeneration: deciphering the "Hows" "nYs". Biochemistry 2007; 46(25): 7325-36.
44. Jalali-Nadoushan M, Roghani M. Alpha-lipoic acid protects against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in a rat model of hemi-parkinsonism. Brain Res 2013; 1505: 68-74.
45. Guo S, Yan J, Yang T, Yang X, Bezard E, Zhao B. Protective effects of green tea polyphenols in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease through inhibition of ROS-NO pathway. Biol Psychiatry 2007; 62(12): 1353-62.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 13.03.2015
Vol. 33, No. 336, 4th Week, July 2015
Accepted: 08.06.2015

Effects of Crocin on Rotational Behavior, Lipid Peroxidation and Nitrite Levels in Rat's Brain Striatum in an Experimental Model of Parkinson's Disease

Maryam Hosseini[1], Ziba Rajaei PhD[2], Hojjatallah Alaei PhD [3]

Original Article

Abstract

Background: Degeneration of the nigrostriatal dopaminergic system is the pathologic hallmark of Parkinson's disease (PD), which leads to movement disorders. Compelling evidence implicates that oxidative stress plays an important role in degeneration of dopaminergic neurons in the disease. The aim of this study was to investigate the neuroprotective effect of crocin, a potent antioxidant in saffron, in an experimental model of Parkinson's disease in rat.

Methods: 32 adult male Wistar rats were randomly divided into 4 groups of 8 including sham, parkinsonian and parkinsonian treated with crocin at doses of 30 and 60 mg/kg. 6-hydroxydopamine (6-OHDA) (16 µg in 0.2% ascorbate-saline) was infused into the left medial forebrain bundle. Crocin was injected intraperitoneally from 3 days before the surgery until 6 weeks. Rats were tested for rotational behavior by injection of apomorphine hydrochloride (2 mg/kg, intraperitoneally) at the weeks 2, 4 and 6. Malondialdehyde and nitrite levels were measured in the striatum at the end of the week 6.

Findings: The apomorphine-induced contralateral body rotations were highly significant in parkinsonian group at the end of the weeks 2, 4 and 6 compared to the sham group ($P < 0.001$). Treatment of parkinsonian rats with crocin at the doses of 30 and 60 mg/kg did not change the rotations compared to the parkinsonian group. Malondialdehyde and nitrite levels in the striatum were significantly increased in parkinsonian group compared to the sham group ($P < 0.050$). Treatment of parkinsonian rats with crocin at a dose of 60 mg/kg significantly decreased the nitrite levels in the striatum compared to the parkinsonian rats ($P < 0.05$). However, treatment with crocin had no effect on malondialdehyde levels in the striatum.

Conclusion: According to the present study, it seems that crocin at a dose of 60 mg/kg is effective on preventing the nitrosative stress in an experimental model of Parkinson's disease. However, crocin has no effect on improvement of rotational behavior and oxidative damage.

Keywords: Crocin, 6-hydroxydopamine (6-OHDA), Oxidative damage, Rotational behavior, Parkinson's disease

Citation: Hosseini M, Rajaei Z, Alaei H. **Effects of Crocin on Rotational Behavior, Lipid Peroxidation and Nitrite Levels in Rat's Brain Striatum in an Experimental Model of Parkinson's Disease.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(336): 780-91

1- MSc Student, Department of Physiology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Associate Professor, Department of Physiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Professor, Neuroscience Research Center AND Department of Physiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Ziba Rajaei PhD, Email: rajaeiz@med.mui.ac.ir