● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیست‌ودوم، شمارهٔ ۴، ص ۳۵۴-۳۴۱، ۱۳۹۴

مقالهٔ پژوهشی

اثر حفاظتی تجویز خوراکی کریاتین در برابر توکسیسیتی ۶- هیدروکسی دوپامین در مدل تجربی بیماری پارکینسون

رضا صداقت[۱]، مهرداد روغنی[۲*]، سمیه جلیلی[۳]

خلاصه

مقدمه: با توجه به خاصیت حفاظت عصبی کریاتین در برخی بیماری‌های عصبی مانند ایسکمی مغزی، هدف مطالعه حاضر بررسی اثر سودمند این ماده در مدل تجربی بیماری پارکینسون بود. علاوه بر این، نقش استرس اکسیداتیو در این رابطه مورد بررسی قرار گرفت.

روش: در این مطالعه تحقیقاتی از نوع تجربی، ۴۰ سر موش صحرایی نر به پنج گروه شم، شم تحت تیمار با دوز بالای کریاتین، ضایعه دیده و دو گروه ضایعه دیده تحت درمان با دوز پایین یا بالای کریاتین تقسیم شدند. مدل اولیه بیماری پارکینسون توسط تزریق ۱۲/۵ میکروگرم ۶- هیدروکسی دوپامین حل شده در محلول سالین آسکوربات به داخل نئواستریاتوم طرف چپ ایجاد گردید. گروه‌های شم و ضایعه دیده تحت درمان از روز قبل از انجام عمل جراحی استریوتاکسیک، روزانه ۱۰۰ یا ۲۰۰ میلی‌گرم دارو را در دو نوبت با فاصله زمانی ۲۴ ساعت به روش خوراکی دریافت کردند. در پایان کار، رفتار چرخشی به دنبال تزریق آپومورفین و تعداد نورون‌های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه (Substantia nigra pars compacta یا SNC) مورد شمارش قرار گرفت. همچنین میزان مالون دی‌آلدئید (Malondialdehyde یا MDA) در هموژنه مغز میانی به عنوان مارکر استرس اکسیداتیو سنجش شد.

یافته‌ها: در هفته دوم بعد از جراحی در گروه ضایعه دیده، آپومورفین موجب بروز رفتار چرخشی به سمت مقابل ناحیه آسیب دیده شد ($P < ۰/۰۰۱$) و تعداد نورون‌های بخش متراکم جسم سیاه سمت چپ کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه شم نشان داد ($P < ۰/۰۱۰$). تجویز کریاتین به گروه‌های ضایعه دیده موجب کاهش وابسته به دوز تعداد چرخش‌های القا شده به وسیله آپومورفین شد ($P < ۰/۰۵۰$ و $P < ۰/۰۱۰$) و از کاهش نورون‌های بخش متراکم جسم سیاه در دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در گروه ضایعه دیده جلوگیری نمود ($P < ۰/۰۵۰$). همچنین تجویز کریاتین موجب کاهش معنی‌دار سطح MDA در گروه‌های ضایعه دیده و تحت تیمار با کریاتین گردید ($P < ۰/۰۵۰$).

نتیجه‌گیری: تجویز خوراکی کریاتین به صورت پیش درمان دارای اثر حفاظتی در برابر توکسیسیتی ۶- هیدروکسی دوپامین در مدل تجربی بیماری پارکینسون است که با کاهش رفتار چرخشی و جلوگیری از کاهش نورونی خود را نشان می‌دهد و بخشی از اثر سودمند آن از طریق کاهش دادن استرس اکسیداتیو انجام می‌شود.

واژه‌های کلیدی: کریاتین، بیماری پارکینسون، ۶- هیدروکسی دوپامین، رفتار چرخشی، استرس اکسیداتیو

۱- استادیار، گروه پاتولوژی و علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران ۲- استاد، مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران ۳- دانش‌آموخته پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

* نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک: mehjour@yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۷/۱۳ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۳/۶/۱ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۸/۲۵

مقدمه

بیماری پارکینسون یک اختلال تخریب کننده عصبی و از نوع پیش‌رونده محسوب می‌شود که پس از بیماری آلزایمر، شایع‌ترین بیماری نورودژنراتیو به شمار می‌رود (۱) و یک نفر از ۱۰۰۰ نفر جمعیت و ۳-۱ درصد از افراد بالاتر از ۶۰ سال را درگیر می‌نماید (۲). در این بیماری تراکم نورون‌های دوپامینرژیک فعال واقع در جسم سیاه مغز میانی و میزان دوپامین آزاد شده در بافت استریاتوم پشتی کاهش می‌یابد (۳). علایم اصلی این بیماری شامل لرزش در حالت استراحت، سختی عضلانی، عدم حرکت (Akinesia) و عدم تعادل حرکتی است و با پیشرفت بیماری نورون‌های نورآدرنرژیک هسته لوکوس سرولئوس (Nucleus locus seruleus یا NLS) نیز درگیر می‌شود که در دراز مدت با علایمی مانند زوال مغزی و افسردگی خود را نشان می‌دهد (۴). گرچه مکانیسم دقیق مرگ سلول‌های جسم سیاه در بیماری پارکینسون هنوز ناشناخته باقی مانده است، اما شواهد زیادی برای نقش استرس اکسیداتیو مطرح می‌باشد. هنوز اقدام درمانی مؤثری جهت توقف نورودژنراسیون در این بیماران در دسترس نیست (۳، ۱).

برای کاهش ناخوشی و مرگ و میر در بیماران مبتلا به پارکینسون، درمان آن در سه دهه اخیر بر مصرف الدوپا (لوودوپا) به عنوان درمان جایگزین دوپامین کاهش یافته در استریاتوم متمرکز شده است. هر چند ناتوانی در انجام حرکات ارادی (Dyskinesia) و اثرات روانی زیادی همچون آژیتاسیون (بی‌قراری روانی)، توهم بینایی، جنون، پارانوئید و... در درمان طولانی مدت با لوودوپا مشاهده می‌شود. علاوه بر این، احتمال این که لوودوپا سرعت پیشرفت بیماری را زیاد کند، وجود دارد (۵). آگونیست‌های جدیدتر دوپامین نیز به دلیل شیوع عوارض حرکتی کمتر به عنوان درمان‌های انفرادی پارکینسون معرفی شده‌اند؛ چرا که پاسخ‌های آنتی‌پارکینسونی را بهبود می‌بخشند، اما مصرف آن‌ها حرکات غیر ارادی را افزایش می‌دهد (۶).

با توجه به افزایش دانش بشری در مورد مکانیسم‌های پاتوژنیک این بیماری، نیاز برای یافتن ترکیبات مؤثرتر و با عوارض جانبی کمتر در درمان آن به ویژه در مراحل اولیه پیشرفت احساس می‌شود. شواهد تحقیقات زیادی مبنی بر نقش مهم استرس اکسیداتیو در بیماری‌زایی پارکینسون وجود دارد (۸، ۷). بر این اساس، داروهای دارای خاصیت کاهش دهندگی استرس اکسیداتیو می‌توانند در جلوگیری از پیشرفت بیماری پارکینسون مؤثر باشند. کریاتین به عنوان یک ماده که در متابولیسم مواد غذایی و بازسازی ذخایر انرژی داخل سلول نقش مهمی به عهده دارد، دارای خاصیت کاهش دهندگی استرس اکسیداتیو است و به عنوان یک عامل حفاظت کننده عصبی در بیماری‌های عصبی عمل می‌نماید. علاوه بر این، نقش سودمند آن در حفاظت نورون‌های دوپامینرژیک در حالت برون‌تن مورد اثبات قرار گرفته است (۱۱-۹).

مطالعه Klivenyi و همکاران نشان داد که استفاده از کریاتین اثر محافظت کننده عصبی در برابر آسیب ناشی از سم متیل فنیل تتراهیدروپیریدین دارد (۱۲). همچنین مشخص شده است که مصرف کریاتین موجب افزایش شانس بقای نورون‌های دوپامینرژیک به دنبال آسیب شیمیایی می‌گردد (۹). Lensman و همکاران در مطالعه خود گزارش کردند که استفاده از کریاتین قبل از ایسکمی مغزی دارای اثر محافظت کننده می‌باشد (۱۳).

هدف این تحقیق، بررسی اثر حفاظتی تجویز کریاتین در موش‌های صحرایی نیمه پارکینسونی بود تا بتواند به عنوان یک پیش درمان جهت پیشگیری از ابتلا یا پیشرفت بیماری پارکینسون راه‌گشا باشد.

روش بررسی

پژوهش حاضر بر روی ۴۰ سر موش صحرایی نر نـژاد ویستار (انستیتو پاستور، کرج) انجام گردید. مـوش‌هـا در محدوده وزنی ۲۴۵-۲۰۰ گرم قرار داشتند. هر سه یا چهـار موش در یک قفس و در شرایط کنترل شده از نظر دمـا و نور با دسترسی آزاد به آب و غذا در اتاق حیوانات به مدت یک هفته قبل از شروع آزمایش‌هـا نگهـداری شـدند. در بررسی حاضر از موش‌هایی استفاده شد که رفتار چرخشـی یک طرفه (چرخش‌های کامـل بیشـتر از ۳۰ بـار در هـر ساعت) را به دنبال تزریق داخل صفاقی (Intraprotaneal یا IP) آپومورفین (سیگما آلدریچ، آلمان) به میزان ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم نشان نمی‌دادند.

حیوانات به صورت تصادفی به گروه‌های زیـر تقسـیم شدند:

۱- **گروه شـم**: این گروه تحـت تغذیـه گـاواژ (تغذیـه خوراکی) حلال کریاتین [کروموفـور (سـیگما آلـدریچ، آمریکا)] قرار گرفتند. این ماده در دو نوبت با فاصله زمانی ۲۴ ساعت به حیوانات خورانده شد. نوبت دوم گاواژ یـک ساعت قبل از جراحی بود. حین جراحی، ۵ میکرولیتر سالین آسکوربات در استریاتوم سمت چپ تزریـق گردیـد. ۲- گروه شم + کریاتین ۲۰۰ میلی‌گرم: این گروه مورد گاواژ کریاتین به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم بـه ازای وزن بـدن قـرار گرفتند. این ماده در دو نوبت با فاصله زمانی ۲۴ ساعت بـه حیوانات خورانده شد. نوبت دوم گاواژ یک ساعت قبـل از جراحی صورت گرفت. حین جراحی ۵ میکرولیتر سـالین اسکوربات در استریاتوم سمت چپ تزریق شد. ۳- گـروه ضایعه دیده: این گروه مورد گاواژ حلال داروی کریـاتین قرار گرفتند. این حلال در دو نوبت بـا فاصـله زمـانی ۲۴ ساعت به حیوانات خورانده شد. نوبـت دوم گـاواژ یـک ساعت قبـل از جراحـی بـود. حـین جراحـی نیـز ۱۲/۵ میکروگرم نوروتوکسین ۶- هیدروکسی دوپامین (سـیگما آلدریچ، آمریکا) حل شده در سالین آسکوربات به میزان ۵ میکرولیتر در استریاتوم سمت چپ تزریق گردید (گـاواژ حلال + تزریق نوروتوکسین). ۴- گروه درمان با کریاتین ۱۰۰ میلی‌گرم: ایـن گـروه تحـت تغذیـه گـاواژ داروی کریاتین (سیگما آلدریچ، آلمان) به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای وزن بدن قرار گرفتند. کریاتین در دو نوبت با فاصـله زمانی ۲۴ ساعت به حیوانات خورانده شد. نوبت دوم گاواژ یک ساعت قبل از جراحی صورت گرفت. حین جراحی، ۵ میکرولیتـر نوروتوکسـین ۶- هیدروکسـی دوپـامین در استریاتوم سمت چپ تزریـق شـد. ۵- گـروه درمـان بـا کریاتین ۲۰۰ میلی‌گرم: این گـروه تحـت گـاواژ داروی کریاتین به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم بـه ازای وزن بـدن قـرار گرفتند. کریاتین در دو نوبت با فاصله زمانی ۲۴ ساعت به حیوانات خورانده شد. نوبت دوم گاواژ یک ساعت قبـل از جراحی بود. حین جراحی نیز ۵ میکرولیتر نوروتوکسین ۶- هیدروکسی دوپامین در اسـتریاتوم سـمت چـپ تزریـق گردید. دوز کریاتین بر اساس دو مطالعـه قبلـی (۱۳، ۱۲) انتخاب گردید شده بود.

موش‌ها دارای چرخش کمتـر از ۳۰ دور کامـل (۳۶۰ درجه) در ساعت به دنبال تجویز داخل صفاقی آپومـورفین هیدروکلراید (شرکت سـیگما) بـا دوز ۲ میلـی‌گـرم بـر کیلوگرم انتخاب و بررسی شدند.

ارزیابی رفتاری قبل از آزمایش: بررسی رفتاری با تجویز ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم داروی آپومورفین هیدروکلرایـد بـه شکل داخل صفاقی توسط سرنگ انسولین یک هفته قبل از جراحی اولیه موش‌ها صورت گرفت و ۱۰ دقیقـه قبـل از انجام آزمایش در محفظه استوانه‌ای با قطر ۳۵ سانتی‌متـر و ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر نگهداری شدند. پـس از تزریـق دارو، تعداد چرخش کامـل ۳۶۰ درجـه در فواصـل زمـانی ۱۰ دقیقه‌ای به مدت ۶۰ دقیقه به صورت دستی انـدازه‌گیـری گردید. موش‌ها در مدت آزمایش تنهـا بـه آب دسترسـی

داشتند. تعداد چرخش‌ها به سمت مخالف محل ضایعه (سمت راست) به عنوان عدد مثبت و چرخش به سمت محل ضایعه (سمت چپ) به عنوان عدد منفی در نظر گرفته شد. تعداد خالص چرخش پس از تفاضل چرخش‌ها در دو جهت محاسبه گردید. این ارزیابی رفتاری دوباره در هفته دوم پس از ایجاد ضایعه و قبل از بیهوش کردن حیوان، جهت انجام پرفیوژن و خارج ساختن مغز برای هر موش انجام شد و تحلیل رفتاری پس از محاسبه آماری به صورت رفتار چرخش القا شده بر اثر آپومورفین، قبل و بعد از جراحی ارایه گردید.

جراحی استریوتاکسیک: موش‌ها توسط تزریق داخل صفاقی مخلوطی از ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کتامین و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گزیلازین بیهوش شدند. سپس در دستگاه استریوتاکس با مختصات تنظیم شده قرار گرفتند. مختصات دستگاه برای ایجاد ضایعه بر روی ۳ میلی‌متر لترال به سمت چپ، ۴/۵ میلی‌متر از سطح سخت شامه و ۰/۲ میلی‌متر قدامی- خلفی نسبت به برگما تنظیم شد. همچنین میله دندانی ۳/۳ میلی‌متر زیر سطح افق قرار گرفت. برای انجام جراحی و یافتن مختصات و سایر مراحل مانند شمارش نورونی و... قبل از انجام اعمال یاد شده از اطلس Paxinos و Watson استفاده گردید (۱۴).

قبل از ثابت کردن سر حیوان در دستگاه، موهای سرش تراشیده شد تا پوست سر در معرض دید کامل قرار گیرد. سپس حیوان در دستگاه ثابت گردید و بعد از ضد عفونی کردن محل جراحی با بتادین، به وسیله تیغ جراحی شکافی موازی با سطح ساژیتال از محل فاصله بین چشم‌ها تا ناحیه فاصله بین گوش‌ها ایجاد گردید، پوست سر و عضلات و ماهیچه‌های ظریف به آرامی کنار زده شد. با پیدا کردن مختصات، استخوان محل تزریق توسط دریل مخصوص با سرعت پایین به منظور جلوگیری از آسیب بافت مغز سوراخ گردید. آن‌گاه با نمایان شدن سطح سخت شامه، تزریق به وسیله سرنگ هامیلتون ۱۰ میکرولیتری صورت گرفت.

مطالعات بافتی: پس از انجام آزمون‌های رفتاری و در پایان کار، بررسی‌های بافتی به ترتیب زیر در مورد نیمی از موش‌ها در هر گروه صورت گرفت: پرفیوژن ترانس کاردیال موش‌ها توسط مخلوط گزیلازین و کتامین به طور عمیق بیهوش گردید. پس از برداشتن پوست و جدار قدامی قفسه سینه، شریان آئورت نزولی کلمپ شد تا محلول ثابت کننده فقط در قسمت‌های بالایی بدن موش جریان یابد. سپس دو واحد سرنگ انسولین هپارین ۱ درصد به بطن چپ موش‌ها تزریق و کانول ست پرفیوژن به بطن چپ وارد گردید و ابتدا ۱۰۰ سی‌سی محلول نرمال سالین و سپس ۲۰۰-۱۰۰ سی‌سی محلول پارافرمالدئید ۴ درصد تزریق شد. با پاره کردن همزمان دهلیز راست، خروج خون و محلول اضافی ادامه یافت. پس از خارج نمودن مغز از جمجمه، به مدت ۳-۲ روز در محلول ثابت کننده به عنوان پست فیکس قرار گرفت.

برشگیری: با استفاده از دستگاه میکروتوم فریزینگ (لایکا، آلمان) برش‌هایی به ضخامت ۳۰ میکرون تهیه شد و در ظرف حاوی بافر فسفات ۰/۱ مولار و pH = ۷/۴ قرار گرفت. سپس به کمک قلموی نازک و ظریف بر روی لام‌های ژلاتینه قرار داده شد و پس از خشک شدن، رنگ‌آمیزی Nissl با استفاده از رنگ Cresyl violet ۰/۱ درصد بر روی آن‌ها انجام شد.

شمارش نورونی بخش متراکم جسم سیاه: برای شمارش نورونی در مورد هر موش، برش‌های مغز میانی مورد بررسی قرار گرفت. نورون‌های واقع در بخش متراکم جسم سیاه در برش‌های منطبق با چهار سطح ۲/۹۶، ۳/۲، ۳/۷ و ۴/۲ اطلس Paxinos و Watson، نسبت به مرکز خط اینتراورال با بزرگنمایی X200 شمارش شد. در هر سطح از چهار سطح ذکر شده، شمارش برای حداقل دو برش انجام گرفت.

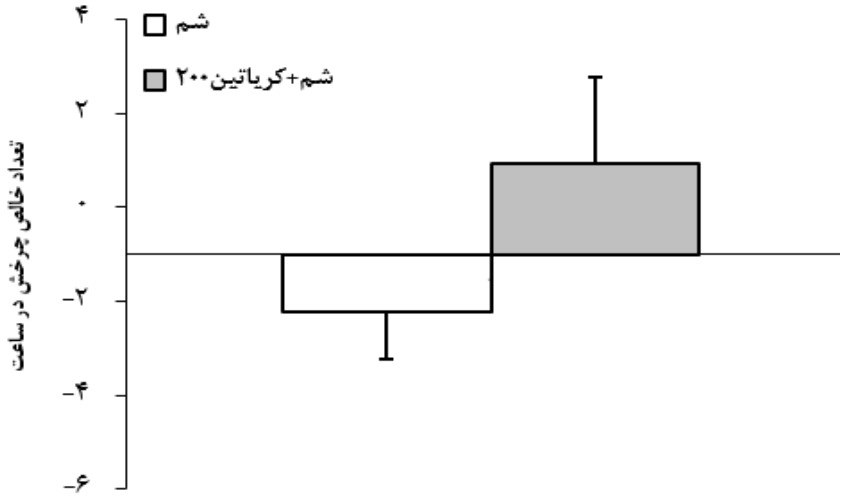
نورون‌های دوپامینرژیک با محدوده سیتوپلاسمی واضح شمارش و مطالعات میکروسکوپی به وسیله عکسبرداری از لام‌ها با بزرگنمایی X200 انجام گردید. در انتها اعداد به دست آمده از شمارش نقاط مشخص شده به عنوان تعداد نورون‌های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه گزارش گردید.

سنجش مالون دی‌آلدئید (Malondialdehyde یا MDA) بافتی: برای این منظور، بافت مغز میانی جدا و پس از شستشو با محلول سالین سرد و خشک، به سرعت توزین شد. سپس بافت جداگانه به همراه بافر تریس به مدت ۲ دقیقه با دستگاه هموژنایزر و با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه هموژنیزه (۵ درصد) و محلول حاصل شده، سانتریفوژ گردید. برای جلوگیری از تخریب آنزیم‌ها و پروتئین‌ها، تمام مراحل گفته شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (سانتریفوژ یخچال‌دار) انجام گرفت. پس از انجام سانتریفوژ، محلول رویی شفاف از بقیه محلول جدا و بخش زیرین رسوب کرده دور ریخته شد و از محلول شفاف رویی برای سنجش استفاده گردید. اندازه‌گیری سطح MDA بر اساس روش استاندارد و واکنش تیوباربیتوریک اسید صورت گرفت که در دمای جوش قرار داشت. جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. منحنی استاندارد نیز بر اساس رقت‌های تتراتوکسی پروپان تهیه گردید و جذب‌های نوری به دست آمده از نمونه‌ها بر روی منحنی استاندارد تطبیق داده شد.

همه داده‌ها به صورت میانگین و انحراف معیار بیان و در مورد نتایج حاصل از بررسی رفتار چرخش القا شده توسط آپومورفین، از آزمون پارامتریک ANOVA استفاده شد. آزمون ANOVA در مورد نتایج حاصل از شمارش نورونی و استرس اکسیداتیو و آزمون تعقیبی Tukey در صورت وجود اختلاف معنی‌دار مورد استفاده قرار گرفت. تحلیل آماری داده‌ها در برنامه سیگما استات نسخه ۳/۵ (نسخه ۲۰۰۶) و رسم نمودارها در برنامه Excel (نسخه ۲۰۰۳) انجام گردید. $P < ۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری برای همه داده‌ها در نظر گرفته شد.

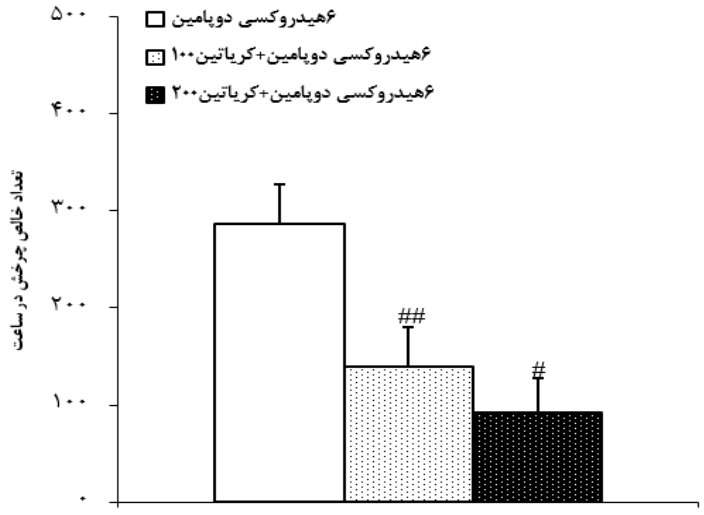
نتایج

شکل ۱ نتایج حاصل از بررسی رفتار چرخشی القا شده توسط آپومورفین (۲ میلی‌گرم به ازای وزن) به صورت داخل صفاقی در دو گروه شم و شم تیمار شده با کریاتین به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم به ازای وزن در هفته دوم پس از جراحی را نشان می‌دهد. تعداد خالص چرخش در گروه شم، منفی (چرخش به سمت ضایعه) و در گروه شم تیمار شده با کریاتین به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم به ازای وزن، مثبت (چرخش به سمت مقابل) به دست آمد. این چرخش‌ها کمتر از ۱۰ دور در دقیقه بود و تفاوت معنی‌داری بین دو گروه یافت نشد.



شکل ۱. *بررسی رفتار چرخشی القا شده توسط آپومورفین در دو گروه شم و شم تیمار شده با کریاتین (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)*

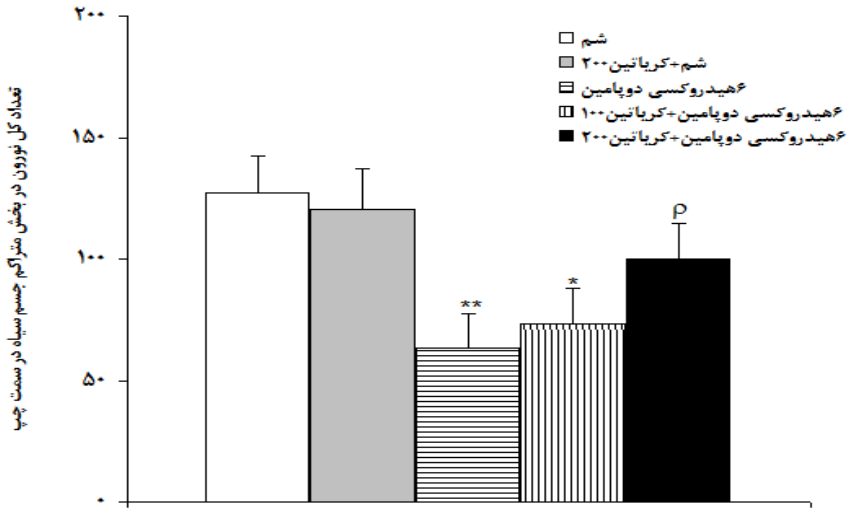
نتایج حاصل از بررسی رفتار چرخشی القا شده توسط آپومورفین (۲ میلی گرم به ازای وزن) به صورت داخل صفاقی در گروه ضایعه دیده و گروه‌های ضایعه دیده و تیمار شده با کریاتین به میزان ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم در هفته دوم پس از جراحی در شکل ۲ نشان داده شده است. موش‌های گروه ضایعه دیده چرخش بارز و زیادی به سمت مقابل داشتند که این خود نشان دهنده ایجاد مدل پارکینسون در این بررسی می‌باشد. علاوه بر این، تیمار موش‌های ضایعه دیده با کریاتین ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم موجب کاهش معنی‌دار و وابسته به دوز تعداد خالص چرخش‌ها گردید (به ترتیب $P < ۰/۰۵$ و $P < ۰/۰۱$).



شکل ۲. *بررسی رفتار چرخشی القا شده توسط آپومورفین در گروه ضایعه دیده و دو گروه ضایعه دیده و تیمار شده با کریاتین (۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)*

$^{\#}$معنی‌داری در سطح $P < ۰/۰۵$ و $^{\#\#}$معنی‌داری در سطح ۰/۰۱

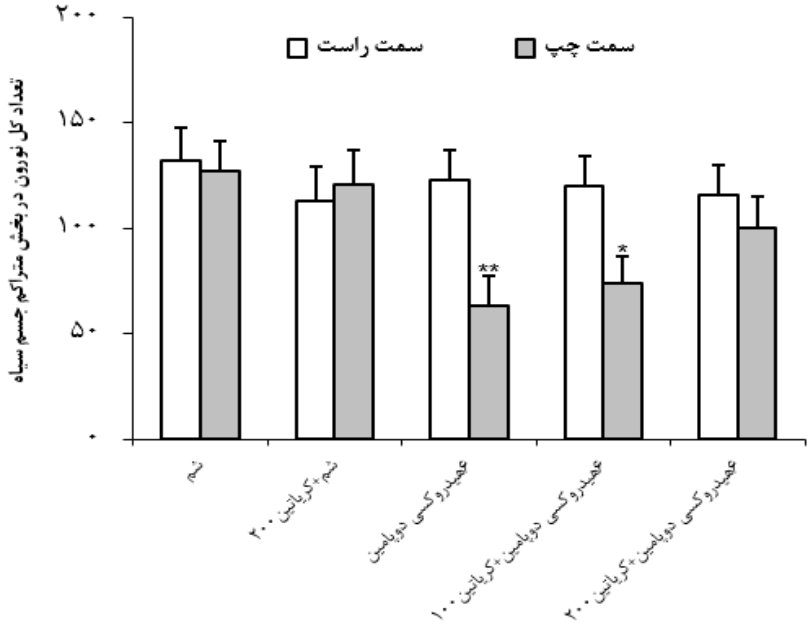
در خصوص شمارش نورونی بخش متراکم جسم سیاه، تیمار موش‌های گروه شم با دوز بالای کریاتین (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) از نظر آماری تغییر محسوس و معنی‌داری در مقایسه با گروه شم ایجاد نکرد. در گروه ضایعه دیده کاهش بارز و معنی‌داری در مقایسه با گروه شم مشاهده شد ($P < ۰/۰۵$). علاوه بر این، تیمار موش‌های ضایعه دیده و تحت تیمار با دوز پایین کریاتین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) نیز نتوانست از این کاهش نورونی به طور بارز و معنی‌داری جلوگیری نماید و همچنان در این گروه کاهش معنی‌دار نورونی در مقایسه با گروه شم وجود داشت ($P < ۰/۰۵$). از طرف دیگر، پیش درمان با دوز بالای کریاتین (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) موجب شد کاهش نورونی در گروه ضایعه دیده کمتر باشد؛ به گونه‌ای که در این گروه تعداد نورون‌های دوپامینرژیک در مقایسه با گروه ضایعه دیده به طور معنی‌داری بیشتر بود ($P < ۰/۰۵$) (شکل ۳).



شکل ۳. *میانگین تعداد نورون‌های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه در سمت چپ مغز میانی در گروه‌های مختلف*

*معنی‌داری در سطح $P < ۰/۰۵$ و **معنی‌داری در سطح $P < ۰/۰۱$ (در مقایسه با گروه شم)؛ $P < ۰/۰۵$ (در مقایسه با گروه ضایعه دیده)

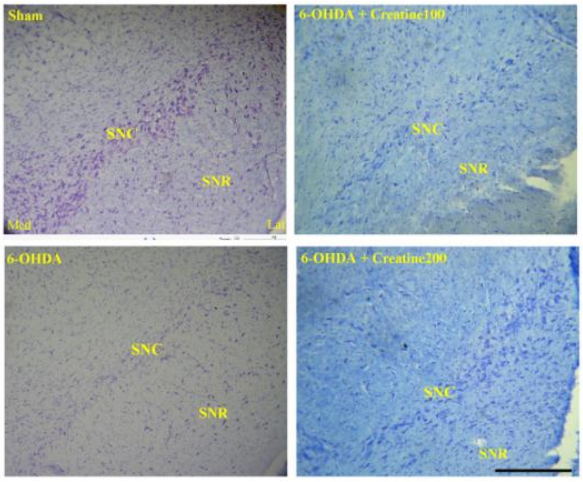
در بررسی حاضر تعداد نورون‌های دوپامینرژیک دو سمت چپ و راست جسم سیاه در گروه‌های مختلف مورد مقایسه قرار گرفت که نتایج آن در شکل ۴ آمده است. در این رابطه تفاوت مشهود و معنی‌داری بین دو سمت چپ و راست در دو گروه شم و شم تیمار شده با دوز بالای کریاتین مشاهده نشد. در گروه ضایعه دیده با نوروتوکسین ۶- هیدروکسی دوپامین، کاهش بارز و معنی‌دار تعداد نورون‌های دوپامینرژیک در سمت چپ در مقایسه با سمت راست وجود داشت ($P < ۰/۰۱$). این کاهش نورونی در گروه ضایعه دیده و تحت تیمار با دوز پایین کریاتین کمتر بود، هرچند در مقایسه با گروه ضایعه دیده به طور معنی‌داری افزایش نداشت و در مقایسه با سمت راست همان گروه همچنان کاهش محسوس و معنی‌داری مشاهده شد ($P < ۰/۰۵$). از طرف دیگر، پیش درمان با دوز بالای کریاتین (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) موجب شد کاهش نورونی در سمت چپ ناحیه جسم سیاه گروه ضایعه دیده کمتر باشد؛ به طوری که در این گروه تعداد نورون‌های دوپامینرژیک در مقایسه با گروه ضایعه دیده بیشتر بود ($P < ۰/۰۵$) و در مقایسه با سمت راست کاهش بارز و معنی‌داری نشان نداد.



شکل ٤. *میانگین تعداد نورون‌های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه در سمت چپ و راست مغز میانی در گروه‌های مختلف*

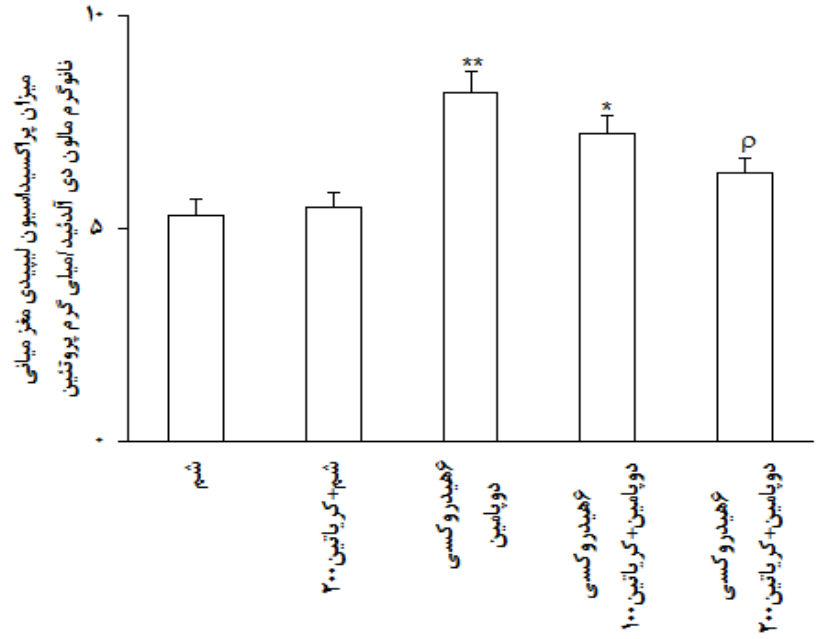
*معنی‌داری در سطح $P<0/05$ و **معنی‌داری در سطح $P<0/01$ (در مقایسه با سمت راست همان گروه)

شکل ۵ نمای میکروسکوپ نوری ناحیه مغز میانی رنگ‌آمیزی شده توسط رنگ Cresyl violet را در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است، در گروه شم نورون‌های بخش متراکم جسم سیاه در محدوده میانی- جنبی از سلامت ظاهری برخوردار بوده، تعداد آن‌ها در حد طبیعی می‌باشد. در مورد گروه ضایعه دیده با نوروتوکسین ۶- هیدروکسی دوپامین، کاهش شدید نورون‌های دوپامینرژیک تا حدودی در همه نواحی بخش متراکم جسم سیاه مشاهده شد که مؤید تحلیل رفتن نورون‌های این قسمت است. این کاهش نورونی در خصوص گروه ضایعه دیده با نوروتوکسین ۶- هیدروکسی دوپامین و تحت تیمار با کریاتین ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، به طور واضح کمتر بود.



شکل ۵. *نمای میکروسکوپ نوری از ناحیه مغز میانی گروه‌های مختلف (بار = ۲۵۰ میکرومتر)*

با اندازه‌گیری سطح MDA در گروه‌های مختلف مشخص شد که این شاخص در گروه شم تحت تیمار با کریاتین ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تغییر معنی‌داری نسبت به گروه شم نشان نمی‌دهد. سطح MDA در گروه ضایعه دیده افزایش قابل ملاحظه و معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نشان داد ($P < ۰/۰۱$) و میزان افزایش MDA در گروه‌های ضایعه دیده و تحت تیمار با کریاتین نسبت به گروه ضایعه دیده کمتر بود. علاوه بر این، سطح MDA در گروه‌های ضایعه دیده و تحت تیمار با کریاتین ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، به طور معنی‌داری کمتر از گروه ضایعه دیده بود ($P < ۰/۰۵$) (شکل ۶).



شکل ٦. *میزان MDA (Malondialdehyde) بافت مغز میانی در گروه‌های مختلف*

*معنی‌داری در سطح $P < ۰/۰۵$ و **معنی‌داری در سطح $P < ۰/۰۱$ (در مقایسه با گروه شم)؛ $P < ۰/۰۵$ (در مقایسه با گروه ضایعه دیده)

بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در هفته دوم بعد از جراحی در گروه ضایعه دیده، آپومورفین موجب بروز رفتار چرخشی بارز به سمت مقابل ناحیه آسیب دیده می‌شود. تعداد نورون‌های بخش متراکم جسم سیاه (Substantia nigra pars compacta یا SNC) سمت چپ کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه شم نشان داد و تجویز کریاتین به گروه‌های ضایعه دیده موجب کاهش وابسته به دوز تعداد چرخش‌های القا شده به وسیله آپومورفین می‌گردد و تجویز کریاتین، کاهش نورون‌های بخش متراکم جسم سیاه را فقط در دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در گروه ضایعه دیده کاهش می‌دهد. از طرف دیگر، تیمار گروه شم با دوز بالای کریاتین تأثیر معنی‌داری بر تعداد چرخش‌های القا شده به وسیله آپومورفین و تعداد نورون‌های بخش متراکم جسم سیاه نداشت. همچنین بخشی از اثر کریاتین از طریق کاهش سطح استرس اکسیداتیو در مغز میانی نشان داده شد.

برای ایجاد مدل تجربی بیماری پارکینسون از مواد و مکان‌های تزریق متفاوتی استفاده می‌شود و در تحقیق حاضر از ۶- هیدروکسی دوپامین استفاده شد. ۶-

هیدروکسی دوپامین به صورت یک طرفه در MFB (Medial forebrain bundle) و یا استریاتوم و یا گاهی به طور مستقیم در جسم سیاه تزریق می‌شود که به دنبال آن توسط نورون‌های دوپامینرژیکی (و سایر کاته کولامینرژیک) جذب انتخابی شده، باعث استرس اکسیداتیو و در نتیجه تخریب سلولی می‌گردد. میزان تخریب جسم سیاه وابسته به دوز است. مرگ سلولی در دو مرحله رخ می‌دهد. مرگ حاد از ۱۲ ساعت پس از تزریق صورت گرفته، تا حدود ۱۰-۷ روز پس از ایجاد ضایعه ادامه دارد. بیشترین مرگ سلولی ۶-۴ روز پس از ایجاد ضایعه ایجاد می‌شود. مرحله دوم که مرگ سلولی کمتر است تا ۳۰ روز پس از ایجاد ضایعه ادامه دارد. با این وجود زمان‌بندی بر اساس دوز است (۳).

تزریق ۶- هیدروکسی دوپامین به مایع مغزی نخاعی سبب تهی شدن نواحی متعدد مغز از دوپامین و نوروایی‌نفرین و متابولیت‌های آن‌ها و تزریق آن به بخش متراکم جسم سیاه سبب تخریب کامل جسم سلولی نورون‌ها در این ناحیه و متعاقب آن تهی شدن استریاتوم از دوپامین می‌شود (۱۶، ۱۵). تزریق دو طرفه درون بطنی سبب از بین رفتن بیش از ۹۵ درصد سلول‌های دوپامنرژیکی جسم سیاه مزانسفال، مشکل در خوردن و نوشیدن، بی‌حرکتی و در نهایت مرگ حیوان می‌شود (۱۵). در تحقیق حاضر از تخریب یک طرفه استریاتوم که اشکالی در خوردن و نوشیدن و سایر عادات حیوان ایجاد نمی‌کرد و میزان تخریب آن در حدی بود که اثرات حافظت نورونی آن قابل بررسی نباشد، استفاده گردید و به همین منظور نوروتوکسین ۶- هیدروکسی دوپامین به داخل استریاتوم چپ موش صحرایی تزریق شد. این نوروتوکسین با اثر سمی خود که مربوط به تولید رادیکال‌های وابسته به اکسیژن است، سبب تخریب پایانه‌های سلولی واقع در استریاتوم که جسم سلولی آن‌ها در بخش متراکم جسم سیاه واقع شده‌اند، می‌شود. به طور اختصاصی‌تر، خاصیت نوروتوکسیک کاتکول آمین به علت تولید رادیکال‌های سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های هیدروکسیل است. آنتی‌اکسیدانت‌ها با زدودن رادیکال‌های با پایه اکسیژن و پایدار کردن غشای سلولی علیه اثرات مخرب پراکسیداسیون لیپیدی، نقش مهمی در درمان بیماری پارکینسون ایفا می‌کنند (۲).

ایجاد مدل یک طرفه بیماری پارکینسون این اجازه را می‌دهد که به وسیله آگونیست‌های دوپامین مانند آپومورفین، حرکت چرخش حیوان به سمت مخالف ضایعه بررسی گردد. نتایج تحقیقات متعدد نشان داده است که بروز عدم تعادل در فعالیت نورونی دوپامینرژیک بین دو طرف، منجر به بروز عدم تقارن در رفتار حرکتی حیوان مبتلا می‌شود (۱). این عدم تقارن در موش‌های صحرایی به صورت چرخش حیوان به سمت دارای فعالیت دوپامینرژیکی کمتر نشان داده می‌شود. با تزریق یک طرفه به داخل استریاتوم موش صحرایی، بخش زیادی از نورون‌های دوپامینرژیک از بین رفته، در نتیجه سطح دوپامین در استریاتوم هم‌طرف با ضایعه کاهش می‌یابد. به دنبال تجویز سیستمیک آگونیست‌های دوپامینرژیک و با توجه به ماهیت دارو، رفتار چرخشی بارزی در حیوان پدیدار می‌گردد که آن را به طور کمی می‌توان اندازه‌گیری نمود.

با تخریب طرف چپ سیستم دوپامینرژیک نیگرواستریاتال، تراکم گیرنده‌های دوپامینرژیک واقع بر روی نورون‌های هدف استریاتال بیشتر می‌شود. به دنبال آسیب ناشی از ۶- هیدروکسی دوپامین، تراکم گیرنده‌های نوع D۲ افزایش می‌یابد؛ در حالی که تغییرات گیرنده نوع D۱ به خوبی مشخص نیست. به همین دلیل با تجویز داروهایی با اثر مستقیم و غیر انتخابی که به طور مستقیم بر روی گیرنده‌ها اثر می‌کنند، فعالیت حرکتی در سمت چپ نسبت به راست بیشتر می‌شود و در نتیجه حیوان به سمت

مقابل خواهد چرخید. ضایعه یک طرفه زواید نیگرواستریاتال به وسیله ۶- هیدروکسی دوپامین منجر به کاهش سلول‌های دوپامین در جسم سیاه از طریق انتقال رتروگراد آکسونی از پایانه‌های آن در استریاتوم به جسم سیاه می‌شود. این تغییرات سلولی در نورون‌ها منجر به ایجاد مدل پارکینسونی (مشابه آنچه در انسان است) می‌گردد.

تزریق درون استریاتوم ۶- هیدروکسی دوپامین سبب کاهش ۵۰ درصدی سلول‌ها در استریاتوم و جسم سیاه و کاهش ۱۰ درصدی سلول‌های VTA (Ventral tegmental area) می‌شود و این منطبق بر سایر مشاهداتی است که میزان تخریب به وسیله ۶- هیدروکسی دوپامین را بین ۶۰-۴۰ درصد پس از دو هفته بیان می‌کند (۱). کاهش سلولی حدود ۱۰ درصد در VTA تأیید کننده این نکته است که استطاله‌های دوپامینرژیکی از VTA به استریاتوم پشتی وارد می‌شوند. اطلاعات موجود بیانگر این نکته است که ارتباطی بین استطاله‌های نیگرواستریاتال دو طرف وجود دارد و این ارتباط کمتر از ۱۰ درصد الیاف نیگرواستریاتال است؛ چرا که در مطالعات نشان داده شده است که با تخریب یک طرفه استریاتوم، کاهش ۱۰-۷ درصدی در تعداد نورون‌های جسم سیاه طرف مقابل مشاهده می‌شود (۱۵). همان‌طور که پیش‌تر بیان شد، ۶- هیدروکسی دوپامین با ایجاد استرس اکسیداتیو سبب بروز بیماری پارکینسون می‌گردد.

گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species یا ROS) و رادیکال‌های آزاد مسبب بسیاری از بیماری‌ها و مسیرهای پاسخ سلولی هستند (۳). ارگانیسم‌های سلولی بسیاری از آنتی‌اکسیدانت‌های آندوژن مانند کاتالاز، SOD (Super oxide dismutase) و اوریک اسید را تولید می‌کنند. به علت عدم کفایت سیستم آنتی‌اکسیدان آندوژن، به تازگی آنتی‌اکسیدان‌های اگزوژن معرفی شده‌اند که از طریق مواد غذایی غنی و گیاهان تأمین می‌شوند. مطالعات اپیدمیولوژیک اثرات مفید مواد غذایی حاصل از گیاهان و میوه‌جات را در کاهش خطر ابتلا به بیماری‌ها به اثبات رسانده‌اند. از آسیب ناشی از ROS به دو روش جذب رادیکال‌های تولید شده در حین واکنش و جلوگیری از تولید رادیکال ممانعت می‌شود (۱۵).

در بررسی حاضر تجویز کریاتین موجب بهبود رفتار چرخشی و تعداد نورون‌های دوپامینرژیکی جسم سیاه در مدل تجربی بیماری پارکینسون گردید. در توجیه اثرات سودمند کریاتین مشخص شده است که این ماده می‌تواند سبب جلوگیری از صدمه به DNA (Deoxyribonucleic acid) توسط رادیکال OH شود (۱۷). در مطالعه Klivenyi و همکاران گزارش گردید که کریاتین دارای اثر حفاظت نورونی در برابر آسیب ناشی از MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) است. این اثر تا حدودی به علت برقرار شدن سطوح مناسب ATP/ADP (Adenosine triphosphate/Adenosine diphosphate) و فسفوکریاتین/کریاتین در بافت عصبی می‌باشد (۱۲).

Andres و همکاران در مطالعه خود با هدف بررسی اثر کریاتین بر بقای نورون‌های دوپامینرژیک در بافت مزانسفالی ونترال جنینی نشان داد که کریاتین به مدت ۷ روز موجب افزایش بقا و اندازه نورون‌های دوپامینرژیک می‌شود و حتی در برابر نوروتوکسین‌های موجود مانند یون ۱- متیل ۴- فنیل پیریدینیوم و یا ۶- هیدروکسی دوپامین اثر محافظت کننده دارد (۱۰) که این یافته در بررسی حاضر می‌تواند رخ داده باشد. همچنین اثر حفاظتی کریاتین در مطالعه Lensman و همکاران در مدل تجربی آسیب ایسکمیک مغزی در رت‌ها به اثبات رسیده است (۱۳). از طرف دیگر، این احتمال وجود دارد که بخشی از اثر سودمند کریاتین در بررسی حاضر به علت اثر آن در بهبود و برگشت سیستم‌های میانجی مرتبط با سیستم دوپامینرژیک به حالت طبیعی باشد و این امر می‌تواند بهبود رفتاری مشاهده شده در تحقیق حاضر را تا حدی توجیه

نماید که با مطالعه Valastro و همکاران بر روی اثر مکمل‌های خوراکی کریاتین بر دیس‌کنزیا ناشی از الدوپا در موش‌های صحرایی ضایعه دیده با ۶- هیدروکسی دوپامین همخوانی دارد (۹). البته نتایج مطالعه حاضر با مطالعه Pastula و همکاران (۱۵) با هدف اثر کریاتین در بیماری اسکلروز آمیوتروفیک جانبی (Amyotrophic lateral sclerosis یا ALS) همخوانی نداشت؛ چرا که این محققان ادعا نموده‌اند که کریاتین هیچ اثری بر بقا و عملکرد نورونی در بیماری‌های دارای ماهیت نورودژنراتیو ندارد.

نتیجه‌گیری

تجویز خوراکی کریاتین به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم قبل از تزریق داخل استریاتوم ۶- هیدروکسی دوپامین در مدل تجربی بیماری پارکینسون موجب کاهش شدت رفتار چرخشی و عدم تقارن حرکتی می‌شود و موجب حفاظت و جلوگیری از کاهش و آسیب نورون‌های دوپامینرژیک جسم سیاه می‌گردد.

References

1. Zbarsky V, Datla KP, Parkar S, Rai DK, Aruoma OI, Dexter DT. Neuroprotective properties of the natural phenolic antioxidants curcumin and naringenin but not quercetin and fisetin in a 6-OHDA model of Parkinson's disease. *Free Radic Res* 2005; 39(10): 1119-25.
2. Ward RJ, Lallemand F, de WP, Dexter DT. Neurochemical pathways involved in the protective effects of nicotine and ethanol in preventing the development of Parkinson's disease: potential targets for the development of new therapeutic agents. *Prog Neurobiol* 2008; 85(2): 135-47.
3. Yuan H, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y. Histological, behavioural and neurochemical evaluation of medial forebrain bundle and striatal 6-OHDA lesions as rat models of Parkinson's disease. *J Neurosci Methods* 2005; 144(1): 35-45.
4. Sawada M, Sawada H, Nagatsu T. Effects of aging on neuroprotective and neurotoxic properties of microglia in neurodegenerative diseases. *Neurodegener Dis* 2008; 5(3-4): 254-6.
5. Singh S, Ahmed R, Sagar RK, Krishana B. Neuroprotection of the nigrostriatal dopaminergic neurons by melatonin in hemiparkinsonium rat. *Indian J Med Res* 2006; 124(4): 419-26.
6. Rose S, Ramsay CN, Jenner P. The novel adenosine A2a antagonist ST1535 potentiates the effects of a threshold dose of L-dopa in unilaterally 6-OHDA-lesioned rats. *Brain Res* 2007; 1133(1): 110-4.
7. Hwang O. Role of oxidative Sstress in Parkinson's disease. *Exp Neurobiol* 2013; 22(1): 11-7.
8. Hipkiss AR. Aging, Proteotoxicity, Mitochondria, Glycation, NAD and Carnosine: Possible Inter-Relationships and Resolution of the Oxygen Paradox. *Front Aging Neurosci* 2010; 2: 10.
9. Valastro B, Dekundy A, Danysz W, Quack G. Oral creatine supplementation attenuates L-DOPA-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Behav Brain Res* 2009; 197(1): 90-6.

10. Andres RH, Huber AW, Schlattner U, Perez-Bouza A, Krebs SH, Seiler RW, et al. Effects of creatine treatment on the survival of dopaminergic neurons in cultured fetal ventral mesencephalic tissue. *Neuroscience* 2005; 133(3): 701-13.

11. Yang L, Calingasan NY, Wille EJ, Cormier K, Smith K, Ferrante RJ, et al. Combination therapy with coenzyme Q10 and creatine produces additive neuroprotective effects in models of Parkinson's and Huntington's diseases. *J Neurochem* 2009; 109(5): 1427-39.

12. Klivenyi P, Calingasan NY, Starkov A, Stavrovskaya IG, Kristal BS, Yang L, et al. Neuroprotective mechanisms of creatine occur in the absence of mitochondrial creatine kinase. *Neurobiol Dis* 2004; 15(3): 610-7.

13. Lensman M, Korzhevskii DE, Mourovets VO, Kostkin VB, Izvarina N, Perasso L, et al. Intracerebroventricular administration of creatine protects against damage by global cerebral ischemia in rat. *Brain Res* 2006; 1114(1): 187-94.

14. Paxinos G, Watson C. The part brain in stereotaxic coordinates. 2hd ed., San Diego, Academic press, 1986.

15. Pastula DM, Moore DH, Bedlack RS. Creatine for amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; (6): CD005225.

16. Gerlach M, Riederer P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *J Neural Transm* 1996; 103(8-9): 987-1041.

17. Cadet JL, Last R, Kostic V, Przedborski S, Jackson-Lewis V. Long-term behavioral and biochemical effects of 6-hydroxydopamine injections in rat caudate-putamen. *Brain Res Bull* 1991; 26(5): 707-13.

Neuroprotective Effect of Oral Administration of Creatine against 6-Hydroxydopamine Toxicity in Experimental Model of Parkinson's Disease

Reza Sedaghat, Ph.D.[1], Mehrdad Roghani, Ph.D.[2*], Somaye Jalili, M.D.[3]

1. Assistant Professor, Department of Anatomy & Pathology, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran
2. Professor, Neurophysiology Research center, Shahed University, Tehran, Iran
3. Medical graduate, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran

* Corresponding author; e-mail: mehjour@yahoo.com

(Received: 5 Oct. 2013 Accepted: 16 Nov. 2014)

Abstract

Background & Aims: With regard to the neuroprotective effect of creatine in some neurological disorders like cerebral ischemia, this study was conducted to evaluate the effect of creatine in an experimental model of Parkinson's disease (PD). Involvement of oxidative stress was also assessed.

Methods: In this experimental study, male rats (n = 40) were divided into 5 groups, i.e. sham-operated (SH), high dose creatine-treated sham-operated (Cr+SH), lesioned (L), and low- and high-dose creatine-treated lesioned (Cr100+L and Cr200+L) groups. The hemi-PD early model was induced by unilateral intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA, 12.5 µg/5 µl of saline-ascorbate; left side). The Cr+SH and Cr+L groups were pretreated by creatine at doses of 100 and/or 200 mg/kg per day before surgery two times at an interval of 24 hours. Finally, the animals were tested for rotational behavior by apomorphine and the number of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNC) was counted. Level of malondialdehyde (MDA), as a marker of oxidative stress, was also evaluated in midbrain homogenate.

Results:, Apomorphine caused a significant contralateral turning ($P < 0.001$) in 6-OHDA-lesioned group and a reduction in the number of neurons on the left side of the SNC in the L group was observed in comparison with SH group ($P < 0.010$) 2 weeks after surgery. Creatine pretreatment caused dose-dependent decrease the rotational behavior in lesioned rats ($P < 0.050$ and $P < 0.010$), and at a dose of 200 mg/kg significantly attenuated the reduction in the number of SNC neurons ($P < 0.050$). Creatine treatment of lesion groups also lowered MDA level at both doses ($P < 0.050$).

Conclusion: Oral creatine pretreatment exhibits neuroprotective effects against 6-OHDA toxicity in an experimental model of PD, as was shown by a lower rotational behavior and attenuation of neuronal loss. Its effect is partly due to the attenuation of oxidative stress.

Keywords: Creatine, Parkinson's disease, 6-hydroxydopamine, Rotational behavior, Oxidative stress

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2015; 22(4): 341-354