آثار حفاظتی پیش درمان با ویتامین E بر نورونهای جسم سیاه پس از القای تخریب توسط ۶ـ هیدروکسی دوپامین در موش صحرایی: مطالعه ایمونوهیستوشیمیایی تیروزین هیدروکسیلاز

مهرداد روغنی .Ph.D☆♦، ژیلا بهزادی .Ph.D☆

☆ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۱۸۱ـ۱۹۸۳۵، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، گروه فیزیولوژی

چکیده

* **هدف:** بررسی آثار پیش درمان با ویتامین E و حفاظت از نورونهای جسم سیاه پس از القای تخریب توسط ٦ـ هیدروکسی دوپامین در موش صحرایی.

* **مواد و روشها:** موشها به سه گروه شاهد، تخریب و درمان تقسیم شدند. برای بیهوشی از مخلوط کتامین و گزیلازین به‌صورت داخل صفاقی استفاده شد. حیوانات گروه تخریب ۵ میکرولیتر از محلول سالین ۰/۹ درصد حاوی ۱۲/۵ میکروگرم ٦ـ هیدروکسی دوپامین و ۰/۲ درصد اسید آسکوربیک را علاوه بر ۰/۸ ml/Kg پروپیلن گلیکول (i.m.) دریافت نمودند و به حیوانات گروه شاهد به همان حجم از محلول سالین ـ آسکوربات تزریق شد. گروه درمان علاوه بر 6-OHDA (6-hydroxydopamine)، محلول د ـ آلفا ـ توکوفریل اسید سوکسینات (I.U./Kg, i.m. ۲۴) حل شده در پروپیلن گلیکول را یک ساعت قبل و هفته‌ای سه بار پس از تزریق نوروتوکسین به‌داخل استریاتوم چپ به‌مدت یک ماه دریافت کردند. ایمونوهیستوشیمی آنزیم تیروزین هیدروکسیلاز در دو ناحیه جسم سیاه و استریاتوم به‌عنوان شاخص میزان کارایی روش درمانی استفاده شد.

* **یافته‌ها:** نتایج حاضر نشان می‌دهد که ۴۷ درصد کاهش در تعداد نورون حاوی تیروزین هیدروکسیلاز در طرف چپ بخش متراکم جسم سیاه (SNC: Substantia Nigra Pars Compacta) گروه تخریب وجود دارد ($P<0.005$). در گروه درمان، میزان کاهش (۱۸ درصد) در مقایسه با طرف راست SNC کمتر است ($P<0.05$). به‌علاوه اختلاف معنی‌داری بین دو گروه شاهد و درمان از نظر تعداد نورون دارای TH (Tyrosine Hydroxylase) وجود ندارد. بررسی میکروسکوپی محل تزریق در استریاتوم نشان می‌دهد که در تمامی حیوانات پیش درمان شده، هاله متراکمی از فیبرهای TH-IR در اطراف محل وجود دارد درحالی‌که در مورد گروه تخریب، تراکم این فیبرها کمتر است.

* **نتیجه‌گیری:** پیش درمان با ویتامین E می‌تواند سبب افزایش مقاومت و طول عمر نورونهای نیگرال در برابر تخریبهای اکسیداتیو بر اثر سمیت 6-OHDA شود و در درمان حفاظتی بیماری پارکینسون کاربرد دارد.

* **گل واژگان:** ویتامین E، ٦ـ هیدروکسی دوپامین، تیروزین هیدروکسیلاز، بیماری پارکینسون، موش صحرایی

مقدمه

درمانهای آنتی‌اکسیداتیو در مراحل اولیه بیماری پارکینسون (PD) امروزه در کلینیک مطرح است (۲،۱). تصور می‌شود که استرسهای اکسیداتیو به‌دنبال تشکیل رادیکالهای آزاد نقش اساسی در نوروپاتولوژی این بیماری دارد (۵،۴،۳).

تزریق داخل استریاتال ۶-هیدروکسی دوپامین (6-OHDA) به‌میزان مشخص در موش صحرایی موجب از دست رفتن پیشرونده و تدریجی نورونهای دوپامینرژیک جسم سیاه می‌گردد که روند آن شباهت بسیاری با نوروپاتولوژی بیماری پارکینسون دارد و به‌عنوان یک مدل تجربی معتبر برای نشان دادن مراحل شروع این بیماری محسوب می‌شود (۷،۶). نوروتوکسین ۶-هیدروکسی دوپامین با تولید رادیکالهای آزاد که خود سیتوتوکسیک هستند، سبب مختل نمودن هموستازی کلسیم از طریق افزایش ورود و یا تشدید آزاد شدن از ذخایر داخل سلولی (۸)، اثر بر برنامه تنظیم ژنتیکی و القا آپوپتوز (۹، ۱۰، ۱۱) شده و موجب مرگ نورونی می‌شود.

یکی از روشهای درمانی جهت کاهش دادن اثرات استرس E اکسیداتیو و محافظت نورونهای دوپامینرژیک در بیماری پارکینسون، استفاده از آنتی‌اکسیدانتها نظیر ترکیبات ویتامین E است (۱۴،۱۳،۱۲،۲،۱). هرچند که در مورد تجویز خوراکی ویتامین E و اثر آن در مقابل اثرات سمی نوروتوکسین 6-OHDA شواهد معدودی یافت می‌شود (۱۶،۱۵) ولی تاکنون تحقیقات در مورد تزریق عضلانی ترکیبات ویتامین E که می‌تواند اثرات خود را سریع‌تر القا کند (۱۸،۱۷)، در مدل تجربی پارکینسون به‌کار نرفته است؛ لذا در این تحقیق، اثرهای حفاظتی پیش درمان با ویتامین E (د - آلفا- توکوفریل اسید سوکسینات) توسط تزریق داخل عضلانی دوز فارماکولوژیک و مکرر آن در مدل یکطرفه و اولیه بیماری با تزریق نوروتوکسین 6-OHDA در موش صحرایی بررسی شد. برای ارزیابی میزان بهبودی، نورونهای دارای آنزیم تیروزین هیدروکسیلاز (TH) در بخش متراکم جسم سیاه (SNC) با روش ایمونوهیستوشیمی بررسی شدند. شمارش کمی نورونهای حاوی TH در SNC و برآورد کیفی دانسیتهٔ فیبرهای TH ایمونوراکتیو در استریاتوم (پایانه‌های مسیر نیگرواستریاتال) پس از تخریب با نوروتوکسین 6-OHDA، مطالعه شد.

مواد و روشها

* حیوانات

از ۳۱ موش صحرایی نر، نژاد Sprague Dawley به وزن ۲۸۰-۲۲۵ گرم در گروههای ۴-۳ تایی با دورهٔ روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته و دمای ۳±۲۱ °C سانتی‌گراد استفاده شد. حیوانات به آب آشامیدنی و غذای مخصوص دسترسی داشتند و حداقل ۱۰ روز قبل از بررسی، برای سازگاری با محیط، به حیوانخانه منتقل شدند.

* روش کار

دسته‌بندی گروههای مورد مطالعه

در این تحقیق پس از تزریق داخل صفاقی آپومورفین (۰/۵ mg/kg) موشهای با چرخش کمتر از ۳۰ دور کامل در ساعت انتخاب شدند. حیوانات به‌طور تصادفی به سه گروه شاهد، تخریب و درمان[1] دسته‌بندی شدند. برای بیهوشی از مخلوط کتامین (۱۰۰ mg/Kg) و گزیلازین (۵ mg/Kg) به روش تزریق داخل صفاقی استفاده شد. تزریق استریوتاکسیک در داخل استریاتوم خلفی با مختصات ۹/۲mm+ = قدامی - خلفی، ۳mm- = جانبی و ۴/۵mm+ = شکمی، نسبت به سخت شامه (۱۹) با قرار دادن سر حیوان در دستگاه استریوتاکس (Stoelting, USA) وتوسط سرنگ هامیلتون ۱۰ میکرولیتری انجام شد. ۵ دقیقه پس از تزریق، سرنگ به آهستگی از مغز خارج شده و پس از ضدعفونی نمودن، محل جراحی بخیه زده شد. حیوانات گروه تخریب ۵ میکرولیتر از محلول سالین ۰/۹ درصد شامل ۲/۵ $\mu g/\mu l$ از ۶-هیدروکسی دوپامین هیدروکلرید (6-OHDA, Sigma) و ۰/۲ درصد اسید آسکوربیک و یک ساعت قبل از جراحی، ۰/۸ ml/Kg از پروپیلن گلیکول (USP) (حلال ویتامین E) را به صورت داخل عضلانی دریافت کردند. به حیوانات گروه شاهد نیز به همان حجم و غلظت از محلول سالین - آسکوربات تزریق شد. گروه درمان علاوه بر تزریق داخل استریاتال 6-OHDA، محلول د - آلفا - توکوفریل‌اسید سوکسینات (۲۴ i.m. I.U. /Kg) حل شده در پروپیلن گلیکول را نیز یک ساعت قبل و هفته‌ای سه بار پس از تزریق نوروتوکسین به‌مدت یک ماه دریافت کردند.

* ایمونوهیستوشیمی آنزیم تیروزین هیدروکسیلاز

ابتدا حیوانات با دوز بالای کتامین (۱۵۰mg/Kg) به‌طور عمیق بیهوش شدند. عمل پرفیوژن از طریق آئورت صعودی با ۲۰۰ میلی‌لیتر محلول سالین ۰/۹ درصد و سپس با ۵۰۰ میلی‌لیتر محلول تثبیت کننده شامل پارافرمالدئید ۴ درصد و گلوتارآلدئید ۰/۵ درصد در بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH= ۷/۴) و Postperfusion توسط ۲۰۰-۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول ۰/۱ مولار بافر فسفات حاوی ساکارز ۱۰ درصد انجام شد. پس از خارج نمودن مغز از جمجمه و تهیه بلوکهای نواحی مغز جلویی و تنهٔ مغزی برشهای تهیه شده توسط دستگاه ویبراتوم به ضخامت ۵۰ میکرومتر به محلول ۰/۱ مولار TBS[2] منتقل شدند. از هر دو برش یکی برای مشاهده نورونهای حاوی تیروزین هیدروکسیلاز برای رنگ‌آمیزی ایمونو- هیستوشیمی و دیگری برای شناخت ساختمانی با محلول ۰/۱ درصد کرزیل ویوله، رنگ‌آمیزی نیسل شدند. برشها به مدت ۲۰ دقیقه در معرض محلول ۰/۱ درصد بوروهیدرات سدیم و پس از شستشو به‌مدت نیم ساعت در متانول حاوی ۰/۰۳ درصد آب اکسیژنه قرارگرفتند. بعد از شستشوی مجدد به‌مدت یک

1. Vitamin E-pretreated
2. Tris-Buffered Saline

ساعت در محلول ۰/۱ درصد BSA[1] و ۰/۳ درصد تریتون X-100 در TBS درجه حرارت اطاق قرار گرفتند (۲۰). سپس مقاطع در محلول آنتی -TH منوکلونال موش (Boehringer, Germany) با غلظت ۱/۱۰۰۰، در محلول ۰/۱ درصد BSA به‌مدت ۳-۲ روز قرار گرفتند. پس از شستشو، ۲ ساعت آنها را در محلول آنتی‌بادی ثانویه -ایمونوگلوبولین ضد موش بیوتینیله (Boehringer, Germany) با غلظت ۱/۲۰۰ در محلول ۰/۱ درصد BSA و سپس ۴۵ دقیقه در محلول کمپلکس آویدین - بیوتین - پراکسیداز[2] قرار گرفتند. برای آشکار نمودن پراکسیداز متصل شده یک سری از برشها بعد از سه بار شستشو در TBS و دوبار شستشو در بافر Tris-HCl ۰/۱ مولار (pH= ۷/۶) به مدت ۱۰-۵ دقیقه در بافر Tris-HCl حاوی دی‌آمینوبنزیدین (DAB،۱۰mg/۲۰ml[3]) به‌عنوان کروموژن و ۰/۰۰۶ درصد آب اکسیژنه قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها به روی لامهای ژلاتینه منتقل و با محلول ۰/۱ درصد کرزیل ویوله رنگ‌آمیزی نیسل شدند. در مورد سری دیگر، نمونه‌ها به محلول Tris-HCl شامل ۵۰mg/۱۰ml کلرور کبالت منتقل شدند و بعد از سه بار شستشو در بافر Tris-HCl، واکنش پراکسیداز با استفاده از DAB (۱۰mg در ۲۰ml بافرفسفات ۰/۱ مولار) در حضور ۴۰mg د -گلوکز و ۰/۰۶mg آنزیم گلوکز اکسیداز انجام شد.

* آنالیز کمی
شمارش نورونی و مطالعه مورفومتریک SNC

در هر حیوان برشهای مغز میانی (۲/۹-۴/۲mm Intraneural,) به روش بیان شده توسط Burke و Muthane بررسی شد (۲۲،۲۱). به‌طور خلاصه نورونهای دارای TH در SNC در برشهای منطبق با چهار سطح ۲/۹، ۳/۲، ۳/۷ و ۴/۲ اطلس پاکسینوس نسبت به مرکز خط بین دو گوش در طرف چپ و راست در ناحیه‌ای به مساحت ۲۸۸ μm^2 شمارش شدند و در هر سطح، حداقل برای دو برش، شمارش انجام شد (میکروسکوپ نوری، ۴۰۰×). تعداد نورونهای SNC به‌صورت میانگین، در هر سطح و تعداد کل در چهار سطح بیان شد. به‌علاوه ناحیه مربوط به SNC با دستگاه کامرا لوسیدا (Wild, Switzerland) در بزرگنمایی ۱۰۰ برابر ترسیم و مساحت آن توسط سطح‌سنج مکانیکی تعیین شد.

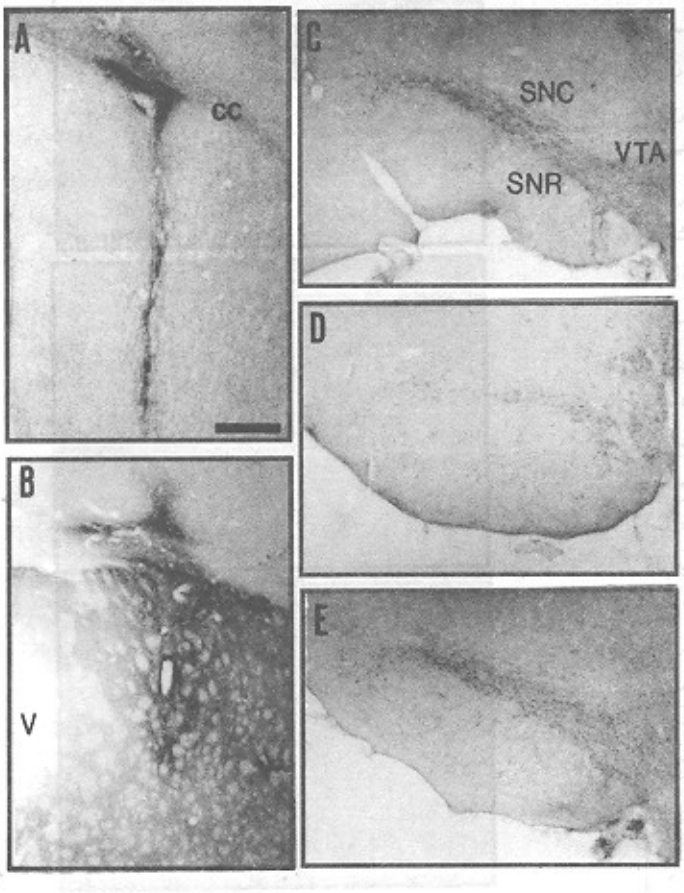
* بررسی آماری

تمامی داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف استاندارد بیان شد. برای بررسی تفاوت تعداد متوسط نورون در گروههای مختلف از آنالیز پراش یک‌طرفه و مقایسه چندگانه توسط آزمون Bonferroni استفاده شد. در مورد تعداد نورونهای حاوی TH در دو نیمه راست و چپ از آزمون Paired *t*-test استفاده شد. اختلاف در سطح $P<0.05$ به‌عنوان اختلاف معنی‌دار در نظرگرفته شد.

یافته‌ها

* ایمونوهیستوشیمی آنزیم تیروزین هیدروکسیلاز(TH)

اثرات د - آلفا توکوفریل اسید سوکسینات بر تعداد نورون حاوی TH در SNC به‌طور کمی و دانسیتهٔ فیبرهای ایمونوراکتیو در استریاتوم به‌طور کیفی بررسی شد. با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی تیروزین هیدروکسیلاز، اجسام سلولی و زوائد سلولی در سیستم نیگرواستریاتال به‌شدت رنگ‌آمیزی شدند. شکل ۱، A و B محل تزریق نوروتوکسین 6-OHDA را داخل استریاتوم به‌ترتیب در دو گروه تخریب و درمان نشان می‌دهد.



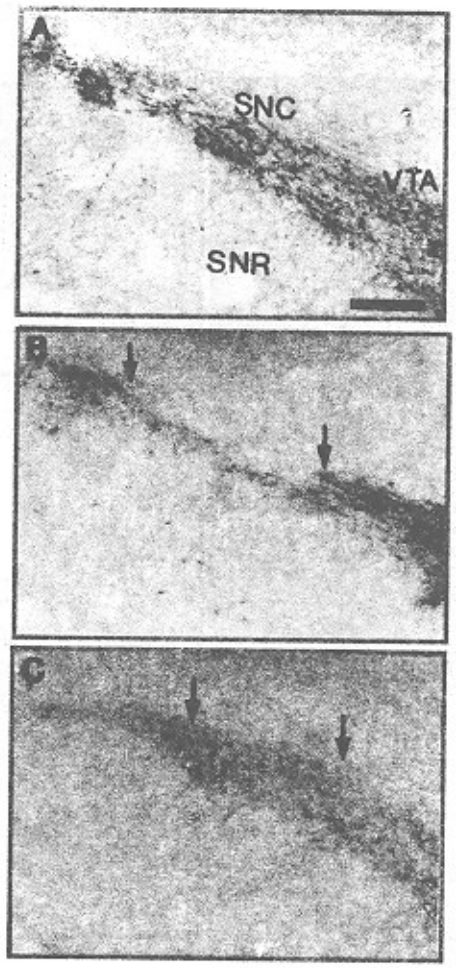
شکل ۱: عکس میکروسکوپی ایمونوهیستوشیمی تیروزین هیدروکسیلاز تشدید شده توسط روش کلرور کبالت را در دو ناحیه استریاتوم (A و B) و جسم سیاه (C، D و E) نشان می‌دهد. A و B محل تزریق نوروتوکسین به ترتیب در دو گروه تخریب و درمان یک ماه پس از جراحی است. افزایش دانسیته فیبرهای ایمونوراکتیو TH در اطراف محل تزریق گروه درمان (B) نشان داده شده است. خط مقیاس=۴۷۶میکرومتر

CC=Corpus Callosum, SNR=Substantia Nigra Pars Reticulata,
V=Ventricle, VTA=Ventral Tegmental Area

1. Bovine Serum Albumin
2. Vector laboratories
3. Diamino benziding

در گروه تخریب کاهش شدید ایمونوراکتیویته برای TH و نامنظم شدن آرایش نواحی Patch و ماتریکس در استریاتوم در اطراف محل تزریق به‌خوبی مشخص است؛ درحالی‌که تقریباً در همهٔ حیوانات گروه درمان، هاله‌ای از فیبرهای ایمونوراکتیو برای آنزیم تیروزین هیدروکسیلاز در اطراف محل تزریق مشاهده می‌شود. C، D و E در تصویر ۱، جسم سیاه را به‌ترتیب در سه گروه شاهد، تخریب و درمان نشان می‌دهد. کاهش تعداد سلولهای ایمونوراکتیو TH به‌ویژه در ناحیه وسط SNC گروه تخریب (D) در مقایسه با گروه شاهد (C) مشاهده می‌شود درحالی‌که در گروه درمان (E) کاهش با شدت کمتری است.

در تصویر ۲ با بزرگنمایی بالاتر، وضعیت نورونها در ناحیه SNC هر سه گروه بهتر دیده می‌شود.



شکل ۲: عکس میکروسکوپی ایمونوهیستوشیمی تیروزین هیدروکسیلاز را با کروموژن DAB در ناحیه جسم سیاه (B،A و C) به‌ترتیب در سه گروه شاهد، تخریب و درمان نشان می‌دهد. کاهش سلولهای ایمونوراکتیو TH در ناحیه SNC گروه تخریب به‌ویژه در بخش مرکزی آن (محدوده بین دو پیکان) (B) بیشتر از گروه درمان (C) در مقایسه با گروه شاهد (A) است. همچنین نورونهای ایمونوراکتیو TH با تراکم بالا و دست نخورده در ناحیه VTA سه گروه مشاهده می‌شوند. خط‌مقیاس=۲۵۰میکرومتر

نتایج بررسی در مورد متوسط تعداد سلول در طرف چپ SNC یعنی همان سمت تخریب استریاتوم (جدول ۱) نشان می‌دهد که تعداد نورون در گروه درمان در مقایسه با گروه تخریب بیشتر است ($P<0.05$).

جدول ۱: مقایسه تأثیر تخریب و درمان بر تعداد کل نورونهای حاوی TH در بخش متراکم جسم سیاه

	SNC	
	طرف راست	طرف چپ
شاهد	۱۱۹/۲±۸/۲۳	۱۰۸/۳±۹/۱۹
تخریب	۱۳۶/۳±۹/۹۳	۷۳/۸±۷/۹۴**
درمان	۱۲۷/۵±۳/۹۲	۱۰۴/۳±۹/۶۴$

تعداد نورونها در طرف چپ SNC دو گروه تخریب و درمان در مقایسه با گروه شاهد $P<0.01$ *. طرف چپ SNC گروه درمان در مقایسه با گروه تخریب. $P<0.05$ $ و در نهایت مقایسه طرف چپ و راست SNC $P<0.005$ **، $P<0.05$ ° است.

در این رابطه دو گروه تخریب و درمان به‌ترتیب کاهشی برابر با ۳۶ درصد و ۸/۹ درصد را در مقایسه با گروه شاهد نشان می‌دهند. آنالیز Paired *t*-test نشان می‌دهد که در گروه شاهد هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین دو طرف SNC مشاهده نمی‌شود درحالی‌که در دو گروه تخریب ($P<0.005$) و درمان ($P<0.05$)، طرف چپ کاهش معنی‌داری را در مقایسه با طرف راست نشان می‌دهد، هر چند که میزان کاهش در گروه درمان کمتر است. همچنین تعداد نورون در طرف چپ SNC گروه درمان به‌میزان ۱۸ درصد و در گروه تخریب به‌میزان ۴۷ درصد در مقایسه با طرف راست کاهش می‌یابد. از بررسی متوسط تعداد نورون در طرف چپ در کل چهار سطح، مشخص می‌شود که کاهش تعداد نورونها فقط در دو سطح ۳/۸ و ۴/۲ گروه تخریب (۳۶ درصد در سطح ۳/۸ و ۶۵ درصد در سطح ۴/۲) و گروه درمان (۱۱ درصد در سطح ۳/۸ و ۲۳ درصد در سطح ۴/۲) در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار است (جدول ۲)، هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری نیز در تعداد نورونهای دارای TH در طرف راست SNC، بین سه گروه وجود ندارد.

جدول ۲: مقایسه تأثیر تخریب و درمان بر تعداد نورونهای حاوی TH در چهار سطح طرف چپ بخش متراکم جسم سیاه

گروه / سطح	شاهد	تخریب	درمان
۲/۹۶	۸۳/۵±۱۵/۳	۶۷/۱۶±۱۰/۱	۸۷/۵۷±۱۵/۷
۳/۲	۱۰۱/۲±۱۰/۱	۷۳/۴±۷/۵۷	۱۱۰/۷±۱۵/۹
۳/۸	۱۰۷/۴±۸/۶۵	۶۹±۱۲/۵*	۹۵/۹±۹$
۴/۲	۵۳/۹±۹/۸	۱۹/۲۸±۳**	۴۲/۳±۵/۶$*

کاهش نورونها پس از تخریب و درمان در مقایسه با گروه شاهد $P<0.01$ **، $P<0.05$ * است. همچنین اختلاف کاهش نورونها بین دو گروه درمان و تخریب $P<0.05$ $ است.

بحث

سیستم دوپامینرژیک نیگرواستریاتال نقش مهمی در سازمان‌بندی عملی عقده‌های قاعده‌ای[1] دارد. نقص عملکردی این سیستم، مشکلات

1. Basal ganglia

حرکتی اصلی را در بیماری پارکینسون به‌وجود می‌آورد (۲۳). قسمت بیشتر این سیستم از نورونهای دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه منشأ گرفته و به‌طور وسیعی در نئواستریاتوم (هسته‌های دمدار و پوتامن) توزیع می‌شود (۲۴). به احتمال زیاد استریاتوم، محل اولیه دژنراسیون در بیماری پارکینسون است که به‌دنبال آن سلولهای دوپامینرژیک نیگرال دچار مرگ سلولی می‌شوند (۲۵). در این تحقیق، مدل اولیه بیماری پارکینسون با استفاده از تزریق داخل استریاتالِ نوروتوکسین 6-OHDA به میزان ۱۲/۵ µg/۵ µl ایجاد شد. 6-OHDA از طریق حاملهای انتخابی دوپامین، وارد پایانه‌های دوپامینرژیکِ استریاتوم شده و با تولید پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل مشتق از آن، موجب تخریب این نواحی می‌شود (۲۶،۶)؛ تخریب نورونهای SNC ناقص بوده، متناسب با دوز به‌کار رفتهٔ نوروتوکسین، درجات مختلف نقایص رفتاری ظاهر می‌شود و روند آتروفی نورونها در دراز مدت قابل مشاهده است .نتایج تحقیقات قبلی نشان می‌دهد که در صورت استفاده از این نوروتوکسین به میزان ۲µg، ۸۰-۷۰ درصد نورونها به‌طور کامل تخریب شده و ۲۰-۱۵ درصد از نورونها روند آتروفی را ادامه می‌دهند (۷). بنابراین، مدل اولیه پارکینسون (تجربی) به‌عنوان یک ابزار تحقیقاتی برای بررسی اثر عوامل نوروپروتکتیو و نوروتروفیک بسیار مطلوب بوده و برای مشخص نمودن مکانیسمهای بازگشت عملکردی نورونهای دوپامینرژیک به‌دنبال آسیب ناقص مسیر نیگرواستریاتال کاربرد دارد (۲۷،۷). از دست رفتن ناقص نورونهای دوپامینرژیک نیگرال به‌دنبال تزریق داخل استریاتالِ ۱۲/۵ میکروگرم 6-OHDA مشابه مراحل شروع بیماری پارکینسون در انسان است که در آن بخش قابل توجهی از سیستم نیگرواستریاتال، سالم به‌نظر می‌آید. به‌علت کند بودن روند تخریب نورونی در این مدل، فرصت مناسبی برای بررسی نحوه اثر عوامل نوروپروتکتیو به‌وجود می‌آید. نتایج بدست آمده از این مدل در مورد جامعه انسانی نیز قابل تعمیم است(۲۸).

با تزریق داخل استریاتال 6-OHDA، پایانه‌های TH-Positive در محل تزریق ظرف چند روز از بین رفته و کاهش نواحی جذب دوپامین در پایانه‌ها در پایان هفته اول بعد از تزریق به‌خوبی مشخص است. اگرچه آتروفی جسم سلولی نورونهای دوپامینرژیک نیگرال از پایان هفته اول شروع می‌شود ولی تخریب کامل آنها روند آهسته‌تری را نشان می‌دهد و مرگ سلولی، حداقل یک ماه طول می‌کشد (۲۹،۲۵). دربارهٔ از بین رفتن نورونهای SNC به‌دنبال آسیب استریاتوم می‌توان سه مکانیسم زیر را مطرح کرد:

۱- نوروتوکسین 6-OHDA به‌دنبال آسیب پایانه‌های آکسونی دوپامینرژیک در استریاتوم سبب دژنراسیون رتروگراد می‌شود که در تأیید آن شواهد زیادی وجود دارد (۲۸،۷، ۳۰، ۳۱)؛

۲- تخریب نورونهای استریاتال پس از نابودی پروژکسیون استریاتوم به بخش مشبک جسم سیاه (SNR) می‌تواند سبب دژنراسیون آنتروگراد Trans-Synaptic نورونهای SNC شود؛

۳- پس از آسیب استریاتوم و امکان حذف پشتیبانی تروفیکِ رتروگراد فراهم شده از طریق نورونهای آن، نورونهای دوپامینرژیک جسم سیاه تحلیل می‌روند (۲۱).

در بررسی اخیر، درمان با ویتامین E یک ساعت قبل از تزریق داخل استریاتال پس 6-OHDA شروع شد و تیمار، یک ماه ادامه یافت. بیشتر بودن تعداد نورونهای TH-Positive پس از چهار هفته درمان با ویتامین E در مقایسه با گروه تخریب، می‌تواند اثر دو عامل زیر باشد:

۱- تنظیم افزایشی[1] آنزیم تیروزین هیدروکسیلاز به‌طور خودبه‌خودی در نورونهای آتروفی شده و در حال آسیب (۳۱). هر چند این احتمال در مقایسه با آثار ویتامین E با دوز بالا در نگهداری نورونهای سالم، ضعیف به‌نظر می‌رسد.

۲- ویتامین E در دوز بالا توان حفاظتی قابل ملاحظه‌ای را علیه آسیب القا شده بر اثر تزریق نوروتوکسین نشان می‌دهد (۱۶،۱۵).

نتایج تحقیقات قبلی نشان می‌دهد که تزریق داخل استریاتال 6-OHDA اغلب بخش مرکزی SNC را گرفتار می‌کند و بر روی ناحیه VTA اثر نمی‌گذارد (۳۲) و رابطهٔ توپوگرافیک با محل تزریق در استریاتوم در نتایج این تحقیق نیز مشاهده می‌شود. SNC فیبرهای زیادی به نئواستریاتوم می‌فرستد، درحالی‌که ناحیه VTA اغلب به استریاتوم شکمی شامل هستهٔ Accumbens و به سایر نواحی در خارج از کمپلکس استریاتال پایانه می‌فرستد که نواحی اخیر تحت‌تأثیر 6-OHDA قرار نمی‌گیرند(۳۰).

دانسیتهٔ بیشتر فیبرهای ایمونوراکتیو TH در اطراف محل تزریق در گروه درمان شده با ویتامین E در مقایسه با گروه تخریب می‌تواند به‌علت حفاظت آنها در زمان تخریب و شاید بهبود در وضعیت بیولوژیک نورونهای دوپامینرژیکِ در حال تخریب باشد(۳۳).

محتوای پروتئین TH در نورونهای جسم سیاه بیماران پارکینسونی در مقایسه با افراد سالم کاهش می‌یابد و با کاهش سطح TH-mRNA ارتباط دارد. در مدل حیوانی پارکینسون، کاهش سطح TH-mRNA به روش In situ hybridization نشان داده شده است (۳۴).

Fujimoto و همکاران در بررسی خود مشخص نمودند که تزریق داخل وریدی ویتامین E با مصرف کمتر و به روش ساده‌تر نسبت به تجویز خوراکی آن می‌تواند اثرات نوروپروتکتیو خود را در مدل تجربی ایسکمی مغزی بر روی کیفیت امواج EEG اعمال کند(۱۷). Cadet و همکاران در یک بررسی نشان دادند که مصرف روزانه ویتامین E به‌صورت خوراکی به مدت یک ماه با یک دوز تقریباً مشابه (۲۰ I.U./Kg) می‌تواند از کاهش شدید سطح دوپامین و متابولیتهای آن (DOPAC،[3] HVA[2]) در ناحیه استریاتوم جلوگیری کند و مشخص شد که مصرف د ـ آلفا ـ توکوفرول آثار قوی‌تری را در مقایسه با All-racemic آلفا توکوفرول اعمال می‌کند. این یافته به‌خوبی با اثر قویتر د ـ آلفا ـ توکوفرول و جدول زمانی تجویز دارو مطابقت دارد(۱۵). Perumal و همکاران به این نتیجه رسیدند که پیش درمان

1. Up-regulation
2. Homovanilic acid
3. Dihydrophenylacetic acid

با ویتامین E خوراکی، آثار سمی 6-OHDA را بر میزان آنزیم سوپر اکسید دیس‌موتاز (SOD) موجود در تنه مغزی، هستهٔ ساب تالامیک و هستهٔ Accumbens کاهش می‌دهد(۱۶). بررسیهای De Rijk و همکاران بر روی جامعه انسانی نشان داد که سه سال مصرف روزانه به میزان متوسط ۱۰ میلی‌گرم ویتامین E به‌صورت وابسته به دوز از بروز علائم اصلی بیماری پارکینسون جلوگیری می‌کند(۱). نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان می‌دهد که ویتامین در E از طریق حفاظت ساختمانی نورونها در برابر آسیب اکسیداتیو، نامتقارن شدن ساختمان نورونهای حاوی TH در رفتار حرکتی SNC گروه درمان را کاهش می‌دهد که نتیجهٔ عملی این حفاظت در رفتار حرکتی نیز قابل مشاهده است (۳۵). بنابراین، به احتمال زیاد مصرف ویتامین E در پیشگیری یا به‌تأخیر انداختن بروز بیماری پارکینسون مؤثر است.

ویتامین E از طریق واکنش با رادیکالهای آزاد، از واکنش زنجیره‌ای آنها جلوگیری می‌کند (۱۸). رادیکالهای آزاد به‌طور مداوم بر اثر متابولیسم دوپامین در نورونهای دوپامینرژیک جسم سیاه تولید می‌شوند (۴،۳). مهمترین فاکتورهای حفاظتی موجود علیه آسیب ناشی از رادیکالهای آزاد در این نورونها شامل سوپراکسید دیس‌موتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون است. آسیب ناشی از رادیکال آزاد در ناحیه جسم سیاه در صورت افزایش تولید یا کمبود عوامل آنتی‌اکسیدانت رخ می‌دهد (۳۶). ویتامین E در صورت تجویز به‌موقع و با دوز مناسب می‌تواند کاهش عملکرد مکانیسمهای حفاظتی را در جسم سیاه جبران کند.

نتایج این تحقیق برای اولین بار، اثر حفاظتی تجویز داخل عضلانی و مکرر ویتامین بخش E به‌مقدار فارماکولوژیک ۲۴ I.U./Kg را روی نورونهای ایمونوراکتیو TH بخش متراکم جسم سیاه نشان می‌دهد. در این بررسی مشخص شد که آثار سمی 6-OHDA بر نورونهای ایمونوراکتیو TH در بخش متراکم جسم سیاه در حضور ویتامین E کاهش یافته و در نتیجه پایانه‌های دوپامینرژیک با شدت بیشتری در استریاتوم محافظت می‌شوند.

تقدیر و تشکر

بخشی از هزینه این تحقیق توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (طرح مصوب شماره ۵۵۰۰) تأمین شده است که بدینوسیله نویسندگان مراتب تقدیر خود را از این معاونت ابراز می‌دارند.

References

1. De Rijk MC, Breteler MM, Den Breeijen, Launer LJ, Grobbee DE, Meche FGA, Hofman A: Dietary antioxidants and Parkinson disease, The Rotterdam study. Arch. Neurology 1997; 54: 762-765

2. Ebadi M, Srinivasan SK, Baxi MD; Oxidative stress and antioxidant therapy in Parkinson's disease. Prog Neurobiol, 1996; 48: 1-19

3. Olanow CW: Oxidation reactions in Parkinson's disease. Neurology 1990; 40: 32-37

4. Olanow CW: A radical hypothesis for neurodegeneration. Trends Neurosci 1993; 16, 11: 439-444

5. Stoof JC, Vermulen RJ, Van Royan EA, Drukarch B, Voom P, Wolters EC, Groenewegen HJ: Dopaminergic systems and Parkinson's disease: some latest developments in pathogenetic, diagnostics and pharmacotherapeutic investigations. Neurosci Res Communications 1996; 18(3): 133-141

6. 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: 987-1041

7. Przedborski S, Levivier M, Jiang H, Ferreira M, Jackson-Lewis V, Donaldson D, Togasaki DM: Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. Neuroscience 1995; 67, 3: 631-647

8. Sautter J, Kupsch A, earl CD, Oertel WH: Degeneration of pre-labelled nigral neurons induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat: behavioral and biochemical changes and pretreatment with the calcium-entry blocker nimodipine. Exp Brain Res 1997; 117: 111-119

9. Lotharius J, Dugan LL, O'Malley KL: Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons. J Neuroscience 1999; 19(4): 1284-93

10. Walkinshaw G, Waters CM: Neurotoxin-induced cell death in neuronal PC12 cells is mediated by induction of apoptosis. Neuroscience 1994; 63(4): 975-987

11. Woodgate A, MacGibbon G, Walton M, Dragunow M: The toxicity of 6-hydroxydopamine on PC12 and P19 cells. Mol Brain Res 1999; 69(1): 84-92

12. Bano S, Parihar MS: Reduction of lipid peroxidation in different brain regions by a combination of a-tocopherol and ascorbic acid. J Neural Transm 1997; 104: 1277-1286

13. Morens DM, Grandinetti A, Waslien CI, Park CB, Ross GW, White LR: Case-control study of idiopathic Parkinson's disease and dietry vitamin E intake. Neurology 1996; 46: 1270-1274

14. Logroscino G, Marder K, Cote L, Tang MX, Shea S,

1. Super oxide desmutase

Mayeux R: Dietary lipids and antioxidants in parkinson's disease: A population-based case-control study. Ann Neuro 1996; 39(1): 89-94
15. Cadet JL, Katz M, Jackson-Lewis V, Fahn S: Vitamin E attenuates the toxic effects of intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA): behavioral and biochemical evidence. Brain Res 1989; 476: 10-15
16. Perumal AS, Gopal VB, Tordzro WK, Cooper TB, Cadet JL: Vitamin E attenuates the toxic effects of 6-hydroxydopamine on free radical scavenging systems in rat brain. Brain Res Bull 1992; 29: 699-701
17. Fujimoto S, Mizoi K, Yoshimoto, Suzuki J: The protective effect of vitamin E on cerebral ischemia. Surg Neuro 1984; 22: 449-54
18. Reynolds JEF: MARTIINDAE the extra pharmacopoeia. London, Churchill-Lvingstone, 1996, pp 1391-1393
19. Paxinos G, Watson C: The rat brain in stereotaxic coordinates, 2nd ed. Academic Press, San Diego 1986
20. Totterdell S, Ingham CA, Bolam JP: Immunocytochemistry I: Pre-embedding staining. In: Experimental neuroanatomy, JP Bolam(ed). Oxford IRL Press, 1992, pp 31-59
21. Burke RE, Macaya A, Devivo D, Kenyon N, Janec EM: Neonatal hypoxic-ischemic or excitotoxic striatal injury results in a decreased adult number of substantia nigra neurons. Neuroscience 1992; 50(3): 559-569
22. Muthane U, Ramsay KA, Jiang H, Jackson-Lewis V, Donaldson D, Fernando S, Ferreira M, Prezedborski: Differences in nigral neuron number and sensitivity to 1- methyl-4-phenyl- 1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine in C57/b1 and CD-1 mice. Exp Neurology 1994; 126: 195-204
23. Henderson JM, Dunnett SB: Targeting the subthalamic nucleus in the treatment of Parkinson's disease. Brain Res Bull 1998; 46(6): 467-474
24. Delong MR: Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. Trends Neurosci 1990; 13(7): 281-295
25. Ichitani Y, Okamura H, Nakahara D, Nagatsu I, Ibata Y: Biochemical and immunocytochemical changes induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine injection in the rat nigrostriatal dopamine neuron system: evidence for cell death in the substantia nigra. Exp Neurology 1994; 130: 269-278
26. Kaakkola S, Teravainen H: Animal models of Parkinsonism. Pharmaco and Toxico 1990; 67: 95-100
27. Schwarting RKW, Huston JP: The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research: analysis of functional deficits, recovery and treatments. Prog Neurobiol 1996; 50: 275-331
28. Sauer H, Oertel WH: Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. Neuroscience 1994; 59(2): 401-415
29. Ichitani Y, Okamura H, Matsumoto Y, Nagatsu I, Ibata Y: Degeneration of the nigral dopamine neurons after 6-hydroxydopamine injection into the rat striatum. Brain Res 1991; 549: 350-353
30. Lee CS, Sauer H, Bjorklund A: Dopamineregic neuronal degeneration and motor impairments following axon terminal lesion by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. Neuroscience 1996; 72(3): 641-653
31. Zigmond MJ, Abercrombie ED, Berger TW, Grace AA, Stricker EM: Compensations after lesions of central dopaminergic neurons: some clinical and basic implication. Trends in Neurosci 1990; 13(7): 290-297
32. Rosenblad C, Martinez-Serrano A, Bjorklund A: Intrastriatal glial cell line-derived neurotrophic factor promotes sprouting of spared nigrostriatal dopaminergic afferents and induces recovery of function in a rat model of Parkinson's disease. Neurscience 1998; 82(1): 129-137
33. Shults CW, Kimber T, Altar CA: BDNF attenuates the effects of intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. Neuro Report 1995; 6: 1109-1112
34. Shirao T, Evinger MJ, Lacovitti L, Reis DJ: Lesions of nigrostriatal pathway reduce expression of tyrosine hydroxylase gene in residual dopaminergic neurons of substantia nigra. Neurosci Lett 1992; 141: 208-212
35. Behzadi G, Roghani M: Neuroprotective effects of intramuscular administration of vitamin E on the early model of Parkinson's disease in the rat: behavioral and histochemical evidence. In: British Neuroscience Association Abstracts 1999; 14: 51.16(abs)
36. Vatassery GT: Vitamin E and other endogenous antioxidants in the central nervous system. Geriatrics 1998; 53: S25-S27