زیست‌شناسی جانوری، سال چهاردهم، شماره اول، پاییز ۱۴۰۰، صفحات ۱۰۵- ۹۳

مقاله پژوهشی

اثر بهبودبخشی پیکنوژنول بر اختلال حرکتی و رفتار اضطرابی در مدل تجربی بیماری پارکینسون القا شده با ٦- هیدروکسی دوپامین (6-OHDA) در موش نر نژاد NMRI

فرج اله جعفری[۱]، مهدی گودرزوند[۲*]، رامین حاجی‌خانی[۱]، مصطفی قربانی[۳]، جلال صولتی[٤]

۱- گروه زیست شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه فیزیولوژی-فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

۳- گروه اپیدمیولوژی، مرکز تحقیقات بیماری‌های غیرواگیر، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

٤- گروه زیست شناسی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

*مسئول مکاتبات: m.godarzvand@abzums.ac.ir

DOI: 10.22034/ascij.2021.684779

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱٤۰۰/۰۳/۰٦

چکیده

با توجه به نقش عوامل اکسیدان در پاتوژنز بیماری پارکینسون، در این مطالعه اثر تجویز ترکیب پیکنوژینول، به عنوان آنتی-اکسیدان، بر بهبود عملکرد حرکتی و رفتار اضطرابی در مدل تجربی بیماری پارکینسون بررسی شد. چهل سر موش کوچک آزمایشگاهی نر نژاد NMRI به صورت تصادفی در ۵ گروه ۸ نایی تقسیم شدند: گروه کنترل سالین ۳ میکرولیتر محلول نرمال سالین حاوی ۰/۱ درصد اسید آسکوربیک، به عنوان حلال 6-OHDA، را به صورت یک‌طرفه در داخل استریانوم چپ دریافت کردند. گروه تیمار که سم 6-OHDA حاوی ۱ درصد اسید اسکوربیک به میزان ۳ میکروگرم/میکرولیتر را به صورت داخل استریاتوم سمت چپ دریافت نمودند، سپس آب مقطر، به عنوان حلال پیکنوژنول، را به مدت ۷ روز به صورت گاواژ دریافت کردند (گروه لیژن یا ضایعه). گروه‌های تیمار ترکیب پیکنوژنول را با دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت گاواژ به مدت ۷ روز دریافت کردند. ۷ روز بعد از تزریق توکسین 6-OHDA در استریاتوم چپ با روش استرئوتاکسی و ایجاد مدل پارکینسون، جهت تایید آسیب نورون‌های ناحیه استریاتوم از تست آپومورفین و اندازه گیری میزان چرخش حیوانات استفاده شد. همچنین میزان کاتالپسی یا سختی عضلانی با روش تست بار و رفتار اضطرابی با تست ماز صعودی (EPM) سنجیده شدند. بررسی تعداد کل چرخش در تست آپومورفین، کاهش معنی‌داری را گروه‌های دریافت کننده پیکنوژینول نشان دادند. تجویز ترکیب پیکنوژینول موجب کاهش معنی‌دار کاتالپسی شد. نتیجه آزمون رفتار اضطرابی نشان داد که درصد مدت زمان حضور در بازوی باز (OAT) در گروه دریافت‌کننده پیکنوژینول افزایش معنی‌داری را نشان داد. تعداد دفعات ورود به بازوهای باز و بسته افزایش معنی‌داری را در گروهی که ترکیب پیکنوژینول دریافت کردند نشان داد. پیکنوژینول با اثر آنتی‌اکسیدانی خود موجب بهبودی عملکرد حرکتی و کاهش رفتار اضطرابی در مدل حیوانی بیماری پارکینسون می شود.

کلمات کلیدی: بیماری پارکینسون؛ کاتالپسی؛ اضطراب؛ پیکنوژینول؛ موش‌های کوچک آزمایشگاهی.

مقدمه

بیماری‌های نورودژنراتیو یا تحلیل برنده سیستم عصبی، بیماری‌های پیشرونده‌ای می‌باشند که موجب اختلال در ساختار و عملکرد نورون‌ها می‌گردند. از بیماری‌های نرودژنراتیو می‌توان به آلزایمر، پارکینسون، دمانس، هانتیگتون و ... اشاره کرد. بیماری پارکینسون یکی از شایع‌ترین اختلالات است که عمدتا سیستم دوپامینرژیک هسته‌های قاعده ای مغز (خصوصاً مسیر جسم سیاه به استریاتوم) را درگیر می‌کند. هر نوع عامل نظیر عوامل محیطی، افزایش سن و عوامل ژنتیکی می‌توانند در بروز بیماری پارکینسون دخیل باشند. عوامل استرس‌زا از طریق القا تولید گونه‌های فعال اکسیژن یا ROS و تغییر متابولیسم میتوکندریایی چرخهٔ اکسیداسیون سلولی را کاهش می‌دهند (۱۸، ۲٤). مطالعات دیگران، آسیب‌پذیری نورون‌های دوپامینرژیک هسته‌ی جسم سیاه به ROS اثبات کرده است (۳، ۱۰).

سیستم دوپامینرژیک با برنامه‌ریزی و بیان متوالی ژن‌هایی مانند فاکتور هسته ای اریتروئید-۲ یا Nrf2 و فاکتور فاکتور هسته‌ای کاپا B یا NF-κB اعمال تنظیمی خود را بروز می‌دهد. فعال‌سازی Nrf2-ARE یک مسیر محافظت‌کننده نورونی جدید است که می‌تواند به عنوان یک استراتژی درمانی امیدبخشی برای درمان بیماری‌های نورودژنراتیو مانند بیماری آلزایمر و پارکینسون در نظرگرفته شود (٦، ۹). NF-κB به عنوان یکی از رگولاتورهای پاسخ التهابی نقش مهمی در پاسخ التهابی بیماری‌های نورودژنراتیو دارد و می‌تواند پراکسیداسیون لیپید را تقویت کند. فعال-سازی آن در میکروگلیاها نقش مهمی در فرآیند التهاب دارد (١٦). تزریق ماده شیمیایی ٦-هیدروکسی دوپامین یا 6-OHDA با آسیب ناقص سیستم دوپامینرژیک نیگرواستریاتال موجب القای مدل شبه-پارکینسون در حیوانات آزمایشگاهی می‌شود. 6-OHDA از طریق تولید هیدروژن پراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل به نورون‌های دوپامینرژیک آسیب می‌رساند (۱۵). پیکنوژنول یک ترکیب از مواد طبیعی، با وزن مولکولی ۹۲-۵۵۲ کیلو دالتون، است که در اروپا آن را از پوست درخت کاج استخراج می‌کنند. ترکیبات عمده‌ی پیکنوژنول پروسیانیدن با نام‌های کاتچین و اپی کاتچین و مقداری ریبوفلاونوید و اسیدفنولیک می‌باشد. با توجه به اینکه پیکنوژنول صددرصد در آب محلول است، به راحتی می‌تواند عملکرد رادیکال آزاد را مهار نماید. ازاین‌رو، از ترکیبات استخراج شده پیکنوژنول به عنوان داروهای سنتی و تجاری برای بیماری‌های التهابی استفاده می‌کنند. همچنین مطالعات حیوانی و کلینیکی نشان دهنده‌ی اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی قوی پیکنوژنول بوده و امروزه برای بیماران التهابی توصیه می‌شود (۱۵، ٤، ٢٦). با توجه به محدودیت‌های مصرف داروهای شیمیائی و هزینه بالای آنها، در این مطالعه اثر گیاه پیکنوژنول را بر بهبود عملکرد حرکتی، رفتار اضطرابی و تغییرات نورونی مغز در مدل تجربی بیماری پارکینسون القاشده با 6-OHDA در موش‌های نر نژاد NMRI بررسی نماییم.

مواد و روش‌ها

حیوانات مورد مطالعه: چهل سر موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر بالغ نژاد NMRI با محدوده وزنی ۳۰ گرم از انستیتو پاستور تهیه و در قفس‌های ٤ تایی و تحت شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و محدوده دمای ۲۲-۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. همه‌ی جانوران دسترسی آزادانه به آب و غذای استاندارد داشتند و حداقل ۱۰ روز پس از آداپتاسیون به محیط به طور تصادفی به ۵ گروه ۸ تایی تقسیم و مورد استفاده قرار گرفتند. کلیه اقدامات

بر اساس پروتکل کمیته اخلاق و مقررات کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال انجام گرفت.

گروه‌های مورد مطالعه (n = ۸ در کلیه گروه‌ها): گروه کنترل سالین: حیواناتی که ۳ میکرولیتر محلول نرمال سالین حاوی ۰/۱ درصد اسید آسکوربیک، به عنوان حلال 6-OHDA، را به صورت یک‌طرفه در داخل استریانوم چپ دریافت کردند. گروه‌های تیمار: حیواناتی که ابتدا سم 6-OHDA (شرکت TOCRIS آمریکا) حاوی ۰/۱ درصد اسید اسکوربیک به میزان ۳ میکرولیتر را به صورت یک‌طرفه در داخل استریاتوم سمت چپ دریافت نمودند (6-OHDA با دوز ٦ میکروگرم در ۲ میکرولیتر محلول نمکی ۰/۹ درصد و ۰/۱ درصد ویتامین C تهیه شد) سپس الف: گروهی که آب مقطر، حلال پیکنوژنول، را به مدت ۷ روز به صورت گاواژ دریافت کردند (گروه لیژن یا ضایعه). ب: گروه‌هایی که ترکیب پیکنوژنول را با دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت گاواژ به مدت ۷ روز دریافت کردند.

استرئوتاکسی و القای مدل حیوانی بیماری پارکینسون: به منظور تزریق درون استریاتوم 6-OHDA، ابتدا موش‌ها با مخلوط کتامین با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم همراه با زایلازین با دوز ۱۰ میلی-گرم/کیلوگرم به صورت تزریق داخل صفاقی (IP)، بیهوش و تحت عمل جراحی قرار گرفتند. سپس با کمک دستگاه استرئوتاکسی (USA, Stoelting) و اطلس پاکسینوس مختصات مغز موش برای ناحیه استریاتوم (AP:+0.04 cm نسبت به برگما، ML:±0.18، DV: -0.35 cm از سطح استخوان جمجمه)، مشخص و کانولی به طول ۱۰ میلی‌متر در ناحیه استریاتوم کاشته شد. جهت بررسی محل دقیق کانول برای تعدادی از موش‌ها رنگ متیلن بلو تزریق شد و سپس با برش بافتی، محل دقیق قرارگیری کانول و تزریق در ناحیه استریاتوم مشخص شد. سپس با استفاده از سرنگ همیلتون ۵ میکرولیتری، با سرعت ۱ میکرولیتر در دقیقه برای مدت ۵ دقیقه، تزریق 6-OHDA از طریق کانول به صورت یک‌طرفه در ناحیه استریاتوم چپ انجام شد (۱).

تست‌های رفتاری برای تایید مدل بیماری پارکینسون

الف. چرخش ناشی از تزریق آپومورفین: یک هفته بعد از ایجاد مدل پارکینسون، آپومورفین با دوز ۰/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت IP تزریق شد. حیوانات از ۱۰ دقیقه قبل از شروع آزمایش به یک محفظه استوانه‌ای مدرج برحسب زاویه از جنس پلکسی گلاس به قطر ۳۳ و ارتفاع ۳۵ سانتی‌متر منتقل شدند. یک دقیقه پس از تزریق دارو، تعداد چرخش در فواصل زمانی ۱۰ دقیقه‌ای به مدت ٦۰ دقیقه تحت شرایط آرام توسط یک شمارش‌گر دستی اندازه‌گیری شد. با توجه به ناحیه‌ی آسیب دیده، تعداد چرخش به سمت نیمکره آسیب دیده (چپ) به عنوان عدد منفی و تعداد چرخش چرخش به سمت نیمکره سالم (راست) به عنوان عدد مثبت در نظر گرفته شده و تعداد خالص چرخش به صورت تفاضل چرخش‌ها در دو جهت محاسبه می‌شود. این آزمون طبق روش شرح داده شده توسط Borlongan و همکارانش در سال ۱۹۹۵ صورت می گیرد. در این آزمون موش‌های پارکینسونی بیش از ۳۰ چرخش در یک ساعت بر خلاف جهت تزریق نوروتوکسین را نشان می دهند. تعداد این چرخش‌ها در واحد زمان نشان‌دهنده شدت تخریب نورونی در جسم سیاه و شدت بیماری است (۱۱).

ب. کاتالپسی: برای بررسی کاتالپسی از روش استاندارد بار تست (Bar test) استفاده شد. در این روش دو پای جلوئی حیوان بر روی میل‌های چوبی و افقی به قطر ۱/۵ سانتی‌متر و به ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر از

کف جعبه قرارداده می‌شود. مدت زمانی را که هر دو پای جلویی حیوان روی میله افقی قرارگرفته جانور در وضعیت ثابت باقی خواهد ماند، اندازه گرفته می‌شود. زمان قطع آزمایش زمانی خواهد بود که حیوان یکی از پاهای جلوئی خود را از روی میله بردارد و یا اینکه سر خود را به طور جستجوگرایانه تکان بدهد. این کار برای سه مرتبه با فواصل ۳ دقیقه تکرار می‌گردد (۲۲).

تست اضطراب و فعالیت حرکتی: جهت سنجش اضطراب موش‌ها از تست ماز EPM استفاده شد. در تست EPM ابزار مورد استفاده یک دستگاه چوبی به ارتفاع ۵۰ سانتی‌متر بالاتر از کف و شامل دو بازوی باز ۵ × ۳۵ سانتی‌متر و دو بازوی بسته ۵ × ۳۵ سانتی-متر و یک سکوی مرکزی ۵ × ۵ سانتی‌متر هر کدام با یک سقف باز است. اتاق تست از لحاظ صدا، دما، نور، اشیا کاملا یکنواخت بود و این آزمایش در سکوت کامل انجام گرفت. در زمان انجام تست موش‌ها ابتدا در یکی از بازوهای باز قرار داده شدند. سپس به وسیله‌ی یک دوربین به مدت ۵ دقیقه پارامترهای مدت زمان حضور حیوان در بازوی باز و بسته، دفعات ورود به بازوی باز و بسته اندازه گیری شد.

به منظور تجزیه و تحلیل فعالیت بازوی باز، برای هر موش درصد زمان گذرانده شده در بازوی باز (OAT) و درصد ورود به بازوی باز (OAE) را حساب کرده، همچنین میزان فعالیت حرکتی موش‌ها که معادل مجموع تعداد دفعات ورود به بازوهای باز و بسته است، نیز محاسبه شد.

رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین: برای شمارش تعداد سلول‌های دوپامینرژیک در بافت استریاتوم مغز، ابتدا مغز درآورده شد و سپس دو نیمکره از یکدیگر جدا شد. نیمکره چپ در بوئن گذاشته شد و پس از تثبیت نمونه‌ها وارد پاساژ بافتی گردیدند. برای رنگ-آمیزی برش‌های بافتی مغز از رنگ‌های هماتوکسیلین – ائوزین استفاده شد. هماتوکسیلین برای رنگ‌آمیزی هسته (به رنگ آبی تیره تا سیاه) و ائوزین برای رنگ-آمیزی سیتوپلاسم (به رنگ صورتی) به کار برده شد. در مرحله ی آخر، تعداد سلول‌های دوپامینرژیک ناحیه استریاتوم در لام های رنگ آمیزی شده، در ٦ فیلد از هر لام، بوسیله‌ی میکروسکوپ نوری و نرم افزار Kekam شمارش شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: به منظور آنالیزهای آماری از نرم افزارSPSS Version 25 استفاده شد. ابتدا برای تعیین توزیع نرمال داده‌ها از آزمون کولموگراف–اسیمرنوف استفاده و بعد از تایید نرمال بودن توزیع داده‌ها، از تست ANOVA یک‌طرفه با آزمون Tukey استفاده شد. نتایج به صورت Mean±S.E. ارائه شد. در تمامی آزمون‌ها مقادیر P Value کمتر از ۰/۰۵ به عنوان مقادیر دارای ارزش آماری در نظر گرفته شد. سپس نمودارها با استفاده از نرم افزار گراف پد رسم گردید.

نتایج

بررسی رفتار چرخشی حیوانات بدنبال تزریق داخل صفاقی آپومورفین در موش‌های پارکینسونی شده با 6-OHDA: یک هفته بعد از ایجاد مدل بیماری پارکینسون یک‌طرفه با 6-OHDA، آپومورفین با دوز ۰/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت IP تزریق شد. یک دقیقه پس از تزریق دارو، تعداد چرخش در فواصل زمانی ۱۰ دقیقه‌ای به مدت ٦۰ دقیقه تحت شرایط آرام اندازه‌گیری شد. تعداد چرخش به سمت نیمکره آسیب دیده (چپ) به عنوان عدد منفی و تعداد چرخش چرخش به سمت نیمکره سالم (راست) به عنوان عدد مثبت در نظر گرفته شده و تعداد خالص چرخش به صورت تفاضل چرخش‌ها در دو جهت محاسبه می‌شود. در بررسی آماری تعداد کل چرخش

در یک هفته پس از جراحی در بین گروه دریافت کننده توکسین 6-OHDA با گروه دریافت کننده سالین اختلاف معنی‌داری ($p < ۰/۰۰۱$) مشاهده شد که نشان دهنده آسیب سلول‌های دوپامینرژیک ناشی از تزریق توکسین در ناحیه استریاتوم چپ می باشد (نمودار A ۱). همچنین تعداد کل چرخش در یک هفته پس از جراحی اختلاف معنی‌داری را در بین گروه دریافت کننده آب مقطر، به عنوان حلال پیکنوژنول، با گروه‌های دریافت کننده پیکنوژنول به میزان ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم ($p < ۰/۰۱$)، ۳۰ و ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم ($p < ۰/۰۰۱$) نشان دادند (نمودار B ۱). اختلاف معنی داری بین گروه‌های دریافت کننده ترکیب پیکنوژنول مشاهده نشد.

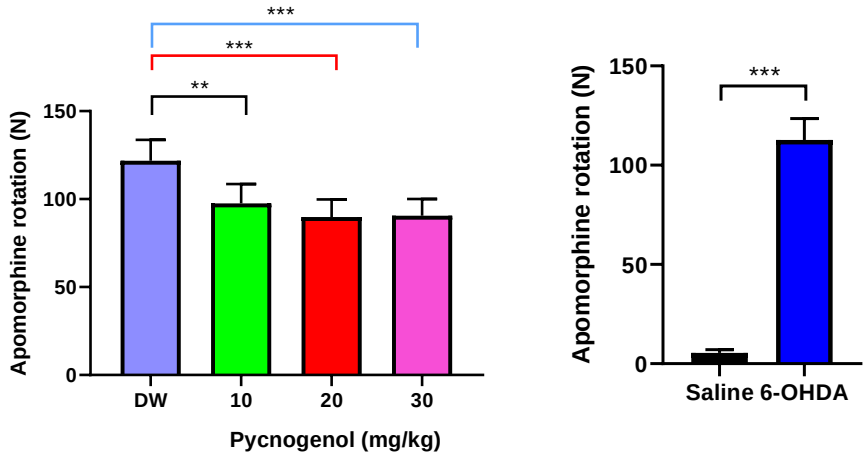
نتایج آزمون حرکتی کاتالپسی یا سختی عضلانی بدنبال تزریق داخل استریاتوم چپ توکسین 6-OHDA و تیمار با ترکیب پیکنوژنول در موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر از نژاد NMRI: نتایج حاصل از آزمون بار یا کاتالپسی در گروه دریافت کننده توکسین 6-OHDA در استریاتوم چپ نشان داد که تزریق توکسین موجب افزایش معنی‌دار کاتالپسی در حیوانات در مقایسه با گروه دریافت کننده سالین شد (نمودار A ۲). تجویز ترکیب پیکنوژنول به میزان‌های ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم ($p < ۰/۰۵$)، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم/کیلوگرم ($p < ۰/۰۰۱$) به صورت گاواژ موجب کاهش معنی‌داری در سختی عضلانی در مقایسه با گروه دریافت کننده آب مقطر شد (نمودار B ۲). همچنین اختلاف معنی‌داری بین گروه دریافت کننده پیکنوژنول ۳۰ میلی‌گرم/کیلوگرم با گروه دریافت کننده پیکنوژنول ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم مشاهده شد ($P<0.05$).

بررسی رفتار اضطرابی مدت زمان حضور در بازوی باز (OAT٪) دستگاه EPM، پس از تجویز ترکیب پیکنوژنول در موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر نژاد NMRI: نتیجه آزمون اضطرابی نشان داد که درصد مدت زمان حضور در بازوی باز تنها در گروهی که پیکنوژنول را به میزان ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم دریافت کردند، در مقایسه با گروهی که آب مقطر را به عنوان حلال ترکیب پیکنوژنول دریافت کردند، افزایش معنی‌داری ($p < ۰/۰۵$) را نشان داد. همچنین درصد مدت زمان حضور در بازوی باز در گروه دریافت کننده پیکنوژنول ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه دریافت کننده پیکنوژنول ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم نشان داد ($p < ۰/۰۵$) اما با گروه دریافت کننده پیکنوژنول ۳۰ میلی‌گرم/کیلوگرم اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (نمودار ۳).

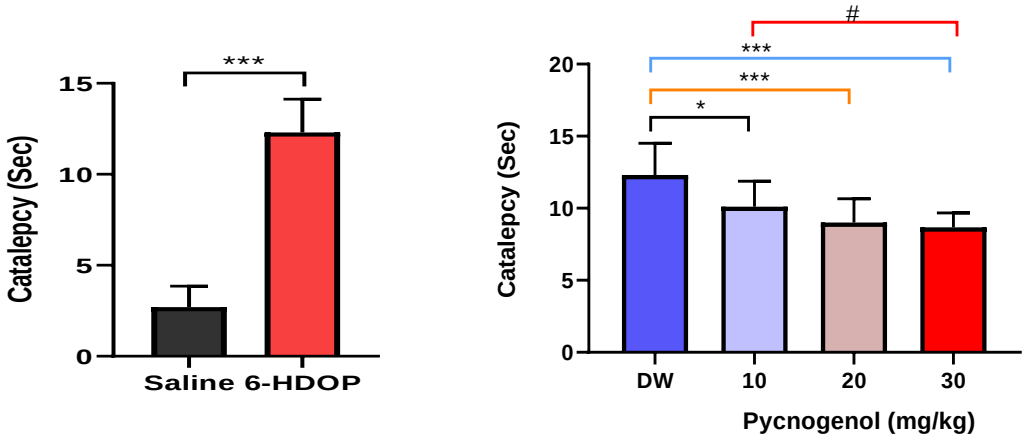
بررسی تعداد دفعات ورود به بازوی باز (OAE٪) دستگاه EPM، به عنوان شاخصی از رفتار اضطرابی، پس از تجویز ترکیب پیکنوژنول در موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر از نژاد NMRI: بررسی درصد تعداد دفعات ورود به بازوی باز، به عنوان شاخص اضطرابی، نشان داد که میزان ورود به بازوی باز در گروه‌های دریافت کننده پیکنوژنول به میزان ۳۰ و ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم در مقایسه با گروه دریافت کننده آب مقطر از افزایش معنی‌داری (به ترتیب $p < ۰/۰۱$ و $p < ۰/۰۵$) برخوردار است (نمودار ٤). اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های دریافت کننده پیکنوژنول مشاهده نشد. **مقایسه تعداد کل دفعات ورود به بازوهای باز و بسته (Locomotor activity) در دستگاه EPM در موش‌های نر بالغ نژاد NMRI:** تعداد دفعات ورود به بازوهای باز و بسته افزایش معنی‌داری را در گروه‌هایی که ترکیب پیکنوژنول را با مقادیر ۱۰ و ۳۰ میلی‌گرم/کیلوگرم ($p < ۰/۰۱$) و ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم ($p < ۰/۰۰۱$) دریافت کردند در مقایسه با گروه دریافت کننده آب

مقطر نشان داند (نمودار ۵). همچنین بین گروه‌های دریافت کننده ترکیب پیکنوژنول اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

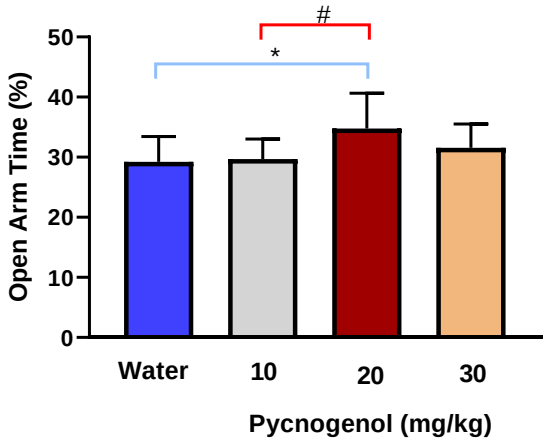
تغییرات نورورژنراتیو سلول‌های دوپامینرژیک ناحیه استریاتوم مغز با استفاده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین بدنبال تیمار با ترکیب پیکنوژنول: نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی بافت مغز نشان داد که توکسین 6-OHDA موجب کاهش معنی-دار ($p < ۰/۰۰۱$) سلول‌های دوپامینرژیک بافت استریاتوم مغز در مقایسه با گروه کنترل (سالین) شد (نمودار ٦ A, B). همچنین تجویز ترکیب پیکنوژنول به میزان‌های ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم ($p < ۰/۰۱$)و ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم/کیلوگرم ($p < ۰/۰۰۱$) به صورت گاواژ موجب افزایش معنی‌داری در تعداد سلول‌های دوپامینرژیک ناحیه استریاتوم در مقایسه با گروه دریافت کننده آب مقطر گردید (نمودار ٦ C,D). بین گروه‌های دریافت کننده ترکیب پیکنوژنول اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.



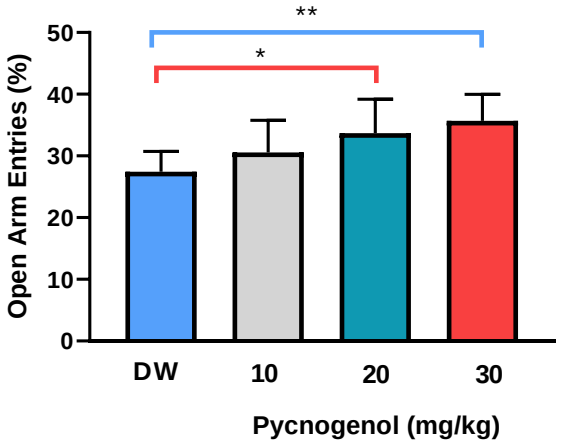
نمودار ۱: میزان چرخش ناشی از تزریق داخل صفاقی آپومورفین در حیوانات پارکینسونی شده با توکسین 6-OHDA یک هفته پس از جراحی. A: تعداد کل چرخش در گروه دریافت کننده توکسین 6-OHDA در استریاتوم چپ. B: گروه های دریافت کننده پیکنوژنول با دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی گرم/میلی لیتر.



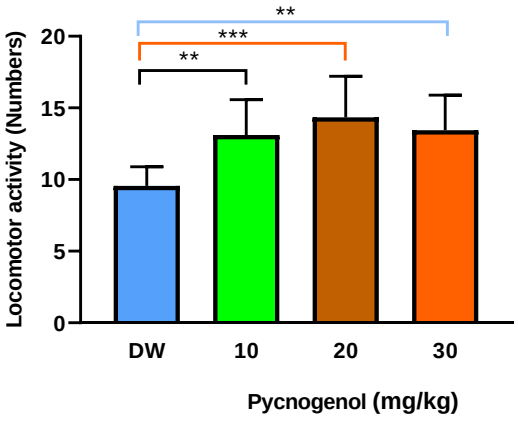
نمودار A,B ۲: سنجش میزان کاتالپسی بدنبال القای مدل پارکینسون با توکسین 6-OHDA یک هفته پس از جراحی بین گروه-های مورد مطالعه. A: میزان کاتالپسی در گروه دریافت کننده توکسین 6-OHDA در استریاتوم چپ. B: گروه‌های دریافت کننده پیکنوژنول با دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی گرم/میلی لیتر.



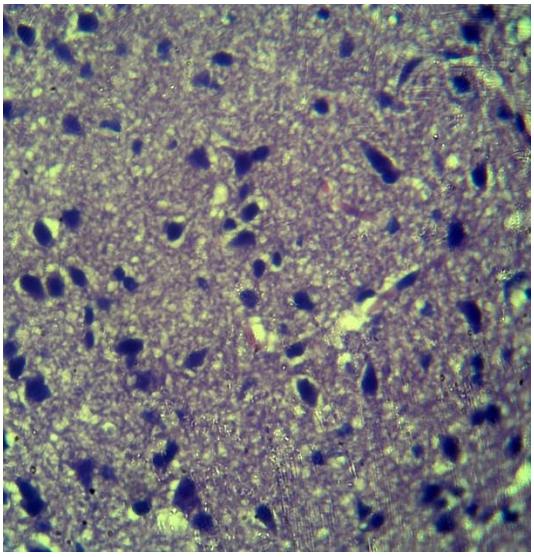
نمودار ۳: مقایسه درصد مدت زمان حضور در بازوی باز (OAT٪) در دستگاه EPM بدنبال القای مدل پارکینسون با توکسین 6-OHDA یک هفته پس از جراحی بین گروه‌های دریافت کننده ترکیب پیکنوژنول با گروه دریافت کننده آب مقطر.



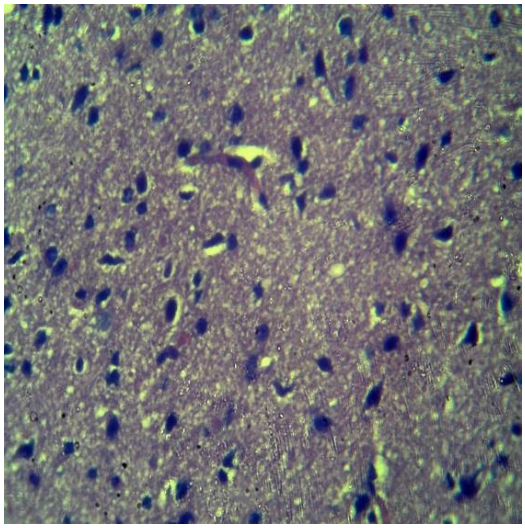
نمودار ٤: مقایسه درصد تعداد دفعات ورود به بازوی باز (OAE٪) در دستگاه EPM بدنبال القای مدل پارکینسون با توکسین 6-OHDA یک هفته پس از جراحی بین گروه‌های دریافت کننده ترکیب پیکنوژنول با گروه دریافت کننده آب مقطر.



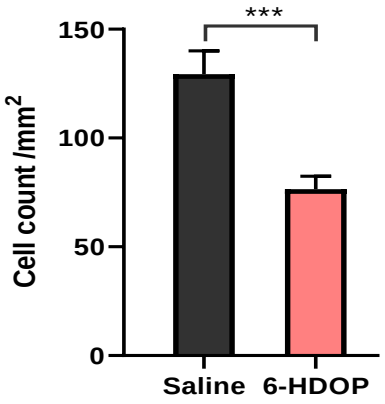
نمودار ۵: مقایسه تعداد حضور در بازوی باز (OAE٪) و بازوی بسته (CAE)، به عنوان شاخص فعالیت حرکتی، در دستگاه EPM بدنبال القای مدل پارکینسون با توکسین 6-OHDA بین گروه‌های دریافت کننده ترکیب پیکنوژنول با گروه دریافت کننده آب مقطر.



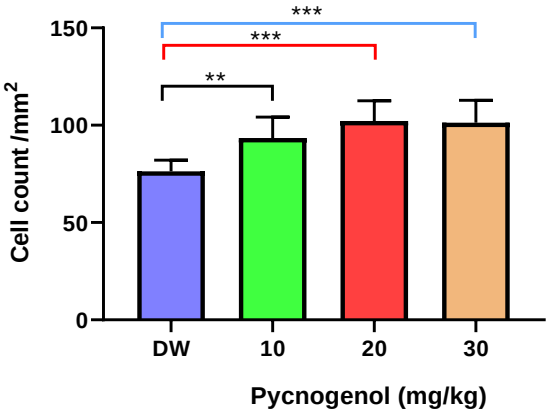
شکل ٦: بررسی تعداد سلول‌های دوپامینرژیک ناحیه استریاتوم مغز با رنگ‌آمیزی **H & E** بدنبال القای مدل پارکینسون با توکسین 6-OHDA بین گروه‌های دریافت کننده ترکیب پیکنوژنول با گروه دریافت کننده آب مقطر. A: میکروگراف ساژیتال ناحیه استریاتوم در گروه دریافت کننده سالین.



B: میکروگراف ساژیتال ناحیه استریاتوم در گروه دریافت کننده پیکنوژنول با دوز ۳۰ میلی گرم/میلی لیتر. ضخامت میکروگراف ها ۱۰ میکرون و بزرگ نمایی ٤۰۰x می باشند.



بررسی تعداد سلول‌های دوپامینرژیک ناحیه استریاتوم مغز با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین بدنبال القای مدل پارکینسون با توکسین 6-OHDA بین گروه‌های دریافت کننده 6-OHDA و سالین.



نتایج حاصل از رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین بافت مغز در بین گروه‌های دریافت کننده ترکیب پیکنوژنول با گروه دریافت کننده آب مقطر.

بحث

بیماری پارکینسون یک اختلال نورودژنراتیو است که با تخریب تدریجی و وسیع نورون های دوپامینرژیک جسم سیاه همراه می باشد. در خصوص مکانیزم‌های پاتولوژیک و علت مرگ نورونی سلول‌های دوپامینرژیک جسم سیاه در این بیماری فرضیات متعددی از جمله افزایش تشکیل رادیکال های آزاد مطرح می باشد. شواهد زیادی وجود دارد که نشان می دهد استرس اکسیداتیو ناشی از اختلالات فوق نهایتا منجر به تحلیل رفتن نورونی می شود (۲۵). با توجه به تحقیقات انجام شده در سال‌های اخیر، التهاب، نقش برخی ژن‌ها و استرس اکسیداتیو را در بیماری‌های نورودژنراتیو مانند پارکینسون مؤثر می‌دانند. بنابراین استفاده از داروهائی که التهاب و استرس اکسیداتیو مغز را کاهش دهند و موجب افزایش سطح فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی درون سلول شوند، از چشم پژوهشگران دور نمانده است (۷، ۲۸). از این رو هدف این مطالعه بررسی تأثیر ترکیب پیکنوژنول در بهبود عملکرد حرکتی، رفتار اضطرابی و تغییرات نورورژنراتیو در مدل تجربی بیماری

پارکینسون القا شده با 6-OHDA در موش‌های نر نژاد NMRI بود.

بررسی آماری تعداد کل چرخش در تست رفتاری آپومورفین، در یک هفته پس از جراحی، در بین گروه دریافت کننده توکسین 6-OHDA در مقایسه با گروه دریافت کننده سالین، حلال توکسین، اختلاف معنی-داری را نشان داد که تعداد چرخش نشان‌دهنده میزان آسیب سلول‌های تولید کننده دوپامین (سلول‌های دوپامینرژیک) و عدم بالانس مقدار دوپامین در دو استریاتوم چپ و راست مغز می‌باشد (۱۳، ۲۳).

همچنین تعداد کل چرخش در بین گروه دریافت کننده آب مقطر، به عنوان حلال پیکنوژنول، با گروه-های دریافت کننده پیکنوژنول (با مقادیر ۱۰، ۲۰، ۳۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) اختلاف معنی‌داری را نشان داد. نتایج تست کاتالپسی در گروه دریافت کننده توکسین 6-OHDA در استریاتوم چپ نشان داد که تزریق توکسین موجب افزایش معنی‌دار کاتالپسی یا سختی عضلانی در حیوانات در مقایسه با گروه دریافت کننده سالین شد. این نتیجه تایید کننده اثر مخرب توکسین 6-OHDA در آسیب ناحیه حرکتی استریاتوم مغز می‌باشد که در مطالعات قبلی نیز به اثبات رسیده است، در صورتی که تزریق سالین، به عنوان حلال توکسین، موجب ایجاد آسیب عصبی و سفتی عضلانی نگردید (۱۹، ۳۰). علاوه بر این، تجویز ترکیب پیکنوژنول با مقادیر فوق به صورت گاواژ موجب کاهش معنی‌داری در سختی عضلانی در مقایسه با گروه دریافت کننده آب مقطر شد.

نتیجه شاخص‌های آزمون اضطرابی (مدت زمان حضور در بازوی باز (OAT٪) و تعداد دفعات حضور در بازوی باز (OAE٪)) در دستگاه EPM، پس از تجویز ترکیب پیکنوژنول نشان داد که پیکنوژنول اثرات ضداضطرابی موثری از خود برجای گذاشت. بررسی تغییرات تعداد سلول‌های دوپامینرژیک ناحیه استریاتوم مغز با استفاده از رنگ‌آمیزی H & E نشان داد که توکسین 6-OHDA موجب کاهش معنی‌دار تعداد سلول‌های دوپامینرژیک بافت استریاتوم مغز در مقایسه با گروه کنترل (سالین). همچنین تجویز ترکیب پیکنوژنول موجب افزایش معنی‌داری در تعداد سلول-های دوپامینرژیک ناحیه استریاتوم گردید.

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱٤ انجام شد، اثر آنتی-اکسیداتیو ترکیب پیکنوژنول در مدل حیوانی بیماری افسردگی ناشی از کورتیکوسترون در موش کوچک آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که میزان زمان بی حرکتی حیوانات، پس از تجویز پیکنوژنول به طور معنی‌داری کاهش یافت (۲۰). اثر ضدالتهابی و آنتی‌اکسیداتیو ترکیب طبیعی پیکنوژنول در سال ۲۰۱۹ نیز در بیماران ADHD مورد بررسی قرارگرفت (۲۹). همچنین اثرات این ترکیب در سال ۲۰۲۰ در بیماران مبتلا به پارکینسون مورد بررسی قرارگرفت که موجب کاهش علایم در این بیماران شد (۵).

اثر محافظتی ترکیب پیکنوژنول در مدل سمیت عصبی ناشی از روتینون در رده سلولی PC12 از طریق تنظیم مسیر سیگنالینگ التهابی NF-ƙB در سال ۲۰۱۵ مورد بررسی قرارگرفت که ترکیب پیکنوژنول موجب افزایش ماندگاری سلول‌ها و کاهش مرگ سلولی شد (۱۲) که در مطالعات مولکولی ما نیز مشاهده شد (داده ها ارایه نشده است). علاوه بر این، اثر پیکنوژنول در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۳ در مدل پارکینسون القا شده با MPTP انجام شد، نشان داد که ترکیب پیکنوژنول اثرات ضدالتهابی عصبی قوی دارد و موجب کاهش میزان نیتریک اکساید سنتاز (iNOS) و اینترلوکین- ۲ می‌شود (۱۷).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۱ بر روی سلول‌های کندروسیت مستخرج از بافت ملتهب زانو صورت گرفت، پیکنوژنول اثرات ضدالتهابی قوی از خود

نشان داد و همچنین موجب کاهش نیتریک اکساید سنتاز و متعاقب آن نیتریک اکساید در محیط کشت شد و از این طریق میزان استرس نیتروزاتیو را کاهش می‌دهد (۲۱).

مطالعات Bayeta و همکارانش در سال ۲۰۱۰ نیز نشان‌دهنده اثرات ضدالتهابی پیکنوژنول می باشد. بر طبق یافته های این تحقیق هنگامی که رده سلولی J 774 در معرض پیکنوژنول به مدت دو ساعت قرار گرفتند، تولید پراکسیداز که یکی از عوامل اصلی التهاب می‌باشد مهار می‌شود (۲).

تحقیقات Grimm و همکارانش در سال ۲۰۰٤ نیز نشان از ماهیت آنتی‌اکسیدانی پیکنوژنول دارد که با مهار و برداشت رادیکال‌های آزاد می تواند به سلامت سلول‌ها کمک کند. پیکنوژنول بطور موثری می‌تواند متالوپروتئینازهای ماتریکس مانند MMP-1، MMP-2 و MMP-9 را مهار کند (١٤). همچنین مطالعات نشان‌دهنده اثرات مفید پیکنوژنول بر روی رفتارهای شناختی و بهود عملکرد شناختی در جانوران می شود و همچنین این ترکیب باعث کنترل سطح لیپید و استرس اکسیداتیو در جانوران می شود (۸). تحقیقات Durackova و همکارانش در سال ۲۰۰۳ نیز نشان می دهد که تیمار با پیکنوژنول باعث بهبود در متابولیسم لیپیدها و سطح استروئیدها می شود (۲۷).

لازم به ذکر است که مطالعات پراکنده‌ای، بی‌تاثیر بودن ترکیب پیکنوژنول را در مقادیر کمتر از این مطالعه، گزارش نمودند.

نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر از پیکنوژنول، به عنوان یک ترکیب ضدالتهابی، به منظور بررسی تاثیر آن بر بهبود علایم حرکتی، رفتار اضطرابی و تعداد نورون‌های دوپامینرژیک ناحیه استریاتوم مغز در مدل بیماری پارکینسون القا شده با ٦-هیدروکسی دوپامین در موش نر نژاد NMRI، استفاده شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ترکیب پیکنوژنول می‌تواند موجب کاهش رفتار اضطرابی و اثرات نورورژنراتیو در ناحیه استریاتوم مغز شود. ازاین‌رو مطالعات گسترده‌تر این ترکیب، خصوصا مطالعات انسانی، برای پیشگیری و استفاده درمانی توصیه می شود.

منابع

1. Alvarez-Fischer D., Henze C., Strenzke C., Westrich J., Ferger B., Höglinger G., et al., 2008. Characterization of the striatal 6-OHDA model of Parkinson's disease in wild type and α-synuclein-deleted mice. *Experimental Neurology*, 210(1): 182-193.

2. Bayeta E., Lau B.H., 2000. Pycnogenol inhibits generation of inflammatory mediators in macrophages. *Nutrition Research*, 20(2): 249-259.

3. Berry C., Vecchia C. L., Nicotera P., 2010. Paraquat and Parkinson's disease, *Cell Death Differentiation*, 17(7): 1115-1125.

4. Betarbet R., Sherer T.B., Greenamyre J.T., 2002. Animal models of Parkinson's disease. *Bioassays*, 24(4): 308-318.

5. Cesarone M.R., Belcaro G., Hosoi M., Ledda A., Feragalli B., Maione C., et al., 2020. Supplementary management with Pycnogenol® in Parkinson's disease to prevent cognitive impairment. *Journal of Neurosurgical Sci*ences, 64(3): 258-262.

6. Chen W., Sun Z., Wang X.J., Jiang T., Huang Z, Fang D, et al., 2009. Direct interaction between Nrf2 and p21Cip1/WAF1 upregulates the Nrf2-mediated antioxidant response. *Molecular Cell*, 34(6): 663-673.

7. D'Andrea G., 2010. Pycnogenol: a blend of procyanidins with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia*, 81(7): 724-736.

8. Durackova Z., Trebaticky B., Novotny V., Zitnanova I., Breza J., 2003. Lipid

lesions: effect of amphetamine, apomorphine, and DOPA. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 12(2): 185-188.

16. Kaplan M.H., 2013. STAT signaling in inflammation. *JAK-STAT*, 2(1): e24198.

17. Khan M.M., Kempuraj D., Thangavel R., Zaheer A., 2013. Protection of MPTP-induced neuroinflammation and neurodegeneration by Pycnogenol. Neurochemistry International, 62(4): 379-388.

18. Lin T.K., Liou C.W., Chen S.D., Chuang Y.C., Tiao M.M., Wang P.W., et al., 2009. Mitochondrial dysfunction and biogenesis in the pathogenesis of Parkinson's disease. Chang Gung Medical Journal, 32(6): 589-599.

19. Mahmoudi J., Nayebi A.M., Samini M., Reyhani-Rad S., Babapour V., 2011. Buspirone improves the anti-cataleptic effect of levodopa in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. Pharmacological reports, 63(4): 908-914.

20. Mei L., Mochizuki M., Hasegawa N., 2014. Pycnogenol ameliorates depression-like behavior in repeated corticosterone-induced depression mice model. *Biomed Research International*, 2014(3): 942927.

21. Peng Y.J., Lee C.H., Wang C.C., Salter D.M., Lee H.S., 2012. Pycnogenol attenuates the inflammatory and nitrosative stress on joint inflammation induced by urate crystals. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(4): 765-774.

22. Pires J., Bonikovski V., Futuro-Neto H., 2005. Acute effects of selective serotonin reuptake inhibitors on neuroleptic-induced catalepsy in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38(12): 1867-1872.

23. Przedbroski S., Leviver M., Jiang H., Ferreira M., Jackson-Lewis V., Donaldson D., et al., 1995. Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by instrastriatal injection of 6-

metabolism and erectile function improvement by pycnogenol®, extract from the bark of pinus pinaster in patients suffering from erectile dysfunction-a pilot study. *Nutrition Research*, 23(9): 1189-1198.

9. Eftekharzadeh B., Maghsoudi N., Khodagholi F., 2010. Stabilization of transcription factor Nrf2 by tBHQ prevents oxidative stress-induced amyloid β formation in NT2N neurons. *Biochimie*, 92(3): 245-253.

10. Franco R., Panayiotidis M.I., 2009. Environmental toxicity, oxidative stress, human disease and the" black box" of their synergism: how much have we revealed? *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674(1-2): 1-2.

11. Fujita M., Nishino H., Kumazaki M., Shimada S., Tohyama M., Nishimura T., 1996. Expression of dopamine transporter mRNA and its binding site in fetal nigral cells transplanted into the striatum of 6-OHDA lesioned rat. *Brain Research Molecular Brain Research*, 39(1-2): 127-136.

12. Gao B., Chang C., Zhou J., Zhao T., Wang C., Li C., et al., 2015. Pycnogenol protects against rotenone-induced neurotoxicity in PC12 cells through regulating NF-κB-iNOS signaling pathway. *DNA Cell Biology*, 34(10): 643-649.

13. Gerlach M., Riederer P., 1996. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *Journal of Neural Transmission*, 103(8-9): 987-104.

14. Grimm T, Schäfer A., Högger P., 2004. JFRB, Medicine. Antioxidant activity and inhibition of matrix metalloproteinases by metabolites of maritime pine bark extract (pycnogenol). *Free Radical Biology and Medicine*, 36(6): 811-822.

15. Hefti F., Melamed E., Sahakian B.J., Wurtman R.J., 1980. Circling behavior in rats with partial, unilateral nigro-striatal

hydroxydopamine. *Neuroscience,* 67(3): 631-647.

24. Rascol O., Payoux P., Ory F., Ferreira J.J., Brefel-Courbon C., Montastruc J.L., et al., 2003. Limitations of current Parkinson's disease therapy. *Annals of Neurology*, 53(3): 3-15.

25. Roghani M., Behzadi G., 2001. Neuroprotective effect of vitamin E on the early model of Parkinson's disease in rat: behavioral and histochemical evidence. *Brain Research*, 892(1): 211-217.

26. Rohdewald P., 2002. A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 40(4): 158-168.

27. Ryan J., Croft K., Mori T., Wesnes K., Spong J., Downey L., et al., 2008. An examination of the effects of the antioxidant Pycnogenol® on cognitive performance, serum lipid profile, endocrinological and oxidative stress biomarkers in an elderly population. *Journal of Psychopharmacology*, 22(5): 553-562.

28. Stanislavov R., Nikolova V., 2003. Treatment of erectile dysfunction with pycnogenol and L-arginine. *Journal of Sex and Marital Therapy*, 29(3): 207-213.

29. Tabolacci C., Forni C., Jadeja R.N., Facchiano F., 2019. Natural compounds against cancer, inflammation, and oxidative stress. *Biomed Research International*, 2019: 9495628.

30. Tostes J., Medeiros P., Melo-Thomas L., 2013. Modulation of haloperidol-induced catalepsy in rats by GABAergic neural substrate in the inferior colliculus. *Neuroscience*, 255: 212-218.