اثر محافظت عصبی گرلین بر اجسام سیاه در مدل پارکینسونی القاشده با MPTP

ندا نیکوکلام نظیف[۱]، مریم خسروی[*۲]، رامش احمدی[۳]، مریم بنانج[٤] ، احمد مجد[٥]

چکیده

بیماری "پارکینسون" نوعی اختلال پیشرونده حرکتی درسیستم عصبی مرکزی است. این بیماری از دست دادن نورون‌های دوپامینرژیک مسیر نیگرواستریاتال که در مغز میانی از ناحیه توده سیاه به جسم مخطط می‌رود؛ همراه است. "گرلین" به عنوان یک محافظت‌کنندهٔ نورونی در بیماری پارکینسون نقش ایفا می‌کند. هدف از این مطالعه بررسی اثر محافظتی عصبی گرلین بر اجسام سیاه در مدل پارکینسونی القا شده با MPTP می‌باشد.

بدین منظور، ٤٠ سرموش نر نژاد NMRI به طور تصادفي به ٥ گروه زیر تقسیم شدند: کنترل، سالین ، پارکینسون، پارکینسون+گرلین ۰/۰۰۰۲ mg/kg، پارکینسون+گرلین ۰/۰۰۰٤ mg/kg.بیماري پارکینسون، به وسیله تزریق MPTP به مدت ٤ روز متوالی (۲۵ mg/kg, i.p) ایجاد گردید. درمان با گرلین به صورت تزریق داخل صفاقی یک روز بعد از ایجاد بیماری به مدت ۳۰ روز انجام شد. براي سنجش کاتالپسي از تست بار استفاده شد. در پایان، پروتکل بافت مغز جداسازی؛ و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین -ائوزین (H&E) انجام شد. همچنین سطح فاکتور نکروزدهنده تومورآلفا (TNF-a) و اینترلوکین -۱۰ (IL-۱۰)درجسم سیاه و مخطط به روش الایزا اندازه‌گیری و ملاحظه گردید که گرلین به طور مؤثری موجب کاهش میزان کاتالپسی و جلوگیری از کاهش نورون‌های دوپامینرژیک در جسم سیاه و کاهش معناداری سطح TNF-a و افزایش معناداری سطح IL-۱۰ درجسم سیاه و مخطط شده است. نتایج این مطالعه گویای آن است که گرلین دارای نقش محافظتی است و باعث بهبود کاتالپسی، کاهش فاکتورهای التهابی و افزایش فاکتورهای ضد التهابی در حیوانات پارکینسونی می‌شود.

واژگان کلیدی: پارکینسون، گرلین، موش ، IL-۱۰، TNF-a .

۱. دانشجوی دکتری ، دانشکده علوم زیستی ،واحد تهران شمال ،دانشگاه آزاد اسلامی ،تهران ،ایران.

۲. استادیار دانشکده علوم زیستی ،واحد تهران شمال ،دانشگاه آزاد اسلامی ،تهران ، ایران.

* نشاني نویسنده مسئول: تهران - پاسداران میدان هروی گلستان ٥- بوستان ۱۰ دانشگاه ازاد واحد تهران شمال دانشکده علوم زیستی

پست الکترونیک :maryam-khosravi@iau-tnb.ac.ir تلفن: ۰۹۱۲۲۵۳٦۲۷۳ دورنویس : ۰۲۱-۲۲۹٥۰۷۲۳

۳. استادیار ، گروه فیزیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.

٤. استادیار ،دانشکده علوم زیستی ،واحد تهران شمال ،دانشگاه آزاد اسلامی ،تهران ،ایران.

٥. استاد، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

مقدمه

"پارکینسون" یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مغزی پیشرونده و مرتبط با سن است که توانایی‌های عملکردی و حرکتی افراد را کاهش می‌دهد(۱). اختلالات حرکتی این بیماری، همچون سفتی عضلانی، لرزش در حال استراحت، آکینزی، یا مشکل در شروع حرکات، کاهش حرکات خود به خودی و برادیکینزی می‌باشد(۲). عامل اصلی این بیماری، دژنراسیون نورون‌های دوپامینرژیک در جسم سیاه و به دنبال آن مشکل در آزادسازی دوپامین در ناحیه استریاتوم مغز می‌باشد(۳). مسیرهای حرکتی را هسته‌های قاعده‌ای و مسیر نیگرواستریاتال کنترل می‌کنند و اختلالات حرکتی در بیماری پارکینسون نمایان می‌شود که با تخریب این مسیر و حذف دوپامین، به بخش ونترال جسم مخطط آسیب می‌رساند(٤). چهار عامل که در بیماری پارکینسون دخیل هستند عبارتند از: تجمع اجسام لوی، اختلال میتوکندریایی، عوامل ژنتیکی و استرس اکسیداتیو. در هسته‌های قاعده‌ای افراد بیمار، استرس اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد تولید شده، آسیب پیشرونده و مرگ سلول‌های عصبی دوپامینرژیک جسم سیاه را موجب می‌شود(٥). از بین رفتن نورون‌های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه از مدار کنترل حرکتی عقده‌های قاعده‌ای، باعث اختلالات حرکتی در بیماری پارکینسون می‌باشد. همچنین فاکتورها و فرآیندهای التهابی در مغز از عوامل مختلفی است که باعث آسیب‌های نورونی و پیشرفت بیماری می‌باشند(٦) .

سایتوکین‌ها به صورت پیش التهابی (عامل نکروزدهندهٔ تومورآلفا(TNF-α)) وضد التهابی (اینترلوکین۱۰ (IL-۱۰)) تقسیم می‌گردند(۷). TNF-α و گیرنده‌اش در سلول‌هاي میکروگلیال مغز (که با فعال کردن NF-κB از سلول‌ها محافظت می‌کنند) سیگنال‌هاي پیش التهابی کهTNF-α در مغز ایجاد می‌کند، در بیماری‌هایی مانند آلزایمر، پارکینسون در ارتباط هستند(۸). TNF-α در حیات سلول‌ها، بیان ژن و مرگ سلولي در التهاب سیستم عصبی مرکزي نقش مهمي دارد(۹). TNF-α ازسد خونی مغزی عبور می‌کند و باعث اختلال در حافظه شده و در شرایط استرس، بیش‌ترین افزایش التهاب را در بین سایر سایتوکین‌ها دارا می‌باشد و خود، عامل نکروز توموری آلفا یک سایتوکین ویژهٔ التهاب‌زاست (۱۰). افزایش سایتوکین‌ها و فاکتورهاي التهابي، از جمله TNF-α در بسیاري از بیماری‌هاي نورودژنراتیو (همچون بیماری پارکینسون) به اثبات رسیده است (۱۱).۱۰-IL یک سایتوکاین ضدالتهابی است که ازطریق جلوگیری بر واکنش‌های التهابی و خنثی‌سازی NF-KB عمل می‌کند(۱۲). ۱۰-IL به گیرنده خود بر روی غشای پلاسمایی منوسیت‌ها متصل و باعث فعال‌سازی تیروزین کیناز، جانوس کیناز۲ (Jak۲) وتیروزین کیناز ۲(Tyk۲) می‌گردد. Jak۲ و Tyk۲ باعث فسفریله‌شدن فعال کننده نسخه‌برداری و انتقال‌دهنده سیگنال (STAT۱, STAT۲, STAT٥) و در نهایت موجب تنظیم بیان ژن NF-KBمی‌شود.-IL ۱۰برای کاهش التهاب ازطریق فعال‌سازی مسیرسیگنالیJak-STAT عمل می‌کند(۱۳). سایتوکین ۱۰-IL می‌تواند

پاسخ‌های التهابي ناشي از آسيب بافتي را محدود کند؛ زيرا نوعی تنظيم‌کننده سيستم ايمني است(١٤).

MPTP یک ترکیب لیپوفیل که ۱متیل، ٤ فنیل، ۱ و ۲ و ۵ و ٦ تترا هیدروپیریدین می‌باشد که از سدخونی مغزی عبور می‌کند و در داخل مغز، با آنزیم مونوآمین اکسیداز B (MAO-B) مشتق از سلول‌های گلیال، به ۱متیل، ٤ فنیل پیریدینیوم تبدیل می‌شود؛ دوپامین را در فضای سیناپسی آزادکرده به تجمع درمتیوکندری و اختلال در زنجیره انتقال الکترونیدر متیوکندری منجر می‌شود که این، سبب تولید بیش از اندازه رادیکال‌های سوپر اکساید (ROS) می‌گردد و کاهش تولید ATP در نهایت باعث تخریب نورون‌ها می‌شود(۱۵).

گرلین یک هورمون پپتیدی است که "هورمون گرسنگی" نام گرفته است (١٦). درپژوهش‌های جدید، بین بیماری پارکینسون و اختلال عملکرد دستگاه گوارش ارتباط مسقیم وجود دارد. لویی بادی ولویی نوریت که هر دو توسط آلفا سینوکلین (یک پروتئین پیش سیناپسی که مستعد تاخوردگی، تجمع و به شکل لویی بادی درآمدن در نورون‌های دوپامینرژیک است)ساخته می‌شوند؛ کلید اصلی بیماری پارکینسون هستند و می‌توانند جسم سیاه و سایر مناطق مغز را تحت تأثیر قرار دهند و باعث بیماری شوند. آلفا سینوکلین از معده سرچشمه می‌گیرد و از طریق سیستم عصبی روده به مغز مهاجرت و در نهایت در نورون‌های دوپامینی قسمت جسم سیاه ساکن می‌شود. همچنین نقش محافظت از جسم مخطط را در برابر کاهش دوپامین دارا می‌باشد و تولید گرلین در بیماران پارکینسونی کاهش می‌یابد(۱۷). گرلین نقش متحافظتی درنورون‌ها دارا می‌باشد و نوعی عامل درمانی جدید در بیماری‌های عصبی همچون بیماری پارکینسون است (۱۸). در حالی که هیچ درمان قطعی برای بیماری پارکینسون وجود ندارد و فقط علائم بیماری کاهش پیدا می‌دهد. این پژوهش به دنبال دارویی غیردوپامنیرژیک مانند گرلین است که این دارو بتواند علائم حرکتی و غیرحرکتی را تسکین ببخشد و عوارض جانبی آن را کاهش دهد.

مواد و روش‌ها

حیوانات مورد آزمایش

این مطالعه تجربی برروی ٤٠ سرموش سوري نرنژاد NMRI، در آزمایشگاه فیزیولوژي دانشگاه آزاد اسلامي واحد قم انجام شد. حیوانات در محدودهٔ وزنی ۵± ۳۰ گرم تهیه و از انستیتو پاستور کرج خریداری شدند. حیوانات در دماي ۲± ۲۳ درجه سانتی گراد؛ رطوبت ٤٠% ٤٥% در قفس‌های پلاستیکی پوشیده شده با خاک ارّه و در شرایط نوری ۱۲ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی به طور ثابت و آب و غذای مناسب در اتاق حیوانات نگهداری و بر اساس استانداردهاي رعايت حقوق حيوانات، مصوبه دانشگاه آزاد اسلامي و معاهده هلسينكي نگهداري شدند.

گروه‌های آزمایشی

موش‌ها به طور تصادفی به ۵ گروه تقسیم شدند (n=۸) :گروه کنترل (دست نخورده)، گروه سالین(به مدت سی روز نرمال سالین را دریافت کردند)، پارکینسون، پارکینسون+گرلین۰/۰۰۰۲ میلی گرم بر کیلوگرم(mg/kg) ، پارکینسون + گرلین۰/۰۰۰٤ میلی گرم بر کیلوگرم (این گروه‌ها به مدت سی روز تحت درمان با گرلین قرار گرفتند) .

روش القا و ارزیابی مدل بیماری پارکینسون

به منظور ایجاد مدل بیماری پارکینسون، ازMPTP (شرکت سازندهSigma)به میزان ۲۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم (۲۵میلی گرم در ۵ سی سی نرمال سالین) به مدت چهار روز به صورت داخل صفاقی (i.p) تزریق شد. برای ارزیابی کاتالپسی از تست بار (Bar Test) استفاده شد. این آزمون برای بررسی اختلالات حرکتی ایجاد شده توسط MPTP در جوندگان به کار می‌رود. وسیله مورد استفاده در این آزمون، یک بارفیکس چوبی دارای یک سکو است. ارتفاع بارفیکس از سکو ۹ سانتی‌متر و قطر میله ۰/۹ سانتی‌متر است. برای اجرای آزمایش، حیوان روی سکو و دو دست آن به آرامی روی میله بارفیکس قرار داده شد. مدت زمانی که حیوان در این وضعیت باقی بود، ثبت شد(۱۹). تمام گروه‌ها، یک روز بعد از ایجاد بیماری و در روز سی‌ام با آزمون تست، مورد ارزیابی میزان جمود عضلانی قرار گرفتند.

روش آماده‌سازی داروی گرلین

ابتدا۰/۵میلی‌گرم داروی گرلین (شرکت سازندهAlfa Aesar) را در ۵۰ سی‌سی محلول (۵ سی‌سی DMSO؛ شرکت سازنده Merck + ٤۵ سی‌سی نرمال سالین) حل شد. یک روز پس از ایجاد مدل بیماری به مدت ۳۰ روز در فواصل ۲٤ ساعته حیوانات، گرلین را به صورت داخل صفاقی در دو دوز ۰/۰۰۰۲ و۰/۰۰۰٤ میلی گرم بر کیلوگرم (حجم تزریق به ترتیب ۰/۵ و۱ میکرولیتر (µl.)) دریافت کردند. سپس موش‌ها را ۲٤ ساعت پس از آخرین آزمایش، با رعایت اصول اخلاقي ابتدا با تزریق درون صفاقي ترکیبي ازکتامین و زایلازین (شرکت سازنده Sigma) بی‌هوش و سر آنها با کمک قیچی مخصوص جدا و کل بافت مغز را از جمجمه برای رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین(H&E)، سنجش سطح TNF-α و۱۰-IL خارج نموده‌ایم.

رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین (H&E)

بافت مغز به منظور تثبیت در فرمالین ۱۰% منتقل شد. سپس مراحل آبگیري، شفافسازي، حمام پارافین و قالب‌گیري انجام و در مرحله بعد به وسیلۀ میکروتوم بر شهایی به ضخامت ۵-۷ میکرون از آن‌ها تهیه شد. پس از

رنگ‌آمیزي باهماتوکسیلین- ائوزین (شرکت سازنده۵۰۴۲C) به وسیلهٔ میکروسکوپ Medacm n۱۰۷ تحت بررسی و عکسبرداري با استفاده از دوربین Dino Lite مخصوص میکروسکوپ متصل به کامپیوتر(CMEX) ، از نقاط موردنظر، تصویر تهیه می‌شود. نحوه شمارش نورون‌های عصبی با استفاده از نرم افزار Image Pro Plus (V.٦)، در این بررسی نقاط بزرگ‌تر از ۷ میکرومتر (سطح ۵۰۰ میکرومتر(µm) و با ۵ بار تکرار)به عنوان هسته نورون‌های عصبی در نظر گرفته شد.

سنجش سطح TNF-α و۱۰-IL ، توسط روش الایزا

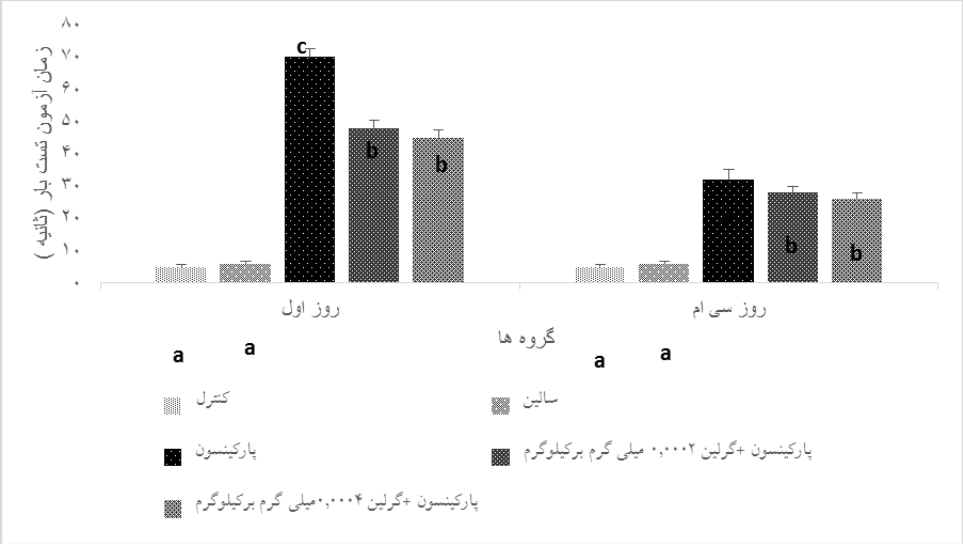
نواحي جسم سیاه و جسم مخطط مغز را با توجه به اطلس پاکسینوس جدا کردیم و فوراً داخل تانک ازت قرار دادیم. در مرحله بعد، در فریز ۸۰- نگهداری شدند. بعد از هموژنیز و سانتریفیوژ، در نهایت سطح پروتئین-TNF α و اینتر لوکین-۱۰با استفاده از کیت الایزا (Mouse TNF alpha ELISA Kit (ab۱۰۰۷٤۷ و Mouse IL-۱۰ (ELISA kit (Interleukin-۱۰) (ab۱۰۸۸۷۰ محصول شرکت abeam اندازه‌گیری شد. با استفاده از دستگاه الایزا ریدر۲۱۰۰ Stat Fax ، ساخت کشور فرانسه، در طول موج ٤۵۰ نانومتر در مقابل معرف بلانک انجام گرفت.

آنالیز آماری داده‌ها

داده‌ها توسط آزمون آنالیز واریانس یکطرفه وسطح معناداری بین گروه‌ها توسط آزمون تعقیبی توکی مشخص شد. داده‌های با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش۲۲ صورت گرفت. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش و سطح معنا داری۰/۰۵>P در نظر گرفته شد. برای شمارش نورونی از نرم افزار ImageJاستفاده شد.

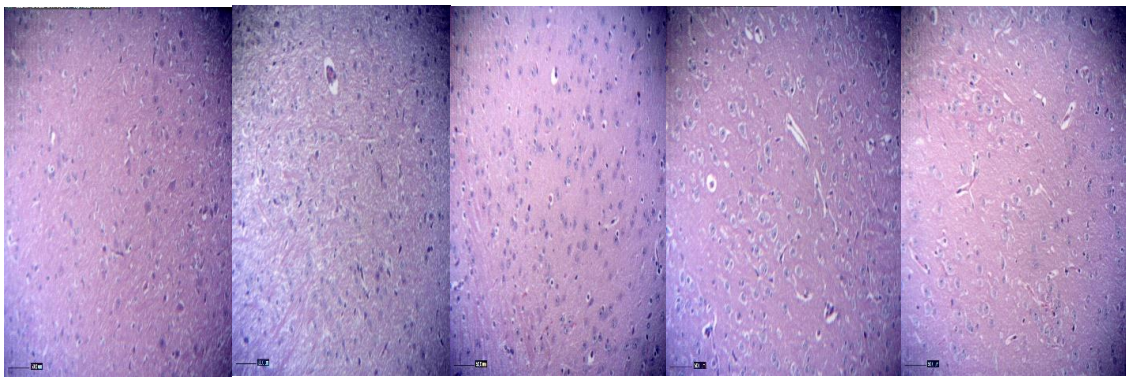
نتایج

همان‌طور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، تجویز MPTP در گروه پارکینسونی در روز اول و روز سی‌ام، باعث افزایش معنادار زمان آزمون تست بار نسبت به گروه کنترل است (P< ۰/۰۵). گروه‌های پارکینسونی، پارکینسون+گرلین۰/۰۰۰۲ میلی گرم بر کیلوگرم و پارکینسون + گرلین۰/۰۰۰٤ میلی گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه کنترل در روز اول و سی‌ام دارای افزایش معنادار است (P< ۰/۰۵).گروه‌های پارکینسون+گرلین۰/۰۰۰۲ میلی گرم بر کیلوگرم و پارکینسون+ گرلین۰/۰۰۰٤ میلی گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه پارکینسونی دارای کاهش معنادار است (P< ۰/۰۵). همان‌طور که در نمودار ۱مشخص است، کاتالپسی با گذشت زمان کاهش پیدا کرده است. کاتالپسی در موش‌های بیمار افزایش یافته است؛ اما بعد از درمان با گرلین، میزان آن کاهش نشان می‌دهد؛ به گونه‌ای که در تمامی حالات کاهش معناداری نسبت به بیماری مشاهده می‌شود (P< ۰/۰۵).



نمودار شماره ۱. بررسي اثر گرلین بر زمان آزمون تست بار در موش‌هاي سوری نر مبتلا به پارکینسون در روز اول و سی‌ام. مقایسه زمان آزمون تست بار در تمامی گروه‌های مورد مطالعه در روزهای اول و سی‌ام. داده‌ها به صورت میانگین ±خطاي استاندارد میانگین نشان داده شده است. P< ۰/۰۵ به عنوان سطح معنادار در نظر گرفته شد. حروف همنام به معنای عدم تفاوت معنادار است و حروف غیر هم نام به معنای وجود تفاوت معناداری است.

همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود برش‌های تهیه شده از ناحیه جسم سیاه مورد بررسی قرار گرفت که در گروه پارکینسونی، نورون‌های دوپامینرژیک جسم سیاه در مقایسه با گروه کنترل دچار تخریب شدند؛ در حالی که مصرف گرلین به مدت ۳۰ روز از کاهش نورون‌های دوپامینرژیک جسم سیاه جلوگیری می‌کند.

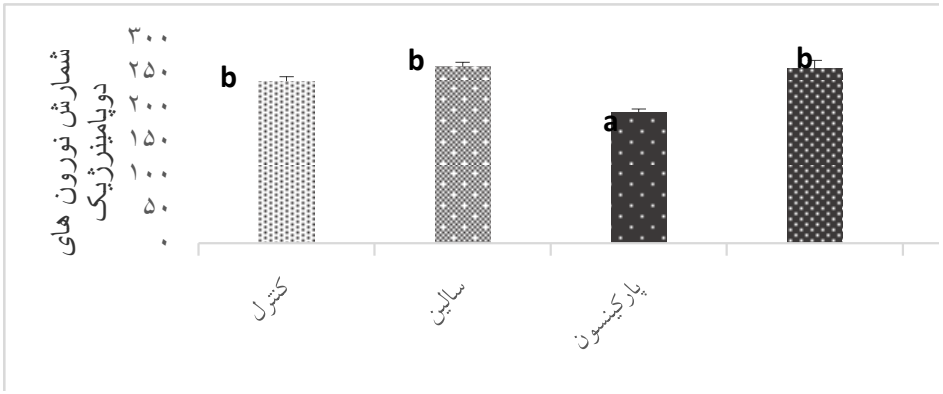


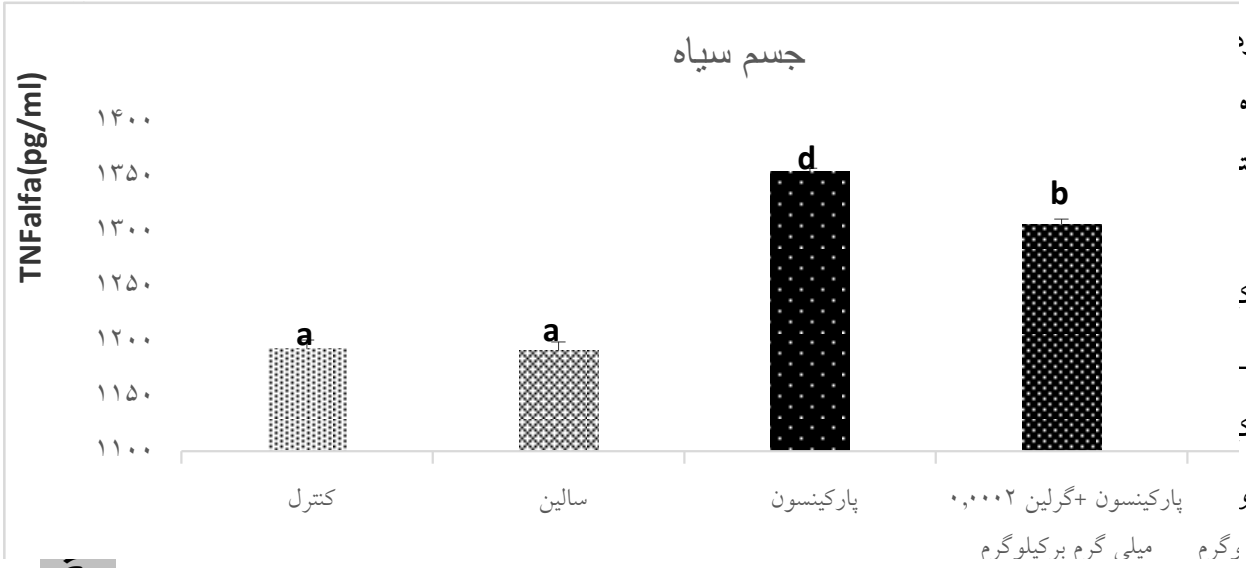
پارکینسون+گرلین۰۰۰۴میلی‌گرم برکیلوگرم پارکینسون +گرلین ۰/۰۰۰۲ میلی گرم برکیلوگرم پارکینسون سالین کنترل

شکل ۱. تصاویر میکروسکوپی تهیه شده از برش عرضی در ناحیه جسم سیاه در موش‌های سوری نر با استفاده از رنگ آمیزی هماتوکسیلین -ائوزین (H&E)با بزرگ نمایی (۱۰۰) ۱۰ X -نوار مقیاس ۵۰۰ میکرومتر. که در این بررسی نقاط با سایز بزرگ‌تر از ۷ میکرومتر را به عنوان هسته نورون‌های عصبی در نظر گرفته شد. از سمت چپ به راست گروه کنترل ،

سالین ، پارکینسون ، پارکینسون +گرلین ۰/۰۰۰۲ میلی گرم برکیلوگرم ، پارکینسون+گرلین۰/۰۰۰٤ .میلی گرم برکیلوگرم .

همان‌طور که در نمودار۲ مشاهده می‌شود، در رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، شمارش نورونی دوپامینرژیک در بخش جسم سیاه در گروه پارکینسون نسبت به گروه کنترل کاهش یافته (**P<۰/۰۵**)؛ ما بعد از درمان با گرلین، شماره نورونی دوپامینرژیک در بخش جسم سیاه افزایش یافته است؛ به گونه‌ای که در تمامی حالات، نسبت به پارکینسون افزایش معناداری مشاهده می‌شود. اختلاف مشاهده شده بین گروه پارکینسون و سایر گروه‌ها معنادار است و با سایر گروه‌ها اختلاف معناداری ندارند (**P<۰/۰۵**).

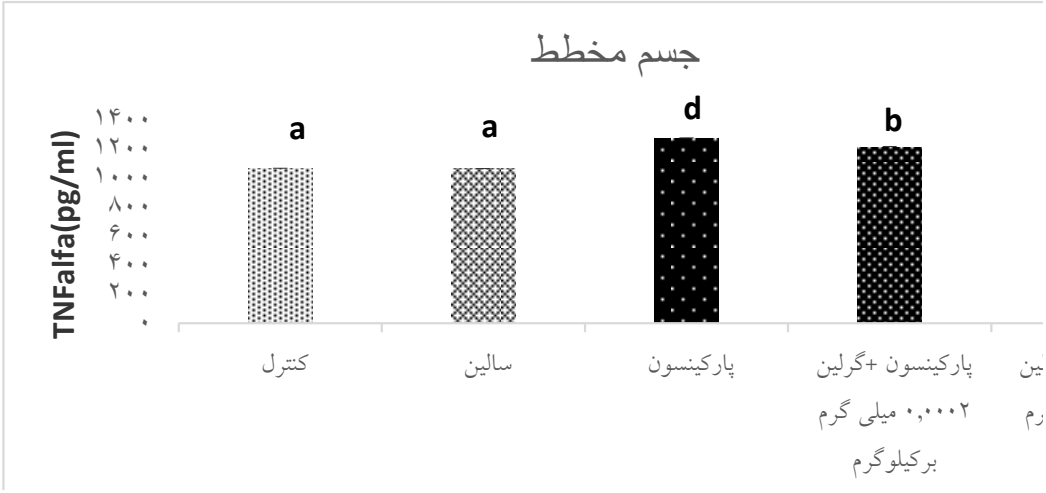




نمودار شماره ۳. مقایسه سطح TNF-α در ناحیه جسم سیاه مغز. داده‌ها به صورت میانگین ±خطای استاندارد میانگین نشان داده شده است. P< ۰/۰۵ به عنوان سطح معنادار در نظر گرفته شد. حروف همنام به معنای عدم تفاوت معنادار است و حروف غیرهمنام به معنای وجود تفاوت معناداری است.

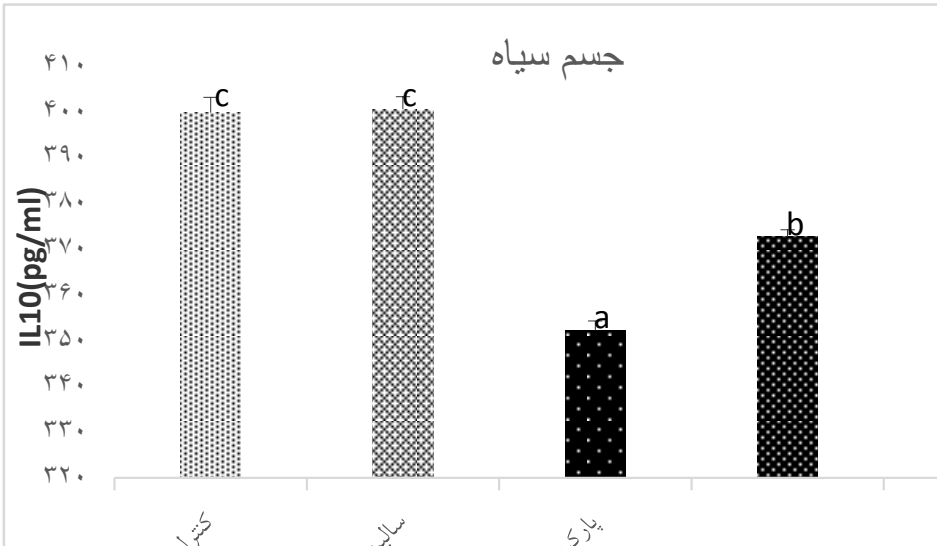
همان‌طور که در نمودار ٤ مشاهده می‌شود، سطح TNF-α در جسم مخطط در گروه پارکینسون، پارکینسون+گرلین۰/۰۰۰۲ میلی گرم بر کیلوگرم و پارکینسون+گرلین۰/۰۰۰٤ میلی گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه کنترل دارای افزایش معناداری می‌باشند. در گروه پارکینسون+گرلین ۰/۰۰۰۲ .میلی گرم بر کیلوگرم و

پارکینسون+گرلین۰/۰۰۰٤ میلی گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه پارکینسون سطح TNF-α در ناحیه جسم مخطط دارای کاهش معناداری است (P< ۰/۰۵). گرلین به عنوان عامل یک ضد التهاب عمل کرده و باعث کاهش سطح TNF-α در هر دو جسم سیاه و جسم مخطط شده است.



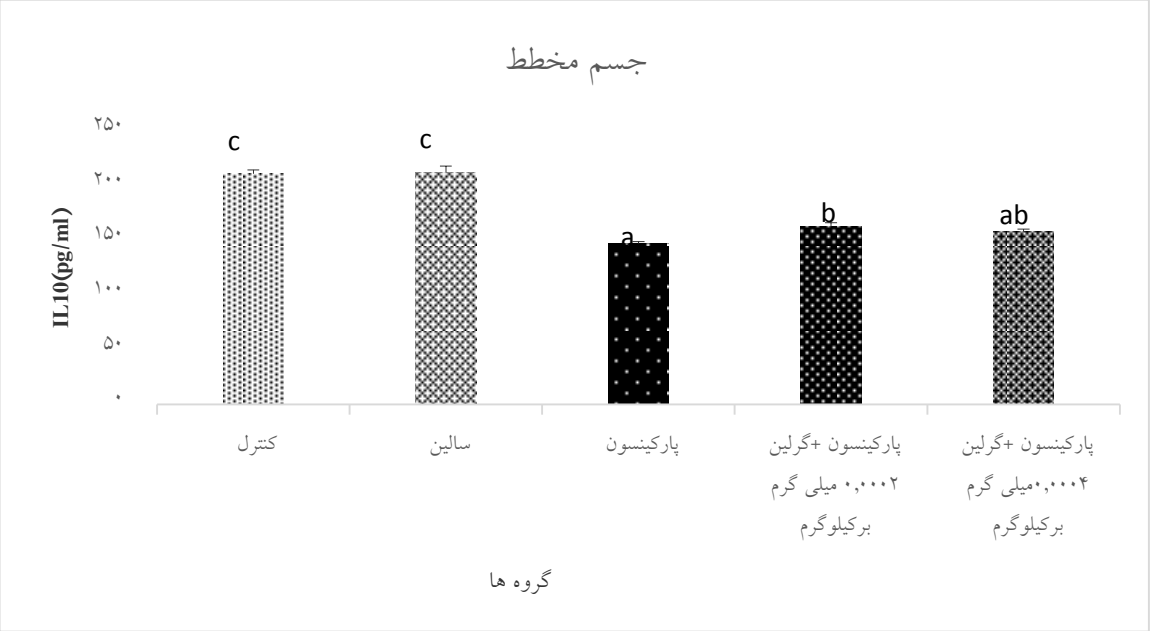
نمودار شماره ٤. مقایسه سطح TNF-α در ناحیه جسم مخطط مغز. داده‌ها به صورت میانگین ±خطاي استاندارد میانگین نشان داده شده است. P< ۰/۰۵ به عنوان سطح معنادار در نظر گرفته شد. حروف همنام به معنای عدم تفاوت معنادار است و حروف غیرهم نام به معنای وجود تفاوت معناداری است.

همان گونه که در نمودار شماره ۵ مشاهده می‌شود، سطح IL-۱۰ در جسم سیاه بین گروه پارکینسون و گروه‌های کنترل، سالین، پارکینسون+گرلین ۰.۰۰۰۲میلی گرم بر کیلوگرم و پارکینسون+گرلین۰/۰۰۰٤ میلی گرم بر کیلوگرم دارای کاهش معنادار می‌باشد (P< ۰/۰۵). همچنین بین گروه‌های پارکینسون+گرلین ۰/۰۰۰۲میلی‌گرم بر کیلوگرم و پارکینسون+گرلین۰/۰۰۰٤ میلی گرم بر کیلوگرم معنادار نیست؛ ولی با سایر گروه‌ها معنادار است (P< ۰/۰۵). اختلاف میانگین مشاهده شده بین گروه‌های کنترل و سالین معنادار نیست؛ ولی با سایر گروه‌ها معنادار است(P< ۰/۰۵).



نمودار شماره ۵. مقایسه سطح IL-۱۰در ناحیه جسم سیاه مغز. داده‌ها به صورت میانگین ±خطاي استاندارد میانگین نشان داده شده است. P< ۰/۰۵ به عنوان سطح معنادار در نظر گرفته شد. حروف همنام به معنای عدم تفاوت معنادار است و حروف غیرهمنام به معنای وجود تفاوت معناداری است.

همان گونه که در نمودار شماره ٦ مشاهده می‌شود، سطح IL-۱۰ در جسم مخطط در گروه‌های پارکینسون، پارکینسون+گرلین ۰/۰۰۰۲میلی گرم بر کیلوگرم وپارکینسون+گرلین۰/۰۰۰٤میلی گرم برکیلوگرم نسبت به گروه کنترل دارای کاهش معناداری هستند (P< ۰/۰۵). گرلین به عنوان نوعی عامل ضد التهاب است که باعث افزایش سطح IL-۱۰ در دو گروه پارکینسون+گرلین ۰۰۰۲ . ۰میلی گرم بر کیلوگرم و پارکینسون+گرلین۰/۰۰۰٤ میلی گرم بر کیلوگرم می‌شود و از افزایش التهاب ناشی از MPTP در دو ناحیه جسم سیاه و جسم مخطط جلوگیری می‌کند.



نمودار شماره ٦-مقایسه سطح IL-١٠در ناحیه جسم مخطط مغز .داده‌ها به صورت میانگین ±خطاي استاندارد میانگین نشان داده شده است. P< ٠/٠٥ به عنوان سطح معنی داردر نظر گرفته شد. حروف هم نام به معنای عدم تفاوت معنادار است و حروف غیرهم نام به معنای وجود تفاوت معناداری است.

بحث

در مطالعه پیش رو، اثر محافظت عصبی گـرلین بـر روی اجسـام سـیاه بررسـی شـد. بـراي ایجـاد مـدل بیمـاري پارکینسون، از تزریق داخل صفاقي MPTP استفاده گردید. این مدل یکی از روش‌های شایع مدل‌های حیوانی است که پارکینسون ایجاد شده بعد از ترزیق به علامت‌های فوق‌العاده مشـابه باپارکینسـون در انسـان منجـر مـی‌شـود. MPTP بعد از تزریق قادر به عبور از سد خونی است؛ وارد مغز شده، توسط آنزیم مونوامینواکسـیداز B (MAO B) به متابولیت فعال خودMPP^+ تبدیل و از طریق ناقلین دوپامین (DAT) وارد نورون‌های دوپامینرژیک می‌شـود و در میتوکندری سلول‌ها انباشته می‌گردد. مکانیسم سمیت ممکن اسـت شـامل ذخیـره‌سـازی نـوروملانین باشـد کـه محصول فرعی تولید دوپامین است. در نتیجه تخریب نـورونی سـبب آزاد شـدن نـوروملانین مـی‌شـود کـه خـود فعال‌کننده قوی میکروگلیاها به شمار می‌رود و در آن‌جا با مهار کمپلکسI زنجیره تنفسـی میتوکنـدریایی و تشـکیل رادیکال آزاد باعث مرگ نورون‌ها می‌شود(٢٠).

اختلالات حرکتی، با استفاده از روش استاندارد آزمون تست بـار ارزیـابی شـد (٢١). پـژوهش حاضـر نشـان می‌دهد که گروه پارکینسونی نسبت گروه‌های کنترل وسالین جمود عضلانی(کاتالپسی) در آزمون تسـت بـار دارای تفاوت معناداری است. سفت‌شدن عضلات، افزایش مقاومت در طول فعالیـت انـدام مسـتقل از جهـت وسـرعت

حرکت وعدم توانایی در کنترل آنها نمایان می‌شود(۲۲). در پاتوفیزیولوژی بیماری پارکینسون، طناب نخاعی و ساقه مغز در سفتی عضلات نقش دارد؛ بدین معنا که تأخیر ارسال پیام در این مناطق باعث افزایش مدت زمان پاسخ رفلکس کششی شده است(۲۳). در پژوهشی که توسط احمدی و همکاران انجام شد، ورزش تردمیل باعث بهبود کاتالپسي و کاهش زمان تست میله در موش‌های صحرایی مدل پارکینسونی با رزرپین شده بود (۲٤). در مطالعهٔ دیگری که توسط احمدی و سهرابیان انجام شد؛ موش‌های صحرایی نر که به مدت بیست و یک روز تحت درمان با این سه عامل آگونیست گرلین، ورزش و نیکوتین قرار گرفته‌اند کاهش کاتالپسي در زمان تست میله نشان می‌دهند (۲۵). کاهش نورون‌هاي دوپامینرژیک در هسته‌هاي قاعده‌ای باعث بیماري پارکینسون می‌شود (۲٦).

در تحقیقی درسال ۲۰۰۲برای ایجاد مدل پارکینسونی MPTP، از ترزیق دوطرفه نوروتوکسین به ناحیهٔ جسم سیاه مغز میانی استفاده شده است. دربافت‌شناسی تیروزین هیدروکسیلاز (TH) نشان داده شده که میزان دوپامین در هیپوکمپ، آمیگدال و بخش ونترال جسم مخطط تغییری کرده؛ یعنی ٤۰% تا ۷۰% نورون‌های بخش متراکم جسم سیاه کاهش نشان می‌دهد و میزان دوپامین در نواحی پشتی جسم مخطط و کورتکس پری فرونتال در حدود ۳۰% تا۵۰% کاهش پیداکرده است(۲۷). پژوهش حاضر نشان می‌دهد که شمارش نورون‌های دوپامینرژیک در گروه پارکینسون کاهش و در گروه‌های پارکینسونی تحت درمان با گرلین شمارش نورون‌های دوپامینرژیک افزایش یافته است.

گیرنده گرلین GHSR۱a در نورون‌های دوپامینرژیک جسم سیاه قرار دارد؛ که این گیرنده یک G پروتئین است که هفت بار از عرض غشا عبور می‌کند و ابتدا از هیپوفیز و هیپوتالاموس کلون شده است (۲۸). تعامل گرلین با گیرنده GHS-R۱a به فعال شدن مسیرهای سیگنالینگی مختلف، از جمله کیناز تنظیم کنندهٔ سیگنال خارج سلولی (ERK۱/۲)، فسفولیپاز C (PLC) و پروتئین کیناز C (PKC) و پروتئین کیناز Raf-MEK-MAPK منجر می‌شود (۲۹). در بیماران مبتلا به بیماری پارکینسون، سطوح پلاسمایی گرلین کاهش می‌یابد و واکنش گرلین به غذا در این بیماران دچار اختلال می‌شود (۳۰).

درمان با گرلین می‌تواند بر روی نورون‌های دوپامینرژیک جسم سیاه تأثیرگذار باشد. همچنین باعث افزایش غلظت تیروزین هیدروکسیلاز در مغز میانی می‌شود و از کاهش نورون‌های دوپامینرژیک در بخش دورسال استریاتوم جلوگیری می‌کند(۳۱). محافظت گرلین از نورون‌ها، مانع از فعال‌شدن میکروگلیال با فعالیت فاگوسیتوزی می‌شود و با آزادشدن سایتوکین‌های پیش التهابی همراه می‌گردد(۳۲). در پژوهشی که توسط مینو ماه و همکاران انجام شده است، نشان می‌دهد گرلین باعث زنده ماندن نورون‌های دوپامینرژیک و کاهش سطح تیروزین و بهبود عملکرد تست rota-rod و همچنین مانع فعال شدن میکروگلیا ناشی از MPTP در جسم سیاه و

استریا توم می‌شود(۳۳). بر اساس پژوهشی که توسط زنددال و همکاران انجام شده است، مصرف آگونیست گرلین (GHRP-۲) وهورمون رشد دارای اثر محافظتی در التهاب مغزی ناشی از LPS از طریق مهارTNF-α و IL-٦ بوده است(٣٤).

در بیماری پارکینسون، TNF-α و گیرنده‌اش موجب فعال شدن سلول‌های گلیال وآبشار التهابی می‌شود(۳۵). سیتوکین‌های پیش التهابیTNF-α و اینترلوکین IL-۱β و IL-٦ و واسط‌های التهابی آزاد می‌شوند؛ نیتریک اکسید تولید نیترک اکسید سنتتاز (iNOS) را شروع می‌کند و آنزیم سیکلوکوکسیژناز-۲ (COX-۲) با فاکتور هسته‌ای تقویت‌کننده زنجیره سبک کاپا (NF-ƙB) فعال و در نتیجه پروتئین کیناز فعال شده بامیتوژن (MAPK) این مسیر آغاز می‌شود(۳٦). این آبشار موجب تجمیع نیتریک اکسید و از بین رفتن کامل نورون‌هاي دوپامینرژیک می‌شود. در پژوهشی نشان داده شده که سطوح سیتوکین پیش التهابی، از جمله TNF-a وIL-۱b، در جسم سیاه بیماران پارکینسونی افزایش می‌یابد. افزایش TNFα در میتوکندری در نهایت، باعث مرگ سلولی و قطعه قطعه شدن DNA و از بین رفتن هسته و در هسته باعث تکثیر سلول و رونویسی ژن‌های پیش التهابی و تنظیم ایمنی می‌شود(۳۷). گرلین باعث مهار فعال شدن میکروگلیا ناشی از تزریق MPTP می‌شود و سطح TNF-a و IL-۱b را در جسم سیاه کاهش می‌دهد. این اثر مهاری گرلین بر TNF-a و IL-۱b می‌تواند موجب کاهش آسیب التهابی ناشی از MPTP شود که این امر، نشان‌دهنده آن است که گرلین به عنوان عامل مهارکننده ماکروفاژ غیرفعال عمل می‌کند و مانع تولید سیتوکین‌های پیش التهابی در ماکروفاژهای تحریک شده توسط لیپوپلی ساکارید می‌شود(۳۸). IL-۱۰ سیتوکین ضد التهابی، مکانیسم‌های ضد التهابی (شامل سرکوب فعال‌سازی و عملکرد سلول‌های ایمنی) است (۱۲). این سرکوب به موارد ذیل منجر می‌شود:

تولید TNF-α از طریق کاهش تنظیم سیکلواکسیژناز ۲ (COX-۲) و بیان نیتریک اکسید سنتتاز(iNOS) ، کاهش سطح پروستاگلاندین E۲ (PGE۲) و مهار فاکتور رشد IL-۱۰ به طور انتخابی سیتوکین‌های پیش التهابی، به ویژه IL-۱β را مسدود می‌کند (۳۹, ٤٠). مکانیسم ضد التهابیIL-۱۰ ، مهارکننده فاکتور هسته‌ای زنجیره سبک کاپا (NF-κB) است. مهار مبدل سیگنال ناشی از IFNs و فعال کننده فعال سازی رونویسی ۱ (STAT۱) از طریق سرکوب کننده سنتز سیتوکین- ۳ (SOCS) می‌باشد (٤١). پژوهش حاضر نشان می‌دهد که گرلین به عنوان عامل ضد التهاب عمل کرده است.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این تحقیق، نوروتوکسینMPTP باعث از دست‌دادن نورون دوپامینرژیک و ایجاد بیماری پارکینسون می‌شود، که گرلین دارای نقش محافظت عصبی، به کاهش مرگ و میر نورون‌های دوپامینرژیک جسم

سیاه و کاهش فعال‌شدن میکروگلیال منجر می‌شود. گرلین به طور مؤثری باعث بهبود کاتالپسی، کاهش فاکتور التهابی TNF-a و افزایش فاکتور ضد التهابی IL-۱۰ در جسم سیاه ومخطط، بر روی حیوانات پارکینسونی می‌گردد.

تشکر و قدرانی

این مقاله بر اساس بخشی از پایان‌نامه دانشجويي دکتری تأیید شده توسط معاونت پژوهشي دانشگاه آزاد اسلامي واحد تهران شمال انجام گرفته است. بدین وسیله از کلیه عزیزاني که در ساماندهی این تحقیق همکاري داشته‌اند، تشکر و قدرداني مي‌شود.

منابع

۱. Saunders-Pullman RJE. Estrogens and parkinson disease. ۲۰۰۳;۲۱(۱):۸۱-۷.

۲. Elbaz A, Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Peterson BJ, Ahlskog JE, et al. Risk tables for parkinsonism and Parkinson's disease. ۲۰۰۲;۵۵(۱):۲۵-۳۱.

۳. Dauer W, Przedborski SJn. Parkinson's disease: mechanisms and models. ۲۰۰۳;۳۹(٦):۸۸۹-۹۰۹.

٤. Elbaz A, Moisan FJRn. Parkinson's disease: Is there a strong environmental contribution? ۲۰۱۰;۱٦٦(۱۰):۷۵۷-٦۳.

۵. Golembiowska K, Dziubina A, Kowalska M, Kamiñska KJPR. Paradoxical effects of adenosine receptor ligands on hydroxyl radical generation by L-DOPA in the rat striatum. ۲۰۰۸;٦۰(۳):۳۱۹.

٦. Noyce AJ, Lees AJ, Schrag A-EJJNNP. The prediagnostic phase of Parkinson's disease. ۲۰۱٦;۸۷(۸):۸۷۱-۸.

۷. Makhija K, Karunakaran SJA, Psychiatry NZJo. The role of inflammatory cytokines on the aetiopathogenesis of depression. ۲۰۱۳;٤۷(۹):۸۲۸-۳۹.

۸. Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JHJB. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: ۲۵ years later, a golden journey. ۲۰۱۲;۱۱۹(۳):٦۵۱-٦۵.

۹. Smith L, Anwar A, Fragen M, Rananto C, Johnson R, Holbert DJEjoap. Cytokines and cell adhesion molecules associated with high-intensity eccentric exercise. ۲۰۰۰;۸۲(۱-۲):٦۱-۷.

۱۰. Chu W-MJCl. Tumor necrosis factor. ۲۰۱۳;۳۲۸(۲):۲۲۲-۵.

۱۱. Ferger B, Leng A, Mura A, Hengerer B, Feldon JJJon. Genetic ablation of tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) and pharmacological inhibition of TNF-synthesis attenuates MPTP toxicity in mouse striatum. ۲۰۰٤;۸۹(٤):۸۲۲-۳۳.

۱۲. Asadullah K, Sterry W, Volk HJPr. Interleukin-۱۰ therapy—review of a new approach. ۲۰۰۳;٥٥(۲):۲٤۱-٦۹.

۱۳. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, De Vries JEJJoEM. Interleukin ۱۰ (IL-۱۰) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-۱۰ produced by monocytes. ۱۹۹۱;۱۷٤(٥):۱۲۰۹-۲۰.

۱٤. Sanjabi S, Zenewicz LA, Kamanaka M, Flavell RAJCoip. Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-β, IL-۱۰, and IL-۲۲ in immunity and autoimmunity. ۲۰۰۹;۹(٤):٤٤۷-٥۳.

۱٥. Khan FH, Sen T, Maiti AK, Jana S, Chatterjee U, Chakrabarti SJBeBA-MBoD. Inhibition of rat brain mitochondrial electron transport chain activity by dopamine oxidation products during extended in vitro incubation: implications for Parkinson's disease. ۲۰۰٥;۱۷٤۱(۱-۲):٦٥-۷٤.

۱٦. Kojima M, Hosoda H, Matsuo H, Kangawa KJTiE, Metabolism. Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. ۲۰۰۱;۱۲(۳):۱۱۸-۲۲.

۱۷. Braak H, de Vos RA, Bohl J, Del Tredici KJNl. Gastric α-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. ۲۰۰٦;۳۹٦(۱):٦۷-۷۲.

۱۸. V dos Santos V, Rodrigues S, Lúcia A, C De Lima T, R de Barioglio S, Raisman-Vozari R, et al. Ghrelin as a neuroprotective and palliative agent in Alzheimer's and Parkinson's disease. ۲۰۱۳;۱۹(۳۸):٦۷۷۳-۹۰.

۱۹. Hattori K, Uchino S, Isosaka T, Maekawa M, Iyo M, Sato T, et al. Fyn is required for haloperidol-induced catalepsy in mice. Journal of Biological Chemistry. ۲۰۰٦;۲۸۱(۱۱):۷۱۲۹-۳۵.

۲۰. Ferreira M, Massano JJANS. An updated review of Parkinson's disease genetics and clinicopathological correlations. ۲۰۱۷;۱۳۵(۳):۲۷۳-۸٤.

۲۱. Pires J, Bonikovski V, Futuro-Neto HJBjom, research b. Acute effects of selective serotonin reuptake inhibitors on neuroleptic-induced catalepsy in mice. ۲۰۰۵;۳۸(۱۲):۱۸٦۷-۷۲.

۲۲. Ahmad M, Arshad H, Kalam NA, Anshu M, Hasin AM, Shadma WJJCDR. Effect of the aqueous extract of Mentha arvensis on haloperidol induced catalepsy in albino mice. ۲۰۱۲;٦(۳):٥٤۲-٦.

۲۳. Fernández E, Greger B, House PA, Aranda I, Botella C, Albisua J, et al. Acute human brain responses to intracortical microelectrode arrays: challenges and future prospects. ۲۰۱٤;۷:۲٤.

۲٤. Khalaj A, Ahmadi R. The effect of treadmill exercise on catalepsy from reserpine-induced Parkinson model in diabetic male rat. Feyz Journal of Kashan University of Medical Sciences. ۲۰۱٦;۲۰.

۲٥. Ahmadi R, Sohrabian L. THE EFFECT OF GHRELIN AGONIST, EXERCISE, AND NICOTINE ON CATALEPSY IN AN ANIMAL MODEL OF PARKINSON'S DISEASE. ۲۰۱۷.

۲٦. Kim Y, Kim M, Kim H, Kim K. Effect of lavender oil on motor function and dopamine receptor expression in the olfactory bulb of mice. Journal of ethnopharmacology. ۲۰۰۹;۱۲٥(۱):۳۱-٥.

۲۷. Park J-H, Enikolopov G. Transient elevation of adult hippocampal neurogenesis after dopamine depletion. Experimental neurology. ۲۰۱۰;۲۲۲(۲):۲٦۷-۷٦.

۲۸. Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberator PA, Rosenblum CI, et al. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. Science. ۱۹۹٦;۲۷۳(٥۲۷۷):۹۷٤-۷.

۲۹. Morgan AH, Rees DJ, Andrews ZB, Davies JS. Ghrelin mediated neuroprotection-A possible therapy for Parkinson's disease? Neuropharmacology. ۲۰۱۸;۱۳٦:۳۱۷-۲٦.

۳۰. Zheng B, Liao Z, Locascio JJ, Lesniak KA, Roderick SS, Watt ML, et al. PGC-۱α, a potential therapeutic target for early intervention in Parkinson's disease. Science translational medicine. ۲۰۱۰;۲(٥۲):٥۲ra۷۳-٥۲ra۷۳.

۳۱. Andrews ZB, Erion D, Beiler R, Liu Z-W, Abizaid A, Zigman J, et al. Ghrelin promotes and protects nigrostriatal dopamine function via a UCP۲-dependent mitochondrial mechanism. Journal of Neuroscience. ۲۰۰۹;۲۹(٤٥):۱٤۰٥۷-٦٥.

۳۲. Banati RB, Gehrmann J, Schubert P, Kreutzberg GW. Cytotoxicity of microglia. Glia. ۱۹۹۳;۷(۱):۱۱۱-۸.

۳۳. Moon M, Kim HG, Hwang L, Seo J-H, Kim S, Hwang S, et al. Neuroprotective effect of ghrelin in the ۱-methyl-٤-phenyl-۱, ۲, ۳, ٦-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease by blocking microglial activation. Neurotoxicity research. ۲۰۰۹;۱٥(٤):۳۳۲-٤۷.

۳٤. Zendehdel M, Allahdini P, Safarpour E, Abrehdari Z, Pourrahimi M, Mazaheri Nezhad Fard R. Effects of co-administration of ghrelin agonist (GHRP-۲) and GH on TNF-α, IL-٦ and iNOS gene expression induced by LPS in the mouse brain. Iranian Journal of Veterinary Research. ۲۰۱۳;۱٤(٤):۳٤۱-٤.

۳٥. McCoy MK, Tansey MG. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. Journal of neuroinflammation. ۲۰۰۸;٥(۱):٤٥.

۳۶. Hoogland IC, Houbolt C, van Westerloo DJ, van Gool WA, van de Beek D. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. Journal of neuroinflammation. ۲۰۱۵;۱۲(۱):۱۱٤.

۳۷. Nagatsu T, Sawada M. Molecular mechanism of the relation of monoamine oxidase B and its inhibitors to Parkinson's disease: possible implications of glial cells. Oxidative Stress and Neuroprotection: Springer; ۲۰۰٦. p. ٥۳-٦٥.

۳۸. Waseem T, Duxbury M, Ito H, Ashley SW, Robinson MK. Exogenous ghrelin modulates release of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in LPS-stimulated macrophages through distinct signaling pathways. Surgery. ۲۰۰۸;۱٤۳(۳):۳۳٤-٤۲.

۳۹. Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, et al. Biology of interleukin-۱۰. Cytokine & growth factor reviews. ۲۰۱۰;۲۱(٥):۳۳۱-٤٤.

٤۰. Kwilasz A, Grace P, Serbedzija P, Maier S, Watkins L. The therapeutic potential of interleukin-۱۰ in neuroimmune diseases. Neuropharmacology. ۲۰۱٥;۹٦:٥٥-٦۹.

٤۱. Hovsepian E, Penas F, Siffo S, Mirkin GA, Goren NB. IL-۱۰ inhibits the NF-κB and ERK/MAPK-mediated production of pro-inflammatory mediators by up-regulation of SOCS-۳ in Trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes. PloS one. ۲۰۱۳;۸(۱۱):e۷۹٤٤٥.

Neuroprotective Effect of Ghrelin on Substantia Nigra in Parkinson Disease Model Induced –MPTP

Neda Nikokalam Nazif [۱](PhD student), Maryam Khosravi[۲], Ramesh Ahmadi[۳](Ph.D), Maryam Bananej[٤](Ph.D), Ahmad Majd[٥](Ph.D)

[۱] Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, North-Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[۲]Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, North-Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

[۳]Department of Physiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran

[٤]Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, North-Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

[٥]Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, North-Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

* Corresponding Author.

Email: maryam-khosravi@iau-tnb.ac.ir Tel: ۰۹۱۲۲۵۳٦۲۷۳ Fax:۰۲۱-۲۲۹٥۰۷۲۳

Abstract:

Aim and Background: Parkinson's disease is a progressive central nervous system disorder. This disease is caused by degenerative loss of dopaminergic neurons of midbrain, from substantia nigra to corpus striatum pathway. Ghrelin act as a neuroprotective against Parkinson disease, and this study aimed to investigate protective effects of ghrelin on the substantia nigra area of brain in Parkinson disease model induced- MPTP.

Materials and Methods:Forty male NMRI mice were randomly divided into ٥ groups of: control, saline, Parkinson, Parkinson + ٠,٠٠٠٢ mg/kg ghrelin, and Parkinson +٠,٠٠٠٤ mg/kg ghrelin. The Parkinson disease model was induced by MPTP intraperitoneally injection (٢٥ mg/kg, i.p) for four days. The treatment was started one day after last MPTP inducement, by ghrelin intraperitoneally injection for ٣٠ days. catalepsy was assessed by the means of a standard test bar. The brains were removed from the skull for histology (haematoxylin and eosin stain were used as the main principle), also tumor necrosis factor alpha (TNF-α), and Interleukin ١٠(IL-١٠) levels in substantia nigra and corpus striatum was measured using ELISA method.

Results:Ghrelin effectively reduces catalepsy levels and reduces the degenerative loss of dopaminergic neurons of substantia nigra pars compacta. It will meaningfully decrease the levels of TNF-α, and positively increases the levels of IL-١٠ in substantia nigra and corpus striatum.

Conclusion: Based on results obtained from this study, we can conclude that ghrelin has a neuroprotective role, improves catalepsy, reduces inflammatory factors, and

increase anti-inflammatory factors in Parkinson disease rodent models.

Key words: Parkinson disease, ghrelin, mice, TNF-α, IL-١٠.