

## مقاله تحقیقی

### بررسی اثر محافظتی نارینژنین در مدل سلولی و حیوانی وابسته به تزریق ۶-هیدروکسی دوپامین در بیماری پارکینسون

بهار ذرات پرست حقانی<sup>۱</sup>، دکتر مریم خسروی<sup>۱\*</sup>، دکتر جلال صولتی<sup>۲</sup>، دکتر رامین حاجی خانی<sup>۱</sup>

۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

۲. گروه فیزیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

\*مسئول مکاتبات: Maryam-khosravi@iau-tnb.ac.ir

محل انجام تحقیق: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، تهران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۵/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۲۲

#### چکیده

هدف این مطالعه سنجش محافظت نارینژنین در مدل حیوانی و مدل سلولی مبتنی بر ۶-هیدروکسی دوپامین بیماری پارکینسون است. موش‌های بالغ نر NMRI بیهوش شدند. برای القاء مدل حیوانی پارکینسون کانول ۲۲ گیج در جسم سیاه متراکم سمت چپ مغز قرار گرفت. از طریق کانول ۳۰ گیج، ۶-هیدروکسی دوپامین، به جسم سیاه متراکم سمت چپ تزریق شد. در مدل کشت سلول، نورون‌های شبه دوپامینرژیک، کشت شده در محیط کشت DMEM، شمارش شدند. سلول‌ها برای بررسی اثر نارینژنین در برابر ۶-هیدروکسی دوپامین استفاده و آنکوبه شدند. غلظت ۵۰ میکرولیتر محلول ۶-هیدروکسی دوپامین و ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۱ و ۰/۰۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای محلول NAR بود. نهایتاً میزان زنده ماندن سلولی با استفاده از روش‌های MTT و تریپان آبی بررسی شد. ۶-هیدروکسی دوپامین زمان کاتالپسی و چرخش‌های مقابل را در مقایسه با گروه کنترل افزایش داد، نارینژنین باعث کاهش کاتالپسی و کاهش چرخش‌های طرف مقابل، کاهش رفتار اضطرابی و افسردگی مانند علاوه بر آن نارینژنین باعث افزایش زمان شنا و افزایش فعالیت حرکتی در مقایسه با گروه کنترل شد. بر اساس یافته‌های حاصل از روش‌های تریپان آبی و MTT، ۶-OHDA منجر به افزایش مرگ و میر در مقایسه با گروه سلولی کنترل شد، در حالی که دوزهای NAR مانع از مرگ سلول در مدل کشت سلولی در مقایسه با گروه توکسین شد. بنظر می‌رسد نارینژنین یک گزینه‌ی درمانی برای درمان اختلالات نورودژنراتیو مانند بیماری پارکینسون باشد.

**واژه‌های کلیدی:** پارکینسون، نارینژنین، محافظت نورونی، ۶-هیدروکسی دوپامین

#### مقدمه

دوپامینرژیک در نواحی مختلف مغز، عمدتاً در بخش متراکم جسم سیاه (بیش از ۷۰٪) و کاهش ترشح دوپامین در استریاتوم همراه است (۲). مشخصه‌های

بیماری پارکینسون PD شایع‌ترین بیماری نورودژنراتیو حرکتی وابسته به سن است (۱). علائم بالینی بیماری پارکینسون با تخریب انتخابی نورون‌های

ناقل دوپامین (DAT) وارد نورون‌های دوپامینرژیک می‌شود (۱۵). نارینژین نوعی فلاوانون (فلاونوئید) بیشتر در میوه‌ها (گریپ فروت و پرتقال) و سبزیجات یافت می‌شود (۱۶). نام شیمیایی نارینژین، ۲،۳-دی هیدرو-۵،۷-دی هیدروکسی-۲- (۴-هیدروکسی فنیل) H-4-1- بنزوپران-۴-یک است (۱۷). نارینژین فعالیت‌های بیولوژیکی مختلفی از جمله خواص آنتی‌دیابتیک، ضداتوزنیک، ضدافسردگی، ایمنومدولاتوری، ضدتوموری، ضدالتهابی، محافظ DNA، هیپولیپیدمیک و آنتی‌اکسیدان دارد (۱۶).

Chiodo و همکارانش طی یک مطالعات پری-کلینیکالی نشان دادند هایپرگلاسمی، انتقال دوپامینرژیک، انشعابات جسم مخطط را کاهش می‌دهد، همینطور حساسیت گیرنده‌های دوپامین پس‌سیناپسی را نیز افزایش می‌دهد (۱۷). اخیراً Gopinath و Sudhandiran در سال ۲۰۱۲ گزارش دادند نارینژین دارای یک محافظ عصبی است که بر اختلالات تخریب کننده عصبی اثر کرده و سبب تعدیل در فرایند استرس اکسیداتیو و پاسخ های التهابی می‌شود (۱۸). علاوه بر این، مطالعات متعددی از اثرات محافظتی نارینژین نیز وجود دارد که اثرات محافظتی خود را از طریق فاکتور نوروتروفیک (مشتق از مغز و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی) سبب فعال شدن مسیرهای ضدآپوپتوز می‌شود (۱۹). شواهد متعدد نشان می‌دهد که نارینژین، یک ترکیب بالقوه طبیعی باشد که در پیشگیری و درمان بیماری‌های عصبی دخیل باشد (۲۰). هدف از انجام این تحقیق بررسی نقش نارینژین بر روی رفتارهای حرکتی ناشی از مدل تجربی سلولی - حیوانی بیماری پارکینسون می‌باشد که با توجه به روش های فارماکولوژیک به کار رفته، نتایج این تحقیق می‌تواند روش درمانی جدیدی را در بهبود اختلال حرکتی بیماران پارکینسون پیشنهاد نماید.

#### مواد و روش ها

hydrobromide از Tocris Biosciences (Hamptonshire, UK) خریداری شده است. Naringenin (2,3-dihydro-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one) از Blackburn Distributions خریداری شده است.

نورولوژیک بیماری پارکینسون عبارتند از: برادیکینسیا<sup>۱</sup> (کندی حرکات)، سفتی عضلانی (۲) ، آتاکسی<sup>۲</sup> (ناهماهنگی حرکات)، لرزش در حال استراحت (۳)، بی‌ثباتی عملکردی (۱)<sup>۳</sup> ، و هیپوکینزیا<sup>۴</sup> (کاهش سرعت حرکت). علاوه بر علائم حرکتی معمول، علائم غیر حرکتی مختلفی از قبیل اختلال عملکرد خودکار، اختلالات خواب، افسردگی و اختلال شناختی نیز می‌توانند بروز کنند که نشان‌دهنده روند گسترده‌تر تخریب می‌باشند (۴). عوامل احتمالی مخرب نورونی در بیماران مبتلا به پارکینسون عبارتند از: عوامل ژنتیکی، سموم محیطی، اختلال عملکرد میتوکندریایی، مرگ سلولی مرتبط با رادیکال‌های آزاد و التهاب عصبی (۵). علاوه بر مرگ نورون‌های دوپامینرژیک در بخش متراکم جسم سیاه، نورون‌های دوپامینرژیک باقی مانده به تشکیل انکلوزیون-های سیتوپلاسمی و عصبی (انباشتگی‌های سیتوپلاسمی و عصبی) موسوم به Lewy bodies، می‌پردازند که عمدتاً از آلفاسینوکلئین و سایر پروتئین‌های موجود در نورون‌های دوپامینرژیک بازمانده تشکیل می‌شوند (۶). اختلال عملکرد میتوکندریایی نیز در پاتوژنز بیماری پارکینسون پراکنده و خانوادگی نقش دارد (۷). استرس اکسیداتیو نیز یکی از عوامل مهم بروز این بیماری می‌باشد (۸). التهاب عصبی نیز یک ویژگی مهم و برجسته در پاتوژنز و پیشرفت بیماری‌های نورودژنراتیو مانند بیماری پارکینسون است (۹). در مغز بیماران مبتلا به بیماری‌های نورودژنراتیو، آستروسیتوز مشخص، فعال‌سازی میکروگلیا و افزایش سطح سیتوکین‌های پیش التهابی مشاهده می‌شود (۱۰). سلول‌های گلیال موجب انتشار ترکیباتی مانند سیتوکین‌های پیش التهابی (  $TNF-\alpha$  ،  $IFN-\gamma$  ،  $IL-1\beta$  ) می‌شوند که اثرات مخربی بر نورون‌های دوپامینرژیک دارند (۱۲). یکی از رایج‌ترین نوروتوکسین‌های دوپامینرژیک، ۶-هیدروکسی دوپامین (6-OHDA) است (۱۴) این نوروتوکسین از سیستم انتقال کاتکول‌آمین دوپامین استفاده می‌کند و در سیتوزول تجمع می‌یابد و باعث سمیت عصبی می‌شود ۶-هیدروکسی دوپامین به خوبی از سد خونی-مغزی عبور نمی‌کند و بنابراین نیاز به تزریق مستقیم به داخل مغز دارد. 6-OHDA از طریق

2-Bradykinesia  
3-- Ataxia  
4-Functional instability  
5-Hypokinesia

## حیوانات

در این آزمایش موش های کوچک آزمایشگاهی نر بالغ، نژاد NMRI با محدوده‌ی وزنی ۳۰ گرم، از انستیتو پاستور تهیه شدند. این حیوانات در قفس‌های ۴ تایی نگهداری شده و ۱۲ ساعت تاریکی، ۱۲ ساعت روشنایی برای حیوانات اعمال شد. محدوده‌ی دمای ۲۵-۲۲ درجه-ی سانتیگراد نیز برای حیوانات در نظر گرفته شد. همه‌ی جانوران دسترسی آزادانه به آب و غذای استاندارد داشتند و حداقل ۱۰ روز پس از انطباق با محیط آزمایشگاه مورد استفاده و جراحی قرار گرفتند.

## جراحی

موش‌ها پس از بیهوشی با مخلوط کتامین با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم با زایلازین دوز ۱۰ میلی-گرم/کیلوگرم به صورت تزریق داخل صفاقی تحت عمل جراحی قرار گرفتند. به کمک دستگاه استریوتاکسی (USA, Stoelting, Watson and Paxinos) مختصات مغز موش برای ناحیه‌ی SNpc (AP: +0.04 (ML: ±0.18 cm, DV: -0.35 cm, پیدا شده و پس از علامت‌گذاری نقطه‌ی مورد نظر، به کمک دستگاه استریوتاکسی کانول راهنما در ناحیه‌ی SNpc جای‌گذاری شد. تزریق به داخل این ناحیه با یک کانول تزریق، از جنس استیل به شماره G۳۰ انجام گرفت. پس از پایان جراحی به مدت ۷ روز به حیوان استراحت داده شد. پس از دوره‌ی ریکاوری، ۶-هیدروکسی دوپامین (6-OHDA، سیگما) (۵ میکروگرم در میکرولیتر) حاوی ۱٪ اسید اسکوربیک با استفاده از یک سرنگ ۱۰ میکرولیتری همیلتون با یک سوزن ۲۲ گیج متصل به یک کانول ۳۰ گیج به سمت چپ SNpc تزریق شد (با سرعت ۱ میکرومتر در دقیقه). گروه کنترل نیز تحت عمل جراحی مشابه قرار گرفتند، با این تفاوت که فقط سالین فیزیولوژیکی حاوی ۱٪ اسید اسکوربیک به سمت چپ SNpc تزریق شد (n=10). جهت بررسی محل دقیق کانول برای تعدادی از موش‌ها، رنگ متیلن بلو تزریق شد و سپس با برش بافتی محل دقیق قرارگیری کانولا و تزریق مشخص شد. کانول‌گذاری و تخریب SNpc فقط یکطرفه و در نیمکره‌ی چپ انجام شد. پس از تزریق یک طرفه 6-OHDA، رفتار چرخشی ناشی از آپومورفین و کاتالپسی اندازه‌گیری شد. یک هفته پس از جراحی،

موش‌های مبتلا به پارکینسون به مدت دو هفته NAR= Naringen (۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میلی گرم در کیلوگرم گاواژ) دریافت کردند (n=30) و چرخش ناشی از آپومورفین، کاتالپسی، رفتارهای شبه‌اضطرابی و شبه-افسردگی، همچنین تعداد سلول در همه‌ی گروه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند.

## داروها و گروه‌های مورد استفاده جهت ایجاد مدل جانوری پارکینسون

مرحله‌ی اول ایجاد گروه کنترل ۱ است، گروه غیرمبتلا به بیماری پارکینسون

۱- گروه کنترل ۱ (غیرمبتلا به پارکینسون): این گروه سالین حاوی ۱٪ اسید اسکوربیک (حلال 6-OHDA) را به درون ماده سیاه متراکم (SNpc) سمت چپ مغز (تزریق ICV) دریافت کردند (۱۰ سر- غیرمبتلا به پارکینسون).

## مرحله‌ی دوم ایجاد مدل پارکینسونی

حیوانات در مرحله‌ی دوم، سم 6-OHDA را به درون ماده سیاه متراکم (SNpc) سمت چپ مغز دریافت کردند (تزریق ICV). ۱۰ سر گروه کنترل ۲ و ۳۰ سر گروه‌های تجربی.

۲- گروه تجربی ۱: موش‌های این گروه ۵ μg/μl از 6-OHDA را به درون ماده سیاه متراکم (SNpc) سمت چپ مغز (تزریق ICV) دریافت کردند.

## مرحله‌ی سوم بررسی اثرات داروها بر روی بیماری پارکینسون

۳- گروه‌های تجربی ۲، ۳ و ۴: گروه‌های تیماری با Naringenin، Naringenin را با دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg را به صورت گاواژ دریافت کردند (۳۰ سر- گروه پارکینسونی).  
۴- گروه کنترل ۲: حیوانات این گروه فقط آب مقطر، حلال Naringenin را به صورت گاواژ دریافت کردند (۱۰ سر- گروه پارکینسونی).

## تایید مدل پارکینسونی

۱- چرخش ناشی از تزریق آپومورفین: پس از ایجاد مدل پارکینسونی، موش‌ها به مدت ۱ هفته ریکاوری

در ابتدای یکی بازوهای باز قرار داده شدند. برای هر جانور به مدت ۵ دقیقه این پارامترها اندازه گرفته شد (این پارامترها پروتکل استفاده از این ابزار محسوب می شوند):

- ۱- مدت زمانی که حیوان در بازوی باز باقی ماند. ۲-
- مدت زمانی که حیوان در بازوی بسته باقی ماند. ۳-
- دفعاتی که حیوان وارد بازوی باز شد. ۴- دفعاتی که حیوان وارد بازوی بسته شد. منظور از ورود به بازوی باز یا بسته زمانی است که هر چهار پای حیوان وارد آن بازو گردد. به منظور تجزیه و تحلیل فعالیت بازوی باز، برای هر موش درصد زمان گذرانده شده در بازوی باز و درصد دفعات ورود به بازوی باز را حساب گردیده، همچنین میزان فعالیت حرکتی موشها که معادل تعداد دفعات ورود به بازوهای مختلف است، نیز محاسبه گردید. افزایش حضور جانور در بازوی باز به عنوان معیاری برای کاهش اضطراب و کاهش حضور آن به عنوان افزایش اضطراب در نظر گرفته شد.

#### تست افسردگی

برای سنجش افسردگی در موشهای نر بالغ از تست شنای اجباری استفاده شد. یکی از معتبرترین و رایج ترین تستهای حیوانی برای بررسی افسردگی تست شنای اجباری است. در این آزمایش به ظرف شیشه‌ای استوانه‌ای با ارتفاع 25 cm و قطر 12 cm نیاز است، 15 cm از این ظرف از آب ۲۵ درجه پر شد و پس از کسب درمان-های لازم، موشهای تجربی و کنترل به صورت انفرادی از ارتفاع ۲۰ سانتی‌متری به آرامی و در کمال احساس امنیت درون آب قرار داده شدند. متعاقباً تحت شرایط آزمایش، حیوانات برای بقا خود در آب شنا کردند. پس از مدتی، حیوانات از دست و پا زدن و تلاش جهت حفظ جان خود در آب، بازماندند، این رفتار به صورت قراردادی بی‌حرکت شدن (Immobility) نامیده می‌شود. برای اندازه‌گیری زمان بی‌حرکتی، مدت زمان بی‌حرکتی حیوان در طی یک محدوده‌ی زمانی مشخص توسط کرونومتر ثبت گردید. در این حالت، افزایش زمان بی‌حرکتی را معادل افسردگی و کاهش آن را به عنوان اثر بخشی درمان ضدافسردگی ارزیابی شد. مدت تست نیز ۵ دقیقه بوده است.

آمیزی

رنگ

شدند. ابزار مورد استفاده در این آزمایش یک محفظه‌ی استوانه‌ای مدرج است. این محفظه قطری معادل ۳۳ و ارتفاعی ۳۳ سانتی متری دارد. پس از مدت زمان ریکآوری و جهت اطمینان حاصل کردن از پارکینسونی شدن حیوانات، ۱۰ دقیقه پیش از انجام آزمایش، حیوانات به این محفظه منتقل شدند. یک دقیقه پس از تزریق داخل صفاقی آپومورفین هیدروکلراید با دوز 0.5 mg/kg، تعداد چرخش در فواصل زمانی ۱۰ دقیقه‌ای به مدت ۶۰ دقیقه تحت شرایط آرام اندازه‌گیری شد. با توجه به ناحیه‌ی ای که توکسین ۶-هیدروکسی دوپامین به صورت ICV تزریق شده است، تعداد چرخش ایپسیلترال (طرف تزریق توکسین در مغز - چرخش به سمت چپ) به عنوان عدد منفی و تعداد چرخش کنترالترال (چرخش به سمت راست - طرف مقابل تزریق توکسین در مغز) به عنوان عدد مثبت در نظر گرفته شد و تعداد خالص چرخش به صورت تفاضل چرخشها در دو جهت ایپسیلترال و کنترالترال محاسبه گردید (۲۱).

**۲- کاتالپسی:** برای بررسی کاتالپسی از روش استاندارد بار تست استفاده شد. در این روش دوپای جلویی حیوان بر روی میل‌های چوبی و افقی به قطر ۱/۲۵ سانتی متر و به ارتفاع ۱۰ سانتی متر از کف جعبه قرار داده شد. مدت زمانی را که هر دو پای جلویی حیوان روی میله افقی قرار می‌گرفت و جانور در وضعیت ثابت باقی می‌ماند، اندازه گرفته می‌شد. حداکثر زمانی که جانور روی میله‌ی افقی باقی ماند، ۳۰ ثانیه در نظر گرفته شد. زمان قطع آزمایش زمانی بود که حیوان یکی از پاهای جلویی خود را از روی میله برمی‌داشت و یا اینکه سر خود را به طور جستجوگرانه تکان می‌داد. این کار برای سه مرتبه با فواصل ۳ دقیقه تکرار گردید (۲۲).

#### تست های رفتاری

##### تست اضطراب با ماز مرتفع به علاوه‌ای شکل

جهت سنجش اضطراب موشها از تست ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع (EPM) (Elevated plus maze) استفاده گردید. ابزار مورد استفاده یک دستگاه چوبی به ارتفاع ۵۰ متر و از دو بازوی باز (۳۵×۵cm) و دو بازوی بسته (۳۵×۵cm) تشکیل یافته است. این ابزار یک سکوی مرکزی (۵×۵cm) نیز دارد، هر کدام از قسمت‌های مذکور دارای یک سقف باز هستند. در زمان انجام تست موشها

غلظت ۵۰ میکرومول برای محلول ۶-هیدروکسی دوپامین و ۰/۲۵، ۰/۱ و ۰/۰۱ میلی گرم بر میلی لیتر برای محلول NAR بود.

### شمارش سلولی با رنگ تریپان بلو

۴۸ ساعت پس از درمان، رنگ آمیزی رنگ آبی trypan برای تعیین تعداد سلول‌های زنده در هر گروه انجام شد. در این روش تعداد سلول‌ها در یک سطح معین با عمق مشخص شمارش شد و تراکم سلولی محاسبه گردید. برای تهیه سوسپانسیون سلولی سلول‌ها با سرعت ۲۰۰۰ و به مدت ۶ دقیقه سانتریفوژ شدند. سوپرناتانت (مایع رویی سوسپانسیون) خارج و ۱ میلی لیتر محیط کامل روی سلول‌ها ریخته و سوسپانسیون مجدد از سلول‌های ته‌نشین شده) انجام شد. نهایتاً پنج نمونه جداگانه توسط سانتریفوژ برداشت و سپس با رنگ آبی trypan به شرح زیر انکوبه شدند. برای شمارش سلولی حجم برابری از رنگ تریپان بلو و سوسپانسیون سلولی تهیه شد و با هم مخلوط شدند. ۱۰ میکرولیتر تریپان بلو و ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با هم مخلوط شد و ۱۰ میکرولیتر از این مخلوط روی لام نئوبار و توسط میکروسکوپ نوری مطالعه شد. سلول‌ها توسط میکروسکوپ نوری معمولی/ invert با بزرگنمایی ۱۰X شمارش شدند. در این روش رنگ تریپان بلو به درون سلول‌های زنده نفوذ نمی‌کند و این سلول‌ها توسط میکروسکوپ شفاف دیده می‌شوند، در حالی که سلول‌های مرده رنگ را جذب می‌کنند و غشای آن‌ها به رنگ آبی تیره دیده می‌شود. درصد زنده ماندن سلولی با استفاده از هموسیتومتر محاسبه شد. تعداد سلول‌های زنده در هر ۵ بخش لام شمارش شد و میانگین گرفته شد. تعداد کل سلول‌ها در ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی عبارتند از: مجموع سلول‌های شمارش شده در ۵ خانه از لام نئوبار، تقسیم بر ۵، ضربدر ضریب رقت (۱) (به این معنی است که سلول‌ها رقیق سازی نشدند)، ضربدر ضریب حجم (۱۰<sup>۴</sup>) (۲۴).

### سنجش زنده ماندن سلول

زنده ماندن سلول با استفاده از روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. چهل و هشت ساعت پس از درمان (مدل سلولی PD)، ۲۰۰ میکرولیتر از محلول کار MTT

به دنبال آزمایشات رفتاری، رنگ آمیزی H&E انجام شد. به طور خلاصه مغز جانوران گروه کنترل و گروه‌های تجربی، پرفیوژ شده و بعد از انجام پرفیوژن، مغزها در قالب پارافین فیکس شدند، از آنجایی که پارافین مانع جذب رنگ به برش‌ها می‌شود برای رفع این مشکل، نمونه‌ها داخل گزلیل فرو برده شد و با استفاده از دستگاه میکروتوم مقاطع کرونال به ضخامت ۷ میکرون تهیه شد و سپس برش‌ها بر روی لام‌های آلومینه قرار داده شدند. بعد از شفاف‌سازی و آبدهی با الکل ۷۰٪، لام‌ها با استفاده از رنگ هماتوکسیلین (۲ دقیقه) - ائوزین (۲۰ ثانیه) رنگ شده و در نهایت، مقاطع با چسب انتلان و لامل پوشانده شدند. لام‌های رنگ شده، با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی X۴۰ بررسی و بعد از تهیه ی عکس توسط نرم‌افزار Image-Pro Plus نوری‌های موجود در SNpc شمارش شد (در ۶ میدان دید). سلول‌های دوپامینرژیک سالم به صورت سلول‌های یوکروماتین مدور دیده شد و سلول‌هایی که در معرض ۶-هیدروکسی دوپامین بودند، دژنه یا تخریب شدند (۲۳).

### مدل کشت سلول

**محیط کشت:** در این مطالعه، رده سلولی کاتکول-آمینرژیک (SH-SY5Y) از انستیتو پاستور، ایران خریداری شد. سلول‌ها شمارش شدند (۵۰۰۰ سلول در هر چاه در ۹۶ چاه) و در Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) Gibco، حاوی ۰/۲ گرم بی‌کربنات سدیم، ۱۰۰ U / ml پنی‌سیلین و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین (Invitrogen) و ۱۰ کشت داده شد. سرم گاو جنین (Gibco ؛ FBS) تحت جو مرطوب (۳۷ درجه سانتیگراد، ۵٪ CO<sub>2</sub>، ۹۵٪ هوا). در یک مدل سلولی PD، سلول‌های تهیه شده به طور تصادفی به ۵ گروه تقسیم شدند: گروه کنترل (محیط کشت پایه + آب مقطر)، 6-OHDA (۵۰ میکرومولار)، 6-OHDA با NAR (۰/۲۵، ۰/۱ و ۰/۰۱). همه گروه‌ها به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند.

۶-هیدروکسی دوپامین، محلول نارینژنین: در مطالعه حاضر، از سالین فیزیولوژی به عنوان حلال برای تهیه محلول ۶-هیدروکسی دوپامین (به عنوان عامل سایتوتوکسیک) و NAR (به عنوان دارو) استفاده شد.

## نتایج

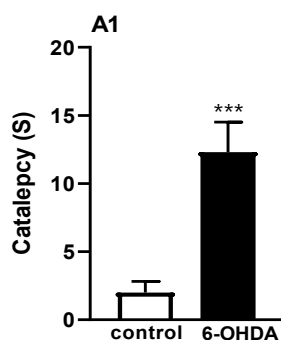
اعتبار مدل پارکینسون (اثر 6-OHDA در مدل موش PD (آزمون کاتالپسی - آزمایش چرخش ناشی از آپومورفین)

داده‌ها نشان داد که تزریق ۵ میکروگرم در میکرولیتر 6-OHDA در بافت مغز توزیع شده و مدل حیوانی PD تحت تأثیر تزریق یک طرفه 6-OHDA قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که 6-OHDA قادر به ایجاد کاتالپسی در مقایسه با گروه کنترل شد (نمودار ۱). همچنین، چرخش‌های طرف مقابل در مدل‌های موش PD نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. چرخش در جهت آسیب به عنوان نمره مثبت در مدل موش PD در نظر گرفته شد (نمودار ۲).

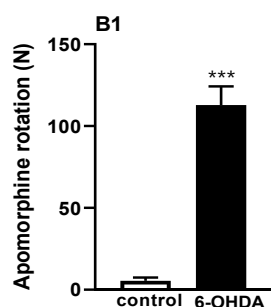
به هر چاهک اضافه شد (با غلظت نهایی ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر). صفحه با فویل پوشانده شده و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از ۴ ساعت، کریستال‌های فرماز بنفش داخل سلول ظاهر شدند. به دنبال آن، ۲۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد و بلورهای فرمازان حل شدند. سرانجام، شدت بلورهای فرمازان محلول (رنگ بنفش) با استفاده از صفحه‌خوان الایزا در ۵۷۰ نانومتر ارزیابی شدند.

## تجزیه و تحلیل اطلاعات

تمام داده‌ها از نظر آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آنالیز واریانس (ANOVA) بررسی گردید. معیار استنتاج آماری  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار GraphPad استفاده گردید.



نمودار ۱ - تأثیر تزریق یک طرفه 6-OHDA بر مدل حیوانی PD.  $t=13.81$ ,  $p=0.0066$ ,  $df=18$ .



نمودار ۲ - تأثیر تزریق آپومورفین بر مدل حیوانی PD در آزمون چرخش.  $t=29.17$ ,  $p < 0.0001$ ,  $df=18$ .

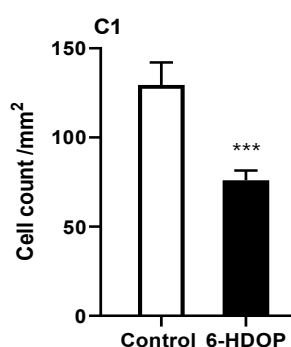
های عصبی در طرف تزریق نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. از آنجایی که رنگ‌آمیزی H&E یک روش رنگ-آمیزی عمومی است و از آنجایی که تعداد زیادی نورون دوپامینرژیک در منطقه SNpc وجود دارد، می‌توان مرگ

اثر 6-OHDA در مدل موش PD مرگ و میر عصبی/رنگ‌آمیزی H&E  
تعداد کل سلول‌های عصبی پس از تزریق داخل جسم مخطط 6-OHDA اندازه‌گیری شد و از دست دادن سلول-

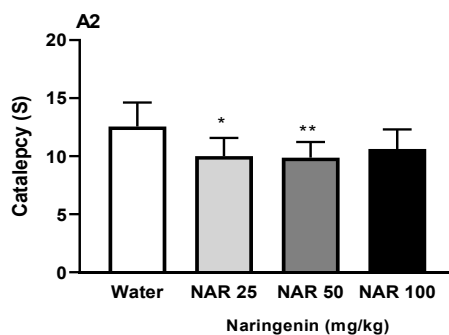
در این تحقیق هر سه دوز NAR باعث کاهش نسبی کاتالپسی در مقایسه با گروه کنترل شد که نتایج حاکی از بی معنا دار بودن ( $P>0.05$ ) می باشد (نمودار ۴). علاوه بر این، اثر درمان NAR در آزمون چرخش طرف مقابل، در مدل موش PD ارزیابی شد. همانطور که نمودار ۵ نشان داده است، هر سه دوز NAR چرخش طرف مقابل را در مدل موش PD در مقایسه با گروه کنترل در سطح اندکی کاهش داد که این امر نشان از غیرمعنا دار بودن دارد.

و میر نسبی سلول های عصبی دوپامینرژیک را تخمین زد. بنابراین در این آزمایش، یک برآورد نسبی از مرگ و میر سلول های عصبی دوپامینرژیک در منطقه SNpc به دست آمد و حاکی از ارتباط معناداری بین آنها ( $P>0.05$ ) وجود ندارد (نمودار ۳).

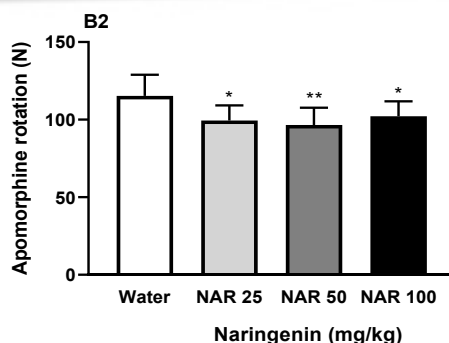
**اثر تجویز NAR در مدل موشهای مبتنی بر سم PD**  
آزمایش چرخش ناشی از آپومورفین و آزمون کاتالپسی



نمودار ۳ - اثر تزریق 6-OHDA بر مرگ و میر سلول های عصبی ناحیه ی تزریق.  $t=10.23$  و  $df=12p=0.6623$ .



نمودار ۴ - اثر نارینژنین بر ایجاد زمان کاتالپسی.  $F=3.30$  و  $P=0.9432$ .



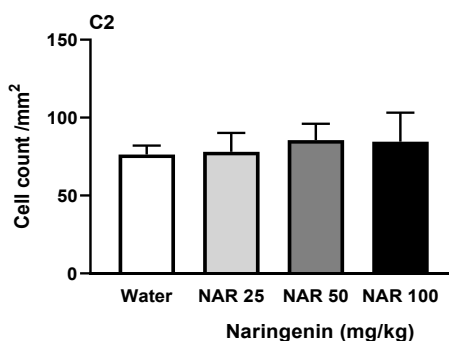
نمودار ۵ - اثر نارینژنین بر چرخش های طرف مقابل.  $F=3.32$  و  $P=0.8312$

عمومی است و از آنجایی که تعداد زیادی نورون دوپامینرژیک در منطقه SNpc وجود دارد، تعداد نسبی نورون های دوپامینرژیک قابل تخمین است. بنابراین در این مطالعه نیز تخمین نسبی از تعداد سلول های عصبی دوپامینرژیک در منطقه ی ذکر شده بدست آمد که حاکی از عدم ارتباط معنی دار بین آن ها می باشد (نمودار ۶) ( $P>0.05$ ).

#### اثر تجویز NAR در مدل موش های مبتنی بر سم PD

(مرگ و میر سلول های عصبی / رنگ آمیزی H&E)

داده های جمع آوری شده نشان داد که NAR در دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم در کیلوگرم، تغییراتی را هر چند اندک در تعداد سلول های عصبی در ماده ی سیاه متراکم ایجاد کرد. همانطور که پیشتر نیز اشاره شد، از آنجایی که رنگ آمیزی H&E یک روش رنگ آمیزی



نمودار ۶ - اثر NAR بر تعداد سلول ها.  $F=3.24$  ،  $P=0.4484$

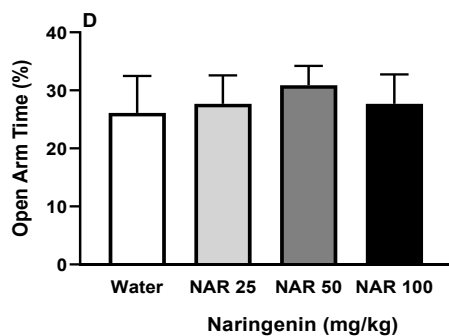
تقریبی ورود به بازوی باز نیز دوزهای NAR25-NAR100 نشان داده شد. علاوه بر این، در آزمایش ماز به علاوه ای شکل، افزایش نسبی فعالیت حرکتی در حیوانات تحت درمان با NAR50 مشاهده شد. بنابراین، داده های جمع-آوری شده نشان دهنده ی کاهش نسبی سطح رفتار اضطراب مانند در برخی از گروه های NAR نسبت به گروه شاهد است و حاکی از ارتباط بی معنی بین آنها می باشد (نمودار ۹) ( $P>0.05$ ).

#### تأثیر تجویز NAR در مدل موش های مبتنی بر سم

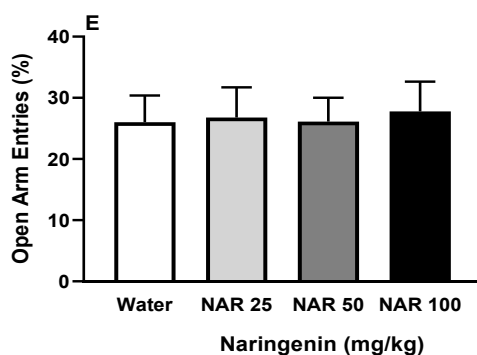
PD (آزمایشات رفتاری)

اثر مصرف NAR بر رفتار شبه اضطرابی از طریق آزمون EPM اندازه گیری شد. زمان سپری شده در بازوی باز و تعداد ورود به بازوهای باز تغییراتی را در بعضی از گروه های NAR، در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. در دوز NAR50 افزایش تقریبی زمان سپری شده در بازوی باز دیده شد (نمودارهای ۷ و ۸) و همچنین افزایش

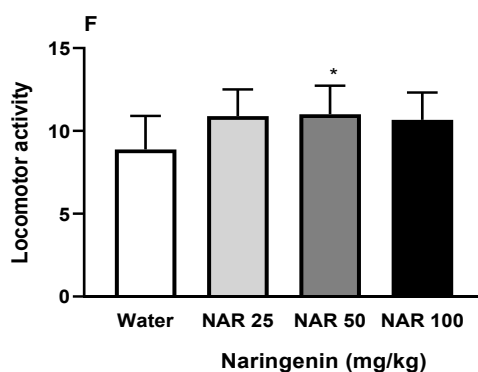




نمودار ۷- اثر نارینژنین بر مدت زمان سپری شده در بازوی باز.  $F=3.31$ ,  $P=0.2831$ .



نمودار ۸- اثر NAR بر تعداد ورود به بازوی باز.  $F=3.31$ ,  $P=0.9434$ .

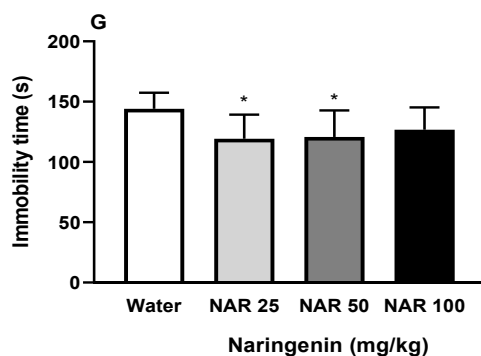


نمودار ۹- اثر نارینژنین بر میزان فعالیت حرکتی.  $F=3.31$ ,  $P=0.8801$ .

تحرك حيوانات ارتباط مستقیمی با افسردگی دارد. داده- های مطالعه‌ی حاضر ادعان داشت که سه دوز NAR باعث کاهش نسبی زمان بی‌تحركی در مقایسه با گروه کنترل

از آنجایی که عدم تحرك یکی از علائم مشاهده شده در PD است، افزایش فعالیت حرکتی نشان دهنده‌ی اثربخشی و مفید بودن دارو است. پس از آن، اثر NAR بر رفتار شبه افسردگی از طریق FST ارزیابی شد. زمان

شد که حاکی از ارتباط بی‌معنی بین آن‌ها می‌باشد ( $P>0.05$ ).

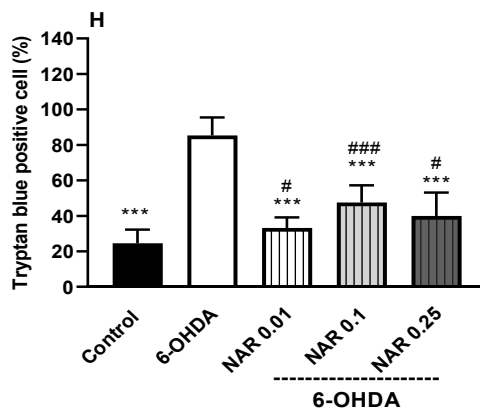


نمودار ۱۰ - اثر نارینژنین بر میزان بی‌حرکتی حیوانات.  $P=0.8596$ ,  $F=3.31$ .

مقایسه با گروه کنترل شد، در حالی که دوزهای NAR مانع از مرگ سلول در مدل کشت سلولی در مقایسه با گروه سم شده است، مدل سلولی مبتنی بر PD ( $P<0.001$ ).

#### تأثیر ۶-OHDA و NAR در مدل کشت سلولی تریپان بلو

در تحقیق حاضر، سطح زنده ماندن سلول با رنگ-آمیزی تریپان بلو نشان داد که قرار گرفتن در معرض ۶OHDA منجر به کاهش نسبی در زنده ماندن سلول در

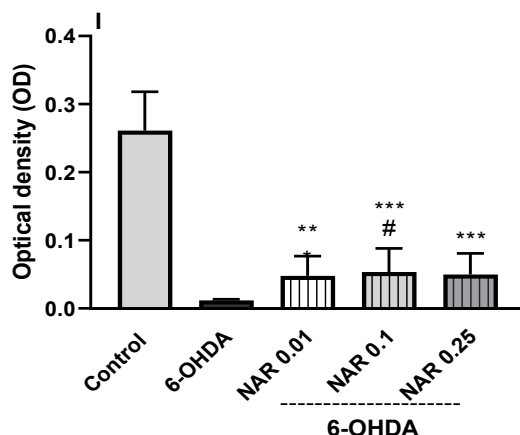


نمودار ۱۱ - اثر OHDA بر مرگ و میر سلولی گروه توکسی.  $P=0.2091$ ,  $F=4.40$ .

دوپامین در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. همچنین، در این روش، اثر مثبت و محافظت نورونی NAR در هر ۳ دوز از دارو، بر بقای سلولی در مقایسه با گروه مبتنی بر سم نشان داده شد (نمودار ۱۲) ( $P<0.01$  &  $P<0.001$ ).

#### MTT تست

نتایج حاصل از بررسی تغییر رنگ در تست MTT، مرگ و میر سلول‌های شبه دوپامینرژیک در سلول‌های عصبی ناشی از 6-OHDA مشاهده شد. در واقع کاهش قابل توجه مرگ و میر نورونی در گروه ۶-هیدروکسی



نمودار ۱۲- اثر 6-OHDA و نارینژنین بر زنده ماندن سلول‌های عصبی زنده،  $F=4.60$ ،  $P<0.0001$ .

شد. یافته‌های این پژوهش حاکی از آن است که NAR به شکل قابل توجهی چرخش‌های ناشی از تزریق آپومورفین و کاتالپسی را کاهش داد. برای اثبات اثر نارینژنین در محافظت از نورون‌ها در برابر 6-OHDA، به بررسی تأثیرات نارینژنین بر آسیب اکسیداتیو نورونی در موش‌ها نیز پرداخته شد. یافته‌ها ادعان داشتند که نارینژنین توانست در برابر آسیب‌های ناشی از 6-OHDA در مدل‌های جانوری پارکینسونی محافظت کرده و از آپاپتوز سلول‌های عصبی جلوگیری کند. طبق گزارش‌های پیشین، استرس اکسیداتیو با افسردگی، اضطراب و اختلالات روانی مرتبط می‌باشد (۲۵). بنابراین تأثیر نارینژنین بر رفتار شبه اضطراب/مدت زمان بی‌حرکتی (FST)، فعالیت حرکتی (EPM) مورد بررسی قرار گرفت. در تحقیق حاضر، یافته‌های حاصل از تست شنای اجباری، عملکرد ضدافسردگی نارینژنین را تأیید کرد که باعث کاهش زمان بی‌حرکتی در تست FST و کاهش رفتارهای شبه‌افسردگی در تست EPM شد. در واقع تیمار نارینژنین در مدل پارکینسونی موش، باعث کاهش رفتارهای شبه-اضطرابی و شبه‌افسردگی و افزایش فعالیت حرکتی در مقایسه با گروه کنترل شد. یافته‌های تحقیق حاضر با نتایج حاصل از مطالعات پیشین مطابقت دارد. 6-OHDA به آسانی اکسید می‌شود تا گونه‌های فعال اکسیژن مانند  $H_2O_2$  را تشکیل دهد و منجر به مهار تنفسی و افزایش استرس اکسیداتیو شود (۱۵). نارینژنین یک آنتی-اکسیدان، پاکسازی کننده رادیکال‌های آزاد، ضدالتهاب، بهبود دهنده متابولیسم کربوهیدرات و تنظیم کننده

## بحث

بیماری پارکینسون شایع‌ترین اختلال حرکتی است. مشخصه اصلی بیماری پارکینسون، مرگ نورون‌های دوپامینرژیک در بخش متراکم جسم سیاه است که منجر به کمبود دوپامین در استریاتوم می‌شود (۴). در مطالعه حاضر، مدل PD از طریق تزریق 6-OHDA به مغز موش القاء گردید. سپس یک هفته پس از جراحی، به منظور تأیید مدل پارکینسونی حیوانی، آزمون چرخش ناشی از تزریق آپومورفین و کاتالپسی در گروه کنترل و موش مدل PD مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که 6-OHDA به طور قابل توجهی زمان کاتالپسی و چرخش‌های مقابل را در مقایسه با گروه کنترل افزایش داد. علاوه بر این، شمارش تعداد سلول‌های عصبی پس از تزریق 6-OHDA به داخل جسم مخطط در مدل حیوانی PD نشان داد که نورودژنراسیون سلول‌های عصبی در سمت تزریق در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته است. در حقیقت این نتایج نشانگر مرگ پیشرونده نورون‌ها است. از آنجایی که NAR دارای ظرفیت آنتی‌اکسیدان و ضدالتهابی است، اثرات محافظت از نورون نیز مورد بررسی قرار گرفت. موش‌های مبتلا به PD و حیوانات گروه کنترل، NAR (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را از طریق گاواژ دریافت کردند. سپس آزمایش چرخش ناشی از تزریق آپومورفین و کاتالپسی در همه‌ی گروه‌ها بررسی

نورون ها، نیازمند انجام تحقیقات بیشتری در این زمینه می باشد. پلی فنول ها به عنوان ترکیبات درمانی، هیچ گونه عوارض جانبی شناخته شده قابل توجهی ندارند و به نظر می رسد که نتایج تقریباً مشابهی با درمان های دارویی معمول داشته باشند (۳۳). در نتیجه ممکن است نارینژنین یک مکمل خوراکی محافظت کننده از نورون ها در برابر نورودژنراسیون و پیامدهای رفتاری آن در بیماری پارکینسون باشد. هرچند، بررسی مکانیسم دقیق عملکرد نارینژنین در محافظت از نورون ها، نیازمند انجام تحقیقات بیشتری در این زمینه می باشد.

هدف از این تحقیق و نتیجه گیری: هدف از این مطالعه بررسی تأثیرات محافظتی نارینژنین در بیماری پارکینسون است. NAR احتمالاً یک مکمل خوراکی محافظت کننده ی عصبی بالقوه در برابر تخریب عصبی و پیامدهای رفتاری آن در PD است. با این حال، برای کشف مکانیسم دقیق محافظت NAR در برابر سلولهای عصبی، تحقیقات بیشتری لازم است. به طور خلاصه، نتایج تحقیق فعلی مطالعات قبلی را تا حدی تأیید کرد و نشان داده شد که 6-OHDA باعث افزایش مدت زمان کاتالپسی و چرخش-های سمت مقابل در آزمون چرخش ناشی از آپومورفین در مقایسه با گروه کنترل شد و از دست دادن سلولهای عصبی در سمت تزریق داخل مغزی 6-OHDA نیز افزایش یافت. داده های حاصل از مطالعه ی حاضر همچنین تایید کننده ی مطالعات مقدماتی است و نشان داد NAR باعث کاهش نسبی در زمان کاتالپسی، رفتار چرخش ناشی از آپومورفین، رفتار شبه اضطرابی و شبه افسردگی و افزایش نسبی زمان شنا و فعالیت حرکتی در مقایسه با گروه کنترل شد. از طرف دیگر مطالعه ی حاضر خواص محافظت عصبی NAR را در کشت سلولی بررسی کرده است. NAR به طور نسبی از مرگ سلولی در مدل کشت سلولی جلوگیری کرد و باعث کاهش آپوپتوز و مرگ نورونی در مقایسه با گروه ناشی از سم شد.

#### تقدیر و تشکر

این تحقیق توسط دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، تهران، ایران پشتیبانی شد.

#### مسائل

#### اخلاقی

سیستم ایمنی می باشد. این ماده می تواند موجب ترمیم DNA شود (۱۶). بنابراین، بررسی اثرات نارینژنین در محافظت از نورون ها در مدل جانوری پارکینسون مشتق از 6-OHDA، برای ما جالب به نظر رسید (۲۶). توکسین 6-OHDA برای القای دژنراسیون عصبی در روش کشت سلول مورد استفاده قرار گرفت. بر اساس داده های حاصل از تحقیق حاضر، اکثر نورون های شبه دوپامینرژیک دچار تخریب و مرگ سلول شدند. از آنجایی که NAR دارای ظرفیت آنتی اکسیدان و ضدالتهابی است، اثرات محافظت از نورون نیز مورد بررسی قرار گرفت. یافته مطالعه ی حاضر خواص محافظت کننده ی نورونی نارینژنین در مدل کشت سلولی پارکینسون را تأیید کرد. 6-OHDA معمولاً برای مطالعه مکانیسم های سیگنالینگ مولکولی دخیل در آپوپتوز سلول نوروبلاستوما ی انسانی SH-SY5Y استفاده می شود (۲۷). به طور کلی، نتایج تحقیق حاضر مطالعات قبلی را تأیید کرد. یقیناً، 6-OHDA به آسانی اکسید می شود تا گونه های فعال اکسیژن مانند  $H_2O_2$  را تشکیل دهد و منجر به مهار تنفسی و افزایش استرس اکسیداتیو شود (۱۵). نارینژنین یک آنتی اکسیدان، پاکسازی کننده رادیکال های آزاد، ضدالتهاب، بهبود دهنده متابولیسم کربوهیدرات و تنظیم کننده سیستم ایمنی می باشد. این ماده می تواند موجب ترمیم DNA شود (۱۶). سلول های SH-SY5Y بسیاری از خصوصیات نورون های دوپامینرژیک را دارا می باشد. به عنوان مثال، این سلول ها تیروزین هیدروکسیلاز، دوپامین-بتا-هیدروکسیلاز و همچنین ناقل های دوپامین را بیان می کنند (۲۸،۲۹). نارینژنین موجب فعال سازی Nrf۲ در شرایط آزمایشگاهی و درون بدنی می شود و از سلول های SH-SY5Y در برابر سمیت 6-OHDA محافظت می نماید (۳۰). بنابراین، بررسی اثرات نارینژنین در محافظت از نورون ها در مدل جانوری پارکینسون مشتق از 6-OHDA، برای ما جالب به نظر می رسید (۳۱). پلی فنول ها به عنوان ترکیبات درمانی، هیچ گونه عوارض جانبی شناخته شده قابل توجهی ندارند و به نظر می رسد که نتایج تقریباً مشابهی با درمان های دارویی معمول داشته باشند (۳۲). در نتیجه ممکن است نارینژنین یک مکمل خوراکی محافظت کننده از نورون ها در برابر نورودژنراسیون و پیامدهای رفتاری آن در بیماری پارکینسون باشد. هرچند، بررسی مکانیسم دقیق عملکرد نارینژنین در محافظت از

تأیید شده است.

کلیه کارهای تجربی توسط دانشگاه آزاد اسلامی -  
واحد شمال تهران با کد IR.IAU.TNB.REC.1398.011

#### منابع مورد استفاده

1. Isaacman-Beck, J., Schneider, J., Franzini-Armstrong, C., Granato, M., 2015. The lh3 glycosyltransferase directs target-selective peripheral nerve Regeneration. *Neuron* 88(4): 691-703.
2. Budzinska, K., Andrzejewski, K., 2014. Respiratory activity in the 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease in the rat. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 74(1): 67-81.
3. Edwards, J.S.A., Gustafsson, I., 2008. PDFlib PLOP: PDF linearization, Optimization, Protection Page inserted by evaluation version.
4. Winklhofer, K.F., Haass, C., 2010. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1802 (1): 29-44.
5. Torabi, M., 2016. We are IntechOpen, the world's leading publisher of open access books built by scientists, for scientists TOP 1%. *Intech tourism*, pp. 13.
6. Hu, Q., Wang, G., 2016. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Transl Neurodegener* 5(1): 1-8.
7. Park, J. S., Davis, R. L., and Sue, C. M., 2018. Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease: New Mechanistic Insights and Therapeutic Perspectives. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 18 (5): 45-53
8. Jing, X., Wei, X., Ren, M., Wang, L., Zhang, X., & Lou, H., 2016. Neuroprotective effects of tanshinone I against 6-OHDA-induced oxidative stress in cellular and mouse model of Parkinson's disease through upregulating Nrf2. *Neurochemical research*, 41(4), 779-786.
9. Qin, X. Y., Zhang, S. P., Cao, C., Loh, Y. P., & Cheng, Y., 2016. Aberrations in peripheral inflammatory cytokine levels in Parkinson disease: a systematic review and meta-analysis. *JAMA neurology*, 73(11), 1316-1324
10. Nava Catorce, M., & Gevorkian, G., 2016. LPS-induced murine neuroinflammation model: main features and suitability for pre-clinical assessment of nutraceuticals. *Current neuropharmacology*, 14(2), 155-164.
11. Dzamko, N., Geczy, C. L., & Halliday, G. M., 2015. Inflammation is genetically implicated in Parkinson's disease. *Neuroscience*, 302, 89-102.
12. Goes, A. T., Jesse, C. R., Antunes, M. S., Ladd, F. V. L., Ladd, A. A. L., Luchese, C., ... & Boeira, S. P., 2018. Protective role of chrysin on 6-hydroxydopamine-induced neurodegeneration a mouse model of Parkinson's disease: Involvement of neuroinflammation and neurotrophins. *Chemico-biological interactions*, 279, 111-120.
13. Rodriguez-Pallares, J., Parga, J. A., Munoz, A., Rey, P., Guerra, M. J., & Labandeira-Garcia, J. L., 2007. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity: the role of NADPH oxidase and microglial activation in 6-hydroxydopamine-induced degeneration of dopaminergic neurons. *Journal of neurochemistry*, 103(1), 145-156.. 103, no.
14. Hanrott, K., Gudmunsen, L., O'Neill, M. J., & Wonnacott, S., 2006. 6-hydroxydopamine-induced apoptosis is mediated via extracellular auto-oxidation and caspase 3-dependent activation of protein kinase C $\delta$ . *Journal of biological chemistry*, 281(9), 5373-5382.
15. Duty, S., & Jenner, P., 2011. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *British journal of pharmacology*, 164(4), 1357-1391.
16. Saller, C. F., & Chiodo, L. A., 1980. Glucose suppresses basal firing and haloperidol-induced increases in the firing rate of central dopaminergic neurons. *Science*, 210(4475), 1269-1271.
17. Gopinath, K., & Sudhandiran, G., 2012. Naringin modulates oxidative stress and inflammation in 3-nitropropionic acid-induced neurodegeneration through the activation of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 signalling pathway. *Neuroscience*, 227, 134-143
18. Kim, S. R., Kareva, T., Yarygina, O., Kholodilov, N., & Burke, R. E., 2012. AAV transduction of dopamine neurons with constitutively active Rheb protects from neurodegeneration and mediates axon regrowth. *Molecular Therapy*, 20(2), 275-286.
19. Jagetia, G. C., & Reddy, T. K., 2005. Modulation of radiation-induced alteration in the antioxidant status of mice by naringin. *Life Sciences*, 77(7), 780-794..
20. Venkateswara Rao, P., Kiran, S. D. V. S., Rohini, P., & Bhagyasree, P., 2017. Flavonoid: A review on Naringenin. *J. Pharmacogn. Phytochem*, 6, 2778-2783.
21. Wilcox, L. J., Borradaile, N. M., & Huff, M. W., 1999. Antiatherogenic properties of naringenin, a citrus flavonoid. *Cardiovascular drug reviews*, 17(2), 160-178.
22. Singh, A., Naidu, P. S., & Kulkarni, S. K., 2003. FK506 as effective adjunct to L-dopa in

- reserpine-induced catalepsy in rats.
23. Macintire, D. K., Drobotz, K. J., Haskins, S. C., & Saxon, W. D., 2012. Manual of small animal emergency and critical care medicine. John Wiley & Sons.
  24. Maioli, M., Rinaldi, S., Migheli, R., Pigliaru, G., Rocchitta, G., Santaniello, S., ... & Serra, P. A., 2015. Neurological morphofunctional differentiation induced by REAC technology in PC12. A neuro protective model for Parkinson's disease. *Scientific reports*, 5(1), 1-8.
  25. 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. *Molecular brain research*, 39(1-2), 127-136.
  26. Prinssen, E. P., Colpaert, F. C., & Koek, W., 2002. 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation and anti-cataleptic effects: high-efficacy agonists maximally inhibit haloperidol-induced catalepsy. *European journal of pharmacology*, 453(2-3), 217-221.
  27. Nishioka, Y., Oyagi, A., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Ishibashi, T., & Hara, H., 2011. The antianxiety-like effect of astaxanthin extracted from *Paracoccus carotinifaciens*. *Biofactors*, 37(1), 25-30.
  28. Ikeda, Y., Tsuji, S., Satoh, A., Ishikura, M., Shirasawa, T., & Shimizu, T., 2008. Protective effects of astaxanthin on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Journal of neurochemistry*, 107(6), 1730-1740.
  29. Xicoy, H., Wieringa, B., & Martens, G. J., 2017. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Molecular neurodegeneration*, 12(1), 1-11.
  30. Xie, H. R., Hu, L. S., & Li, G. Y., 2010. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chinese medical journal*, 123(8), 1086-1092.
  31. Lou, H., Jing, X., Wei, X., Shi, H., Ren, D., & Zhang, X., 2014. Naringenin protects against 6-OHDA-induced neurotoxicity via activation of the Nrf2/ARE signaling pathway. *Neuropharmacology*, 79, 380-388.
  32. Madani, E. L., EL-Shenawy, S. M., Arbid, M. S., Abd, E. R., & Attia, A., 2016. Neuropharmacological effects of naringenin, harmine and adenosine on parkinsonism induced in rats. *Der Pharmacia Lettre*, 8(5), 45-57.
  33. Magalingam, K. B., Radhakrishnan, A. K., & Haleagrahara, N., 2015. Protective mechanisms of flavonoids in Parkinson's disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2015.