زیست‌شناسی جانوری، سال پانزدهم، شماره دوم، زمستان ۱۴۰۱، صفحات ۱۹- ۱

مقاله پژوهشی

اثر محافظت عصبی زانتون و ٦-هیدروکسی‌فلاون در مدل بیماری پارکینسون القاء شده توسط ٦-هیدروکسی‌دوپامین در موش آزمایشگاهی: ارزیابی‌های رفتاری

مهشید عطاری[۱]، مریم خسروی[۱]، رامین حاجی‌خانی[۱]، مریم بنانج[۱]، جلال صولتی[۲*]

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

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

*مسئول مکاتبات: jsolati@gmail.com

DOI: 10.22034/ascij.2022.1928825.1252

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۱۲

چکیده

استرس اکسیداتیو و التهاب عصبی در بیماری پارکینسون نقش دارند. آنتی‌اکسیدان‌ها و ضدالتهاب‌ها مانند ترکیبات پلی‌فنلی و فلاونوئیدها مرگ نورونی را مهار می‌کنند. هدف مطالعه حاضر اثر زانتون و ٦-هیدروکسی‌فلاون در بیماری پارکینسون در موش-آزمایشگاهی است. حیوانات توسط جراحی استریوتکس کانول گذاری شده و تزریق یک طرفه ٦-هیدروکسی‌دوپامین در ناحیه متراکم جسم سیاه (SNc) مغز انجام می‌شود. زانتون و ٦-هیدروکسی‌فلاون به صورت داخل صفاقی تزریق شدند. سه هفته پس از جراحی، ارزیابی‌های حرکتی و رفتارهای شبه‌اضطرابی و شبه‌افسردگی انجام شدند. شمارش کل نورون‌های ناحیه متراکم جسم سیاه انجام شد. تزریق٦-هیدروکسی دوپامین باعث افزایش تعداد چرخش‌های آپومورفین گردید. زمان کاتالپسی افزایش یافت. نورون‌ها در جسم سیاه کاهش یافت. ٦-هیدروکسی‌فلاون (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زانتون (۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) باعث کاهش چرخش‌ها و کاتالپسی شدند. در تست ماز مرتفع به علاوه شکل، ٦-هیدروکسی‌فلاون در دوزهای ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و زانتون در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم فعالیت حرکتی را افزایش دادند. در تست شنای اجباری، زانتون در دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم میزان بی‌حرکتی را در موش‌های پارکینسونی کاهش داد. تعداد نورون‌های جسم سیاه با تیمار ٦-هیدروکسی‌فلاون در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم زانتون افزایش یافت. زانتون و ٦-هیدروکسی‌فلاون اختلال حرکتی و کاتالپسی را بهبود بخشیدند و تعداد سلول‌های عصبی جسم سیاه را افزایش دادند. زانتون توانست افسردگی را کاهش دهد. احتمالاً بخشی از این اثرات حفاظت کننده مرکزی به وسیله اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی زانتون و ٦-هیدروکسی‌فلاون میانجی‌گری می‌شوند که با کاهش رادیکال‌های آزاد و سایتوکین‌های التهابی از مرگ سلولی جلوگیری می‌کنند، و درنتیجه اختلالات شناختی و حرکتی را بهبود می‌بخشند.

کلمات کلیدی: بیماری پارکینسون، ٦-هیدروکسی دوپامین، زانتون، ٦-هیدروکسی فلاون، موش آزمایشگاهی.

مقدمه

بیماری پارکینسون شایع‌ترین بیماری تحلیل‌برنده عصبی بعد از بیماری آلزایمر به شمار می‌رود که تقریباً ۱ درصد افراد بالای ۵۰ سال به آن مبتلا می-شوند، این بیماری با تخریب نورون‌های دوپامینرژیک

بخش متراکم جسم سیاه (SNc) در مغز میانی و به دنبال آن کاهش دوپامین در جسم مخطط همراه است. علائم بیماری پارکینسون در دو مرحله ظاهر می‌شود: ۱- مرحله ابتدایی یا مرحله قبل از بروز علائم بالینی، ۲ – مرحله‌ای که طی آن علائم بالینی بیماری آغاز می‌شود. این مرحله با تأخیر شروع شده و زمانی علائم بیماری آشکار می‌شوند که میزان تخریب نورون‌های دوپامینرژیک جسم سیاه ۵۰ تا ٦۰ درصد و کاهش دوپامین در جسم مخطط ۷۰ تا ۸۰ درصد باشد و بدین ترتیب منجر به شروع دوره حاد بیماری می‌گردد (۲۲). بیماری پارکینسون اولین بیماری تحلیل‌برنده عصبی است که علت عصبی- شیمیایی آن کاهش شدید کتکولامین دوپامین در جسم مخطط می‌باشد (۵).

تمام درمان‌های تایید شده مستقیم یا غیرمستقیم سعی در مقابله با از دست‌رفتن دوپامین در جسم مخطط دارند (۹).

استرس اکسیداتیو یکی از عواملی است که در تخریب نورون‌های دوپامینرژیک در بیماری پارکینسون نقش دارد. مطالعات نشان داده است که صدمات ناشی از استرس اکسیداتیو و رادیکال‌های آزاد نقش مهمی در تخریب نورون‌های جسم سیاه دارد (۱۵).

چون متابولیسم دوپامین در نورون‌ها با تولید گونه‌های واکنشگر اکسیژن (ROS)، از جمله پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل همراه میباشد، نورون‌های دوپامینرژیک مغز بیشتر در معرض مرگ سلولی ناشی از استرس اکسیداتیو قرار می‌گیرند (۳۷).

بررسی‌های پس از مرگ مغز بیماران پارکینسونی، نشان می‌دهد که تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد عامل پیشرفت این بیماری بوده و آزمایشات انجام شده روی سرم و مایع مغزی‌نخاعی، میزان بالای استرس اکسیداتیو را تنها عامل مرگ سلولی در این بیماری معرفی کرده است (۱۵، ۳۷).

همچنین، به دلیل غنی‌بودن سیستم عصبی مرکزی از لیپید، مصرف اکسیژن زیاد و سطح پایین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، سیستم عصبی مرکزی حساسیت بالایی نسبت به استرس اکسیداتیو دارد، به ویژه هیپوکمپ، جسم سیاه و جسم مخطط از حساس‌ترین بخش‌ها هستند (۱۱).

نورون‌های دوپامینرژیک در جسم سیاه عملکردهای مختلفی چون یادگیری، فرآیندهای حافظه و کنترل حرکتی دارند، تخریب نورون‌های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه و ناحیه تگمنتال شکمی (VTA) به وسیله نوروتوکسین ٦-هیدروکسی دوپامین (6-OHDA) از طریق دو مکانیسم مهار کمپلکس I میتوکندری و ایجاد استرس اکسیداتیو می‌تواند با حذف ورودی‌های دوپامینی هیپوکمپ مدل پارکینسونی با اختلال حافظه در جوندگان ایجاد کند (۲۰، ۲۵).

٦-هیدروکسی دوپامین آنالوگ دوپامین هیدروکسیله میباشد که میل ترکیبی زیادی به دوپامین دارد .۱۲ ساعت پس از تزریق، مرگ سلولی در نورون‌های بخش متراکم جسم‌سیاه شروع شده و در طول ۲ -۳ روز فقدان دوپامین مشاهده می‌شود. سطح بسیار بالای مرگ سلولی در جسم‌سیاه و کاهش دوپامین در این فرآیند مشاهده می‌شود (حدود ۹۰ تا ۱۰۰ درصد). مکانیسم عملکرد این نوروتوکسین به خصوصیت پراکسیدانت آن بستگی دارد، ابتدا ، در سیتوزول تجمع یافته و سریعاً دچار اتواکسیداسیون شده و هیدروژن پراکسید تولید می‌شود. علاوه بر این، در میتوکندری نیز تجمع یافته و از فعالیت کمپلکس I میتوکندری جلوگیری می‌کند (۲۸).

٦-هیدروکسی دوپامین مدتها است که در مدل‌های تجربی برای مطالعه عملکرد دوپامین در مغز و بررسی فعالیت داروهای فعال عصبی بر سیستم دوپامینرژیک مرکزی، که دژنره شدن آن نشانه‌ای از بیماری

پارکینسون است، استفاده می‌شود. استفاده مستقیم از ۶-هیدروکسی دوپامین به داخل ماده سیاه (Substantia nigra) یا جسم مخطط باعث دژنره شدن نورون‌های nigrostriatal tract در مغز شده و منجر به تغییرات رفتاری، بیوشیمیایی و پاتولوژیکی که مشخصه بیماری پارکینسون هستند، می‌شود. این اثرات سمی در تشکیل اکسیدان‌های مختلف و رادیکال‌های آزاد، پراکسیده شدن لیپید، تخلیه گلوتاتیون (GSH) کاهش یافته و نقص‌های کمپلکسI میتوکندریایی دخالت دارند (۶). تحقیقات نشان داده که تزریق یک‌طرفه هیدروکسی دوپامین به بخش متراکم جسم سیاه باعث تخریب کامل نورون‌های دوپامینرژیک و کاهش شدید دوپامین گردیده و به دنبال آن حرکات مزاحم مانند رفتارهای چرخشی در حیوانات مدل پارکینسونی مشاهده می‌گردد که این علائم نشان دهنده مدل پیشرفته بیماری که با اختلالات حرکتی همراه است (۲۷).

به طور کلی، ۶-هیدروکسی دوپامین مانند دوپامین رفتار کرده و نورون‌های کتکولامینرژیک را مورد هدف قرار داده به طوریکه از طریق ناقل‌های دوپامینی (DAT) از غشاء نورون‌ها عبور کرده و با سه مکانیسم تولید ROS، پراکسید هیدروژن و مهار زنجیره تنفسی در میتوکندری عمل کرده و باعث تخریب نورون‌های دوپامینرژیک می‌گردد. البته، باتوجه به اینکه متابولیسم اکسیداتیو دوپامین در نورون‌های دوپامینرژیک SNc با تولید رادیکال آزاد همراه است این گروه از نورون‌ها در مقایسه با سایر نورون‌های مناطق دیگر مغز در مواجه با استرس اکسیداتیو آسیب‌پذیرترند (۸).

منگوستین (Mangosteen) با نام علمی *Garcinia mangostana* L. از خانواده Guttifereae است و قسمت‌های مختلف این گیاه علاوه بر مواد تشکیل دهنده آن اثرات فارماکولوژیکی بسیاری مانند خاصیت ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی، حفاظت در مقابل بیماری آلزایمر دارند (۱۲).

متابولیت‌های ثانویه متنوعی مانند زانتون‌ها، به‌عنوان رده‌ای از ترکیبات پلی‌فنلی با اثرات زیستی در منگوستین وجود دارند (۳۶).

زانتون‌ها از برگ‌ها، پوست درخت، میوه، پریکارپ منگوستین ایزوله می‌شوند. فراوان‌ترین زانتون‌ها آلفا- و گاما-منگوستین هستند. بنابراین، منگوستین ممکن است حاوی ماده‌ای ضدالتهابی باشد. آلفا-منگوستین ترکیبی از پوست میوه این درخت است. آلفا و گاما منگوستین فعالیت‌های مختلف فارماکولوژیکی مانند اثر آنتی‌هیستامینی، مهار شبکه‌سارکوپلاسمی پمپ کننده کلسیمی آدنوزین ۵-تری‌فسفات ATPase و فعالیت ضدسروتونینی دارند. زانتون‌ها پیگمنت‌های زرد رنگ با اهمیت کموتاکسونومیکی و بسیاری اثرات فارماکولوژیک (ضدتومور، آنتی‌اکسیدان، کاهش‌دهنده یا محرک سیستم اعصاب مرکزی هستند (۲۴).

گروه زانتون‌های اکسیژنه ساده که اغلب در گونه‌های جنس *Gentiana* وجود دارند که طیف وسیعی از اثرات فارماکولوژیک را نشان می‌دهند. مشخص شده است که زانتون‌ها خصوصیات درمانی در مدل‌های جانوری بیماری‌های تحلیل‌برنده عصبی مانند آلزایمر، پارکینسون و ALS دارند و پیشرفت این بیماری‌ها را کند می‌کنند و برخی از زانتون‌ها به عنوان مهارکننده-های منوامین‌اکسیداز (MAO) عمل می‌کنند (۳۴).

فلاون‌های هیدروکسیله و مشتقات آنها گروهی از محصولات طبیعی مشتق شده هستند که طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های ضدالتهابی، ضدسرطانی، آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی دارند (۲۶).

برخی از فلاونوئیدهای طبیعی مولکول‌های فعال سیستم عصبی مرکزی هستند و اصلاح شیمیایی هسته فلاون به‌طور چشمگیری تمایل آنها را به گیرنده‌های

بنزودیازپین افزایش و قدرت ضداضطرابی آنها را تقویت می‌کند (۲۱).

پلی‌فنل‌ها از نورون‌ها در مقابل ترکیبات سمی مختلف حفاظت می‌کنند (۷).

ترکیبات پلی‌فنلی هم از طریق پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و هم تعدیل مسیرهای مختلف مانند آبشارهای سیگنال‌دهنده، فرایندهای ضدآپوپتوزی، یا سنتز/تجزیه پپتید آمیلوئید-بتا اثرات سودمندی برای سلول‌ها نشان می‌دهند . غلظت پلی‌فنل‌ها در رژیم غذایی به اندازه کافی بالا هست تا در مغز فعالیت فارماکولوژیکی اعمال نماید (۴۰).

برخی فلاونوئیدها از سلول‌های عصبی در مقابل سمیت اکسیداتیو گلوتامات و سایر فرم‌های آسیب اکسیداتیو حفاظت می‌کنند. نشان داده شده است که فلاونوئیدها با سه مکانیسم مجزا در مقابل استرس اکسیداتیو عمل می‌کنند: مستقیماً متابولیسم گلوتاتیون (GSH) را تحت‌تاثیر قرار می‌دهند، به‌عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کنند و سطوح پایین Ca^{2+} را علارغم سطوح بالای ROS حفظ می‌کنند (٤).

ترکیب ٦-هیدروکسی‌فلاون، فلاونی است که به طور طبیعی در برگ‌های گیاه *Barleria prionitis* یافت می‌شود که گونه‌ای از خانواده Acanthaceae است که بومی هند می‌باشد. این گیاه به‌طورگسترده در اختلالات نورولوژیکی مانند پاراپلاژی و سیاتیک استفاده می‌شود (۳۰).

٦-هیدروکسی‌فلاون یک آگونیست نسبی ساب‌تایپ انتخابی گیرنده‌های $GABA_A$ است که اثرات ضد اضطرابی نشان می‌دهد، بنابراین، می‌تواند یک داروی امیدبخش در درمان اختلالات شبه‌اضطرابی باشد. عملکردهای ترجیحی ٦-هیدروکسی‌فلاون بر ساب‌تایپ‌های α_2 و α_3 همچنین ثابت می‌کند که ساب‌تایپ‌های α_2 و α_3 اهداف مفید دارویی ضداضطراب‌های فلاوونوئیدی هستند (۳۵).

برخی فلاونوئیدها از سلول‌های عصبی در مقابل سمیت اکسیداتیو گلوتامات و سایر فرم‌های آسیب اکسیداتیو حفاظت می‌کنند. استفاده از گیاهان یا عصاره‌های غذایی غنی از فلاونوئید در مطالعات مکمل غذایی در انسان و جانوران بهبود در عملکرد شناختی را نشان می‌دهند که احتمالا از طریق حفاظت از نورون‌های آسیب‌پذیر، افزایش عملکرد نورونی موجود و یا با تحریک رژنره شدن نورونی، روی می‌دهد (۲۹).

ترکیبات طبیعی مانند فلاونوئیدها پتانسیل حفاظت‌کننده عصبی دارند که احتمالاً این اثر حفاظتی مرتبط با توانایی آنها در تعدیل پاسخ‌های التهابی موجود در بیماری‌های تحلیل‌برنده عصبی است. در واقع، فلاونوئیدهای خالص بیان سایتوکین‌های پیش‌التهابی را کاهش می‌دهند و مارکرهای التهابی را فروتنظیمی و از آسیب نورونی جلوگیری می‌کنند (۱۹).

مطالعه حاضر، اولین مطالعه‌ای است که در یک مدل حیوانی قصد دارد تا اثر حفاظتی احتمالی زانتون مشتق از گیاه منگوستین و ٦-هیدروکسی‌فلاون را به‌عنوان یک فلاونوئید را در محافظت عصبی ناشی از آنها را با ارزیابی رفتاری نشان‌دهد.

مواد و روش‌ها

حیوانات: در این تحقیق از تعداد ۸۰ عدد موش آزمایشگاهی نر بالغ نژاد NMRI با وزن حدود ۳۰ گرم استفاده شد. حیوانات به مدت یک هفته جهت سازش با محیط جدید در شرایط استاندارد با درجه حرارت ۲۰-۲۲ درجه سانتیگراد، ۱۲ ساعت تاریکی ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شدند. آب و غذا آزادانه در اختیار آنها قرارگرفت. موش‌های آزمایشگاهی به ۱۰ گروه ۸ تایی تقسیم می‌شوند:

گروه اول: کنترل که به موش‌های پارکینسونی ۲ میکرولیتر حامل (یک میکروگرم اسید اسکوربیک در

یک میکرومولار سالین ۰/۹ درصد) با سرعت ۰/۳۳ میکرولیتر در دقیقه در نواحی SNc تزریق می‌شود. گروه دوم: نوروتوکسین-٦-هیدروکسی دوپامین (هیدرو برومید سیگما) به میزان ٦ میکروگرم در ۲ میکرولیتر نرمال در بخش متراکم جسم‌سیاه (SNc) تزریق می‌شود. گروه‌های سه، چهار و پنج گروه‌هایی هستند که سم را به‌صورت داخل مغزی (i.c.v.) دریافت کرده و سپس تیمار ٦-هیدروکسی‌فلاون را در سه دوز مختلف به‌صورت داخل‌صفاقی (i.p.) دریافت می‌کنند. گروه‌های شش، هفت و هشت گروه‌هایی هستند که سم را به صورت داخل مغزی دریافت کرده و سپس تیمار زانتون را در سه دوز مختلف (i.p.) دریافت می‌کنند. گروه نه: سم را به صورت داخل مغزی دریافت کرده و سپس تیمار ترکیبی از دوزهای ساب‌افکتیو ٦-هیدروکسی‌فلاون و زانتون را به‌صورت زیر دریافت می‌کند: جراحی استریوتکس و تزریق داخل مغزی حلال ٦-هیدروکسی دوپامین (سالین + ۰/۱ اسید اسکوربیک) + تزریق داخل صفاقی (i.p.) حلال

جراحی استریوتکس و تزریق داخل مغزی سم ٦-هیدروکسی دوپامین (سالین + ۰/۱ اسید اسکوربیک)

جراحی استریوتکس و تزریق داخل مغزی نوروتوکسین-٦-هیدروکسی دوپامین + تزریق داخل صفاقی حلال

جراحی استریوتکس و تزریق داخل مغزی نوروتوکسین-٦-هیدروکسی دوپامین + ٦-هیدروکسی فلاون (تزریق داخل صفاقی ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی-گرم/کیلوگرم)

جراحی استریوتکس و تزریق داخل مغزی نوروتوکسین-٦-هیدروکسی دوپامین + زانتون (تزریق داخل صفاقی ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم،)

جراحی استریوتکس و تزریق داخل مغزی نوروتوکسین- ٦-هیدروکسی دوپامین + ترکیب دوز ساب‌افکتیو-هیدروکسی فلاون و زانتون

جراحی استریوتکس و القاء بیماری پارکینسون: موش‌های آزمایشگاهی با تزریق کتامین ۱۰۰ و زایلازین ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت داخل صفاقی بیهوش شده و سر حیوان به کمک میله دهانی جلویی و میله‌های داخل گوشی در دستگاه استریوتاکس ثابت می‌شود. مختصات محل تزریق با توجه به اطلس Paxinos و Watson بر این اساس است: -۵ میلی‌متر از برگما، -۷/۷ میلی‌متر پشتی شکمی، و ۲.۱± میلی‌متر داخلی خارجی (۲۰). پس از سوراخ کردن محل موردنظر به کمک دریل دندانپزشکی، ٦ میکروگرم نوروتوکسین ٦-هیدروکسی دوپامین (6-OHDA) در ۲ میکرولیتر محلول نمکی ۰/۹ درصد حاوی ۰/۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر اسید اسکوربیک به‌صورت یک‌طرفه درون بخش متراکم جسم‌سیاه با استفاده از سرنگ هامیلتون ۵۰ میکرو-لیتری که به پمپ تزریق نصب شده بود، با سرعت تزریق ۰.۳۳ میکرولیتر در دقیقه تزریق شد . به منظور جلوگیری از بازگشت محلول به درون سرنگ و انتشار بهتر محلول در منطقه SNc، سرسوزن به مدت ۵ دقیقه پس از تزریق در جای خود باقی ماند. سپس، سر موش‌ها بخیه شده، پس از اتمام عمل جراحی، حیوانات جراحی شده تا زمان به هوش آمدن به اطاقی با دمای مناسب انتقال یافته و پس از به‌هوش آمدن در قفس نگهداری شدند

بررسی‌های رفتاری: سه هفته پس از جراحی، برای اثبات القاء بیماری پارکینسون و نشان‌دادن اثر حفاظتی احتمالی تیمارهای مختلف، تست‌های رفتاری شامل آزمون چرخش القاشده با آپومورفین، تست کاتالپسی، تست سنجش اضطراب ماز مرتفع به‌علاوه شکل (EPM) و سنجش افسردگی توسط تست شنای

اجباری (FST) انجام می‌گیرد. همچنین، شمارش کل نورون‌های واقع در ناحیه متراکم جسم‌سیاه از سمت میانی تا بخش جانبی با هسته واضح و محدوده سیتوپلاسمی مشخص و به‌صورت یک‌سو کور یک‌طرفه با استفاده از گرید انجام می‌شود.

آزمون چرخش القاشده با آپومرفین: آگونیست‌های گیرنده دوپامین، مانند آپومورفین به‌صورت پس‌سیناپسی عمل می‌کنند و در نتیجه تحریک بیش از حد گیرنده‌های دوپامینی بسیار حساس در جسم مخطط عصب‌دهی شده، چرخش را در مسیر مخالف سمت آسیب دیده القاء می‌کنند. ابتدا موش‌ها داخل یک استوانه پلکسی‌گلاس شفاف با قطر ۲۸ و ارتفاع ۳۸ سانتیمتر قرار داده شدند و به آنها ۵ دقیقه جهت سازش با محیط زمان داده‌شد. سپس، آپومورفین هیدروکلراید (۰/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم در نرمال سالین حاوی ۰/۰۱ درصد اسکوربیک اسید) به‌صورت داخل صفاقی به موش‌ها تزریق شد. یک دقیقه پس از آن، تعداد چرخش‌ها به طرف محل تزریق سم (عدد منفی) و یا خلاف آن (عدد مثبت) به مدت یک ساعت ثبت گردید. در پایان تعداد چرخش خالص موش‌ها به یک طرف با جمع جبری اعداد به دست آمده محاسبه شد.

کاتالپسی: برای بررسی کاتالپسی از روش استاندارد بارتست استفاده شد. در این روش، دوپای جلوئی حیوان روی میله‌های چوبی و افقی به قطر۱/۵۲ سانتی‌متر و ارتفاع ۱٤ سانتی‌متر از کف جعبه قرار داده می‌شود مدت زمانی را که هر دو پای جلویی حیوان روی میله افقی قرارگرفته و جانور در وضعیت ثابت باقی خواهد ماند، اندازه گرفته می‌شود. حداکثر زمانی که جانور می‌تواند روی میله افقی باقی بماند ۹٤ ثانیه در نظر گرفته خواهد شد. زمان پایان آزمایش زمانی خواهد بود که حیوان یکی از پاهای جلوئی خود را از روی میله بردارد و یا سر خود را جستجوگرایانه تکان بدهد. این کار برای سه مرتبه با فواصل ۹ دقیقه تکرار می‌گردد.

تست اضطراب با ماز مرتفع به‌علاوه **شکل**: جهت سنجش اضطراب موش‌ها از تست ماز مرتفع بعلاوه شکل (EPM) استفاده گردید. در تست EPM ابزار مورد استفاده یک دستگاه چوبی به ارتفاع ۵۰ سانتی‌متر از کف و شامل دو بازوی باز و دو بازوی بسته (۳۵ × ۵) و یک سکوی مرکزی (۵ × ۵) که هر کدام از یک سقف باز تشکیل شده است. در زمان انجام تست موش‌ها در ابتدای یکی بازوهای باز قرار داده شدند. داده‌های رفتاری به وسیله یک دوربین که در بالای سر ماز نصب گردیده و نرم‌افزار *EthoVision* XT ضبط می‌گردد. در هر جانور به مدت ۵ دقیقه پارامترهای زیر اندازه گرفته می‌شوند: مدت زمانی که حیوان در بازوی باز باقی می‌ماند به ثانیه، مدت زمانی که حیوان در بازوی بسته باقی می‌ماند به ثانیه، دفعاتی که حیوان وارد بازوی باز و بازوی بسته می‌شود (.no). 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 حساب می‌شود، همچنین، میزان فعالیت حرکتی موش‌ها که معادل تعداد کل 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 می‌شود.

تست شنای اجباری: برای سنجش افسردگی از تست شنای اجباری (FST) استفاده شد. این تست یکی از معتبرترین و رایج‌ترین تست‌های حیوانی برای بررسی افسردگی می‌باشد. روش آزمایش به این صورت است که ۱۵ سانتی‌متر از ظرف شیشه‌ای استوانه‌ای با ارتفاع ۲۵ و قطر۱۲ سانتی‌متر از آب ۵۲ درجه پر و موش‌های تیمار و کنترل پس از کسب درمان‌های لازم بصورت انفرادی از ارتفاع ٥٤ سانتی‌متر به ملایمت درون آب

قرار داده می‌شوند. در این شرایط، حیوانات برای نجات خود و یا حفظ پایداری در آب شنا می‌کنند. پس از مدتی، حیوانات با توقف حرکات دست و پای خود از تحرک و فعالیت باز می‌مانند که بطور قراردادی به آن بی‌حرکت شدن می‌گویند. برای اندازه گیری زمان بی-حرکتی، مدت زمان آن حیوان در طی محدودهٔ زمانی مشخص ٦ دقیقه‌ای توسط کرونومتر ثبت می‌گردد که دو دقیقه اول به عنوان زمان سازگاری در نظر گرفته می‌شود و میزان بی‌حرکتی (ثانیه) در چهار دقیقه پایانی در محاسبات استفاده می‌شوند. در این حالت، افزایش زمان بی‌حرکتی را معادل افسردگی و کاهش آن را به عنوان اثربخشی درمان ضد افسردگی ارزیابی می-شود.

مطالعات بافتی: پس از اتمام مطالعه رفتاری، مغز از جمجمعه خارج شده و جهت فیکس کردن از فرمالین استفاده می‌شود. بلوک‌هایی از مغز میانی و استریاتوم تهیه می‌شود. به دنبال آماده سازی نهایی بافتی (قرار دادن بلوک‌ها در محلول ساکروز ۳۰ درصد به مدت ۲ تا ۳ روز)، برش‌هایی به ضخامت ۵۰ میکرومتر با استفاده ازمیکروتوم انجمادی (Leica) تهیه شده و در بافر فسفات ۰/۱ مول جمع آوری شدند. برش‌ها با استفاده از روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی می‌شوند. برای هر حیوان، حداقل دو برش از هر یک از چهار سطح پاکسینوز ٩/٦- و ٦/٣٩ اینتراورال، ٩/٤، واتسون ٨/٦ مورد بررسی قرار گرفت. در ضمن، شمارش در مورد کل نورون‌های واقع در ناحیه متراکم جسم‌سیاه از سمت میانی تا بخش جانبی با هسته واضح و محدوده سیتوپلاسمی مشخص و به صورت یک‌سو کور یک‌طرفه با استفاده از گرید انجام می‌شود. به‌علاوه، شمارش در مورد هر برش حداقل دو بار انجام شد تا خطا به حداقل برسد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌ها از نظر آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS 22 و آنالیز واریانس (ANONA) مورد بررسی قرار گرفتند. همهٔ داده ها به صورت Mean ± S.E.M ارائه شده‌اند. اختلاف بین گروه‌ها در سطح معنی‌داری ارزش p کوچکتر از ۰/۰۵ تعیین می‌شود.

نتایج

اثر ٦-هیدروکسی‌فلاون (6-HF) (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زانتون (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی-گرم/کیلوگرم) بر تعداد چرخش‌های القاء شده با آپومورفین در موش‌های پارکینسونی دریافت کننده ٦-هیدروکسی دوپامین در شکل ۱ نشان داده شده است. در مقایسه با گروه شم دریافت کننده سالین، تمام گروه‌ها به‌صورت معنی‌داری تعداد چرخش‌های بیشتری داشته‌اند: F (8, 83)= ٩٤/٣٥٥ و $p <$ ۰/۰۰۱. درحالیکه مقایسه با گروه پارکینسونی دریافت کننده سالین نشان می‌دهد تیمار 6-HF در دوزهای ۵۰ میلی-گرم/کیلوگرم $p <$ ۰/۰۵، F(٨ ،٨٣) = ٩٤/٣٥٥ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم $p <$ ۰/۰۱ به طور معنی‌داری باعث کاهش تعداد چرخش‌ها شده است. به‌طور مشابه، تیمار زانتون نیز در دوزهای ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم $p <$ ۰/۰۱، F(٨ ،٨٣)= ٩٤/٣٥٥ و ۲۰۰ میلی-گرم/کیلوگرم ۰/۰۰۱، تعداد چرخش‌های ناشی از آپومورفین را به طور معنی‌داری کاهش داده است.

اثرات ٦-هیدروکسی‌فلاون (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم) و زانتون (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلو-گرم) بر کاتالپسی القاء شده توسط ٦-هیدروکسی دوپامین (مدت زمانی که هر دو پای جلویی موش‌ها روی میله افقی باقی و موش بی‌حرکت است) در موش‌های پارکینسونی دریافت کننده ٦-هیدروکسی دوپامین در شکل ۲ نشان داده شده است. در مقایسه با گروه شم دریافت کننده سالین تمام گروه‌ها به صورت معنی‌داری مدت زمان کاتالپسی بیشتری داشتند F(٨ ،٧٠) = ٤٣/٣٠٧ $p <$ ۰/۰۰۱. درحالیکه،

مقایسه با گروه پارکینسونی دریافت کننده سالین نشان می‌دهد تیمار ٦-هیدروکسی‌فلاون در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به طور معنی‌داری باعث کاهش مدت زمان کاتالپسی شده است $F(۸ ،۷۰) = ۴۳/۳۰۷$ ، $p < ۰/۰۱$. به‌طور مشابه، تیمار زانتون نیز در دوزهای ۱۰۰ ($p < ۰/۰۰۱$) و ۲۰۰ ($p < ۰/۰۰۱$) $F(۸ ،۷۰) = ۴۳/۳۰۷$ مدت زمان کاتالپسی را به طور معنی‌داری کاهش داده است.

اثرات ٦-هیدروکسی‌فلاون (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زانتون (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) بر درصد مدت زمان سپری شده در بازوهای باز (OAT) (شکل ۳)، درصد تعداد ورود به بازوهای باز (OAE) (شکل ٤) و فعالیت حرکتی عمومی (تعداد کل ورود به بازوهای باز و بسته) (شکل ۵) را در تست ماز مرتفع بعلاوه شکل (EPM) در موش‌های پارکینسونی دریافت‌کننده ٦-هیدروکسی دوپامین در شکل ۳ نشان داده شده است.

آنالیز آماری و تست ANOVA نشان داد که در مقایسه با گروه شم دریافت‌کننده سالین و گروه پارکینسونی دریافت‌کننده سالین، تیمارهای ٦-هیدروکسی‌فلاون و زانتون هیچگونه اثرات معنی‌داری بر درصد مدت زمان سپری شده در بازوهای‌باز (OAT) $F(٦ ،۵٦) = ۱/۰٤۵$، $p = ۰/٤۰٦$

و درصد تعداد ورود به بازوهای باز (OAE) نداشتند $F(٦ ،۵٦) = ۱/۲۰۹$، $p = ۰/۳۱۵$ (شکل‌های ۳ و ٤).

هرچند، فعالیت لوکوموتور موش‌های تیمار شده با ٦-هیدروکسی‌فلاون در دوزهای ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به طور معنی‌داری بیشتر از موش‌های پارکینسونی دریافت کننده سالین بود: $p < ۰/۰۱$ و $F(٦ ،۵٦) = ۳/۵۵۳$. به طور مشابه، فعالیت لوکوموتور موش‌های تیمار شده با زانتون در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به طور معنی‌داری بیشتر از موش‌های پارکینسونی دریافت کننده سالین بود: $p < ۰/۰۵$ و $F(٦ ،۵٦) = ۳/۵۵۳$

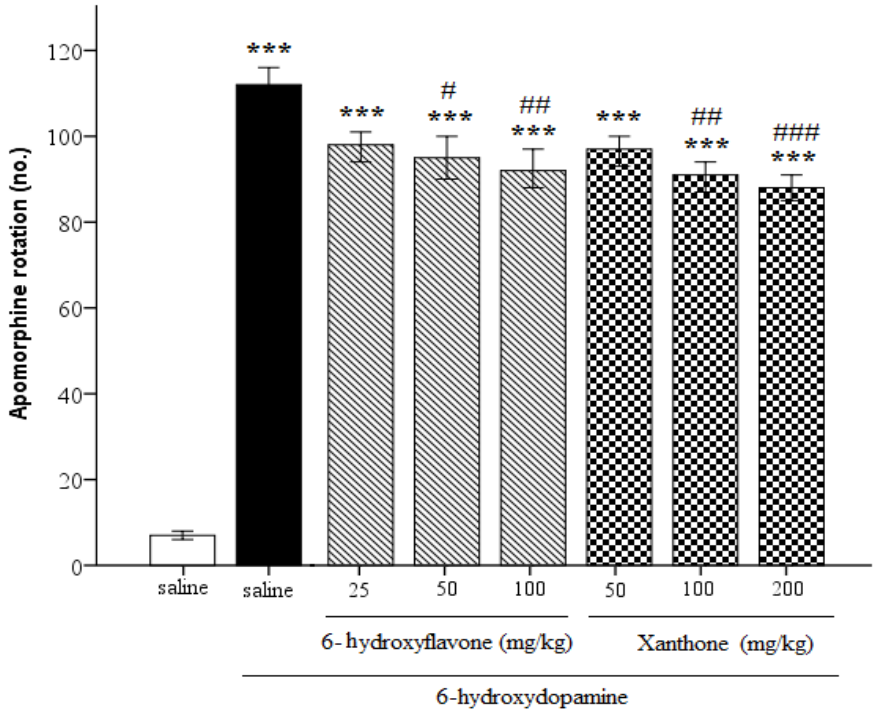
اثرات ٦-هیدروکسی‌فلاون و زانتون بر بی‌حرکتی القاء شده توسط ٦-هیدروکسی دوپامین (مدت زمانی که موش‌ها در استوانه شنا بی‌حرکت هستند) در موش‌های پارکینسونی دریافت‌کننده ٦-هیدروکسی دوپامین در تست شنای اجباری (FST) در شکل ٦ نشان داده شده است.

در مقایسه با گروه پارکینسونی دریافت کننده سالین، تیمار زانتون نیز در دوزهای ۵۰ ($p < ۰/۰۱$)، ۱۰۰ ($p < ۰/۰۰۱$) و ۲۰۰ $F(٦ ،۵٦) = ۵/۳۱۳$ $p < ۰/۰۵$ مدت زمان بی‌حرکتی در تست شنای اجباری را به طور معنی‌داری کاهش داده است.

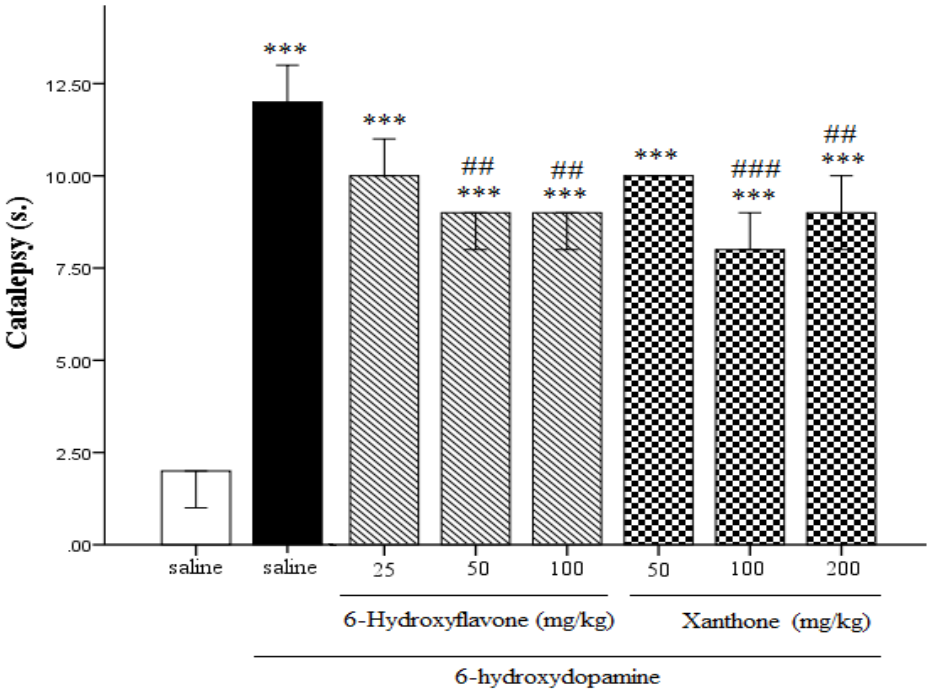
اثرات ٦-هیدروکسی‌فلاون و زانتون بر تعداد نورون‌های واقع در ناحیه متراکم جسم‌سیاه در موش‌های پارکینسونی دریافت کننده -هیدروکسی‌دوپامین در شکل ۷ نشان داده شده است. در مقایسه با گروه شم دریافت کننده سالین، تمام گروه‌ها به صورت معنی‌داری تعداد کمتری نورون داشتند و کاهش معنی‌دار نشان دادند: $F(۸ ،٦۳) = ۳٤/۷٤٤$، $p < ۰/۰۰۱$

در حالیکه، مقایسه با گروه پارکینسونی دریافت کننده سالین نشان می‌دهد تیمار ٦-هیدروکسی‌فلاون در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به طور معنی‌داری باعث افزایش تعداد سلول‌های عصبی شده است: $F(۸ ،٦۳) = ۳٤/۷٤٤$، $p < ۰/۰۵$

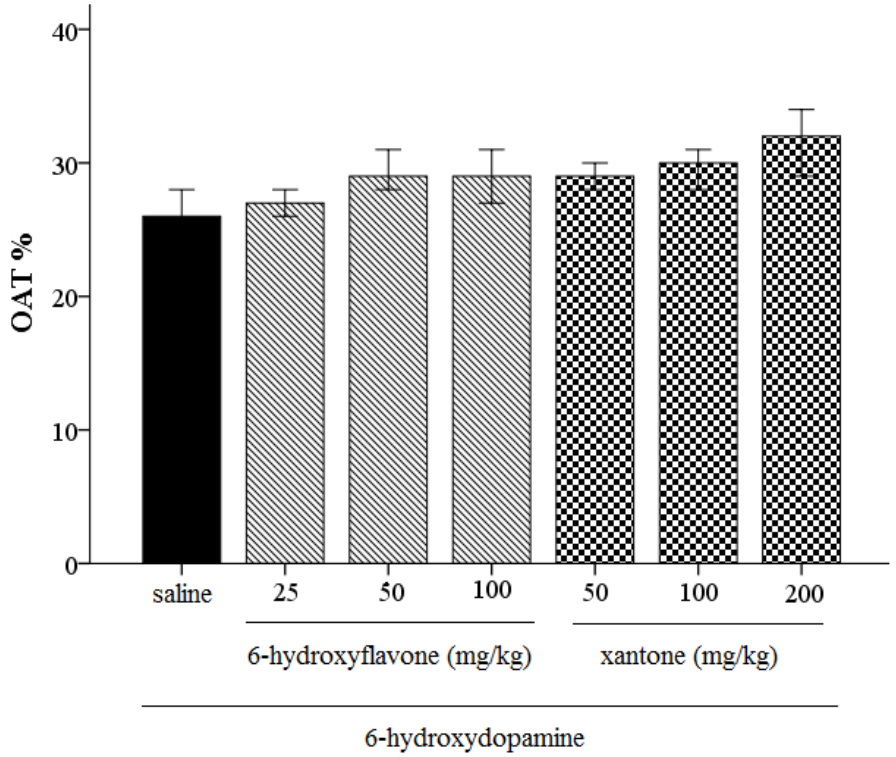
به طور مشابه، تیمار زانتون نیز در دوز ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم $p < ۰/۰۵$، $F(۸ ،٦۳) = ۳٤/۷٤٤$ باعث افزایش معنی‌دار تعداد نورون‌های جسم‌سیاه شده است.



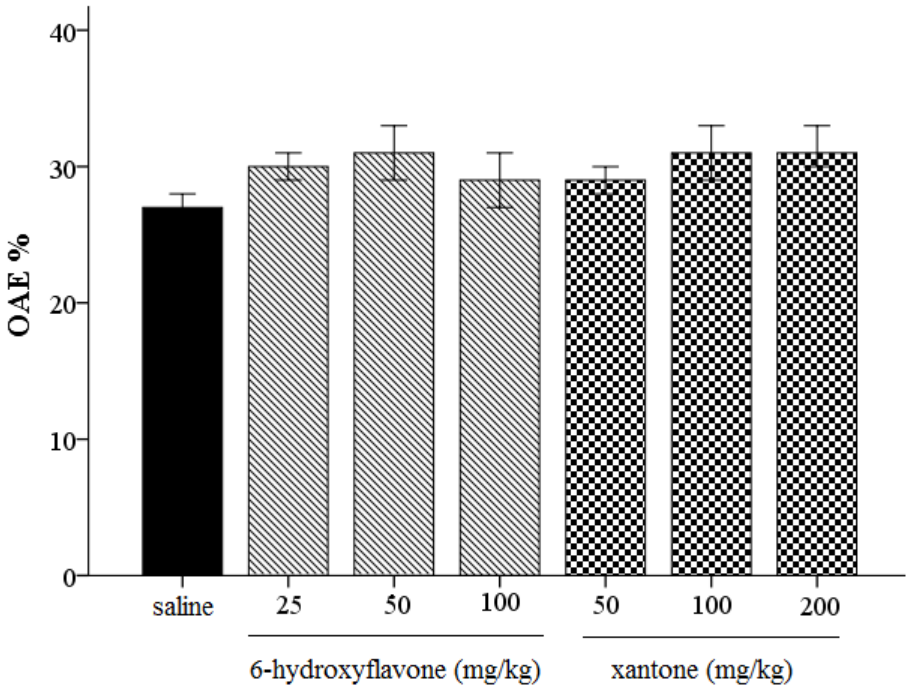
شکل ۱- اثرات دوزهای مختلف ٦-هیدروکسی‌فلاون و زانتون در موش‌های پارکینسونی دریافت کننده ٦-هیدروکسی‌دوپامین بر تعداد چرخش‌های القاء شده با آپومورفین. *** ($p < ۰/۰۰۱$) نشان دهنده تغییر معنی‌دار در مقایسه با گروه شم دریافت کننده سالین، # ($p < ۰/۰۵$)، ## ($p < ۰/۰۱$) و ### ($p < ۰/۰۰۱$)نشان دهنده تغییر معنی‌دار در مقایسه با گروه پارکینسونی دریافت کننده سالین.



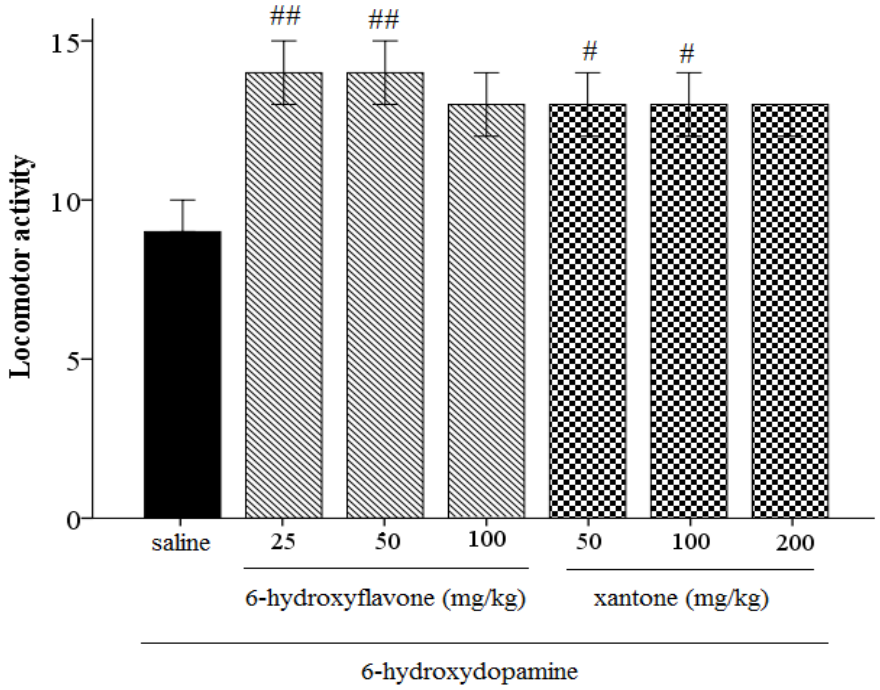
شکل ۲- اثرات دوزهای مختلف ٦-هیدروکسی‌فلاون و زانتون بر مدت زمان کاتالپسی (ثانیه) در موش‌های پارکینسونی دریافت کننده ٦-هیدروکسی‌دوپامین. *** ($p < ۰/۰۰۱$) نشان دهنده تغییر معنی‌دار در مقایسه با گروه شم دریافت کننده سالین، ## ($p < ۰/۰۱$)) و ### ($p < ۰/۰۰۱$) نشان دهنده تغییر معنی‌دار در مقایسه با گروه پارکینسونی دریافت کننده سالین.



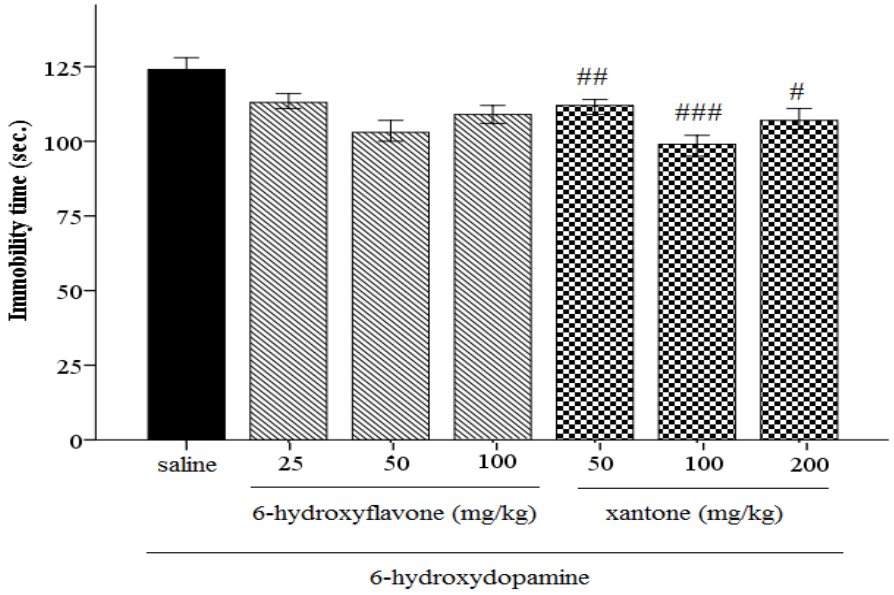
شکل ۳ - اثرات دوزهای مختلف ٦-هیدروکسی‌فلاون و زانتون بر درصد مدت زمان سپری شده در بازوهای باز (OAT)



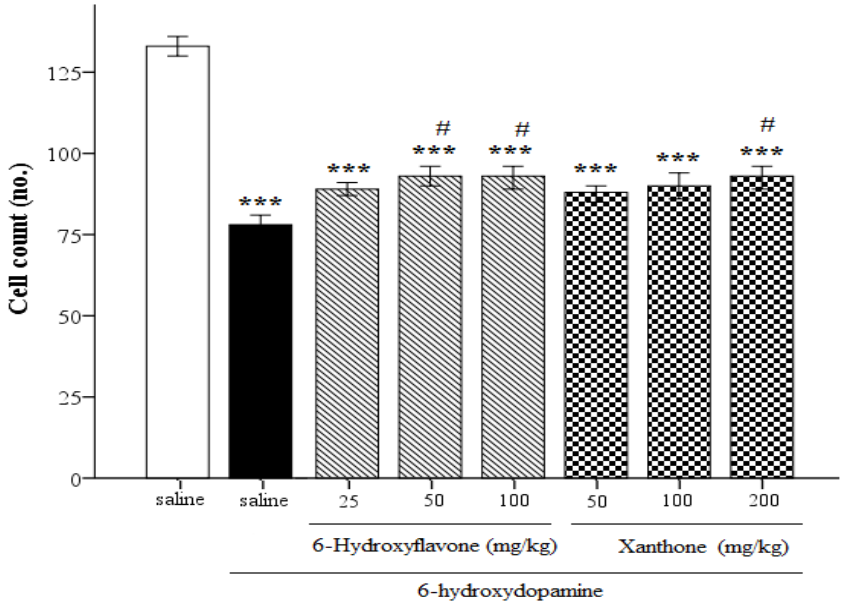
شکل ٤- اثرات دوزهای مختلف ٦-هیدروکسی‌فلاون و زانتون بر درصد تعداد ورود به بازوهای باز (OAE)



شکل ۵- اثرات دوزهای مختلف ٦-هیدروکسی‌فلاون و زانتون بر فعالیت حرکتی عمومی (تعداد کل ورود به بازوهای باز و بسته). # $p < ۰/۰۵$ و ## $p < ۰/۰۱$ نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه پارکینسونی دریافت‌کننده سالین.



شکل ٦- اثرات دوزهای مختلف ٦-هیدروکسی‌فلاون و زانتون بر بی‌حرکتی القاء شده توسط ٦-هیدروکسی دوپامین در موش‌های پارکینسونی در تست شنای اجباری (FST) . # $p < ۰/۰۵$ ، ## $p < ۰/۰۱$ و ### $p < ۰/۰۰۱$ نشان دهنده تغییر معنی‌دار در مقایسه با گروه پارکینسونی دریافت کننده سالین.



شکل ۷- اثرات دوزهای مختلف ٦-هیدروکسی‌فلاون و زانتون بر تعداد کل نورون‌های واقع در ناحیه متراکم جسم‌سیاه در موش‌های پارکینسونی دریافت کننده ٦-هیدروکسی‌دوپامین. *** $p < ۰/۰۰۱$ نشان دهنده تغییر معنی‌دار در مقایسه با گروه شم دریافت کننده سالین، # $p < ۰/۰۵$ نشان دهنده تغییر معنی‌دار در مقایسه با گروه پارکینسونی دریافت کننده سالین.

بحث

در مطالعه حاضر بیماری پارکینسون با تزریق داخل مغزی نوروتوکسین ٦-هیدروکسی دوپامین در موش‌های آزمایشگاهی القاء گردید. سپس، تیمارهای دو ترکیب پلی‌فنلی و فلاونوئیدی به نام‌های زانتون و ٦-هیدروکسی‌فلاون در دوزهای مختلف به صورت داخل صفاقی به مدت سه هفته متعاقب تزریق ٦-هیدروکسی دوپامین، شدند. برای اثبات القاء بیماری و همچنین اثرات محافظت‌کننده عصبی احتمالی زانتون و ٦-هیدروکسی‌فلاون، بررسی‌های رفتاری شامل آزمون چرخش القاء شده با آپومورفین و تست کاتالپسی برای نشان دادن اختلالات حرکتی، و تست EPM و تست FST به ترتیب جهت سنجش اضطراب و افسردگی انجام گرفتند. همچنین، شمارش کل نورون‌های واقع در ناحیه SNc انجام شد. نتایج ما نشان دادند که تزریق ٦-هیدروکسی دوپامین باعث افزایش تعداد چرخش‌ها در تست چرخش القاء شده با آپومورفین و افزایش مدت زمان بی‌حرکتی در تست کاتالپسی در مقایسه با موش‌های سالم دریافت کننده سالین، شده است. از طرف دیگر، تعداد نورون‌ها در جسم‌سیاه کاهش قابل توجهی را نشان داد. تیمار ٦-هیدروکسی‌فلاون در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم و زانتون در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به طور معنی‌داری باعث کاهش تعداد چرخش‌های القاء شده با آپومورفین، در مقایسه با موش‌های پارکینسونی دریافت‌کننده سالین، شدند. همچنین، در تست کاتالپسی، ٦-هیدروکسی‌فلاون در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم و زانتون در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم توانستند باعث کاهش زمان بی‌حرکتی در تست کاتالپسی شوند. به‌علاوه، ٦-هیدروکسی‌فلاون در دوزهای ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم و زانتون در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم توانستند فعالیت حرکتی موش‌های

پارکینسونی را به طور معنی‌داری در تست EPM افزایش دهند. هر چند، تغییر معناداری در زمان سپری شده در بازوهای باز و تعداد ورود به این بازوها در موش‌های پارکینسونی، ایجاد نکردند. در تست FST، تیمار زانتون در دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم توانست به طور قابل توجهی مدت زمان بی‌حرکتی را کاهش دهد. همچنین، تعداد نورون‌های جسم‌سیاه در موش‌های پارکینسونی با تیمار ٦-هیدروکسی‌فلاون در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم و زانتون در دوز ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت معناداری افزایش نشان داد.

مشابه با تحقیق حاضر، در یک بیماری تحلیل‌برنده عصبی دیگر مانند آلزایمر، مطالعات در مدل‌های جانوری توانایی حفاظت عصبی پلی‌فنل ها را در مدل‌های مختلف مسمومیت عصبی ناشی از پپتیدهای آمیلوئیدی نشان می‌دهند (١٦).

ونگ و همکاران در ۲۰۱۲ شرح دادند که آلفا-منگوستین به صورت وابسته به غلظت (۰/۵ و ۵۰ nM) مسمومیت عصبی القاء شده توسط اولیگومرهای Aβ، شامل کاهش بقاء سلولی و نقص رشد نوریت، را در نورون‌های اولیه قشر مغزی موش‌های صحرایی مدل آلزایمر با مهار تجمع آمیلوئید کاهش داده است (۲).

به‌طور مشابه، شواهد از ظرفیت زانتون‌های *G. angostana L.* در کاهش مسمومیت عصبی ناشی از مواد شیمیایی و برخی از تغییرات فیزیولوژیکی مرتبط با بیماری آلزایمر مانند التهاب عصبی، تجمع اولیگومرهای Aβ و اختلال حافظه بخوبی نشان داده شده است (۱۲).

اخیراً، اثر حفاظت کننده عصبی تیمار زانتون مشتق از پریکارپ گیاه *Garcinia mangostana* (۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و آلفا-منگوستین (۵۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم) به مدت ١٤ روز بر یادگیری و حافظه فضایی (ماز آبی موریس) موش‌های صحرایی هایپوپرفیوز شده مغزی (CCH) مزمن نشان داده شده است که نشان می‌دهد این ترکیبات ممکن است در بیماری‌های تحلیل‌برنده عصبی مرتبط با CCH مانند آلزایمر اثر حفاظتی داشته باشند (۲۳).

به‌علاوه، اثرات پلی‌فنل‌ها بر مسمومیت‌های عصبی ناشی از مواد شیمیایی، فلزات سنگین و ترکیب ازت‌دار، به ترتیب مانند دوکسوروبیسین، لیپوپلی‌ساکارید، سرب و اسیدپروپیونیک، نشان داده شده است. به عنوان مثال، مصرف داخل‌صفاقی زانتون (۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) از موش‌های آزمایشگاهی B6C3 در مقابل مسومیت نورونی مرکزی ناشی از دوکسوروبیسین حفاظت کرده است. این اثر حفاظتی با کاهش سطوح TNF-α و iNOS و اکسیده و پراکسیده شدن پروتئین در هموژنات‌های بافت مغز و ماکروفاژها نشان داده شد. کاهش آسیب اکسیداتیو ناشی از این گونه‌های شیمیایی با کاهش آپوپتوز سلول مغز همبستگی داشته است (۳).

به‌طور مشابه، مصرف خوراکی روزانه آلفا-منگوستین (p.o.) ٤٠ میلی‌گرم/کیلوگرم به مدت ١٤ روز، التهاب عصبی ناشی از LPS را در موش‌های ازمایشگاهی C57BL/6J کاهش داد. همچنین، سطوح مغزی سایتوکین‌های پیش‌التهابی IL-6 و COX-2 و پروتئین translocation (TSPO) در هیپوکمپ و کورتکس، کاهش یافت (۳۳).

در یک مطالعه، آلفا-منگوستین آسیب اکسیداتیو را در بافت مغز موش صحرایی کاهش داد. در این مطالعه، پراکسیده شدن لیپید ناشی از نوروتوکسین‌های مختلف در سیناپتوزوم‌ها و هموژنات‌های مغز از طریق مکانیسمی احتمالاً آنتی‌اکسیدانی مهار شد (۱۷).

موش‌های آزمایشگاهی که روزانه عصاره آبی پریکارپ منگوستین (زانتون مشتق از گیاه *Garcinia mangostana*) را به مدت ۳۸ روز (۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌

گرم/کیلوگرم) دریافت کرده بودند بهبودی قابل‌توجه در حافظه از دست رفته‌ی ناشی از فلز سنگین استات سرب، در تست ماز آبی و تست FST نشان دادند. همچنین، این عصاره غنی از زانتون قادر به بازگرداندن فعالیت استیل‌کولین‌استراز در سلول‌های خونی قرمز و بافت مغز بوده است. علاوه‌براین، در خون و مغز کاهش تولید مالون دی آلدئید (MDA) دیده شد. همچنین، پیشنهاد کردند که سرکوب آسیب اکسیداتیو ناشی از سرب توسط عصاره غنی از زانتون مکانیسم اصلی حفاظت عصبی بود. تیمار زانتون توانسته به طور معنی‌داری فعالیت استیل‌کولین‌استراز را در خون و مغز موش‌ها تعدیل نماید و اختلالات شناختی را بهبود بخشد. که این اثر حفاظتی به خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن ربط داده شده است (۱۰).

همچنین، مشابه با تحقیق حاضر، اثر ضدافسردگی مشتقی از زانتون در دوزهای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت داخل‌صفاقی، با کاهش زمان بی‌حرکتی در FST در موش‌های آزمایشگاهی که مهار‌کننده تریپتوفان‌هیدروکسیلاز دریافت کرده بودند، نشان داده شده است (۳۹).

درحالیکه، ترکیبات مورد بررسی ما نیز توانستند به طور معنی‌داری رفتار شبه‌افسردگی را در موش‌های آزمایشگاهی پارکینسونی کاهش دهند که با کاهش مدت زمان بی‌حرکتی در FST مشخص می‌شود.

قابل ذکر است که در مطالعات بالینی نیز، مصرف روزانه نوشیدنی منگوستین به مدت ۳۰ روز حتی در بالغین سالم ظرفیت آنتی‌اکسیدانی جریان خون را به طور قابل‌ملاحظه افزایش داده و مارکرهای التهابی مانند پروتئین واکنشگر C (CRP) را به میزان ٤٦ درصد کاهش داده است (۳۸)، و زانتون‌های آلفا- و گاما-منگوستین (۱۰ یا ۳۰ میلی‌مول/لیتر) از طریق خصوصیات ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی خودشان بیان ژن PPARγ ناشی از LPS و بیان ژن‌های التهابی مانند TNF-α، IL-6، پروتئین القایی ۱۰- INF-γ را در کشت سلول‌های انسانی کاهش دادند (۲۵).

همچنان که در تحقیق ما ٦-هیدروکسی‌فلاون توانست اثر حفاظت‌کننده عصبی در موش‌های آزمایشگاهی پارکینسونی دریافت کننده ٦-هیدروکسی دوپامین داشته باشد، مشاهده شده است که تیمار یک فلاون مرکبات به نام Tangeretin، به مدت ۲۸ روز به صورت خوراکی در دوز ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، تمامیت و عملکرد جسم سیاه را در موش‌های صحرایی پارکینسونی متعاقب آسیب با ٦-هیدروکسی دوپامین، حفظ کرده است که نشان می‌دهد این فلاونوئید احتمالاً از مایع مغزی-نخاعی عبور می کند، و ممکن است به عنوان عاملی بالقوه در حفاظت عصبی در مقابل پاتولوژی زیربنایی مرتبط با بیماری پارکینسون عمل نماید (۳۲).

به‌طور مشابه، همچنین اثر ۷-هیدروکسی‌فلاون (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) خوراکی در بیماری پارکینسون القاء شده توسط رزرپین (۵ میلی‌گرم/کیلو‌گرم) در موش‌های آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج نشان داده که ۷-هیدروکسی‌فلاون به طور معنی‌داری کاتالاز، SOD و سطح گلوتاتیون را افزایش داده و MDA را کاهش داده است و به صورت وابسته به دوز فعالیت حرکتی کلی و هماهنگی ماهیچه‌ای را در تست روتارود بهبود بخشیده است. همچنین، کاهش اسکورهای کاتالپتیک را در تست میله موجب شده است که مشابه با نتایج ما از تست‌های سنجش اختلال حرکتی هستند که ٦-هیدروکسی‌فلاون توانست تعداد چرخش‌های ناشی از آپومورفین و بی‌حرکتی کاتالپسی را به طور قابل‌توجهی کاهش دهد (۳۱).

به‌طور مشابه، چندین فلاونوئید از پیشرفت AD جلوگیری کرده‌اند که این اثرات حفاظت‌کنندگی عصبی آنها به توانایی‌شان در جلوگیری از نقص‌های

شناختی در بسیاری مدل‌های جانوری طبیعی یا ترنس ژن ربط داده شده است (۱).

فلاونوئیدها شروع و پیشرفت نشانه‌های پاتولوژیکی مشابه AD را کند کرده و اختلالات مرتبط تحلیل‌برنده عصبی را بهبود بخشیده‌اند و مکانیسم‌های ممکن شامل مهار آپوپتوز نورونی القاء شده با التهاب عصبی و استرس اکسیداتیو بوده‌اند (۱۸).

مشابه با تحقیق حاضر، اثر ضداضطرابی ٦-هیدروکسی‌فلاون، به صورت خوراکی (۲۵ میلی‌گرم/ کیلوگرم)، در تست EPM در موش‌های آزمایشگاهی نشان داده شده است که با افزایش درصد مدت زمان و تعداد ورود به بازوهای باز مشخص شده است. قابل ذکر است که گیرنده های $GABA_A$ پیشنهاد شده که مستقیماً در این اثر حفاظت‌کننده عصبی نقش دارند (۳۵).

نتیجه‌گیری

تزریق ٦-هیدروکسی دوپامین باعث ایجاد استرس اکسیداتیو شد و با حذف ورودی‌های دوپامینی مدل پارکینسونی با اختلال حافظه به‌وجود آورد. همچنین، التهاب عصبی ایجاد شد که موجب فعال شدن میکروگلیا که ویژگی اصلی التهاب عصبی است، می شود که سایتوکین‌های پیش‌التهابی را آزاد می‌کند و مرگ پیشرونده سلول‌های عصبی در جسم‌سیاه روی می‌دهد. درنهایت، تغییرات رفتاری، بیوشیمیایی و پاتولوژیکی که مشخصه بیماری پارکینسون هستند مشاهده گردیدند، و به دنبال آن حرکات مزاحم مانند رفتارهای چرخشی در حیوانات مدل پارکینسونی ایجاد شد که این علائم نشان‌دهنده مدل پیشرفته بیماری است که با اختلالات حرکتی همراه می‌باشد. از طرف دیگر، زانتون و ٦-هیدروکسی‌فلاون توانستند اختلال حرکتی (چرخش) و کاتالپسی ناشی از عدم تعادل در آزاد شدن دوپامین در دو نیمکره مغز را بهبود بخشند. همچنین، زانتون توانست رفتار شبه افسردگی را در تست شنای اجباری کاهش دهد. به‌علاوه، تعداد سلول‌های عصبی جسم‌سیاه را افزایش داد. احتمالا این اثرات حفاظت‌کننده مرکزی به وسیله اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی میانجی می‌شوند که با کاهش رادیکال‌های آزاد و سایتوکین‌های پیش‌التهابی از مرگ سلول های عصبی جلوگیری می‌کنند و درنتیجه اختلالات شناختی و حرکتی را بهبود می‌بخشند. هرچند، باید بررسی‌های بیشتری انجام‌گیرد تا سطح آنزیم‌های آنتی‌کسیدانی و اکسیدانی و همچنین سطوح فاکتورهای پیش‌التهابی و ضدالتهابی را مورد سنجش قرار دهند، تا این مکانیسم‌های پیشنهادی را که برای حفاظت عصبی تیمار زانتون و ٦-هیدروکسی‌فلاون در این مدل پارکینسونی ارائه شده روشن نمایند.

منابع

1. Attari M., Jamaloo F., Shadvar S., Fakhraei N., Dehpour A.R. 2016. Effect of *Withania somnifera* dunal root extract on behavioral despair model in mice: a possible role for nitric oxide. *Acta Medica Iranica*, 54(3):165-172.

2. Bumrungpert A., Kalpravidh R.W., Chuang C.C., Overman A., Martinez K., Kennedy A., McIntosh M. 2010. Xanthones from mangosteen inhibit inflammation in human macrophages and in human adipocytes exposed to macrophage-conditioned media. *The Journal of Nutrition*, 140(4):842-847.

3. Catorce M.N., Acero G., Pedraza-Chaverri J., Fragoso G., Govezensky T., Gevorkian G. 2016. Alpha-mangostin attenuates brain inflammation induced by peripheral lipopolysaccharide administration in C57BL/6J mice. *Journal of Neuroimmunology*, 297:20-27.

4. Chin Y.W., Jung H.A., Chai H., Keller W.J., Kinghorn A.D. 2008. Xanthones with quinone reductase-inducing activity from the fruits of *Garcinia mangostana*

11. Khoshnoodi M., Fakhraei N., Dehpour A.R. 2015. Possible involvement of nitric oxide in antidepressant-like effect of silymarin in male mice. *Pharmaceutical Biology*, 53(5):739-745.

12. Liu Q., Li D., Wang A., Dong Z., Yin S., Zhang Q., Ye Y., Li L., Lin L. 2016. Nitric oxide inhibitory xanthones from the pericarps of *Garcinia mangostana. Phytochemistry*, 131:115-123.

13. Luo Y., Smith J.V., Paramasivam V., Burdick A., Curry K.J., Buford J.P., Khan I., Netzer W.J., Xu H., Butko P. 2002. Inhibition of amyloid-β aggregation and caspase-3 activation by the *Ginkgo biloba* extract EGb761. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(19):12197-12202.

14. Maciel R.M., Carvalho F.B., Olabiyi A.A., Schmatz R., Gutierres J.M., Stefanello N., Zanini D., Rosa M.M., Andrade C.M., Rubin M.A., Schetinger M.R. 2016. Neuroprotective effects of quercetin on memory and anxiogenic-like behavior in diabetic rats: Role of ectonucleotidases and acetylcholinesterase activities. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 84:559-568.

15. Macready A.L., Kennedy O.B., Ellis J.A., Williams C.M., Spencer J.P., Butler L.T. 2009. Flavonoids and cognitive function: a review of human randomized controlled trial studies and recommendations for future studies. *Genes and Nutrition*, 4(4):227-242.

16. Mahabusarakam W., Wiriyachitra P., Taylor W.C., 1987. Chemical constituents of *Garcinia mangostana*. *Journal of Natural Products*, 50(3):474-478.

17. Mahabusarakam W., Proudfoot J., Taylor W., Croft K. 2000. Inhibition of lipoprotein oxidation by prenylated xanthones derived from mangostin. *Free Radical Research*, 33(5):643-659.

18. Mishra M., Sonar P., Tripathi A., Saraf S., Verma S. 2020. Ligand and structure-based hybrid screening for anti-Parkinson (Mangosteen). *Phytochemistry*, 69(3):754-758.

5. Ferro M.M., Bellissimo M.I., Anselmo-Franci J.A., Angellucci M.E., Canteras N.S., Da Cunha C. 2005. Comparison of bilaterally 6-OHDA-and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: histological, neurochemical, motor and memory alterations. *Journal of Neuroscience Methods*, 148(1):78-87.

6. Ghaffari F., Moghaddam A.H., and Zare M. 2018. Neuroprotective effect of quercetin nanocrystal in a 6-hydroxydopamine model of parkinson disease: biochemical and behavioral evidence. *Basic and Clinical Neuroscience*, 9(5):317.

7. Gupta S.C., Tyagi A.K., Deshmukh-Taskar P., Hinojosa M., Prasad S., Aggarwal B.B. 2014. Downregulation of tumor necrosis factor and other proinflammatory biomarkers by polyphenols. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 559:91-99.

8. Haghdoost-Yazdi H., Sehatbakhsh S., Sophiabadi M., Dargahi T., Yaghubidust M.H., Piri H. 2016. Effect of potassium channel blocker Tetraethylammonium pretreatment on prevention of the 6-OHDA-induced chronic Parkinson's disease in rats. *The journal of Gazvin University of Medical Sciences*, 20(2):41-48.

9. Jenner P. 2003. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 53(S3):S26-S38.

10. Joseph J.A., Shukitt-Hale B., Denisova N.A., Bielinski D., Martin A., McEwen J.J., Bickford P.C. 1999. Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. *Journal of Neuroscience*, 19(18):8114-8121.

Pharmacology and Therapeutics, 137(1):1-21.

26. Prinssen E.P., Colpaert F.C., and Koek W. 2002. 5-HT1A receptor activation and anti-cataleptic effects: high-efficacy agonists maximally inhibit haloperidol-induced catalepsy. *European Journal of Pharmacology*, 453(2-3):217-221.

27. Ramassamy C. 2006. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *European Journal of Pharmacology*, 545(1):51-64.

28. Schober A. 2004. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell and Tissue Research*, 318(1):215-224.

29. Spencer J.P. 2010. The impact of fruit flavonoids on memory and cognition. *British Journal of Nutrition*, 104(S3):S40-S47.

30. Sriraksa N., Wattanathorn J., Muchimapura S., Tiamkao S., Brown K., Chaisiwamongkol K. 2012. Cognitive-enhancing effect of quercetin in a rat model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012:1-10

31. Suzuki O., Katsumata Y., Oya M., Chari V.M., Klapfenberger R., Wagner H., Hostettmann K., 1980. Inhibition of type A and type B monoamine oxidase by isogentisin and its 3-o-glucoside. *Planta Medica*, 39 (05):19-23.

32. Suzuki K., Okada K., Wakuda T., Shinmura C., Kameno Y., Iwata K., Takahashi T., Suda S., Matsuzaki H., Iwata Y., Hashimoto K., 2010. Destruction of dopaminergic neurons in the midbrain by 6-hydroxydopamine decreases hippocampal cell proliferation in rats: reversal by fluoxetine. *Plos one*, 5(2):e9260.

33. Tansey M.G. and Goldberg M.S., 2010. Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and agents and their pharmacological evaluation. *International Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 2(02):30-38.

19. Mousavi M.S., Riazi G., Imani A., Meknatkhah S., Fakhraei N., Pooyan S., Tofigh N. 2019. Comparative evaluation of adolescent repeated psychological or physical stress effects on adult cognitive performance, oxidative stress, and heart rate in female rats. *Stress*, 22(1):123-132.

20. Mura A., Feldon J. 2003. Spatial learning in rats is impaired after degeneration of the nigrostriatal dopaminergic system. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 18(8):860-871.

21. Paladini A.C., Marder M., Viola H., Wolfman C., Wasowski C., Medina J.H. 1999. Flavonoids and the central nervous system: from forgotten factors to potent anxiolytic compounds. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51(5):519-526.

22. Pedraza-Chaverri J., Cárdenas-Rodríguez N., Orozco-Ibarra M., Pérez-Rojas J.M. 2008. Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Food and Chemical Toxicology*, 46(10):3227-3239.

23. Pedraza-Chaverrí J,. Reyes-Fermín L.M., Nolasco-Amaya E.G., Orozco-Ibarra M., Medina-Campos O.N., González-Cuahutencos O., Rivero-Cruz I., Mata R. 2009. ROS scavenging capacity and neuroprotective effect of α-mangostin against 3-nitropropionic acid in cerebellar granule neurons. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 61(5):491-501.

24. Peres V., Nagem T.J., de Oliveira F.F. 2000. Tetraoxygenated naturally occurring xanthones. *Phytochemistry*, 55(7):683-710.

25. Pienaar I.S., Chinnery P.F. 2013. Existing and emerging mitochondrial-targeting therapies for altering Parkinson's disease severity and progression.

actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease. Free *Radical Biology and Medicine*, 52(1):35-45.

38. Xie Z., Sintara M., Chang T., Ou B. 2015. Daily consumption of a mangosteen-based drink improves in vivo antioxidant and anti-inflammatory biomarkers in healthy adults: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Food Science and Nutrition*, 3(4):342-348.

39. Youdim K.A., Joseph J.A. 2001. A possible emerging role of phytochemicals in improving age-related neurological dysfunctions: a multiplicity of effects. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(6):583-594.

40. Zhao B. 2009. Natural antioxidants protect neurons in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Neurochemical Research*, 34(4):630-638.

implications for therapeutic intervention. *Neurobiology of Disease*, 37(3):510-518.

34. Tiang N., Ahad M.A., Murugaiyah V., Hassan Z. 2020. Xanthone-enriched fraction of Garcinia mangostana and α-mangostin improve the spatial learning and memory of chronic cerebral hypoperfusion rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 72(11):1629-1644.

35. Ungerstedt U. 1971. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiologica Scandinavica*, 82(S367):69-93.

36. Weecharangsan W., Opanasopit P., Sukma M., Ngawhirunpat T., Sotanaphun U., Siripong P. 2006. Antioxidative and neuroprotective activities of extracts from the fruit hull of mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.). *Medical Principles and Practice*, 15(4):281-287.

37. Williams R.J., Spencer J.P. 2012. Flavonoids, cognition, and dementia:

The Neuroprotective Effect of Xanthone and 6-Hydroxyflavone in the Model of Parkinson's Disease Induced by 6-Hydroxydopamine in Laboratory Mice: Behavioral Evaluations

Mahshid Attari[1], Maryam Khosravi[1], Ramin Hajikhani[1], Maryam Bananaj[1], Jalal Solati[2]*

1- Department of Biology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Department of Biology, Karaj branch, Islamic Azad University, Alborz, Iran

Abstract

Oxidative stress and neuroinflammation play a role in Parkinson's disease. Antioxidants and anti-inflammatories such as polyphenol compounds and flavonoids inhibit neuronal death. The aim of the present study is the effect of xanthone and 6-hydroxyflavone in Parkinson's disease in laboratory mice. Animals are cannulated by stereotaxic surgery and unilateral injection of 6-hydroxy-dopamine is performed in the dense area of the substantia nigra (SNc) of the brain. Xanthone and 6-hydroxyflavone were injected intraperitoneally. Three weeks after surgery, movement evaluations and pseudo-anxiety and pseudo-depression behaviors were performed. Counting of all the neurons in the dense area of the substantia nigra was done. Injection of 6-hydroxydopamine increased the number of apomorphine rotations. Catalysis time increased. Neurons in the substantia nigra decreased. 6-Hydroxyflavone (50 and 100 mg/kg) and xanthone (100 and 200 mg/kg) reduced vertigo and catalepsy. In the elevated plus shape maze test, 6-hydroxyflavone in doses of 25 and 50 mg/kg and xanthone in doses of 50 and 100 mg/kg increased motor activity. In the forced swimming test, xanthone in doses of 50, 100 and 200 mg/kg reduced immobility in parkinsonian rats. The number of substantia nigra neurons increased with the treatment of 6-hydroxyflavone in doses of 50 and 100 mg/kg and 200 mg/kg xanthone. Xanthone and 6-hydroxyflavone improved movement disorder and catalepsy and increased the number of nerve cells in the substantia nigra. Xanthon was able to reduce depression. Probably, part of these central protective effects are mediated by the antioxidant and anti-inflammatory effects of xanthone and 6-hydroxyflavone, which prevent cell death by reducing free radicals and inflammatory cytokines, and as a result, they improve cognitive and movement disorders.

Keywords: Parkinson's Disease, 6-Hydroxcy Dopamine, Xanthone, 6-Hydroxyflovane, Laboratory Mouse.