Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2015; 18(99): 33-41

The Effects of Melatonin with Memantin on MPTP-Induced Parkinson Model in Male Mice

Reza Talebi[1], Abbas Alimoradian[2*], Mehdi Sadegh[3]

1- Department of Anatomy, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
2- Department of Pharmacology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
3- Department of Physiology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

Received: 26 Jan 2015, Accepted: 6 May 2015

Abstract

Background: Oxidative stress and severe neuro-excitation have significant effects on pathogenesis of Parkinson's disease and agents with antioxidant property can potentially prevent these effects. Herein we examined potential protective effects of melatonin as an antioxidant agent and memantine as an uncompetitive receptor of NMDA, on a model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP).

Materials and Methods: Male mice were divided into 8 groups with 7 mice in each group: saline, ethanol, melatonin, memantin, MPTP, melatonin+MPTP, memantin+ MPTP, melatonin+ memantin+ MPTP. All of agents were injected intraperitoneally once a day for 14 days before beam traversal test. Dopaminergic neurons of the Substantia Nigra Pars compacta (SNPC) were determined by immunohistochemical and were counted.

Results: Melatonin improved notably movement dysfunction resulted of MPTP such as the number of errors, paces and the time of movement during behavioral test and also the counting of neurons of Substantia Nigra Pars Compacta. Memantin had a synergic effect on the most of improvements. However, the level of improvement and retrieval of signs was not as in saline and ethanol groups.

Conclusion: Melatonin especially together with memantine is able to prevent some of the MPTP-induced dysfunctions. However, the protective effects were not enogh, probably because of the amount of dose and the time of injection.

Keywords: Beam traversal test, Immunohistochemical, Parkinson, Melatonin, Memantin

*Corresponding Author:
Address: Department of Pharmacology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
Email: Dr.alimoradian@arakmu.ac.ir

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۱۸، شماره ۶ (شماره پیاپی ۹۹)، شهریور ۱۳۹۴، ۴۱-۳۳

اثرات ملاتونین و ممانتین بر روی مدل پارکینسون القا شده با MPTP در موش‌های سوری نر

رضا طالبی[۱]، عباس علیمرادیان[۲*]، مهدی صادق[۳]

۱- مربی، گروه آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۲- استادیار، گروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۳- استادیار، گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۶ تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۱۶

چکیده

زمینه و هدف: استرس اکسیداتیو و تحریکات شدید عصبی اثرات معناداری برروی پاتوژنز بیماری پارکینسون دارند و مواد با خاصیت آنتی اکسیدانتی می‌توانند به صورت بالقوه مانع از این اثرات شوند. در این تحقیق اثرات حفاظتی بالقوه ملاتونین به عنوان آنتی‌اکسیدانت و ممانتین به عنوان گیرنده غیررقابتی گلوتامات در یک مدل پارکینسون القا شده با ۱-متیل-۴-فنیل، ۱ و ۲و ۳و ۶- تتراهیدروپیریدین (MPTP) بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: موش‌های سوری نر به ۸ گروه ۷ تایی تقسیم شدند که عبارت بودند از: سالین، اتانول، ملاتونین، ممانتین، MPTP، ملاتونین+ MPTP، ممانتین+ MPTP، ملاتونین+ ممانتین+ MPTP . کلیه این مواد ۱۴ روز پیش از آزمون رفتاری پیمایش با اشعه، یک با در روز به صورت داخل صفاقی تزریق شدند. نورون‌های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه به کمک تکنیک ایمنوهیستوشیمی مشخص و شمارش گردیدند.

یافته‌ها: ملاتونین، اختلالات حرکتی ناشی از MPTP هم‌چون تعداد خطا، گام، مدت زمان حرکت حین آزمون رفتاری و نیز شمارش نورونی اجسام سیاه را به طور چشم‌گیر بهبود بخشید. ممانتین بر روی بیشتر این اصلاحات ناشی از ملاتونین اثر هم افزایی داشت. با وجود این، میزان بهبود و برگشت علائم ناشی از این عوامل به میزان گروه‌های سالین و اتانول نبود.

نتیجه‌گیری: ملاتونین به خصوص به همراه ممانتین توانست از برخی اختلالات ناشی از MPTP جلوگیری کند. البته این اثرات محافظتی چندان کافی نبود که علت این امر احتمالا دوز یا مدت زمان تجویز است.

واژگان کلیدی: آزمون پیمایش با اشعه، ایمنوهیستوشیمی، پارکینسون، ملاتونین، ممانتین

* **نویسنده مسئول:** اراک، دانشگاه علوم پزشکی اراک، گروه فارماکولوژی

Email: Dr.alimoradian@arakmu.ac.ir

مقدمه

بیش از یک میلیون نفر در ایالات متحده از بیماری پارکینسون رنج می‌برند. برخی عوامل از جمله زمینه ژنتیکی و قرار گرفتن در معرض سموم (داخل بدن یا خارج بدن) بیشترین نقش را در بروز آن دارند. هم‌چنین بروز سالیانه آن ارتباط مستقیمی با افزایش سن دارد(۱). بیماری پارکینسون با تخریب پیش‌رونده و تدریجی اعصاب دوپامینرژیک ناحیه اجسام سیاه SubstantiaNigra Pars Compacta (SNpc) مشخص می‌شود(۲). در این بخش اکسیداسیون خود به خودی دوپامین به واسطه آنزیم مونوآمینواکسیداز (MAO)، استرس-اکسیداتیو و تولید رادیکال‌های آزاد به میزان زیاد رخ می‌دهد. چندین مولکول آنتی اکسیدانت هم‌چون گلوتاتیون در این بخش وجود دارد که آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد را کاهش می‌دهد، ولی در بیماری پارکینسون این عوامل محافظتی کارایی کافی را از دست داده‌اند. بنابراین، آسیب سلولی ناشی از استرس-اکسیداتیو به عنوان یک علت پاتولوژیک برای بیماری پارکینسون مطرح می‌باشد(۱، ۳).

فعالیت دراز مدت گیرنده گلوتاماتی ان-میتل-دی- اسپارتات (NMDA) منجر به مرگ نورونی می‌شود. بنابراین به نظر می‌رسد که ممانتین به عنوان یک آنتاگونیست غیررقابتی گیرنده NMDA بتواند یک محافظت نورونی را فراهم سازد(۴، ۵). هم‌چنین ملاتونین به عنوان هورمون غده پینه آل رشد و نمو نورون‌های دوپامینرژیک را تنظیم می‌کند و این در حالتی است که گیرنده‌های نوع ۱ ملاتونین (MT1) در ناحیه اجسام سیاه بیان می‌شوند. ملاتونین می‌تواند رادیکال‌های آزاد را به دام اندازد و از نشت الکترون از زنجیره انتقال الکترونی میتوکندری جلوگیری کند که بدین وسیله منجر به کاهش تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود. هم‌چنین به عنوان یک آنتی اکسیدانت قوی در دوزهای فارماکولوژیک، اثرات محافظتی نورونی خود را در مدل‌های مختلف تخریب نورونی هم‌چون پارکینسون اعمال کرده است(۶، ۷).

استفاده از L-DOPA منجر به آسیب دراز مدت اکسیداتیو و تخریب میتوکندری ناشی از متابولیسم دوپامین می‌شود. بنابراین استفاده از آنتی اکسیدانت‌ها به عنوان یک درمان جانبی در کنار روش‌های مرسوم درمانی پارکینسون می‌تواند کمک کننده باشد(۷). به دلیل اهمیت تحریک شدید و سمی اکسیداتیو نورونی در پاتوژنز بیماری پارکینسون(۷)، مقایسه کارایی عواملی با خاصیت بالقوه آنتی اکسیدانتی می‌تواند مفید بوده و درمانی برای بیماری باشد. تجویز ترکیب MPTP منجر به تخریب نورون‌های دوپامینرژیک اجسام سیاه هسته‌های قاعده ای شده که با در نظر گرفتن فرضیه استرس-اکسیداتیو به عنوان یک مدل حیوانی برای بیماری پارکینسون می‌شود(۱، ۸). بنابراین در پژوهش فعلی، اثرات ملاتونین و ممانتین در مدل پارکینسون القا شده با MPTP از طریق آزمون‌هایtraditional beam و challenging beam بررسی شدند. هم‌چنین اثرات آن‌ها برروی بیومارکرهای مرگ سلولی (آپوپتوزیس) و تیروزین هیدروکسیلاز (به عنوان آنزیم محدود کننده میزان سنتز دوپامین) به کمک تکنیک ایمنوهیستوشیمی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

حیوانات: موش‌های سوری (۲۵ تا۳۲ گرم) در شرایط ۱۲ساعته روشنایی-تاریکی و با شرایط دسترسی آزاد به آب و غذا مورد آزمایش قرار گرفتند. مطابق دستورالعمل استفاده از حیوانات آزمایشگاهی (مطبوعات آکادمی ملی، واشنگتن، 2070,D.C) همه گونه تلاشی برای کاهش آزار و تعداد حیوانات مورد استفاده صورت گرفت.

مواد: ملاتونین (سیگما، آمریکا) حل شده در اتانول ۱۰ درصد، MPTP HCl (سیگما، آمریکا) حل شده در نرمال سالین (سدیم کلراید ۰/۹ درصد)، ممانتین (داروسازی اسوه، ایران) حل شده در نرمال سالین، کتامین (روتکس مدیا، آلمان)، زایلازین (آلفاساین، هلند)، پارافرمالدئید (مرک، آلمان)، سرم آلبومین گاوی (BSA) (سیگما، آمریکا)، آنتی بادی منوکلونال نیروزین

هیدروکسیلاز (سیگما، آمریکا)، آنتی بادی Goat IgG+IgM+IgA، HRP (سیگما، آمریکا)، ´3.3- دی آمینوبنزایدین، DAB (سیگما، آمریکا)، رقیق کننده (سیگما، آمریکا)، هماتوکسیلین، پتاسیم کلراید، مونو و دی سدیم فسفات، گزیلن، اسید استیک، هیدروژن پراکساید، بافر تریس، هیدروکلریک اسید (مرک، آلمان).

گروه‌های مورد آزمایش: موش‌ها به صورت زیر به ۸ گروه (۷ موش در هر گروه) تقسیم شدند:

نرمال سالین، اتانول ۱۰ درصد، ملاتونین (۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم)، ممانتین (۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم)، MPTP (۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم)، ملاتونین + MPTP، ممانتین + MPTP، ملاتونین+ ممانتین+ MPTP. این عوامل روزانه به مدت ۱۴ روز پیش از آزمون رفتاری به روش داخل صفاقی به حیوان تزریق شدند. آزمون رفتاری ۲۴ ساعت پس از آخرین تزریق انجام شد.

آزمون رفتاری: اختلالات در حرکت و در مسیر نیگرواستریاتال با استفاده از هردو آزمون‌های پیمایش با اشعه به صور traditional و challenging انجام می‌شود(۹، ۱۰). در آزمون Challenging Beam Traversal، موش ۴ بار در روز آموزش می‌بیند، به نحوی که از میله‌ای که انتهای آن به قفسه حیوان منتهی می‌گردد و عرض آن در طول مسیر کم می‌شود، عبور می‌کند. اختلالات حرکتی با افزایش تعداد لغزش و خطای گام ها در حین حرکت از طریق میله مرتبط است. حرکات حیوان در طول همه‌ی آزمون‌ها فیلم برداری شد(۱۱). حداکثر خطای هر حیوان در هر مرحله، ۴ خطا بود. میانگین تعدادکل لغزش‌ها در ۳ آزمون برای هر حیوان ثبت شد(۱۲، ۱۳). در آزمون traditional beam traversal ، قطر میله چوبی ثابت بود (۳/۵ سانتی‌گراد)، در حالی که در وضعیت challenging beam، این قطر به تدریج از ۳/۵ به ۰/۵ سانتی متر کاهش می‌یافت. میانگین تعداد خطاهای گام‌ها، تعدادکل گام‌ها و مدت زمان عبور از میله ثبت برای آنالیز در نظر گرفته شد.

بافت شناسی: موش‌ها ۲۴ ساعت پس از آخرین آزمایش، با کتامین (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی گرم بر کیلوگرم) بی‌هوش شدند. پرفیوژن قلبی با سالین هپارینیزه و به دنبال آن با پارافرمالدئید ۴ درصد در بافر فسفات سدیم به عنوان محلول فیکس کننده انجام شد. مغز برداشته شد و در فرمالین ۴ درصد نگهداری گردید. سپس بلوک‌های پارافینی تهیه گشت و برش‌گیری کرونالی سریالی ۵ میکرون به کمک میکروتوم انجام شد و برش‌هایی از ناحیه اجسام سیاه مطابق با اطلس پاکسینوس موش فراهم گردید.

رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی: هویت نورون‌های دوپامینرژیک اجسام سیاه به کمک ایمنوهیستوشیمی مشخص شد. پارافین برداشته شد و آب دهی با گزیلن و حمام اتانول انجام گرفت. اسلایدها در متانول/پراکسید هیدروژن ۱۰ درصد انکوبه شدند. سپس برش‌ها با بافر تریس (H2NC (CH2OH) 3, pH 7.4) شسته و به مدت ۱۱ دقیقه در بافر سیترات (C6H5Na3O7.2H2O, pH 6) و در اتوکلاو نگهداری شدند. مراحل بعدی شامل پیش انکوباسیون نمونه‌ها با سرم آلبومین گاوی برای ۱۰ دقیقه و انکوباسیون با آنتی بادی اولیه (آنتی بادی تیروزین هیدروکسیلاز) برای ۱ ساعت مراحل بعدی هستند. شستن با بافر تریس و انکوباسیون با آنتی بادی ثانویه در مرحله بعدی انجام می‌شود. برای مشاهده اتصال آنتی‌بادی، برش‌ها برای ۱۰ دقیقه با DAB واکنش داده و در بافر تریس (pH=7.4) شسته شدند و رنگ آمیزی متقابل از طریق فرورفتن در هماتوکسیلین برای ۱۰ دقیقه، انجام شد. سپس برش‌ها به مدت ۳ دقیقه با آب جاری شسته شده، به کمک الکل‌هایی با درصد صعودی دهیدراته شدند و با گزیلول پاک شدند و سپس اسلایدی جهت مطالعه میکروسکوپی تهیه شد. در گروه کنترل منفی، به جز عدم استفاده از آنتی بادی اولیه، برش‌ها همانند روش بالا آماده شدند.

مطالعات مورفولوژی: پس از رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی، تعداد نورون‌های دوپامینرژیک اجسام سیاه شمارش شد. برش‌ها با مختصات ۵۰×۳۰۰×۳۰۰ و بزرگ‌نمایی ۲۰ برابر و نرم افزار «ایمیج جی» تحلیل شدند. تنها سلول‌هایی با هسته‌های مشخص شمارش شدند.

تحلیل آماری: پس از بررسی توزیع نرمال داده‌ها، آزمون آنووای یک طرفه و تست توکی جهت مقایسه داده‌ها از گروه‌های مختلف انجام شد. همه‌ی داده‌ها به صورت میانگین ±انحراف معیار بیان شدند. سطح معنی‌داری برابر با p<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

آزمون Traditional beam traversal

جدول ۱ مقادیر میانگین و انحراف معیار زمان گذر از میله، تعداد کل گام‌ها و تعداد خطاها در گام برداشتن را در حین آزمون traditional beam traversal نشان می‌دهد. آنالیز آنووای یک طرفه و تست توکی جهت ارزیابی معنی‌دار بودن اختلافات این شاخص‌ها بین گروه‌ها به کار رفت. بر طبق جدول ۱، تزریق MPTP به تنهایی به طور معنی‌داری موجب ایجاد اختلالات حرکتی نسبت به گروه سالین شد. زمان گذر از میله، تعداد کل گام‌ها و خطا در گام‌ها به ترتیب بدین صورت به دست آمد: (سالین: ۱/۸ + ۱۷/۶، MPTP: ۱۰/۲ + ۱۹۴/۲، p<۰/۰۰۱)، (سالین: ۲/۷ + ۴۹/۶، MPTP: ۶/۳ + ۱۲۰/۶، p<۰/۰۰۱) و (سالین: ۰/۱+ ۱، MPTP: ۰/۱ + ۳/۲، p<۰/۰۰۱).

تجویز هم‌زمان ممانتین با MPTP، اختلالات حرکتی القا شده با MPTP را بهبود نبخشید، با این وجود، تجویز ملاتونین به همراه MPTP زمان گذر از میله را به میزان مشخصی کاهش داد (ملاتونین + MPTP: ۹/۱ + ۶۲/۲، MPTP: ۱۰/۲ + ۱۹۴/۲، p<۰/۰۱) که این امر نشان دهنده بهبود اختلالات حرکتی بود، هرچند که تعداد کل گام ها و خطاهای آن‌ها تغییر معنی‌داری را نشان نداد(جدول ۱). هم‌چنین تجویز هم‌زمان ملاتونین و ممانتین به همراه MPTP اثرات بهتری را نسبت به ملاتونین به تنهایی ایجاد کرد، به نحوی که زمان گذر از میله (ممانتین + ملاتونین + MPTP: ۱۵/۶ + ۸۲/۷، MPTP: ۱۰/۲ + ۱۹۴/۲، p<۰/۰۱) و نیز تعداد خطای گام‌ها (ممانتین + ملاتونین + MPTP: ۰/۲ + ۲/۲، MPTP: ۰/۱ + ۱/۲، p<۰/۰۵) در مقایسه با گروه MPTP کاهش یافت(جدول ۱).

جدول ۱. آزمون Traditional beam traversal

گروه های مورد آزمایش	زمان گذر از میله	تعداد کل گام ها	تعداد خطا در گام ها
سالین	۱۷/۶+۱/۸	۴۹/۶+۲/۷	۱+۰/۱
اتانول	۲۰/۶+۲/۴	۵۸/۲+۵/۲	۲/۲+۰/۳
ممانتین	۲۸+۵/۲	۶۱/۸+۸/۸	۱/۹+۰/۳
ملاتونین	۴۶/۸+۷/۸	۸۶/۳+۹/۶	۱/۵+۰/۲
MPTP	۱۹۴/۲+۱۰/۲***	***۱۲۰/۶+۶/۳	**۳/۲+۰/۱
ممانتین+ MPTP	۱۷۵/۷+۹/۳	۱۱۹/۹+۲/۶	۳/۵+۰/۱
ملاتونین+ MPTP	##۶۲/۲+۹/۱	۱۰۰+۱۲/۵	۳+۰/۲
ملاتونین+ممانتین+MPTP	$$۸۲/۷+۱۵/۶	۹۱/۸+۱۱/۵	$۲ /۲+۰/۲

سه پارامتر در طول آزمون traditional beam traversal بررسی شده‌اند. اختلافات معنی‌دار بین گروه MPTP و سالین به صورت ** (p<۰/۰۱) و *** (p<۰/۰۰۱) نشان داده شده است. گروه ملاتونین + MPTP یک اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با گروه MPTP نشان داد ## (p<۰/۰۱). هم‌چنین اختلاف معنی‌دار بین گروه ملاتونین+ ممانتین+ MPTP و گروه MPTP به صورت $(p<۰/۰۵) و $$ (p<۰/۰۱) نشان داده شده است.

آزمون Challenging beam traversal

جدول ۲ مقادیر میانگین و انحراف معیار زمان گذر از میله، تعداد کل گام‌ها و تعداد خطا در گام برداشتن را در حین آزمون challenging beam traversal نشان می‌دهد. آزمون آنووای یک طرفه و تست توکی جهت ارزیابی معنی‌دار بودن اختلافات این شاخص‌ها بین گروه‌ها به کار رفت. بر طبق جدول ۲، تزریق MPTP به تنهایی به طور معنی‌داری منجربه ایجاد اختلالات حرکتی نسبت به گروه سالین شد؛ زمان گذر از میله، تعداد کل گام‌ها و خطا در گام به ترتیب بدین صورت به دست آمد: (سالین: ۲/۳ + ۲۳/۵، MPTP: ۱۶/۹ + ۱۸۴/۵ ، p<۰/۰۰۱)، (سالین: ۴/۵ + ۶۱/۶، MPTP: ۸ + ۱۰۸/۲، p<۰/۰۵) و (سالین: ۰/۴+ ۲، MPTP: ۰/۲ + ۴/۴ ، p<۰/۰۱).

تجویز هم‌زمان ممانتین با MPTP، اختلالات حرکتی القا شده با MPTP را بهبود نبخشید. با این وجود، تجویز ملاتونین به همراه MPTP زمان گذر از میله (ملاتونین + MPTP: ۶/۱ + ۱۱۵، MPTP: ۱۶/۹ + ۱۸۴/۵، p<۰/۰۱) و تعداد خطا در گام‌ها (ملاتونین + MPTP: ۰/۲ + ۳، MPTP: ۰/۲ + ۴/۴، p<۰/۰۵) را به میزان مشخصی کاهش داد که این امر نشان دهنده بهبود اختلالات حرکتی است، هرچند که تعداد کل گام‌ها تغییر معنی‌داری را نشان نداد(جدول ۲). هم‌چنین تجویز هم‌زمان ملاتونین و ممانتین به همراه MPTP کارایی بهتری را نسبت به ملاتونین تنها نشان داد، به نحوی که زمان‌گذر از میله (ممانتین + ملاتونین + MPTP: ۱۵/۶ + ۸۲/۷، MPTP: ۱۶/۹ + ۱۸۴/۵، p<۰/۰۱) و تعداد خطای گام‌ها (ممانتین + ملاتونین + MPTP: ۰/۲ + ۲/۶، MPTP: ۰/۲ + ۴/۴، p<۰/۰۵) در مقایسه با گروه MPTP کاهش یافت(جدول ۲).

جدول ۲. آزمون Challenging beam traversal

گروه های مورد آزمایش	زمان گذر از میله	تعداد کل گام ها	تعداد خطا در گام ها
سالین	۲۳/۵+۲/۳	۶۱/۶+۴/۵	۲+۰/۴
اتانول	۳۶/۳+۱۰/۳	۶۴/۶+۷/۷	۲/۷+۰/۲
ممانتین	۵۲/۷+۸/۹	۱۰۰/۷+۱۰/۲	۲/۶+۰/۲
ملاتونین	۶۸/۶+۱۰/۸	۱۰۹+۱۲/۷	۲/۲+۰/۱
MPTP	۱۸۴/۵+۱۶/۹***	۱۰۸/۲+۸	**۴/۴+۰/۲
ممانتین+MPTP	۱۶۱/۱+۹/۹	۱۲۷+۵/۲	۴ +۰/۱
ملاتونین+ MPTP	##۱۱۵+۶/۱	۱۰۹/۳+۳/۸	#۳+۰/۲
ملاتونین+ممانتین+ PTP	$$۸۲/۷+۱۵/۹	۱۰۷/۴+۱۰/۶	$$۲ /۶+۰/۲

سه پارامتر در طول آزمون challenging beam traversal بررسی شده‌اند. اختلافات معنی‌دار بین گروه MPTP و سالین به صورت ** (p<۰/۰۱) و *** (p<۰/۰۰۱) نشان داده شده است. گروه ملاتونین + MPTP یک اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با گروه MPTP نشان داد ## (p<۰/۰۵). هم‌چنین اختلاف معنی‌دار بین گروه ملاتونین+ ممانتین+ MPTP و گروه MPTP به صورت $$ (p<۰/۰۱) نشان داده شده است.

مطالعات ایمنوهیستوشیمی

جدول ۳ مقادیر میانگین و انحراف معیار مربوط به شمارش نورونی دوپامینرژیک در بخش اجسام سیاه را نشان می‌دهد. آزمون آنووای یک طرفه و تست توکی نشان داد که اختلافات معنی‌داری در شمارش نورونی بین گروه‌های سالین (۲/۵ + ۵۸/۵) و MPTP (۲۱+۱)(p<۰/۰۱) وجود دارد. به علاوه تزریق ملاتونین به همراه MPTP منجر به افزایش چشم‌گیر تعداد شمارش نورونی در مقایسه با MPTP به تنهایی می‌شود (ملاتونین+ MPTP: ۲/۵ + ۳۵/۵، MPTP: ۱ + ۲۱، p<۰/۰۵). با وجود این، تزریق ممانتین به همراه MPTP اثرات معنی‌داری ایجاد نکرد. تزریق هم‌زمان ملاتونین و ممانتین به همراه MPTP کارایی بیشتری را نشان داد و افزایش قابل ملاحظه‌ای در تعداد شمارش نورونی مشاهده شد (ممانتین+ ملاتونین + MPTP: ۱ + ۳۹، MPTP: ۱ + ۲۱، p<۰/۰۵) (جدول ۳).

جدول ۳. رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی

گروه های مورد آزمایش	شمارش نورونی
سالین	۵۸/۵+۲/۵
اتانول	۶۰/۵+۲/۵
ممانتین	۵۷/۵+۳/۵
ملاتونین	۵۸+۳
MPTP	**۲۱+۱
ممانتین+ MPTP	۲۶/۵+۱/۵
ملاتونین + MPTP	#۳۵/۵+۲/۵
ملاتونین+ ممانتین+ MPTP	$ ۳۹+۱

شمارش نورونی دوپامینرژیک دربرش‌های ناحیه‌ی اجسام سیاه گروه‌های مورد آزمایش انجام شده است. داده‌ها به صورت میانگین±انحراف معیار و p<۰/۰۵ برای معنی‌دار بودن در نظر گرفته شده است. میزان از دست رفتن معنی‌دار نورونی در گروه MPTP در مقایسه با گروه سالین به صورت ** و (p<۰/۰۱) نشان داده شده است. هم‌چنین گروه ملاتونین + MPTP و ملاتونین+ممانتین+ MPTP در مقایسه با گروه MPTP بهبود معنی‌داری را نشان دادند # (p<۰/۰۵) و $ (p<۰/۰۵).

بحث

پژوهش حاضر به منظور بررسی توانایی آنتی‌اکسیدانتی ملاتونین و ممانتین برروی اختلالات حرکتی

و ازدست رفتن نورون‌های هسته سیاه القا شده با MPTP به عنوان یک مدل برای بیماری پارکینسون انجام شد. نتایج موید اثرات مخرب نورونی MPTP در هسته‌های اجسام سیاه از طریق ایجاد اختلالات حرکتی بود. تجویز ملاتونین موجب ایجاد اثرات محافظتی نورونی شد و توانست اثرات ایجاد شده از طریق MPTP را اعاده کند که البته تأثیر آن با تجویز هم‌زمان با ممانتین مشخص تر می‌شد.

مطالعات پیشین، تاثیر MPTP را به عنوان مدلی برای بیماری پارکینسون تایید کرده‌اند. ماده‌ی MPTP می‌تواند به واسطه‌ی آنزیم منوآمینواکسیداز-B (MAO-B) به یون ۱-متیل-۴-فنیل پریدینیوم (MPP+) تبدیل شود. این ماده در داخل نورون‌های دوپامینرژیک تجمع پیدا کرده و کمپلکس میتوکندریال زنجیره انتقال الکترونی را مهار می‌کند و بدین صورت موجب افزایش گونه‌های رادیکال آزاد درون سلولی می‌شود که منجر به مرگ سلولی می‌گردد(۱، ۸). هر دو آزمون traditional و challenging traversal beam برای ارزیابی تغییرات فعالیت حرکتی القا شده با MPTP استفاده شد. نتایج آن‌ها موید گزارشات پیشین بود.

نتایج حاصل از آزمایشات رفتاری نشان داد که ملاتونین توانایی برگشت دادن برخی از اختلالات حرکتی القا شده با MPTP را دارا می‌باشد. این اثرات ملاتونین در حین آزمون challenging beam در مقایسه با آزمون traditional traversal beam واضح‌تر بود. به علاوه تجویز هم‌زمان ملاتونین و ممانتین یک اثر هم افزایی را در اعاده اختلالات حرکتی القا شده با MPTP نشان داد. با وجود این، تجویز تنهای ممانتین به همراه MPTP تاثیر مشخص و مثبتی را ایجاد نکرد.

ملاتونین (N-استیل-۵-متوکسی تریپتامین) به عنوان یک پپتید طبیعی دخیل در ریتم شبانه روزی پستانداران شناخته می‌شود(۱۵). ملاتونین هم‌چنین به عنوان یک ماده نگهدارنده و آنتی اکسیدانت قوی عمل می‌کند، به طوری که هم‌چون یک سد خونی- مغزی به آسانی از غشا سلول‌ها عبور می‌کند(۱۴، ۱۵). ملاتونین نقش ویژه‌ای در محافظت DNA هسته‌ای و میتوکندریایی دارد(۱۶) و یک روبنده مستقیم رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن است(۱۷). برخلاف سایر آنتی اکسیدانت‌های معمول، ملاتونین دارای خاصیت روبندگی آبشاری رادیکال‌های آزاد است و یک مولکول N-استیل-N-۲-فرمیل-۵-متوکسی-کینورامین به عنوان متابولیت آنتی‌اکسیدانتی ملاتونین می‌تواند تا ۱۰ جزء رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن را خنثی کند(۱۸). ملاتونین اثرات محافظتی قوی‌تری نسبت به ویتامین‌های ایی و سی در برابر اکسیداسیون دوپامین نشان داده است(۱۹). این شواهد می‌تواند کارایی ملاتونین را در برگشت اختلالات حرکتی ایجاد شده با MPTP توضیح دهد. مطالعات دیگر نیز حاکی از کارایی ملاتونین در کاهش بیماری پارکینسون است(۷، ۲۰).

شواهد حاکی است که ملاتونین می‌تواند فعالیت پیش-اکسیداتیو ساخت نیتریک اکساید را در برابر آسیب‌های اکسیداتیو مهارکند، از تخریب غشا جلوگیری نماید، ارتشاح سلول‌های چند هسته‌ای به بافت‌های آسیب دیده را مهار کند و اتصال گلبول‌های سفید به سلول‌های اندوتلیال را محدود نماید. هم‌چنین باعث افزایش جریان خون و کاهش ادم می‌شود(۲۰). گیرنده‌های ملاتونین واسطه‌ی این اثرات هستند(۲۱). گیرنده‌ی MT1 رفتارهای دوپامینرژیک را از طریق تحریک بیان گیرنده‌های D1 تنظیم می‌کند(۲۲). این مطالعات با نتایج حاضر مبنی بر این که ملاتونین می‌تواند تغییرات رفتاری القا شده با MPTP را اصلاح کند تطابق دارد.

ممانتین به عنوان یک آنتاگونیست غیررقابتی وابسته به ولتاژ گیرنده‌ی گلوتامات NMDA، می‌تواند با اتصال به این گیرنده و تمایل بیشتر نسبت به یون‌های منیزیم، ورود یون کلسیم را کاهش داده و تحریکات سمی نورونی را مهار کند(۲۳، ۲۴). البته در تحقیق فعلی در صورت تجویز ممانتین به تنهایی، اثر معنی‌داری از کارایی آن برای کاهش اختلالات حرکتی القا شده با MPTP دیده نشد. با این وجود، نتایج نشان داد که ممانتین می‌تواند اثرات سلولی و رفتاری ملاتونین را بهبود بخشد که این یافته منطبق با سایر

گزارشات مبنی بر اثرات محافظت نورونی ممانتین از طریق آگونیسم گیرنده‌ی D2 دوپامین است(۲۵، ۲۶). هم‌چنین توانایی ممانتین در مراحل پایانی بیماری پارکینسون(۲۶) به خصوص کارایی متوسط آن به عنوان درمان کمکی پارکینسون(۲۷) نشان داده شده است. با این وجود، کارایی ممانتین در بهبود علائم بیماری پارکینسون، مستقل از سامانه دوپامینرژیک است و بنابراین اثری برروی دیسکنزی القا شده با دارو ندارد(۲۸، ۲۹).

به طور خلاصه، تجویز ملاتونین کارایی و تاثیر بالقوه‌ای را در بهبود اختلالات حرکتی و از دست رفتن نورون در بیماری پارکینسون القا شده با MPTP نشان داد. هرچند داروی ممانتین نتوانست اثرات مفیدی در برگشت اختلالات القا شده با MPTP داشته باشد، ولی تجویز هم‌زمان آن با ملاتونین اثرات مثبت ملاتونین برروی اختلالات حرکتی را افزایش داد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی معاونت آموزشی-پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک در قالب طرح شماره‌ی ۵۸۷ اجرا شده است.

منابع

1. Chen JJ, nelson MV, Swope DM. Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach. 8th ed. New York: McGraw-Hill Medical. 2011.
2. McCorry LK. Essentials of human physiology for pharmacy: CRC Press; 2008.
3. Standaert DG, Young AB.Treatment of central nervous system degenerative disorders. In: Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC, editors. Goodman & Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics. 12th edition ed. New York: McGraw-Hill Medical. 2011. p. 549-68.
4. Danysz W, Parsons CG. The NMDA receptor antagonist memantine as a symptomatological and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease: preclinical evidence. International journal of geriatric psychiatry. 2003; 18:S23-S32.
5. Giustizieri M, Cucchiaroni ML, Guatteo E, Bernardi G, Mercuri NB, Berretta N. Memantine inhibits ATP-dependent K+ conductances in dopamine neurons of the rat substantia nigra pars compacta. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2007; 322(2):721-9.
6. Mehraein F, Talebi R, Jameie B, Joghataie MT, Madjd Z. Neuroprotective effect of exogenous melatonin on dopaminergic neurons of the substantia nigra in ovariectomized rats. Iranian biomedical journal. 2011; 15(1-2):44-5.
7. Mayo JC, Sainz RM, Tan D-X, Antolín I, Rodríguez C, Reiter RJ. Melatonin and Parkinson's disease. Endocrine. 2005; 27(2): 169-78.
8. Duty S, Jenner P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. British journal of pharmacology. 2011; 164(4): 1357-91.
9. Lezcano LB, Pedre LDCL, Fernández CI, Verdecia TSS, Fuentes NP, Turner LF. Convenience of the traversal beam test modified to evaluate the model of Parkinson's disease in Rat lesioned in SNPC. Journal of Cell and Animal Biology. 2009; 3(9):145-51.
10. Goldberg MS, Fleming SM, Palacino JJ, Cepeda C, Lam HA, Bhatnagar A, et al. Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. Journal of Biological Chemistry. 2003; 278(44):43628-35.
11. Fleming SM, Salcedo J, Fernagut P-O, Rockenstein E, Masliah E, Levine MS, et al. Early and progressive sensorimotor anomalies in mice overexpressing wild-type human α-synuclein. The Journal of Neuroscience. 2004; 24(42):9434-40.
12. Meredith GE, Kang UJ. Behavioral models of Parkinson's disease in rodents: a new look at an old problem. Movement disorders. 2006; 21(10):1595-606.
13. Carter RJ, Lione LA, Humby T, Mangiarini L, Mahal A, Bates GP, et al. Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. The Journal of Neuroscience. 1999; 19(8):3248-57.

14. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacognosy reviews. 2010; 4(8):118-9.
15. Altun A, Ugur-Altun B. Melatonin: therapeutic and clinical utilization. International journal of clinical practice. 2007; 61(5):835-45.
16. Reiter RJ, Acuna-castroviejo D, Tan DX, Burkhardt S. Free radical-mediated molecular damage. Annals of the New York Academy of Sciences. 2001; 939(1):200-15.
17. Poeggeler B, Saarela S, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC, et al. Melatonin—A Highly Potent Endogenous Radical Scavenger and Electron Donor: New Aspects of the Oxidation Chemistry of this Indole Accessed in vitroa. Annals of the New York Academy of Sciences. 1994; 738(1):419-20.
18. Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? Journal of pineal research. 2007; 42(1):28-42.
19. Khaldy H, Escames G, Leon J, Vives F, Luna J, Acuña-Castroviejo D. Comparative effects of melatonin, l-deprenyl, Trolox and ascorbate in the suppression of hydroxyl radical formation during dopamine autoxidation in vitro. Journal of pineal research. 2000; 29(2): 100-7.
20. Reiter R, Garcia J, Pie J. Oxidative toxicity in models of neurodegeneration: responses to melatonin. Restorative neurology and neuroscience. 1998; 12(2-3):135-42.
21. Boutin JA, Audinot V, Ferry G, Delagrange P. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. Trends in pharmacological sciences. 2005; 26(8):412-9.
22. Uz T, Arslan AD, Kurtuncu M, Imbesi M, Akhisaroglu M, Dwivedi Y, et al. The regional and cellular expression profile of the melatonin receptor MT1 in the central dopaminergic system. Molecular brain research. 2005; 136(1): 45-53.
23. Chen H, Pellegrini J, Aggarwal S, Lei SZ, Warach S, Jensen FE, et al. Open-channel block of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses by memantine: therapeutic advantage against NMDA receptor-mediated neurotoxicity. The Journal of Neuroscience. 1992; 12(11):4427-36.
24. Lipton SA. Pathologically-activated therapeutics for neuroprotection: mechanism of NMDA receptor block by memantine and S-nitrosylation. Current drug targets. 2007; 8(5): 621-32.
25. Aarsland D, Ballard C, Walker Z, Bostrom F, Alves G, Kossakowski K, et al. Memantine in patients with Parkinson's disease dementia or dementia with Lewy bodies: a double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. The Lancet Neurology. 2009; 8(7):613-8.
26. Litvinenko I, Odinak M, Mogil'naya V, Perstnev S. Use of memantine (akatinol) for the correction of cognitive impairments in Parkinson's disease complicated by dementia. Neuroscience and behavioral physiology. 2010; 40(2): 149-55.
27. Schneider E, Fischer P, Clemens R, Balzereit F, Fünfgeld E, Haase H. [Effects of oral memantine administration on Parkinson symptoms. Results of a placebo-controlled multicenter study]. Deutsche medizinische Wochenschrift (1946). 1984; 109(25):987-90.