اثرات و مکانیسم‌های حفاظتی عصاره آبی دم گیلاس *Cerasus avium* L. بر مدل پارکینسونی موش صحرایی نر

مریم رضایی[۱،۲]، سیما نصری[۳*]، سیدعلی ضیایی[۴]، مهرداد روغنی[۵]، محمد کمالی‌نژاد[۶]

۱- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، لرستان
۲- کارشناس ارشد زیست‌شناسی دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور تهران، تهران
۳- استادیار، گروه علمی زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران
۴- استادیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران، تهران
۵- استاد، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد تهران، تهران
۶- کارشناس آزمایشگاه، گروه فارماکوگنوزی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران، تهران
*آدرس مکاتبه: تهران، خیابان استاد نجات‌الهی، خیابان فلاحپور، دانشگاه پیام‌نور تهران، مجتمع علوم پایه و کشاورزی، گروه زیست‌شناسی، تلفن: ۸۸۹۱۳۴۷۵ (۰۲۱)
پست الکترونیک: s_nasri2000@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۸/۹/۲۱ **تاریخ تصویب:** ۸۹/۱۲/۲۴

چکیده

مقدمه: بیماری پارکینسون با تخریب پیشرونده نورون‌ها همراه است. شواهد زیادی در تاثیر استرس اکسیداتیو بر پیشرفت بیماری پارکینسون وجود دارد. آنژیوتانسین II باعث فعال شدن اکسیدازهای وابسته به NADPH می‌شود که سوپراکسایدها را تولید می کنند. عصاره آبی دم گیلاس در محیط برون سلولی سبب مهار آنزیم مبدل آنژیوتانسین (ACE) می‌شود.

هدف: بررسی اثر حفاظت از نورون (Neuroprotective) های عصاره آبی دم گیلاس بر مدل پارکینسونی موش صحرایی نر.

روش بررسی: موش‌های صحرایی نر به ۴ گروه شاهد، نوروتوکسین (۶- هیدروکسی دوپامین)، درمان با عصاره آبی دم گیلاس و کاپتوپریل تقسیم شدند. گروه درمان علاوه بر نوروتوکسین، عصاره آبی دم گیلاس را ۷ روز قبل از تزریق نوروتوکسین و ۳ روز بعد از آن به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. در گروه کاپتوپریل به جای عصاره گیاه، از کاپتوپریل استفاده شد. در همه گروه‌ها تست‌های رفتاری سفتی عضلانی و چرخش، اکسیداسیون پروتئین‌ها، پراکسیداسیون لیپیدها، اندازه‌گیری آنزیم ACE سرمی و مغزی و بافت جسم سیاه مغز از نظر تراکم نورون‌های دوپامینی مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج: چرخش با آپومورفین در گروه عصاره آبی دم گیلاس کمتر از گروه نوروتوکسین بود (p=۰/۰۰۲). پراکسیداسیون لیپیدها در گروه کاپتوپریل کمتر از گروه نوروتوکسین بود (p=۰/۰۳۳). عصاره آبی دم گیلاس توانست آنزیم ACE سرم را مهار کند. تعداد نورون‌ها در گروه عصاره (۹/۱ ± ۹۹/۱) بیشتر از گروه نوروتوکسین (۹/۸ ± ۵۶/۲) بود.

نتیجه‌گیری: عصاره آبی دم گیلاس با مهارکردن ACE سبب بهبودی علائم پارکینسون در موش صحرایی پارکینسونی می‌شود.

گل‌واژگان: عصاره آبی دم گیلاس، بیماری پارکینسون، آنزیم مبدل آنژیوتانسین، موش صحرایی نر

مقدمه

بیماری پارکینسون که فلج تحریکی (Paralysis agitation) نیز نامیده می‌شود ناشی از آسیب جسم سیاه، به ویژه نورون‌های دوپامینرژیک بخش متراکم آن و ضایعات مسیر جسم سیاه – جسم مخطط است که منجر به از بین رفتن سلول‌های رنگدانه‌دار دوپامینی می‌شود. پس از بیماری آلزایمر، پارکینسون شایع‌ترین بیماری تخریب‌کننده اعصاب به شمار می آید که نورون‌های موجود در عقده‌های قاعده‌ای و جسم سیاه مغز را تحت تاثیر قرار می‌دهد [۱]. سلول‌های جسم سیاه ماده شیمیایی به نام دوپامین را تولید می‌کنند. زمانی شخص دچار بیماری پارکینسون می‌شود که سلول‌های مولد دوپامین شروع به تحلیل نموده و میزان دوپامین مغز کاهش می‌یابد که منجر به شروع و کنترل غیرطبیعی حرکات می‌شود [۲].

آنزیوتانسین II اکسیدازهای وابسته به NADPH را فعال نموده که سبب تولید سوپراکسایدها می‌شود. شواهد روزافزونی در تاثیر استرس اکسیداتیو بر پیشرفت بیماری پارکینسون وجود دارد [۳]. نورون‌های دوپامینرژیکی که به هسته اکومبنس می رسند و همچنین از ناحیه تگمنتوم شکمی به هسته آمیگدال کشیده می‌شوند، در ایجاد اثرات آنژیوتانسین II اهمیت زیادی دارند. شواهد نشان می‌دهد که آنژیوتانسین II نقش یک ناقل عصبی را دارد و در آزاد شدن ناقلین عصبی مختلف مانند نورآدرنالین، سروتونین، وازوپرسین، دوپامین، گابا و آدنوزین نقش مهمی را دارد [۴]. مصرف کاپتوپریل (مهار کننده آنزیم مبدل آنژیوتانسین I به II) موجب افزایش سطح دوپامین در مناطق مختلف مغزی می‌شود [۵]. اثرات مفید داروهای مهار کننده آنزیم مبدل آنژیوتانسین I به II مثل کاپتوپریل، در درمان بیماران پارکینسونی مورد توجه قرار گرفته است [۶].

در مطالعه‌ای که به منظور شناسایی گیاهان دارویی مورد استفاده در طب سنتی از نظر قدرت مهارکنندگی فعالیت ACE صورت گرفت ۱۳۵ گیاهی که در درمان فشار خون مصرف داشتند، مورد بررسی قرار گرفتند. یکی از این گیاهان که توانست در محیط برون سلولی اثرات مهارکنندگی ACE خوبی از خود نشان دهد، عصاره آبی گیاه دم گیلاس بود [۱۷]. از آنجایی که مهارکنندگان جدیدتر ACE با قدرت حفاظت نورونی بیشتر و اثرات قلبی عروقی کمتر ممکن است جایگاه ویژه‌ای در درمان بیماری پارکینسون داشته باشند، پژوهش حاضر تاثیر عصاره آبی دم گیلاس را بر تست‌های رفتاری، اکسیداسیون پروتئین‌ها، پراکسیداسیون لیپیدها، اندازه‌گیری آنزیم ACE سرمی و مغزی و همچنین بافت جسم سیاه مغز از نظر تراکم نورون‌های دوپامینی در مدل پارکینسونی موش‌های صحرایی نر را مورد بررسی قرار داده است.

مواد و روش‌ها

مواد: سدیم دودسیل سولفات، ۲،۴ دی‌نیتروفنیل هیدرازین هیدروکلراید، هیدروکسی تولوئن بوتیله، دفراکسامین و آلبومین سرم گاوی، ۶ هیدروکسی دوپامین و آپومورفین از شرکت سیگما و کاپتوپریل از شرکت داروسازی اکسیر، اسید آسکوربیک، کتامین و گزیلازین از شرکت مرک خریداری شد.

حیوانات مورد آزمایش: در این پژوهش از ۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد Wistar با محدوده وزنی ۲۵۰ – ۲۰۰ گرم استفاده شد، که از حیوانخانه مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه شهید بهشتی تهیه گردیدند. موش‌ها در شرایط کنترل شده از نظر دما و نور با دسترسی آزاد به آب و غذا در اتاق حیوانات نگهداری شدند. حیوانات به صورت تصادفی به ۴ گروه زیر تقسیم شدند (n=۸):

۱- گروه شاهد (بدون ایجاد ضایعه) که ۵ μl محلول نرمال سالین ۰/۹ درصد حاوی ۰/۱ μl اسید آسکوربیک ۰/۲ درصد به داخل جسم سیاه (در ناحیه چپ) آنها تزریق شد.

۲- گروه تخریب که جسم سیاه آنها با تجویز نوروتوکسین به داخل جسم سیاه (به صورت یک طرفه در جسم سیاه نیمکره چپ) تخریب شد و ۵ μl از محلول نرمال سالین ۰/۹ درصد حاوی ۸ µg نوروتوکسین ۶- هیدروکسی دوپامین به داخل جسم سیاه و ۰/۱ μl اسید آسکوربیک ۰/۲ درصد را با سرعت ۱ μl / min به صورت تک دوز دریافت کردند.

۳- گروه درمان که ۶ روز قبل از تخریب جسم سیاه و تا ۷۲ ساعت بعد از آن تحت درمان عصاره آبی دم گیلاس قرار گرفتند. گروه درمان ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره آبی دم گیلاس محلول در ۱ میلی‌لیتر نرمال سالین ۰/۹ درصد را مجموعاً ۱۰ روز: ۷ روز قبل از تزریق نورو توکسین و ۳ روز پس از آن، به صورت درون صفاقی دریافت نمودند.

۴- گروه کاپتوپریل که از کاپتوپریل به عنوان کنترل مثبت جهت درمان آنها استفاده شد. این گروه نیز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاپتوپریل محلول در ml ۰/۵ نرمال سالین ۰/۹ درصد را مجموعاً ۱۰ روز: ۷ روز قبل از تزریق نوروتوکسین و ۳ روز پس از آن (مانند گروه درمان)، به صورت درون صفاقی دریافت کردند. نوروتوکسین به صورت داخل جسم سیاه (در ناحیه چپ) تزریق شد.

روش تهیه عصاره آبی دم گیلاس

زمان جمع‌آوری دم گیلاس، پس از رسیدن میوه گیلاس است. دم گیلاس از عطاری خریداری شد و توسط گیاه‌شناس دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی شناسایی و عصاره‌گیری شد.

عصاره آبی به روش خیساندن به ترتیب زیر تهیه شد:

مقدار ۱۰۰ گرم دم گیلاس وزن شده و پس از شستن، همراه مقدار لازم آب (طوری که سطح گیاه را آب فراگیرد) در یک بشر بزرگ ریخته شده و بر روی هیتر قرار گرفت تا به جوش بیاید، و به مدت ۱۵ دقیقه جوشید و پس از آن ابتدا با پارچه تمیز و سپس با کاغذ صافی صاف شد. عصاره صاف شده درون کریستالیزور ریخته شده و بر روی بن ماری خشک شد [۷].

روش جراحی و تزریقات

ابتدا موش‌ها توزین و سپس با تزریق داخل صفاقی، مخلوطی از ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کتامین و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم گزیلازین (شرکت مرک آلمان) بیهوش شدند. آنگاه موش در دستگاه استرئوتاکس (Stoelting - USA) قرار گرفت و توسط قطعه دهانی و میله‌های داخل گوش بر روی میز جراحی ثابت شد. بافت‌های پیوندی روی جمجمه به وسیله پنبه آغشته به پودر پنی سیلین زدوده شد و نقطه برگما مشخص شده، نشانگر دستگاه بر روی آن تنظیم گردید. سپس با توجه به مختصات بخش متراکم جسم سیاه [(DV ۸/۳ mm، ۲ mm ML، Ap -۴/۸ mm to bregma)، از سطح استخوان جمجمه] که از اطلس Watson & Paxinos استخراج شده، جهت ایجاد مدل حیوانی بیماری پارکینسون استفاده شد [۸].

تست سفتی عضلانی

حیوان را روی میز قرار داده، چنانچه طرز ایستادن و راه رفتن آن طبیعی باشد، نمره‌ای دریافت نمی‌کند (نمره صفر می گیرد). در صورتی که حیوان روی میز قرار گرفته و در اثر سفتی عضلات بی حرکت باقی مانده و یا با زحمت با حرکت دست‌ها و پاها شروع به حرکت کند، به حیوان نمره ۰/۵ داده می‌شود. دست راست حیوان را روی سکوی چوبی به ارتفاع ۳ سانتی‌متر قرار داده چنانچه حیوان حداقل ۱۰ ثانیه دست خود را از روی سکو برندارد نمره ۰/۵ دریافت می‌کند، برای دست چپ نیز به همین ترتیب آزمایش صورت می‌گیرد و اگر حیوان دست خود را برای ۱۰ ثانیه برندارد مجدداً نمره ۰/۵ می گیرد، این مرحله در مجموع ۱ نمره دارد. دست راست حیوان را بر روی سکوی ۹ سانتی متری قرار داده به طوری که سایر قسمت‌های بدن با سکو تماس نداشته باشد، در صورت نگه داشتن دست خود به مدت ۱۰ ثانیه، نمره‌ی ۱ را می‌گیرد و برای دست چپ نیز به همین صورت انجام می‌شود، این مرحله در مجموع ۲ نمره دارد. حیوانی که کاملاً دچار بیماری پارکینسون شده باشد، نمره‌ی ۳/۵ را دریافت می‌کند و حیوان سالم نمره صفر را دریافت می‌کند [۱۰].

تست چرخش با Apomorphine

جهت انجام آزمایش چرخشی به حیوانات داروی آپومورفین هیدروکلراید به میزان ۲/۵ mg/kg (که در ml ۰/۵ نرمال سالین ۰/۹ درصد حل شده بود)، یک هفته بعد از جراحی به روش داخل صفاقی تجویز شد. چرخش‌های کامل در یک محفظه استوانه‌ای (به قطر ۳۳ سانتی‌متر و ارتفاع

۳۵ سانتی‌متر) برای ۶۰ دقیقه در فواصل ۱۰ دقیقه‌ای در یک اتاق کاملاً ایزوله شده اندازه‌گیری می‌شود. در صورت ایجاد صحیح ضایعه در سمت چپ جسم سیاه، پس از پایان هفته اول، آپومورفین سبب القای چرخش به سمت راست (مخالف ضایعه) شده و این چرخش چند دقیقه پس از تزریق آپومورفین صورت می‌گیرد.

مطالعات بافت‌شناسی

در پایان آزمایش‌های رفتاری، یکی از موش‌های صحرایی از هر گروه با دوز بالایی از کتامین (۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) عمیقاً بیهوش شده و از طریق آئورت بالا رو μl ۱۰۰ – ۵۰ از سالین ۰/۹ و سپس ۳۰۰ میلی‌لیتر محلول تثبیت‌کننده حاوی فرومالدئید ۴ درصد در بافر فسفات ۰/۲ مولار، با pH ۷/۴ دریافت کرده و پس از آن ۱۰۰ میلی‌لیتر ساکاروز ۰/۱ مولار در بافر فسفات به موش‌ها تزریق شد. در ادامه‌ی تزریق، مغز حیوانات از جمجمه برداشته شده، قطعه‌هایی از مغز پیشین و ساقه‌ی مغز توسط قرار گیری در ساکاروز ۳۰ درصد به مدت دو روز آماده شده و در مرحله انتهایی از آزمایش برش‌هایی با ضخامت ۴۰ میکرومتر به کمک یک دستگاه میکروتوم فریزکننده تهیه شد و در بافر فسفات ۰/۱ مولار نگهداری شدند. هر مقطع در مرحله‌ی بعد با نیسل حاوی کریزل ویوله ۰/۱ درصد رنگ آمیزی شد. در پایان این مرحله نمونه ها بعد از ۲۴ ساعت، جهت بررسی‌های میکروسکوپی آماده شدند و توسط میکروسکوپ نوری (Zeiss, Germany) در بزرگنمایی ۲۰۰، شمارش نورونی درناحیه بخش متراکم جسم سیاه صورت گرفت. همچنین محل تزریق به صورت کیفی نیز بررسی شد. در خصوص شمارش نورونی، این محل در مختصات ۲/۹۶، ۳/۲، ۳/۷، ۴/۲، بر طبق اطلس پاکسینوس و با توجه به مختصات اینتراورال صورت گرفت. ضمناً در هر سطح شمارش نورون‌های ناحیه SNC، در حداقل دو برش صورت گرفت و نهایتاً میانگین تعداد نورونی در هر چهار سطح به صورت کلی گزارش شد. کل نورون‌ها از بخش مدیال تا جانبی‌ترین ناحیه SNC مورد شمارش قرار گرفتند.

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم ACE در سرم خون و هموژن بافت مغزی

قطعات بافت مغز و همچنین خون در ۵ میلی‌لیتر بافر هموژناسیون (۱/۴۰۴ گرم Tris-HCl، ۰/۱۳۴ گرم Tris- Base، ۱ گرم Triton X-100، pH=۷/۵، ۰/۲۱۴ گرم استات منیزیم، ۰/۴۴۸ گرم KCl و ۱۷/۲ گرم سوکروز در ۲۰۰ میلی‌لیتر) ریخته شد و توسط دستگاه هموژنایزر Tomy Micro Smash (مدل MS-100 با دور ۴۰۰۰ rpm) به مدت ۱/۵ دقیقه تحت عمل هموژناسیون قرار گرفت.

روز بعد، بافت‌ها در سانتریفیوژ یخچال‌دار Beckman مدل GS-15R و با شتاب ۵۵۰۰ گرم سانتریفیوژ شدند. محلول فوقانی را جدا نموده و تا زمان اندازه‌گیری در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

دستگاه HPLC مورد استفاده متعلق به شرکت Shimadzu و شامل پمپ IC-10ADVP، شناساگر SPD-10AV، سیستم کنترل SCL-10AVP بود. ستون مورد استفاده µBondapak®C18 به ابعاد ۲۵۰ × ۴۶ میلی‌متر و قطر ذرات ۱۰ میکرون بود. در هر بار کروماتوگرافی μl ۲۵ از محصول انکوباسیون (هم بافت مغزی هموژن شده و هم سرم) توسط سرنگ همیلتون به دستگاه تزریق شد. فاز متحرک (مخلوط ۱:۱ از KH2PO4 ۱۰ میلی‌مولار و متانول با pH= ۳ که با صافی غشایی ۰/۴۵ میکرون صاف شد) با سرعت ۱ میلی‌لیتر در دقیقه جریان داشت و کل زمان کروماتوگرام ۸ دقیقه بود. پیک‌ها در طول موج ۲۲۸ نانومتر ردیابی شدند.

تعیین فعالیت آنزیم ACE

برای تعیین فعالیت آنزیم در بافت مغز و سرم خون تفاوت سطح زیر منحنی تست و بلانک را در معادله خط منحنی استاندارد قرار داده و غلظت محصول (اسید هیپوریک) را از آن به دست می‌آوریم. واحد فعالیت آنزیم، مقدار آنزیمی است که بتواند در مدت ۱ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد یک میکرومول اسید هیپوریک تولید نماید. فعالیت آنزیم بر حسب

مقدار پروتئین بافت مغز که به روش بردفورد تعیین شد، محاسبه گردید.

ارزیابی اکسیداسیون پروتئین‌ها

اکسیداسیون پروتئین‌ها از طریق تعیین اجزاء کربونیل پروتئین در بافت مغزی اندازه‌گیری می‌شود [۱۱]. اجزاء کربونیل پروتئین به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر ارزیابی شدند. قطعات بافت در سه برابر حجم بافر Na2PO4/KH2PO4 pH= ۷/۴، که با KCl ایزوتون شده و حاوی هیدروکسی تولوئن بوتیله ۲۰۰ میکرومولار و دفروکسامین ۲۰۰ میکرومولار بود ریخته شد، سپس توسط دستگاه هموژنایزر Tomy Micro Smash مدل MS-100 با دور ۴۰۰۰ rpm به مدت ۱/۵ دقیقه تحت عمل هموژناسیون قرارگرفت. هموژنات بافتی پس از صاف شدن به مدت ۴۰ دقیقه در سانتریفوژ یخچال دار با دور ۱۳۰۰۰ rpm که قبلاً روی دمای ۴- تنظیم شده بود، سانتریفوژ شد. سپس محلول بالایی (Supernatant) بافت‌های هموژن شده را جدا نموده مجدداً به مدت ۱۵ دقیقه با همان دور سانتریفیوژ شد. در نهایت محلول فوقانی جدا شد.

یک قسمت از هموژن برای رسوب اسید نوکلئیک با یک قسمت استرپتومایسین ۱ درصد مجاور نموده سپس در دور ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول فوقانی همراه با تری کلرواستیک اسید M ۱ به مدت ۲۰ دقیقه توسط دستگاه سونیکیتور (Ulterasonic System Tecna 3) مخلوط شد. در مرحله بعد کمتر از ۵ دقیقه آن را سانتریفیوژ نموده، قسمت رسوب داده شده (Pellet) را با ۲۰۰ میکرولیتر NaOH ۰/۵ مولار ۳ دقیقه ورتکس کرده تا حل شد.

- دی نیترو فنیل هیدرازین ۱۰ میلی‌مولار در HCl ۲ مولار حل شده و حجم به ۸۰۰ میکرولیتر رسانده شد، در مرحله بعد به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی قرار گرفت. سپس محلول با ۲۰۰ میکرولیتر تیو باربیتوریک اسید ۱ مولار به مدت ۲ دقیقه مجاور و بعد سانتریفوژ شد. رسوب با محلول اتیل استات: اتانول (V/V ۱:۱) شستشو داده شد. گوانیدین ۶ مولار را **با** KH2PO4 ۲۰ میلی‌مولار pH= ۲/۳ مخلوط نموده از این مخلوط ۸۰۰ میکرولیتر به هر لوله حاوی رسوب اضافه نموده پس از حل شدن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل (2501, Cecil CE مدل series ۲۰۰۰) در طول موج ۳۷۰ nm خوانده شد.

۲،۴- دی نیترو فنیل هیدرازین ۱۰ میلی‌مولار در HCl ۲ مولار حل شده و حجم به ۸۰۰ میکرولیتر رسانده شد، در مرحله بعد به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی قرار گرفت. سپس محلول با ۲۰۰ میکرولیتر تیو باربیتوریک اسید ۱ مولار به مدت ۲ دقیقه مجاور و بعد سانتریفوژ شد. رسوب با محلول اتیل استات: اتانول (V/V ۱:۱) شستشو داده شد. گوانیدین ۶ مولار را **با** KH2PO4 ۲۰ میلی‌مولار pH= ۲/۳ مخلوط نموده از این مخلوط ۸۰۰ میکرولیتر به هر لوله حاوی رسوب اضافه نموده پس از حل شدن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Cecil CE, 2501 مدل series ۲۰۰۰) در طول موج ۳۷۰ نانومتر خوانده شد.

ارزیابی میزان پروتئین

از روش بردفورد استفاده شده و توسط دستگاه الایزا ریدر (مدل۲۰۰ Medispec ESR) در طول موج ۶۰۰ نانومتر جذب‌ها خوانده شد. پس از رسم منحنی استاندارد با استفاده از BSA (آلبومین سرم گاوی) غلظت پروتئین‌ها تعیین شد.

تعیین پراکسیداسیون لیپیدها

اندازه‌گیری میزان مالون دی‌الدهید (MDA) از راه‌هایی است که توسط آن می‌توان استرس اکسیداتیو را بررسی نمود. مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی بر اساس تشکیل کمپلکس مالون دی آلدئید ایجاد شده با تیو باربیتوریک اسید (TBARS) در بافت مغزی سنجیده شد. تعیین (TBARS) به طریق دستگاه اسپکتروفوتومتری صورت گرفت.

۲۰۰ میکرولیتر از محلول هموژنایز شده را برداشته با ۲۰۰ میکرولیتر محلول SDS (سدیم دودسیل سولفات) ۸ درصد و ۷۵۰ میکرولیتر اسید استیک ۲۰ درصد، به مدت ۱ دقیقه در ورتکس قرار داده شد. در مرحله بعد با ۷۵۰ میکرولیتر تیوباربیتوریک اسید ۰/۸ درصد در ۹۵ درجه به مدت ۶۰ دقیقه

انکوبه شد. بعد از خنک شدن مخلوط با ۳ میلی‌لیتر ان – بوتانول مخلوط و به شدت تکان داده شد و در سانتریفوژ با دور ۴۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. در مرحله آخر، جذب نوری لایه مایع فوقانی جدا شده (لایه نارنجی رنگ) در اسپکتروفوتومتر با طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. همه گروه‌ها تحت این بررسی قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل آماری

جهت بررسی اختلاف میانگین گروه‌ها، با استفاده از نرم افزار آماری SPSS، به روش آنالیز واریانس یک طرفه آزمون ANOVA، تجزیه و تحلیل آماری صورت گرفت و جهت تعیین وجود اختلاف معنی‌دار بین دو گروه از پس آزمون Tukeyاستفاده شد. برای رسم نمودارها از Excel استفاده شده و مقادیر $p < ۰/۰۵$ به عنوان ملاک معنی‌دار بودن اختلاف در نظر گرفته شد.

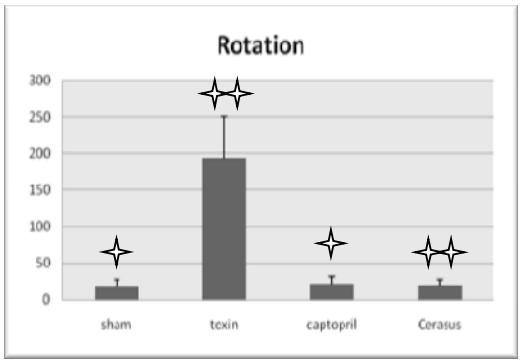
نتایج

بررسی آزمون‌های رفتاری بر میزان شاخص‌های فعالیت حرکتی موش‌های گروه‌های مختلف:

آزمایش چرخش

بعد از تزریق آپومورفین، میانگین چرخش با خطای استاندارد در گروه توکسین (۵۵/۸ ± ۱۹۴) در مقایسه با گروه شاهد (۹/۸ ± ۱۷/۷)، بیانگر ایجاد ضایعه و تخریب نورون‌های دوپامینرژیک است.

میانگین چرخش در گروه درمان با عصاره آبی دم گیلاس (۹/۱ ± ۱۸/۹) و در گروه کاپتوپریل (۱۰/۶ ± ۲۲/۴) بوده که در مقایسه با گروه شاهد (۹/۸ ± ۱۷/۷) تفاوت معنی‌دار نداشت. طبق نتایج این پژوهش حاضر، بهبودی قابل ملاحظه ای در موش‌های گروه درمان با عصاره دم گیلاس مشاهده شد (جدول شماره ۱). در مقایسه گروه درمان با گروه توکسین، گروه درمان کاهش معنی‌داری در تعداد دفعات چرخش نشان دادند ($p<۰/۰۱$). به طور کلی نتایج نشان داد که در اثر درمان به مدت دو هفته، علایم بیماری به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافته است (نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱ – تاثیر عصاره آبی دم گیلاس بر تست چرخش با استفاده از آپومورفین، $p< ۰/۰۵$ مقایسه گروه کاپتوپریل با گروه توکسین، $p< ۰/۰۱$ مقایسه گروه دریافت‌کننده عصاره با گروه توکسین

آزمایش سفتی عضلانی

میزان سفتی عضلانی در گروه شاهد و کاپتوپریل صفر بوده این میزان در گروه توکسین (۰/۳۱ ± ۰/۶) و در گروه درمان (۰/۰۸ ± ۰/۱۳) بود که در مقایسه گروه درمان با گروه توکسین میزان سفتی عضلانی کمتر است (جدول شماره ۱). در تست سفتی عضلانی گروه توکسین، اثرات قابل توجهی دیده شد و سفتی عضلانی بیشتری در مقایسه با گروه شاهد نشان داد ولی تفاوت معنی‌داری بین گروه توکسین و گروه درمان با عصاره مشاهده نشد.

تعیین پراکسیداسیون لیپیدها

میزان پراکسیداسیون لیپیدها در گروه توکسین (۰/۸۳± ۲/۹۵) بالاتر از گروه شاهد (۰/۳۳± ۱/۵۴) بود و در گروه کاپتوپریل (۰/۰۴ ± ۰/۴۷) به طور معنی‌داری پائین‌تر از گروه توکسین بود. همچنین در گروه درمان با عصاره (۰/۳۴± ۱/۴۱) نسبت به گروه توکسین (۰/۸۳ ± ۲/۹۵) پراکسیداسیون لیپیدها کاهش یافته (جدول شماره ۱) و در حد گروه شاهد بود، ولی تفاوت معنی‌داری بین گروه توکسین و گروه درمان با عصاره مشاهده نشد.

جدول شماره ۱- میانگین نتایج به دست آمده از تست‌های ذکر شده (همراه با خطای استاندارد)، در گروه‌های مختلف

آزمایش	شاهد	توکسین	کاپتوپریل	دم گیلاس
چرخش	۱۷/۶۷	۱۹۴	۲۲/۴*	۱۸/۸۸**
	(۹/۷۴)	(۵۵/۷۵)	(۱۰/۵۳)	(۹/۱۱)
سفتی عضلانی	۰	۰/۶	۰	۰/۱۳
	(۰)	(۰/۳۱)	(۰)	(۰/۰۸)
پراکسیداسیون لیپیدها	۱/۵۴	۲/۹۵	۰/۴۷*	۱/۴۱
	(۰/۳۳)	(۰/۸۳)	(۰/۰۴)	(۰/۳۴)
اکسیداسیون پروتئین‌ها	۳/۹۳	۵/۶۴	۶/۱۱	۵/۷۵
	(۰/۷۵)	(۰/۸۳)	(۰/۷۴)	(۱/۳۷)
فعالیت ACE سرم	۳۴۸/۲۵	۳۲۷/۴۹	۴۴/۱۹**	۱۹۱/۹۲*
	(۱۶/۳۳)	(۲۵/۷۵)	(۱۵/۶۹)	(۱۹/۵۱)
فعالیت ACE مغزی	۰/۰۴۵	۰/۰۵۵	۰/۰۴۲	۰/۰۴۹
	(۰/۰۰۸۵)	(۰/۰۰۴۹)	(۰/۰۰۶۴)	(۰/۰۱۲۶)

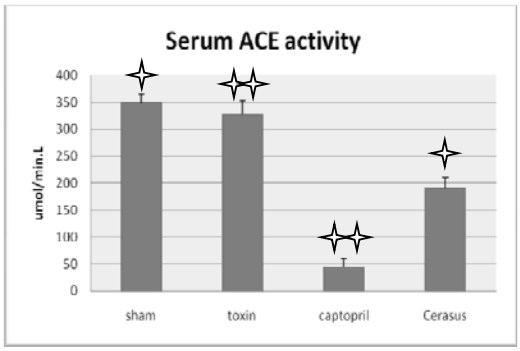
* p< ۰/۰۵، ** p< ۰/۰۱ تفاوت با گروه توکسین با آنالیز واریانس یک طرفه و پس آزمون Tukey

بررسی اکسیداسیون پروتئین‌ها

اکسیداسیون پروتئین‌ها در بافت مغزی گروه شاهد (۰/۰۷۵ ± ۳/۹۳) و در گروه توکسین (۰/۸۳ ± ۵/۶۴) بود که افزایش معنی‌داری را نشان نداد. همچنین در گروه کاپتوپریل (۰/۷۴ ±۶/۱۱) و گروه درمان (۱/۳۷± ۵/۷۵) این میزان تغییری نکرده بود (جدول شماره ۱).

فعالیت آنزیم ACE سرمی

فعالیت آنزیم ACE سرمی (جدول شماره ۱) در گروه توکسین (۲۵/۷۴± ۳۲۷/۴۹) تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد (۱۶/۳۳ ±۳۴۸/۲۵) نداشت ولی در گروه کاپتوپریل فعالیت آنزیم در حدود ۸۷ درصد مهار شده بود (۴۴/۱۹±۱۵/۶۹) که کاملاً کاهش معنی‌داری را نشان می‌داد (p<۰/۰۱) و در گروه درمان نیز حدود ۴۶ درصد مهار را نشان می‌داد (۱۹/۵ ±۱۹۱/۹۲) که آن هم معنی‌دار بود (p<۰/۰۵) (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۲- تاثیر عصاره آبی دم گیلاس بر فعالیت آنزیم ACE سرمی، p<۰/۰۱ مقایسه گروه کاپتوپریل با گروه توکسین و شاهد، p< ۰/۰۵ مقایسه گروه دریافت‌کننده عصاره با گروه توکسین و شاهد

فعالیت آنزیم ACE مغزی

فعالیت آنزیم ACE مغزی در گروه توکسین (۰/۰۰۵ ± ۰/۰۵۵) تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد (۰/۰۰۹± ۰/۰۴۵) نداشت، همچنین در گروه کاپتوپریل (۰/۰۰۶± ۰/۰۴۲) و گروه درمان (۰/۰۱۳± ۰/۰۴۹) فعالیت آنزیم تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد (۰/۰۰۹ ±۰/۰۴۵) نداشتند (جدول شماره ۱).

بررسی بافتی جسم سیاه

شکل شماره **۱** فتومیکروگراف سلول‌های جسم سیاه موش های درمان شده با دم گیلاس را نشان می‌دهد. مقایسه نتایج شمارش در مورد هر گروه بین دو سمت چپ و راست، با آزمون تی تست زوجی انجام شده است. همچنین در نیمه چپ مقایسه گروه‌ها با هم، توسط آزمون آنووای یک‌طرفه انجام شده است.

تعداد نورون‌های دوپامینرژیک گروه درمان با عصاره در ناحیه سمت چپ جسم سیاه آن‌ها (۹/۱ ±۹۹/۱) بوده که در مقایسه با تعداد نورون‌ها در ناحیه سمت چپ جسم سیاه گروه توکسین (۹/۸ ±۵۶/۲)، افزایش بارزی را نشان می‌دهد (p< ۰/۰۵) (جدول شماره ۲). همچنین در سمت راست جسم سیاه در گروه شاهد تعداد نورون‌ها (۹/۲ ±۱۲۴/۲) بوده و در گروه درمان (۷/۵ ± ۱۱۷/۶) است، بنابراین تعداد نورون‌های دوپامینرژیک سمت راست جسم سیاه در گروه درمان نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری ندارد. با مقایسه تعداد نورون‌های دوپامینرژیک سمت چپ جسم سیاه گروه توکسین (۹/۸ ±۵۶/۲) با تعداد این نورون‌ها در گروه شاهد (۸/۷ ± ۱۱۹/۴) کاهش شدید نورون‌ها را در گروه توکسین می‌توان مشاهده نمود (p< ۰/۰۱) (جدول شماره ۲ و شکل شماره ۱).

بحث

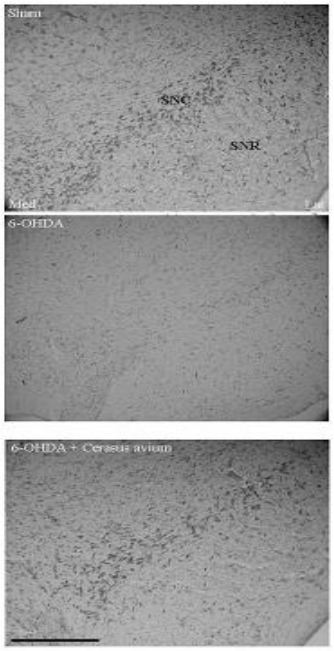
در این مطالعه اثر عصاره آبی گیاه دم گیلاس بر مدل تجربی بیماری پارکینسون در موش‌های صحرایی نر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره آبی دم گیلاس به میزان ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم شاخص‌های فعالیت حرکتی را در موش‌های مبتلا به بیماری پارکینسون افزایش می‌دهد. عصاره آبی دم گیلاس احتمالاً به علت دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی، قادر به کاهش علائم بیماری پارکینسون در مراحل اولیه مدل موش پارکینسونی است. همچنین با وجود داشتن اثرات مهارکنندگی ACE، می‌تواند با مکانیسم‌های دیگری در درمان حفاظتی بیماری پارکینسون موثر باشد.

۶- هیدروکسی دوپامین یک نوروتوکسین کاتکول آمینرژیک است که به صورت گسترده برای تحقیقات و بررسی در رابطه با پیشرفت بیماری پارکینسون و پاتوژنز آن به کار می رود. سمیت این نوروتوکسین، به جذب و تجمع از طریق یک مکانیزم انتقالی خاص در مورد نورون‌های کاتکول آمینرژیک بستگی دارد. نتایج محققین ثابت نموده که نوروتوکسین ۶- هیدروکسی دوپامین ارتباط زیادی با رادیکال‌های آزاد دارد، چون مالون دی‌آلدهید به طور بازری در گروه ۶- هیدروکسی دوپامین افزایش می‌یابد. مقدار دوپامین هنگام درمان با کاپتوپریل افزایش یافته و این امر ثابت نموده که کاپتوپریل می تواند توانایی از بین بردن رادیکال‌های آزاد را بهبود بخشیده و تأثیر آنتی‌اکسیداتیو بر موش‌های بیمار که توسط ۶- هیدروکسی دوپامین پارکینسونی شده‌اند، را داشته باشد. ۶- هیدروکسی دوپامین با ایجاد استرس اکسیداتیو، سبب بروز بیماری پارکینسون می‌شود [۱۲].

جدول شماره ۲- میانگین تعداد نورون‌های رنگ‌آمیزی شده (همراه با خطای استاندارد) در سمت چپ و راست جسم سیاه، در گروه‌های توکسین، شاهد، و درمان با عصاره آبی دم گیلاس

SNC	شاهد	توکسین	دم گیلاس
چپ	۱۱۹/۴**	۵۶/۲	۹۹/۱*
	(۸/۷)	(۹/۸)	(۹/۱)
راست	۱۲۴/۲	۱۲۹/۶	۱۱۷/۶
	(۹/۲)	(۱۰/۱)	(۷/۵)

* p< ۰/۰۵، ** p< ۰/۰۱ مقایسه گروه‌های شاهد و دریافت کننده عصاره با گروه توکسین



شکل شماره ۱- نورون‌های دوپامینرژیک ناحیه مغز میانی (منطقه جسم سیاه) در گروه‌های شاهد، توکسین و درمان با عصاره، (خط مقیاس ۲۵۰ µm)

از آنجایی که آنژیوتانسین II باعث آزادشدن دوپامین جسم مخطط می‌شود، تجویز حاد مهارکنندگان ACE همانند کاپتوپریل، مانع انتقال عصبی دوپامین در سیستم عصبی مرکزی می‌گردد. اما تجویز طولانی مدت مهارکننده‌های ACE (حداقل ۷ روز) اثرات متضادی در بر دارد و باعث افزایش قابل توجه میزان دوپامین و افزایش رهاسازی آن می‌شود که احتمالاً به تغییرات جبرانی در میزان انکفالین و یا تاکی کینین جسم مخطط مربوط است [۱۳]. در بیماران پارکینسون میزان فعالیت آنزیم ACE در مایع مغزی نخاعی افزایش می‌یابد و بین پلی مورفیسم ژن ACE و بیماری پارکینسون نیز ارتباط وجود دارد [۱۴]. تزریق زیر جلدی کاپتوپریل به مدت ۹ روز به موش هایی که توسط ۶- هیدروکسی دوپامین دچار پارکینسون شده بودند، اثر محافظت‌کنندگی عصبی و کاهش استرس اکسیداتیو در قسمت مغز میانی و جسم مخطط داشت [۱۵].

آنژیوتانسین II منجر به آزادسازی دوپامین جسم مخطط می‌شود، بنابراین، با بکارگیری مهارکننده‌های ACE، آزادسازی دوپامین کاهش می‌یابد [۱۶]. مطالعات نشان داده‌اند که به کارگیری مهارکننده‌های ACE در افزایش مقدار یا آزادسازی دوپامین جسم مخطط اثرات متضادی با آنژیوتانسین II دارد، که به تغییر در سطوح انکفالین یا تاکی کینین جسم مخطط بستگی دارد. اثرات مفید ایجاد شده به وسیله درمان با مهار کننده‌های ACE، با حفاظت نورون‌ها و خواص آنتی‌اکسیداتیو مشاهده شده در مطالعه‌ای که توسط دانشمندان صورت گرفت، ارتباط داشت. به طوری که اثرات حفاظت نورونی و آنتی اکسیدانی ایجاد شده به وسیله درمان با مهارکننده‌های ACE، ممکن است به اثرات بازدارندگی که بر سنتز آنژیوتانسین II دارد، ارتباط داشته باشد [۱۷]. اخیراً نشان داده شده که در چندین نوع سلول از جمله نورون‌ها، انواع رادیکال‌های آزاد اکسیژن (Reactive oxygen species)، نقش حیاتی در سیگنال‌دهی آنژیوتانسین II از طریق گیرنده AT1 ایفا می‌کند و آنژیوتانسین II اکسیدازهای وابسته به NADPH را که منبع اصلی داخل سلولی سوپر اکسیدها هستند، فعال می‌کند [۱۸]. نیتریک اکساید بازجذب دوپامین را در ناحیه سیناپسی مناطقی چون هسته اکومبنس کاهش می‌دهد و کاپتوپریل احتمالاً از طریق افزایش نیتریک اکساید می‌تواند سبب افزایش دوپامین در

هسته اکومبنس شود. توجیه احتمالی دیگر می‌تواند تغییر فعالیت سیستم کولینرژیک در مغز باشد [۱۹].

Margolin و همکاران در یک مطالعه قابلیت داروهای مهارکننده ACE، در کاهش مصرف کوکائین به وسیله معتادان به این ماده را مشاهده کردند که این اثر را به توانایی این داروها در تنظیم سطح دوپامین مغز نسبت دادند [۲۰].

از دیگر بررسی‌های انجام شده در رابطه با اثر عصاره گیاهان بر درمان بیماری پارکینسون، عصاره گیاه آلوورا (Aloe vera) را می‌توان نام برد که مخلوطی از ویتامین C، بیو فلاونوئیدها، قندها، آنزیم‌ها و آنتی‌اکسیدان‌های قوی است و در مقابله با رادیکال‌های آزاد خیلی موثر بوده و در درمان بیماری هایی مانند بیماری پارکینسون به کاررفته است [۲۱]. در پژوهش دیگری، پیش درمانی با عصاره گیاهان شبدر چمنی غنی از ایزوفلاوون‌ها (Isoflavones) و پوست پرتقال حاوی فلاوون‌های پلی متوکسیله (Polymethoxylated flavones). موش‌های صحرایی را که نورون‌های دوپامینرژیک جسم سیاه آنها توسط نوروتوکسین ۶- هیدروکسی دوپامین دچار ضایعه شده بود، را تا حدودی بهبود بخشید [۲۲].

نتایج پیشنهاد می‌کنند که مصرف ترکیبات پلی‌فنولیک می تواند اثرات مفیدی را بر علیه آسیب‌هایی که به وسیلهٔ استرس اکسیداتیو ایجاد می‌شوند، داشته باشد. در یک بررسی ترکیبات فنولیک چای سبز، آب انگور و مادهٔ رنگی زردچوبه (Curcumin)، اثرات حفاظتی پلی فنول‌ها و فلاونوئیدها را بر علیه بیماری‌های عصبی نشان داده است [۲۳].

همچنین در موش‌های صحرایی بالغ، رژیم غذایی کامل از میوه‌ها و سبزیجات غنی از آنتی‌اکسیدان‌ها (مانند توت‌فرنگی، زغال اخته و اسفناج) می‌توانند اثرات مفیدی را بر کاهش عملکردهای شناخته شده که به سن بستگی دارند (مانند بیماری پارکینسون) داشته باشند [۲۴].

زانولی و همکارانش گزارش دادند که تزریق داخل صفاقی آپی ژنین و کریزین دو فلاونوئید جدا شده از عصاره گل بابونه شاخص‌های فعالیت حرکتی موش‌های پارکینسونی را در آزمون میدان باز در مقایسه با گروه تخریب و شاهد به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد [۲۵].

رزوراترول در گیاهانی مانند انگور به صورت طبیعی وجود داشته و دارای خواص آنتی‌اکسیدانی قوی در برابر H_2O_2 و O_2 ایجاد شده توسط ماکروفاژها است. مطالعات بسیاری خواص آنتی‌اکسیدانی رزوراترول را در جذب رادیکال‌های آزاد اکسیژن نشان داده است [۲۶]. همچنین رزوراترول ممکن است به عنوان محافظ سلول‌های عصبی در داروهای جدید، برای جلوگیری از بیماری پارکینسون به کار رود [۲۷].

عصارهٔ برگ جینکو بیلوبا دارای خاصیت آنتی‌اکسیداتیو است، به طوری که از تشکیل مالون دی‌آلدهید جلوگیری می کند. اخیراً تحقیقات جالبی در مورد خواص آنتی‌اکسیدانت عصارهٔ برگ جینکو بیلوبا انجام شده و اعلام شده که bilobalide دارای تأثیرات حفاظتی بر علیه نیتریت اکساید و آمیلوئید بتاپپتید ۳۵ – ۲۵ است (که باعث سمیت عصبی و سلول‌های pc_{12} می‌شوند) و عصارهٔ برگ جینکو بیلوبا می‌تواند مانع سمیت سلول‌های عصبی دوپامینرژیک شود [۲۸].

آنتوسیانین‌های موجود در عصاره دم گیلاس درد و التهاب را کاهش می‌دهند، این آنتوسیانین‌ها، آنتی‌اکسیدان‌های قوی نیز هستند. بررسی‌ها نشان داده که این گیاه حاوی درصد بالایی از ملاتونین نیز است که برای عملکرد سیستم ایمنی مهم است. از آنجا که در ترکیب گیاه دم گیلاس سزکویی‌ترپنویید و ترپن‌ها وجود دارند، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی دم گیلاس قابل توجه است. آنتوسیانین‌ها و بیوفلاونیدهای موجود در این گیاه، بازدارنده آنزیم سیکلواکسیژناز هستند و مانع التهاب در بدن می‌شوند. این ترکیبات مشابه داروهای ضدالتهاب غیر استروئیدی عمل می‌کنند. حدود ۲۰ عدد گیلاس ۲۵ میلی‌گرم آنتوسیانین دارد [۲۹]. بررسی‌های انجام شده توسط ضیایی و همکاران مهار ۷۷ درصدی ACE توسط عصاره آبی دم گیلاس و مهار ۷۰ درصدی ACE توسط عصاره اتانولی این گیاه را نشان می دهد [۱۷]. بدین‌ترتیب عصاره آبی دم گیلاس ممکن است آیندهٔ روشنی در درمان بیماران پارکینسونی داشته باشد. احتمالاً عصاره آبی دم گیلاس از طریق مهار آنزیم ACE و کاهش آنژیوتانسین II و افزایش آنتی‌اکسیدان‌ها سبب بهبود علایم در موش‌های پارکینسونی می شود. به هرحال، با وجود پیشرفت‌های درمانی جدید برای معالجه علایم و سندرم‌های این بیماری، اکثر بیماران نهایتاً از

کار افتادگی و ناتوانی را تجربه خواهند کرد. تاکنون درمان قطعی و دارویی مناسب برای این بیماری کشف نشده است. اطلاعات فارماکولوژیک این پژوهش، فرضیه استفاده از عصاره گیاهان را به عنوان داروهای جدید و جایگزین داروهای شیمیایی موجود، در درمان بیماری پارکینسون تقویت می‌کند و پیشنهاد می‌شود تحقیقات آینده بر حفاظت نورونی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات موجود در عصاره این گیاه تمرکز نمایند.

منابع

1. Greenamyre JT, Hastings TG. Parkinson's--divergent causes, convergent mechanisms. *Sci*. 2004; 304: 1120 - 2.

2. Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K, Seitelberger F. Brain dopamine and the syndromes of parkinson and huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J. Neurol Sci*. 1973; 20: 415 - 55.

3. Ahlskog JE. Slowing parkinson's disease progression: Recent dopamine agonist trials. *Neurology* 2003; 60: 381 - 9.

4. Jenner P. Oxidative stress in parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2003; 53 Suppl 3: S26 - 36; discussion S36 - 28.

5. Ganong WF. Origin of the angiotensin II secreted by cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1994; 205: 213 - 9.

6. Zhu M, Sumners C, Gelband CH, Posner P. Chronotropic effect of angiotensin II via type 2 receptors in rat brain neurons. *J. Neurophysiol*. 2001; 85: 2177 – 83.

7. Samsam SH. Extraction and effective materials deduction method of medicinal plants and identity methods. Mani Press, Esfahan. 1371, pp: 13 - 9.

8. Paxinos G, Watson CR, Emson PC. Ache-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. *J. Neurosci Methods* 1980; 3: 129 - 49.

9. Fujita M, Nishino H, Kumazaki M, Shimada S, Tohyama M, Nishimura T. Expression of dopamine transporter mRNA and its binding site in fetal nigral cells transplanted into the striatum of 6-OHDA lesioned rat. *Brain Res. Mol. Brain Res*. 1996; 39: 127 - 36.

10. Morpurgo C. Effects of antiparkinson drugs on a phenothiazine-induced catatonic reaction. *Arch Int. Pharmacodyn Ther*. 1962; 137: 84 - 90.

11. Hermida-Ameijeiras A, Mendez-Alvarez E, Sanchez-Iglesias S, Sanmartin-Suarez C, Soto-Otero R. Autoxidation and MAO-mediated metabolism of dopamine as a potential cause of oxidative stress: Role of ferrous and ferric ions. *Neurochem. Int*. 2004; 45: 103 - 16.

12. Tsuda K, Tsuda S, Nishio I, Masuyama Y, Goldstein M. Captopril inhibits both dopaminergic and cholinergic neurotransmission in the central nervous system. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1998; 25: 904 - 7.

13. Mendelsohn FA, Jenkins TA, Berkovic SF. Effects of angiotensinII on dopamine and serotonin turnover in the striatum of conscious rats. *Brain Res*. 1993; 613: 221 - 9.

14. Newall CA, Anderson LA, Phillipson JD. Herbal medicines: A guide for health-care professionals. *Pharmaceutical Press*, London. 1996; 613: 221 - 9.

15. Munzel T, Keaney JF, Jr. Are ACE inhibitors a "Magic bullet" Against oxidative stress? *CIRCJ*. 2001; 104: 1571 - 4.

16. Reardon KA, Mendelsohn FA, Chai SY, Horne MK. The angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor, perindopril, modifies the clinical features of parkinson's disease. *Aust N Z J. Med.* 2000; 30: 48 - 53.

17. Ziai SA, Rezazadeh Sh, Dastpak A, Shabestari A, Taghizadeh M, Naghdibadi H,et al. Study of the ace inhibitory effect of medicinal plants used in Iranian folk-medicine as antihypertensive remedy. *J. Medicinal Plants* 2006; 5: 53 - 74.

18. Tallant EA, Higson JT. Angiotensin II activates distinct signal transduction pathways in astrocytes isolated from neonatal rat brain. *Glia.* 1997; 19: 333 - 42.

19. Sahraei H, Poorheidari G, Foadaddini M, Khoshbaten A, Asgari A, Noroozzadeh A, Ghoshooni H, Firoozabadi SH, Zarrindast MR. Effects of nitric oxide on morphine self-administration in rat. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 2004; 77: 111 - 6.

20. Margolin A, Avants SK, Setaro JF, Rinder HM, Grupp L. Cocaine, HIV and their cardiovascular effects: Is there a role for ACE-inhibitor therapy? *Drug Alcohol Depend*. 2000; 61: 35 - 45.

21. Cao G, Shukitt-Hale B, Bickford PC, Joseph JA, McEwen J, Prior RL. Hyperoxia-induced changes in antioxidant capacity and the effect of dietary antioxidants. *J. Appl. Physiol*. 1999; 86: 1817 - 22.

22. Astarloa R, Mena MA, Sanchez V, de la Vega L, de Yebenes JG. Clinical and pharmacokinetic effects of a diet rich in insoluble fiber on parkinson disease. *Clin. Neuropharmacol.* 1992; 15: 375-380.

23. Ramassamy C. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: A review of their intracellular targets. *Eur. J. Pharmacol.* 2006; 545: 51 - 64.

24. Esposito E, Rotilio D, Di Matteo V, Di Giulio C, Cacchio M, Algeri S. A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. *Neurobiol. Aging* 2002; 23: 719 - 35.

25. Zanoli P, Avallone R, Baraldi M. Behavioral characterisation of the flavonoids apigenin and chrysin. *Fitoterapia* 2000; 71 Suppl 1: S117 - 123.

26. Gao ZB, Chen XQ, Hu GY. Inhibition of excitatory synaptic transmission by trans-resveratrol in rat hippocampus. *Brain Res.* 2006; 1111: 41 - 7.

27. Kim MJ, Shin KS, Chung YB, Jung KW, Cha CI, Shin DH. Immunohistochemical study of p47phox and gp91phox distributions in rat brain. *Brain Res.* 2005; 1040: 178 - 186.

28. Yang SF, Wu Q, Sun AS, Huang XN, Shi JS. Protective effect and mechanism of Ginkgo biloba leaf extracts for parkinson disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine. *Acta Pharmacol Sin.* 2001; 22: 1089 - 93.

29. Wang H, Nair MG, Strasburg GM, Chang YC, Booren AM, Gray JI, DeWitt DL. Antioxidant and anti-inflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. *J. Nat Prod*. 1999; 62: 294 - 6.

Protective Effect and Mechanism of Aqueous Extract of *Cerasus avium* L. in Rats with Parkinson's Disease

Rezaii M (M.Sc.)[1, 2], Nasri S (Ph.D.)[3*], Ziaii SA (Ph.D.)[4], Roghani M (Ph.D.)[5], Kamalinejad M (B.Sc.)[6]

1- Razi Herbal Medicines Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khoramabad, Iran
2- Biology Department, Payam Noor University, Tehran, Iran
3- Biology Department, Payam Noor University, Tehran, Iran
4- Pharmacology Department, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran
5- Physiology Department, School of Pharmacy, Shahed University of Medical Sciences, Tehran, Iran
* Corresponding author: Biology Department, Payam Noor University,
P.O.Box: 19395-3697, Tehran, Iran
Tel: +98- 912 - 3277593, Fax: +98 - 21 - 88913475
E-mail: s_nasri2000@yahoo.com

Abstract

Background: Parkinson's disease (PD.) is one of the most common neurodegenerative disorders. There are many documents about the effects of oxidative stress on PD. progress. Angiotensin II activates NADPH depending on oxidases and these oxidases produce superoxides. *Cerasus avium* extract is an angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor in Invitro.

Objective: Evaluation of neuroprotective effect of aqueous extract of *Cerasus avium* L. in Parkinson's models of rats .

Methods: Male rats were divided in 4 groups: sham, neurotoxin (6-hydroxydopamine), *Cerasus avium* aqueous extract and captopril. *Cerasus avium* and captopril were injected i.p. 7 days before and 3 days after 6-hydroxydopamine injection. Muscle stiffness, apomorphine test, histology test, protein oxidation and lipid peroxidation in brain and dopamine neurons density in substantia nigra tissue as well as serum and brain ACE activity were assayed in all groups.

Results: Rotation test with apomorphine in *Cerasus avium* group was significantly lower than neurotoxin group (p=0.002). Lipid peroxidation in captopril group was significantly lower than neurotoxin group (p=0.033) *Cerasus avium* inhibited serum ACE activity. Number of neurons in *Cerasus avium* group (99.1 ± 9.1) were significantly more than neurotoxin group (56.2±9.8).

Conclusion: Aqueous extract of *Cerasus avium* can be useful in treatment of Parkinson's disease because of ACE inhibitor effects.

Keywords: Aqueous extract of *Cerasus avium*, Parkinson's disease, Angiotensin converting enzyme, Male rat