

Increased Serum Lithium Level due to Mild to Moderate damage to Dopaminergic Neurons of the Substantia Nigra, Evidence from Animal Model of Parkinson's Disease induced by 6-Hydroxydopamine

Mohammad Hossein Esmaeli¹, Hashem Haghdoost-Yazdi², Milad Mazaheri³

1.Full professor, Dept. Physiology, Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Prevention of Non-Communicable Disease, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran, ORCID ID: 0000 0003 2152 9660

2.Associate professor, Dept. Physiology, Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Prevention of Non-Communicable Disease, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran (corresponding author), Email:haghdoost@gmail.com, Tel: 028-33336001, ORCID ID: 0000 0001 5825 8758

3.M.D, Dept. Physiology, Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Prevention of Non- Communicable Disease, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran, ORCID ID: 0000 0003 2181 5324

ABSTRACT

Background and Aim. It has been reported that lithium (Li) has neuroprotective effects in neurodegenerative diseases. In this study, we investigated the association between serum Li level and Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in rats.

Material and Methods. 6-OHDA was injected into the medial forebrain bundle by stereotaxic surgery. Apomorphine- induced rotational and cylinder tests were carried out before the toxin injection and in the second and sixth weeks thereafter. Blood samples were collected from the heart of the animals in the seventh week. The survival of dopaminergic (DA) neurons in the substantia nigra pars compacta (SNc) was determined using immunohistochemistry. Li was measured by ion selective electrode method (ISE).

Results. There was no significant difference in the serum Li levels between control and 6-OHDA-treated rats. Based on the severity of the rotational behavior, the 6- OHDA- treated rats were divided into two subgroups: symptomatic (with severe behavioral symptoms) and asymptomatic (with no or mild behavioral symptoms). In the symptomatic and asymptomatic subgroups, SNc DA neuronal loss was $83 \pm 16\%$ and $45 \pm 10\%$, respectively. Serum Li level in the asymptomatic subgroup was significantly higher than that in the symptomatic subgroup and control group.

Conclusion. Serum Li level increased in the mild to moderate damage to SNc DA neurons but returned to normal value in severe neuronal damage. Therefore, an increase in serum Li level can predict subclinical SNc DA neuronal death and helps in making early diagnosis of PD.

Keywords: Parkinson's disease, Serum lithium level, 6-hydroxydopamine, Apomorphine, Dopaminergic neurons, Substantia nigra

Received: Jan 26, 2021

Accepted: Nov 7, 2021

How to cite the article: Mohammad Hossein Esmaeli, Hashem Haghdoost-Yazdi, Milad Mazaheri. Increased Serum Lithium Level due to Mild to Moderate damage to Dopaminergic Neurons of the Substantia Nigra, Evidence from Animal Model of Parkinson's Disease induced by 6-Hydroxydopamine. *BJKU* 2022;27(5):10-23.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

آسیب خفیف تا متوسط نورون‌های دپامینرژیک جسم سیاه سبب افزایش سطح سرمی لیتيوم می‌شود، شواهدی از مدل حیوانی 6- هیدروکسی دپامین بیماری پارکینسون

محمد حسین اسماعیلی¹، هاشم حق دوست یزدی²، میلاد مظاهری³

1. استاد، گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، پژوهشکده جلوگیری از بیماری‌های غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران، کد ارکید: 0000-0003-2152-966

2. دانشیار، گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، پژوهشکده جلوگیری از بیماری‌های غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران، (نویسنده مسئول)، پست الکترونیک: jhaghdoost@gmail.com تلفن: 028-33336001، کد ارکید: 0000-0001-5825-8758

3. پزشک عمومی، گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، پژوهشکده جلوگیری از بیماری‌های غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران، کد ارکید: 5324-2181-0003-0000

چکیده

زمینه و هدف: گزارش شده است که لیتيوم دارای اثرات حفاظت نورونی در بیماری‌های نورودژنراتیو است. در این مطالعه، ارتباط بین سطح سرمی لیتيوم و بیماری پارکینسون ناشی از سم 6-هیدروکسی دپامین در موش صحرایی بررسی شد.

مواد و روش‌ها: سم 6-هیدروکسی دپامین به ناحیه دسته مغزی جلویی میانی تزریق شد. آزمون‌های رفتاری قبل از تزریق سم و در هفته‌های دوم و ششم پس از آن انجام گرفت. در هفته هفتم، نمونه خون از قلب حیوانات جمع‌آوری شد و سپس بقاء سلول‌های دپامینرژیک در بخش متراکم هسته جسم سیاه با استفاده از ایمونوهیستوشیمی بررسی شد. لیتيوم با استفاده از روش الکتروود انتخابی یون اندازه‌گیری شد.

نتایج: اختلاف معنی‌داری در سطح سرمی لیتيوم بین موش‌های گروه کنترل و موش‌های دریافت‌کننده سم 6-هیدروکسی دپامین مشاهده نشد. بر اساس شدت علائم رفتاری، موش‌های دریافت‌کننده سم به دو زیرگروه علامت دار (با علائم شدید) و بی علامت (با علائم خفیف) تقسیم شدند. درصد مرگ نورون‌های دپامینرژیک در زیرگروه‌های علامت دار 83 ± 16 و بدون علامت 45 ± 10 درصد کمتر از گروه کنترل بود. سطح سرمی لیتيوم در زیرگروه بدون علامت به‌صورت معنی‌داری بیشتر از آن در زیرگروه علامت دارو کنترل بود.

نتیجه‌گیری: سطح سرمی لیتيوم در آسیب خفیف تا متوسط نورون‌های دپامینرژیک جسم سیاه افزایش می‌یابد ولی در آسیب شدید به مقدار طبیعی باز می‌گردد. از این رو افزایش در سطح سرمی لیتيوم می‌تواند به تشخیص زودرس بیماری پارکینسون کمک کند.

واژه‌های کلیدی: بیماری پارکینسون، سطح سرمی لیتيوم، 6-هیدروکسی دپامین، آپومورفین، نورون‌های دپامینرژیک، جسم سیاه

وصول مقاله: 99/11/26 اصلاحیه نهایی: 1400/8/15 پذیرش: 1400/8/16

مقدمه

مرگ پیشرونده نورون های دوپامینرژیک در بخش متراکم جسم سیاه در مغز میانی مکانیسم پاتوفیزیولوژیک اصلی در ایجاد بیماری پارکینسون است. کاملاً روشن نیست چه عواملی منجر به این مرگ نورونی می شوند؛ اما شواهد نشان می دهند که استرس اکسیداتیو و اختلال در عملکرد میتوکندری ها نقش مهمی دارند (1-3). علائم بالینی بیماری پارکینسون شامل علائم حرکتی همچون لرزش در حالت استراحت، برادی کینزیا، سفتی عضلانی و بی ثباتی در وضعیت است که پس از آنکه حدود 70٪ از نورون های دوپامینرژیک جسم سیاه از دست رفته باشند، آشکار می شوند (4 و 5)؛ بنابراین ردیابی و تشخیص نشانگرهای زیستی که مرگ زودرس این نورون ها را نشان دهند می تواند برای تشخیص زودهنگام و در نتیجه مدیریت بهتر بیماری پارکینسون مفید باشند. از آنجایی که استرس های اکسیداتیو یکی از عوامل اصلی مرگ نورون های دوپامینرژیک معرفی شده است، مواد یا ترکیباتی که در این استرس نقش دارند از اهمیت خاصی برخوردار هستند (2). لیتیموم فلزی قلیایی است که در تمام سلول های بدن یافت می شود و برای بیش از 50 سال در درمان اختلالات دوقطبی استفاده می شود (6). اخیر شواهدی ارائه شده است که لیتیموم را به عنوان یک عامل حفاظت کننده نورون ها معرفی می کند. لیتیموم آسیب بافتی به مغز و زمان بهبودی در مدل های تجربی خونریزی داخل مغزی را کاهش می دهد (7) و از طریق کاهش هیپرفسفوریلاسیون پروتئین های تائو، تولید پپتیدهای بتا آمیلوئیدی را در مغز موش های آلزایمری تراریخته مهار می کند (8 و 9). همچنین تجویز مزمن لیتیموم می تواند تخریب نورونی در جسم مخطط موش های صحرایی در مدل تجربی بیماری هانتینگتون را کاهش دهد (10). در ارتباط با بیماری پارکینسون گزارش شده است که در موش های پارکینسونی شده دوز کم لیتیموم از تخریب نورونی و کاهش دوپامین در مسیر نیکروستریاتال جلوگیری می کند (11-13). افزون بر این

در شرایط آزمایشگاهی، لیتیموم می تواند از اثرات سمی MPP+ و روتنون، دو عامل تخریب کننده نورون های دوپامینرژیک جلوگیری کند (11 و 12). مطالعات درون تنی (in vivo) و برون تنی (in vitro) متعدد نشان داده اند که این فلز از طریق مهار استرس اکسیداتیو و التهاب، افزایش اتوفازی مهار اپوپتوز و کاهش انباشت آلفا-سینوکلئین اثرات حفاظت نورونی خود را القاء می کند. همچنین مسیرهای بیولوژیک متعددی شرح داده شده است که از طریق آن این فلز برای جلوگیری از مرگ نورون ها عمل می کند. مهم ترین این مسیرها مهار کیناز 3 گلیکوژن سنتتاز (GSK-3) است که نشان داده شده است عملکرد ناقص آن در پاتوژنیز بیماری آلزایمر نقش دارد. همچنین نشان داده شده است که لیتیموم می تواند سبب فعال شدن فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF) شود. BDNF نمو سیناپسی و نورونی را تنظیم کرده و بقاء و انعطاف پذیری نورون ها را پشتیبانی می کند (9). علاوه بر این، این فرضیه مطرح شده است که لیتیموم می تواند حساسیت بیش از حد گیرنده های دوپامین در جسم مخطط را کاهش دهد. این افزایش حساسیت به عنوان عامل ایجاد دیسکینزیا ناشی از مصرف طولانی مدت داروی لوودوپا معرفی می شود (14). مطالعات کمی ارتباط بین لیتیموم و بیماری پارکینسون در انسان را بررسی کرده اند. تقریباً همه آنها مطالعات بالینی یا اپیدمیولوژیک هستند که قادر به روشن کردن این مسئله نیستند که آیا مرگ پیشرونده نورون های دوپامینرژیک باعث ایجاد تغییرات دینامیک در سطح پلاسمایی لیتیموم می شود و یا لیتیموم می تواند در این مرگ نورونی سهیم باشد. علاوه بر این، همزمانی ابتلا به چند بیماری (comorbidity) داده های بالینی را به طور چشمگیری مخدوش می کند و از این رو از ارزیابی دقیق این ارتباط جلوگیری می کند؛ بنابراین در این مطالعه، ارتباط بین بیماری پارکینسون ناشی از سم 6-هیدروکسی دوپامین و سطح سرمی لیتیموم در مدل حیوانی 6-هیدروکسی دوپامین بررسی شد. اگرچه علائم رفتاری در این مدل با علائم

گروه آزمایشی تقسیم شدند: گروه کنترل ($n=9$)، گروه شم ($n=10$) و گروه 6 - هیدروکسی دوپامین ($n=29$). گروه 6 - هیدروکسی دوپامین و گروه شم به ترتیب محلول 6 - هیدروکسی دوپامین و حلال آن را بصورت درون مغزی دریافت کردند. شمار موش های ذکر شده در هر گروه شماری است که تا انتهای تحقیق زنده مانده و از آن ها نمونه خون تهیه گردید. همچنین تعداد موش ها در گروه دریافت کننده سم بیشتر انتخاب شد تا بتوان بعداً آن ها را بر اساس شدت بیماری به زیرگروه های مختلف تقسیم نمود.

برنامه آزمایشی:

شکل 1 برنامه زمانی آزمایش ها در این مطالعه را نشان می دهد. ابتدا آزمون چرخشی القاء شده با آپومورفین انجام شد و حیواناتی که کمتر از 10 چرخش خالص در مدت سی دقیقه به سمت راست یا چپ داشتند، وارد آزمایش شدند. پس از چند روز، آزمایش عدم تقارن استفاده از دست ها (آزمون سیلندر) بر روی موش های انتخاب شده انجام گرفت و سپس سم 6 - هیدروکسی دوپامین یا حلال آن به مغز تزریق شد. آزمون های چرخشی و سیلندر با حداقل 1 روز فاصله از هم انجام شد تا از تأثیر آپومورفین بر آزمون سیلندر جلوگیری شود.

جراحی استریوتاکی:

6 - هیدروکسی دوپامین (سیگما) یا حلال آن از طریق سرنگ 10 میکرولیتری هاملتون و با استفاده از جراحی استریوتاکی به داخل ناحیه دسته مغزی جلویی میانی نیمکره راست تزریق شد. حیوانات ابتدا با ترکیبی از کتامین (70 میلی گرم بر کیلوگرم، داخل صفاقی) و زایلازین (6 میلی گرم بر کیلوگرم، داخل صفاقی) بیهوش شدند. سپس، 16 میکروگرم 6 - هیدروکسی دوپامین حل شده در 4 میکرولیتر سرم نمکی (NaCl) حاوی اسید اسکوربیک (0.2٪) به دو نقطه در ناحیه دسته مغزی جلویی با مختصات زیر: قدامی خلفی (AP): -4،

بالینی بیماری پارکینسون در انسان متفاوت است، لکن این مدل می تواند فرایندهای سلولی اصلی درگیر در تحلیل نورون های دوپامینرژیک مانند استرس اکسیداتیو، تخریب و التهاب نورونی و همچنین مرگ نورونی توسط آپوپتوز را بازتولید کند (15). همچنین بر خلاف مطالعات انسانی در این مدل می توان با روش های ایمونوهیستوشیمی درصد آسیب و تخریب نورونی دپامینرژیک را ارزیابی کرد و از این طریق بازتاب مرگ این نورون ها در سرم را بررسی نمود.

پیش از این، ما نشان دادیم که تغییر در سطح اورات سرم که یک آنتی اکسیدان طبیعی درون زامی باشد، می تواند شدت مرگ نورون های دوپامینرژیک در موش های تحت درمان با سم 6 - هیدروکسی دوپامین را پیش بینی کند (16). ما همچنین سلیم و روی را در سرم موش های تحت درمان با سم 6 - هیدروکسی دوپامین اندازه گیری کردیم و دریافتیم که مرگ نورون های دوپامینرژیک بخش متراکم هسته جسم سیاه با کاهش سطح سرمی این عناصر همراه است (داده ها منتشر نشده است).

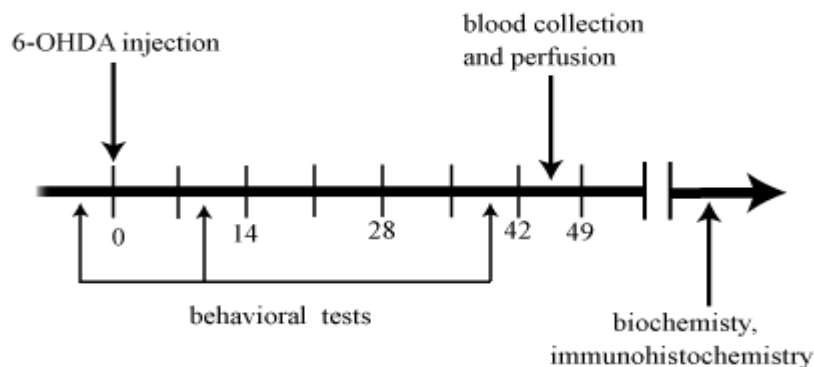
مواد و روش ها

حیوانات و گروه های آزمایشی:

این مطالعه تجربی در سال 1398 در دانشگاه علوم پزشکی قزوین بر روی موش های صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار (موسسه رازی، کرج، ایران) که در ابتدای تحقیق در محدوده وزنی 250 تا 300 گرم بودند انجام شد. موش ها در حیوانخانه دانشگاه در قفس های بزرگ با ابعاد $59 \times 20 \times 38$ در اتاقی با درجه حرارت کنترل شده و شرایط 12 ساعت روشنایی و 12 ساعت تاریکی نگهداری شدند و به آب و غذا به صورت نامحدود دسترسی داشتند. تمام رویه های این مطالعه مطابق با دستورالعمل آزمایش های حیوانی شورای تحقیقات در دانشگاه علوم پزشکی قزوین با کد اخلاق IR.QUMS.REC.1397.127 انجام شده است. موش ها به سه

پاکسینوز و واتسون 2007 تزریق شد (17). برگما مرجع محاسبه AP و L و سطح مجموعه مرجع محاسبه DV بود.

جانبی (L): 1/8-، پشتی شکمی (DV): 9 و 4/4-AP، 2-L: و 8/8 DV: بر طبق مختصات ارائه شده توسط اطلس



شکل 1. برنامه زمان بندی آزمایش ها. آزمایش های رفتاری یک هفته قبل از تزریق سم و در هفته های دوم و ششم پس از آن انجام شد. جمع آوری خون و استخراج سرم در هفته هفتم پس از سم انجام شد. پس از آن برخی از موش ها در هر گروه پرفیوژن شدند و مغز آن ها برای مطالعات ایمونوهیستوشیمی خارج شد. اعداد روزهای بعد از سم را نشان می دهد.

در این آزمون نحوه استفاده از دست ها بدون کمک داری خاص و بر اساس مطالعات قبلی مورد بررسی قرار گرفت (19 و 20). موش ها در ظرف استوانه ای قرار گرفته و به مدت ده دقیقه اجازه حرکت آزادانه در محیط به آن ها داده شد. در این مدت، تعداد تماس های دست راست یا چپ یا هر دو با دیواره ظرف به منظور حفظ تعادل و یا وزن بدن توسط شخصی که برای این آزمایش آموزش دیده بود، شمارش شد. سپس، نمره عدم تقارن با معادله زیر محاسبه گردید:

$$\text{عدم تقارن} = \frac{I \setminus I + C + B - C \setminus I + C + B}{2}$$

که در آن I و C به ترتیب تعداد تماس های دست طرف آسیب (راست) و دست مقابل را نشان می دهند و B نشان دهنده تعداد تماس ها با هر دو دست است. امتیازات مربوط به عدم تقارن دست ها از 1- تا 1+ است. نمرات مثبت و منفی نشان می دهند که دست طرف آسیب و یا دست طرف سالم به ترتیب برای تماس با دیواره ظرف غالب بودند؛ بنابراین انتظار

آزمون های رفتاری:

الف -آزمون چرخش القا شده با آپومرفین:

آزمون چرخش القا شده با آپومرفین بر طبق روشی که قبلاً توضیح داده شده است انجام شد (16 و 18). به طور خلاصه، ابتدا به موش ها اجازه داده شد تا برای 5 دقیقه در یک ظرف استوانه ای (قطر، 28 سانتی متر، ارتفاع، 38 سانتی متر) با محیط مأنوس شوند و سپس هیدروکلراید آپومورفین (سیگما، 0/5 میلی گرم بر کیلوگرم) به صورت داخل صفاقی تزریق شد. پس از یک دقیقه، تعداد چرخش های کامل در مدت 30 دقیقه توسط افراد خبره ثبت شد. تعداد چرخش ها به طرف نیمکره محل تزریق سم (عدد منفی) یا مقابل آن (عدد مثبت) ثبت گردید. تعداد خالص چرخش ها با کسر نمرات منفی از نمرات مثبت محاسبه شد. تعداد بالای چرخش های خالص به طرف مقابل نیمکره تزریق سم نشان می دهد که مدل به خوبی ایجاد شده است.

آزمون سیلندر:

سپس آن‌ها با آنتی بادی ثانویه (60 دقیقه، IgG خراگوش، سانتا کروز) انکوبه شدند. پس از آن برش‌ها در معرض ترکیبی از پراکسیداز هورسرادیش (HRP) و دی‌امینو بنزیدین به مدت 60 دقیقه قرار گرفتند تا رنگ‌آمیزی مؤثر برای مشاهده میکروسکوپ نوری حاصل شود. پس از آن، برش‌ها دهیدره شدند، توسط زایلین پاکسازی و پوشانده شدند. آن‌ها در میکروسکوپ الیمپوس با بزرگنمایی 10 مشاهده شدند و برش‌هایی از جسم سیاه که در محدوده برگما، 4/8- تا 5/2- بودند انتخاب شدند. سپس شش برش در هر حیوان از بین تقریباً 50 برش که به طور سری به پنج گروه تقسیم شده بودند، انتخاب شد. بین دو نمونه انتخاب شده حداقل پنج برش فاصله وجود داشت. سلول‌های TH مثبت با استفاده از میکروسکوپ نوری در بزرگنمایی 400 مشاهده و شمارش شدند.

تجزیه و تحلیل آماری:

تمامی داده‌ها به صورت SEM Mean(±) بیان شدند. مقایسه داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه به همراه تست تعقیبی توکی و همچنین آزمون تی (t-test) صورت گرفت. به منظور بررسی همبستگی (correlation) داده‌های آزمون‌های رفتاری و ایمونوهیستوشیمی با داده‌های سطح سرمی لیتیموم محاسبه ضریب همبستگی پیرسون استفاده شد. در مورد کلیه یافته‌ها، اختلاف در سطح $P < 0/05$ به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

آزمون‌های رفتاری:

دو آزمون رفتاری چرخش القاء شده با اپومرفین و سیلندر به منظور اطمینان از ایجاد مدل و همچنین ارزیابی شدت بیمارپاریسون از موش‌ها به عمل آمد. نمودارهای چپ در شکل 2 نتایج آزمون چرخش القاء شده با آپومورفین را نشان

می‌رود که یک موش مبتلا به همی پارکینسون شدید نمره عدم تقارن مثبت قابل توجهی را نشان دهد.

خون‌گیری و اندازه‌گیری سطح سرمی لیتیموم:

خون‌گیری در هفته هفتم پس از پایان آزمون‌های رفتاری و قبل از پرفیوژن از قلب صورت گرفت. قبل از خون‌گیری حیوان با ترکیب کتامین و زایلازین در بیهوشی عمیق قرار داده شد. پس از انعقاد خون سرم با استفاده از سانتریفیوژ جدا گردید و در 80- درجه تا زمان اندازه‌گیری لیتیموم نگه‌داری شد. برای تعیین میزان لیتیموم از روش انتخابی یونی که روش متداول برای اندازه‌گیری این یون در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی است، استفاده شد.

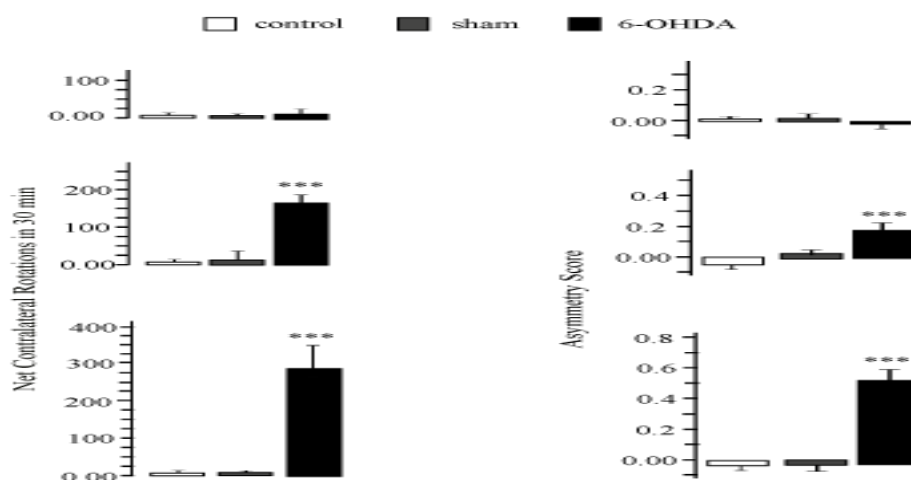
ارزیابی بافت شناسی:

ایمونوهیستوشیمی برای ارزیابی شدت از دست دادن نورون‌های دپامینرژیک (DA) در هسته جسم سیاه (SNc) انجام گرفت. سه موش از هر گروه کنترل و شم و هشت موش از گروه OHDA-6 وارد این آزمایش شدند. پس از بیهوشی با کتامین و زایلازین، مغز هر موش از طریق قلب با 50 میلی لیتر فسفات بافر سالین (PBS) و حدود 100 میلی لیتر پارافورمالدئید 4٪ پرفیوز شد. پس از آن، مغز بیرون آورده شد و یک شب در پارافورمالدئید در 4 درجه سانتی گراد قرار گرفت. بخش مغز میانی به صورت دو طرفه جدا شده و به وسیله ی پارافین غالب گیری شد و سپس برش‌های کروئال (ضخامت 8 میکرومتر) با استفاده از میکروتوم Thermo Shandon Microtome (انگلستان) تهیه و از هر سه برش یکی انتخاب شد. برش‌های انتخاب شده پس از خشک شدن در طول شب، از پارافین جدا گشته و با 0.2٪ تریتون X-100 آبرسانی شدند و اتصالات غیر اختصاصی با استفاده از 10٪ سرم نرمال گات مسدود شدند. به دنبال آن، نمونه‌ها یک شب در دمای 4 درجه سانتی‌گراد با آنتی بادی ضد تیروزین هیدروکسیلاز (TH) انکوبه شدند (1:200، سانتا کروز) و

برای استفاده از دست راست یا چپ برای لمس دیواره ظرف نداشتند. پس از سم، نمره عدم تقارن در گروه های کنترل و شم تقریباً نزدیک به صفر باقی ماند؛ اما در گروه دریافت کننده سم، این نمره به میزان قابل توجهی افزایش یافت و در هفته های دوم و ششم به ترتیب به $0/17 \pm 0/06$ و $0/08 \pm 0/51$ رسید. این اعداد نشان می دهند که موش های دریافت کننده سم ترجیح می دهند از دست راست برای لمس دیواره ظرف استفاده کنند.

می دهند. قبل از سم، هیچ یک از موش ها رفتار چرخشی قابل توجهی نشان ندادند. بعد از تزریق سم فقط موش های متعلق به گروه 6-هیدروکسی دوپامین چرخش های زیادی به سمت چپ نشان دادند. تعداد چرخش ها در هفته ششم بعد از سم به طور معنی داری ($P < 0.001$) بیشتر از هفته دوم بود (به ترتیب 160 ± 30 و 285 ± 60 در هفته دوم و ششم).

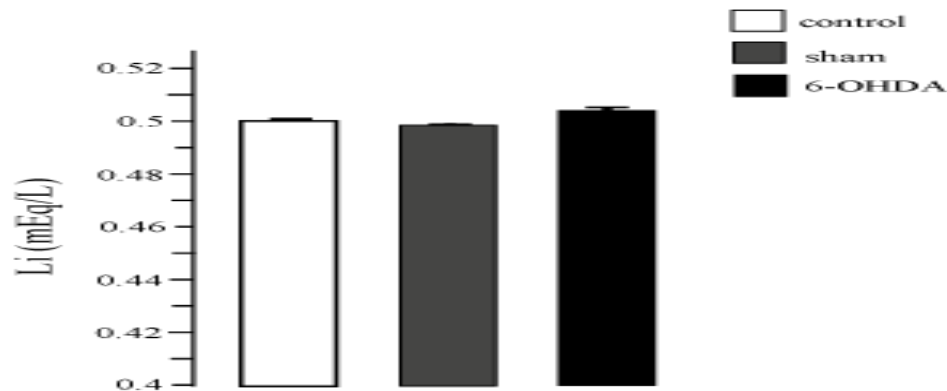
نمودارهای راست در شکل 2 نتایج آزمون های سیلندر را نشان می دهند. قبل از سم، نمره عدم تقارن در همه گروه ها نزدیک به صفر بود، به این معنی که حیوانات هیچ ترجیحی



شکل 2. نتایج آزمون های رفتاری در گروه های مختلف آزمایشی. نمودارهای چپ و راست به ترتیب یافته های آزمون چرخش القاء شده با آپومورفین و آزمون سیلندر را نشان می دهند. نمودارهای بالایی یافته های این آزمون ها قبل از تزریق سم و نمودارهای میانی و تحتانی به ترتیب در هفته های دوم و ششم بعد از آن را نشان می دهند. همان طور که مشاهده می شود شدت علائم رفتاری به تدریج پس از تزریق سم افزایش یافت. $P < 0.001$: *** در مقایسه با گروه کنترل و شم. آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی توکی

سطح سرمی لیتیم :

شکل 3 سطح سرمی لیتیم را در گروه های مختلف آزمایشی نشان می دهد. همان طور که مشاهده می شود، در هفته هفتم پس از سم، سطح سرمی لیتیم در موش های دریافت کننده سم اندکی بالاتر از گروه شم و کنترل بود؛ ولی این اختلاف از نظر آماری معنی دار نبود. کمترین و بالاترین مقادیر لیتیم به ترتیب در گروه کنترل $0/5$ و $0/5$ ، در گروه شم $0/49$ و $0/5$ و در گروه 6-هیدروکسی دوپامین $0/5$ و $0/6$ میلی اکسی والان در لیتر بود.



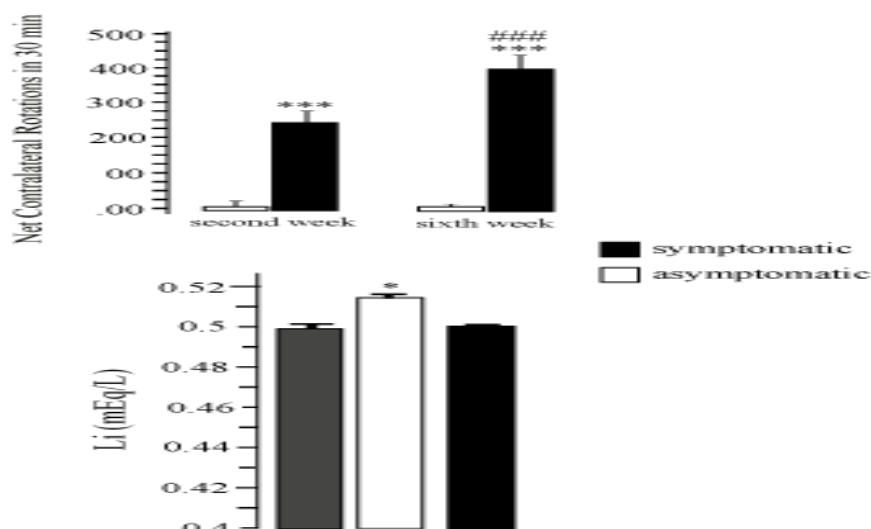
Groups	Mean (mEq/L)	Standard Error	P value
Control (n=9)	.5	.000	
Sham (n=10)	.498	.0013	.17
6-OHDA (n=29)	.506	.004	.2

شکل 3. سطح سرمی لیتیوم (Li) در گروه‌های مختلف آزمایشی.

دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، سطح لیتیوم در زیر گروه بدون علامت به طور معنی داری بالاتر از آن در زیر گروه علامت دار و گروه شم بود (0.52 ± 0.01 میلی اکسید والان بر لیتر در گروه بدون علامت و 0.50 ± 0.00 در گروه علامت دار)؛ ولی در زیر گروه علامت دار این سطح نزدیک به گروه شم بود⁰ با این حال، تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که هیچ ارتباطی بین تعداد چرخش ها و سطح سرمی لیتیوم در موش های صحرایی دریافت کننده سم وجود نداشت. $r = -0.127$ ، $P = 0.302$ ، $n = 28$ بین تعداد چرخش در هفته ششم پس از سم و سطح لیتیوم در تمامی موش های دریافت کننده سم و $r = 0.19$ ، $P = 0.46$ ، $n = 17$ بین تعداد چرخش ها در هفته

ارتباط بین شدت علائم رفتاری و سطح سرمی لیتیوم: موش های دریافت کننده سم پاسخ یکسان و مشابهی به آپومورفین نشان ندادند و تعداد چرخش ها در آن ها بسیار متفاوت بود. بیشتر موش ها رفتار چرخشی شدیدی را نشان دادند؛ اما بعضی از آن ها هیچ چرخشی نشان ندادند یا تعداد چرخش ها در آن ها بسیار کم بود. بر این اساس، این موش ها به دو زیر گروه تقسیم شدند: علامت دار (symptomatic, n=17) شامل موش هایی که بیش از 200 چرخش در هر بار آزمون نشان دادند و بدون علامت (asymptomatic, n=11) شامل موش هایی که هیچ چرخشی نشان ندادند یا کمتر از 30 چرخش داشتند. نمودارهای شکل 4 نتایج آزمایش های چرخشی و سطح سرمی لیتیوم را در این زیر گروه ها نشان می

ششم و سطح لیتیوم در موش های متعلق به زیر گروه علامت دار.



شکل 4. نتایج آزمون چرخش القاء شده با اپومرفین در زیر گروه های علامت دار و بدون علامت موش های دریافت کننده سم. تعداد چرخش ها (نمودار بالا) و سطح سرمی لیتیوم (نمودار پایین) در زیر گروه های علامت دار (symptomatic) و بدون علامت (asymptomatic) در موش های دریافت سم نشان داده شده است. تفاوت در تعداد چرخش ها و سطح سرمی لیتیوم بین این زیر گروه ها معنی دار بود.

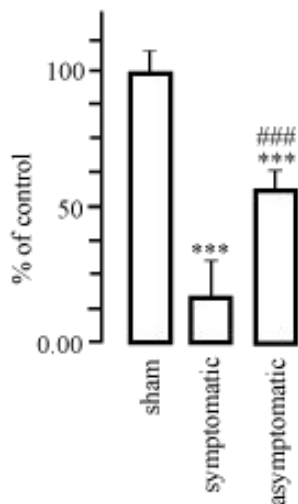
$P < 0.05$: در مقایسه با زیر گروه بدون علامت و گروه سم. آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی توکی

$P < 0.001$: *** در مقایسه با زیر گروه بدون علامت. آزمون تی (t-test)

$P < 0.001$: #### در مقایسه با هفته دوم در همان زیر گروه. آزمون تی (t-test)

دوپامینرژیک در زیر گروه بدون علامت نیز قابل توجه بود. تعداد نورون های TH مثبت زیر گروه های علامت دار و بدون علامت به ترتیب 83 ± 16 و 55 ± 10 درصد کمتر از گروه کنترل بود (نمودار در شکل 5، $P < 0.001$). با این حال، تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که هیچ ارتباطی بین تعداد این نورون ها و سطح سرمی لیتیوم در موش های دریافت کننده سم وجود نداشت ($n = 8$ ، $P = 0.25$ ، $r = 0.246$).

ارتباط بین از دست دادن نورون های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه و سطح سرمی لیتیوم: میکروگراف ها در شکل 5 شدت ضایعه را در نورون های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه در گروه های سم و همچنین زیر گروه های علامت دار و بدون علامت موش های دریافت کننده سم نشان می دهند. همان طور که مشاهده می شود، مرگ نورون های دوپامینرژیک در زیر گروه علامت دار گسترده بود. با این حال، از دست دادن نورون های



شکل 5. ارزیابی ایمونوهیستوشیمیایی بقاء نورون‌های دوپامینرژیک در جسم سیاه. میکروگراف‌ها نشان‌دهنده نورون‌های تیروزین هیدروکسیلاز (TH) مثبت در جسم سیاه نیمکره راست در گروه شم (میکروگراف بالا) و همچنین زیر گروه‌های علامت‌دار (میکروگراف میانی، symptomatic) و بدون علامت (میکروگراف پایین، asymptomatic) موش‌های دریافت‌کننده سم می‌باشند. نمودار تعداد نورون‌های TH مثبت را به صورت کمی نشان می‌دهد. توجه کنید تعداد سلول‌های TH مثبت در زیر گروه بدون علامت به طور قابل توجهی کمتر از گروه شم؛ اما به طور معنی‌داری بالاتر از زیر گروه علامت‌دار بود. خط مقیاس: 100 میکرومتر

***: P < 0.001. نسبت به گروه شم. آزمون (t-test)

####: P < 0.001. نسبت به زیرگروه علامت‌دار. آزمون (t-test).

بحث

در این مطالعه ارتباط بین سطح سرمی لیتيوم و بیماری پارکینسون ایجاد شده بر اثر تزریق درون مغزی سم 6-هیدروکسی دوپامین در موش صحرایی بررسی شد. مشاهدات ما نشان می‌دهند که هفت هفته پس از تزریق این سم به ناحیه دسته مغزی جلویی میانی مغز، تفاوت معنی‌داری در سطح سرمی لیتيوم بین موش‌های دریافت‌کننده سم و کنترل وجود نداشت. با این حال، تجزیه و تحلیل دقیق داده‌ها نشان داد که در موش‌های دریافت‌کننده سم که علائم رفتاری خفیف و مرگ نورونی متوسط داشتند سطح لیتيوم به میزان معنی‌داری بالاتر از آن در گروه کنترل بود. این در حالی است که در موش‌های دریافت‌کننده سم با علائم رفتاری شدید و مرگ

گسترده نورونی سطح لیتيوم در حد مقادیر گروه کنترل بود؛ بنابراین می‌توان بیان کرد که سطح سرمی لیتيوم در مراحل ابتدایی آسیب به نورون‌های دوپامینرژیک در جسم سیاه افزایش می‌یابد؛ اما با پیشرفت و گسترش این آسیب به مقدار طبیعی بازمی‌گردد.

چند مطالعه ارتباط بین سطح سرمی لیتيوم و بیماری پارکینسون را بررسی کرده‌اند. فورته و همکاران، (2005) سطح سرمی 26 عنصر کاتیونی در بیماران مبتلا به پارکینسون را با افراد کنترل همسان شده در سن مقایسه کردند (21). میزان لیتيوم سرم را در افراد کنترل و بیماران به ترتیب $1/01 \pm 0/75$ و $0/79 \pm 0/6$ نانوگرم در میلی لیتر گزارش کردند که نشان می‌دهد سطح طبیعی لیتيوم در انسان نزدیک به دو برابر سطح

آن در موش‌های گروه کنترل مطالعه ما (5/ میلی اکی والان در لیتر معادل 0/5 نانوگرم در میلی لیتر) است؛ البته لازم به ذکر است که لیتوم درمانی برای اختلالات روان‌شناختی بر اساس روش‌های توصیف شده توسط کوپر و همکاران (22 و 23) روزانه 600 - 1200 میلی گرم است تا سطح سرمی لیتوم را به 0/65 تا 0/85 میلی اکی والان در لیتر برساند. همچنین مطالعه فورته و همکاران نشان دهنده کاهش معنی دار لیتوم در سرم بیماران مبتلا به پارکینسون است. بیماری پارکینسون در انسان با علائم حرکتی تشخیص داده می‌شود که پس از مرگ 60 تا 80 درصد نوروں‌های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه آشکار می‌شوند (4 و 5)؛ بنابراین بیماران پارکینسونی شبیه موش‌های زیر گروه علامت دار در مطالعه ما هستند که حدود 80 درصد نوروں‌های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه خود را از دست داده بودند. بر این اساس داده‌های ما داده‌های فورته و همکاران را مبنی بر کاهش لیتوم متعاقب مرگ نورونی شدید در جسم سیاه تأیید نمی‌کنند؛ زیرا سطح لیتوم در موش‌های علامت‌دار نزدیک به کنترل بود؛ البته لازم به ذکر است که 75٪ بیماران پارکینسونی در مطالعه فورته و همکاران توسط داروی ال - دوپا و یا اگونیست‌های دوپامین یا هر دو تحت درمان قرار داشتند که می‌تواند داده‌های آن‌ها را مخدوش کند. عامل مخدوش کننده دیگر، میزان مصرف لیتوم است. مصرف لیتوم به منطقه جغرافیایی و همچنین رژیم غذایی بستگی دارد. لیتوم به مقدار خیلی کمی در خاک یافت می‌شود و میزان مصرف آن بسیار متفاوت است و انحراف معیار از میانگین مصرف موجود در همان منطقه جغرافیایی نیز زیاد است. به عنوان مثال، مصرف لیتوم در Tijuana ، مکزیک 1485 + 1009 میکروگرم در روز است و در گالوستون، تگزاس 821 + 684 و در وین، اتریش 348 + 290 میکروگرم در روز است (24). از طرف دیگر انحراف معیار از میانگین در داده‌های ما به‌طور قابل توجهی کمتر بوده و برای کنترل تقریباً

صفر بود. علاوه بر این، گزارش شده است که مصرف کلرید سدیم بر میزان دریافت لیتوم تأثیر می‌گذارد و رژیم غذایی با نمک زیاد در جوامع صنعتی می‌تواند باعث کاهش دریافت لیتوم شود (25). در همین راستا، گزارش شده است که جذب لیتوم از روده کوچک از طریق کانال‌های سدیمی انجام می‌شود (26).

یافته مهم مطالعه ما این است که در مراحل ابتدایی مرگ نوروں‌های دوپامینرژیک سطح لیتوم سرم افزایش می‌یابد؛ ولی در مراحل شدید مرگ این نوروں‌ها دوباره به سطح طبیعی باز می‌گردد. داده‌های مشابهی در مورد سطح سرمی بیلی روبین گزارش شده است. بیلی روبین یکی از ترکیبات آنتی اکسیدان

طبیعی است که گزارش شده است سطح سرمی آن در بیماران پارکینسونی افزایش می‌یابد (29-27). از آنجا که استرس اکسیداتیو یکی از اصلی‌ترین مکانیسم‌های زمینه ساز مرگ نوروں‌های دوپامینرژیک در بخش متراکم جسم سیاه است (1-3)، بیلی روبین می‌تواند در این زمینه نقش مهمی داشته باشد. بیلی روبین توسط سیستم آنزیمی هم -اکسیژناز تولید می‌شود که نشان داده شده است

در نوروں‌های دوپامینرژیک در معرض استرس اکسیداتیو به میزان زیاد تولید (up-regulated) می‌شود (28-30)؛ بنابراین، این فرضیه مطرح شده است که تنظیم افزایشی در این سیستم آنزیمی یک پاسخ سازشی بدن به استرس اکسیداتیو در بیماری پارکینسون است. با این حال، مطالعات بالینی نشان می‌دهند که در افراد با شدت خفیف تا متوسط بیماری پارکینسون سطح سرمی بیلی روبین بالاتر از آن در افراد مبتلا به پارکینسون شدید است (29 و 30). شده است که لیتوم دارای اثرات محافظت‌کنندگی از نوروں‌ها می‌باشد (10-6) که تا حدی از طریق فعالیت ضد اکسیدانی آن انجام می‌شود (6 و 11). از طرف دیگر نشان داده شده است که لیتوم می‌تواند از طریق مهار مسیر GSK سلول‌ها را از استرس شبکه اندوپلاسمی

نتیجه گیری

داده های ما نشان می دهند که مرگ نورون های دوپامینرژیک جسم سیاه می تواند همراه با تغییر در سطح سرمی لیتوم باشد. تغییر به شدت مرگ نورون های دوپامینرژیک بستگی دارد. در شدت خفیف تا متوسط سطح سرمی لیتوم افزایش می یابد؛ اما با پیشرفت و گسترده شدن مرگ نورون لیتوم به سطح طبیعی برمی گردد؛ بنابراین، افزایش سطح سرمی لیتوم می تواند مرگ نورون های دوپامینرژیک جسم سیاه را قبل از بروز علائم بالینی پارکینسون پیش بینی کرده و به تشخیص زود هنگام این بیماری کمک کند.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از خانم ها آریتا مینایی و نفیسه راستگو که در جراحی استریوتاکسی و شماره گذاری نمونه ها ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می شود.

محافظت کند (31). اخیراً ما نشان دادیم که این استرس در مرگ نورونی در مدل 6- هیدروکسی دپامین بیماری پارکینسون دخالت داشته و سبب پیشرفت بیماری می شود (32). از این رو ممکن است مکانیسم های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی درون زا با افزایش سطح سرمی لیتوم با مرگ نورون های دوپامینرژیک ناشی از استرس اکسیداتیو و استرس شبکه اندوپلاسمی مقابله کنند. این مکانیسم ها احتمالاً در مرگ نورونی زودرس مؤثر هستند؛ اما همان طور که برای سطح سرمی بیلروبین اتفاق می افتد در مرگ شدید نورونی موفق نمی باشند. به هر حال، داده های ما می توانند از نظر بالینی مهم باشند؛ زیرا علائم بالینی بیماری پارکینسون نسبت به از دست دادن نورون های دوپامینرژیک جسم سیاه تأخیر قابل توجهی دارند (4 و 5)؛ بنابراین، افزایش سطح سرمی لیتوم می تواند مرگ نورون های دوپامینرژیک جسم سیاه را قبل از بروز علائم بالینی پیش بینی کند و از این رو می تواند به تشخیص زود هنگام بیماری پارکینسون در انسان کمک کند.

References

1. Tsang AHK, Chung KKK. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1792: 643–650. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.12.006>
2. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*. 2003; 39(6):889-909. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00568-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00568-3)
3. Bose A, Beal MF. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2016; 139: 216-231. doi: 10.1111/jnc.13731.
4. Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008; 79(4):368-76. <http://dx.doi.org/10.1136/jnnp.2007.131045>
5. Shulman JM, De Jager PL, Feany MB. Parkinson's disease: genetics and pathogenesis. *Annu Rev Pathol*. 2011; 6:193-222.
6. Camins A, Verdager E, Junyent F, Yeste-Velasco M, Pelegrí C, Vilaplana J, et al. Potential Mechanisms Involved in the Prevention of Neurodegenerative Diseases by Lithium. *CNS Neurosci Ther*. 2009; 15: 333–344.
7. Kang K, Kim Y-J, Kim Y-H, Roh JN, Nam J-M, Kim P-Y, et al. Lithium pretreatment reduces brain injury after intracerebral hemorrhage in rats. *Neurol Res*. 2012; 34:447–54.
8. Su Y, Ryder J, Li B, Wu X, Fox N, Solenberg P, et al. Lithium, a common drug for bipolar disorder treatment, regulates amyloid-beta precursor protein processing. *Biochemistry*. 2004; 43:6899–908.
9. Lazzara CA, Kim YH. Potential application of lithium in Parkinson's and other neurodegenerative diseases. *Front Neurosci*. 2015 Oct 27; 9:403. doi: 10.3389/fnins.2015.00403.
10. Wei H, Qin ZH, Senatorov VV, Wei W, Wang Y, Qian Y, et al. Lithium suppresses excitotoxicity-induced striatal lesions in a rat model of Huntington's disease. *Neuroscience*. 2001; 106:603–12.

- 11.Li XZ, Li XZ, Chen XP, Zhao K, Bai LM, Zhang H, et al. Therapeutic effects of valproate combined with lithium carbonate on MPTP-induced Parkinsonism in mice: possible mediation through enhanced autophagy. *Int J Neurosci*. 2013; 123:73–9.
- 12.Youdim MB, Arraf Z. Prevention of MPTP (N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) dopaminergic neurotoxicity in mice by chronic lithium: involvements of Bcl-2 and Bax. *Neuropharmacology*. 2004; 46:1130–40.
- 13.King TD, Bijur GN, Jope RS. Caspase-3 activation induced by inhibition of mitochondrial complex I is facilitated by glycogen synthase kinase-3beta and attenuated by lithium. *Brain Res*. 2001; 919:106–14.
- 14.Dalen P, Steg G. Lithium and levodopa in Parkinsonism. *Lancet*. 1973 1(7809):936-7.
15. Hernandez-Baltazar DH, Zavala-Flores LM, Villanueva-Olivo A. The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model. *Neurologia*. 2017; 32(8). 533-539.
- 16.Sarukhani MR, Haghdooost-Yazdi H, Khandan-Chelarci G. Changes in the Serum Urate Level Can Predict the Development of Parkinsonism in the 6- Hydroxydopamine Animal Model. *Neurochem Res*. 2018; 43(5):1086-1095.
- 17.Paxinos G and Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed, San Diego, Academic Press, 2007. 70-80
- 18.Sarukhani M, Haghdooost-Yazdi H, Sarbazi Golezari A, Babayan-Tazehkand A, Dargahi T, Rastgoo N. Evaluation of the antiparkinsonism and neuroprotective effects of hydrogen sulfide in acute 6-hydroxydopamine-induced animal model of Parkinson's disease: behavioral, histological and biochemical studies. *Neurol Res*. 2018; 1-9.
- 19.Prasad EM, Hung SY. Behavioral Tests in Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson's disease. *Antioxidants*. 2020; 9(10):1007. doi: 10.3390/antiox9101007.
- 20.Minaei A, Haghdooost-Yazdi H. Dexmedetomidine attenuates the induction and reverses the progress of 6-hydroxydopamine- induced Parkinsonism; involvement of KATP channels, alpha 2 adrenoceptors and anti-inflammatory mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2019; 382:114743.
- 21.Forte G, Alimonti A, Pino A, Stanzione P, Brescianini S, Brusa I, et al. Metals and oxidative stress in patients with Parkinson's disease. *Ann Ist Super Sanità*. 2005; 41(2):189-195.
- 22.Cooper TB, Bergner PE, Simpson GM. The 24-hour serum lithium level as a prognosticator of dosage requirements. *Am J Psychiatry*. 1973; 130(5):601-3.
- 23.Cooper TB, Simpson GM. The 24-hour lithium level as a prognosticator of dosage requirements: a 2-year follow-up study. *Am J Psychiatry*. 1976; 133(4):440-3.
- 24.Schrauzer GN. Lithium: occurrence, dietary intakes, nutritional essentiality. *J Am Coll Nutr*. [Review]. 2002; 21(1):14-21.
- 25.Schrauzer GN, Shrestha KP, Flores-Arce MF. Lithium in scalp hair of adults, students, and violent criminals. Effects of supplementation and evidence for interactions of lithium with vitamin B12 and with other trace elements. *Biol Trace Elem Res*. 1992; 34(2):161-76.
- 26.Schopfer J, Schrauzer GN. Lithium and other elements in scalp hair of residents of Tokyo Prefecture as investigational predictors of suicide risk. *Biol Trace Elem Res*. 2011; 144(1-3):418-25
- 27.Li J, Zhao L, Wang Z, Zhao X, Wu J. Association of Serum Indirect Bilirubin Concentrations With Motor Subtypes of Parkinson's Disease. *Neurodegener Dis*. 2019; 19:155–161
- 28.Moccia M, Picillo M, Erro R, et al. Increased bilirubin levels in de novo Parkinson's disease. *Eur J Neurol*. 2015; 22(6): 954–959. doi:10.1111/ene.12688.
- 29.Macias-Garcia D, Mendez-Del Barrio C, Jesus S, Labrador MA, Adarmes-Gomez A, Vargas-Gonzalez L, Carrillo F, et al. Increased bilirubin levels in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2019; 63: 213-216.
- 30.Songsomboon C, Tanprawate S, Soontornpun A, Wantaneeyawong W, Louthrenoo W. Serum Uric Acid, Serum Uric Acid to Serum Creatinine Ratio and Serum Bilirubin in Patients With Parkinson's Disease: A Case-Control Study. *J Clin Med Res*. 2020; 12: 172-179

31. Kim AJ, Shi Y, Austin RC, Werstuck GH. (2005). Valproate protects cells from ER stress-induced lipid accumulation and apoptosis by inhibiting glycogen synthase kinase-3. *J Cell Sci.* 2005; 118: 89–99. doi:10.1242/jcs.01562

32. Minaei A, Sarookhani MR, Haghdoost-Yazdi H, Rajaei F. Hydrogen sulfide attenuates induction and prevents progress of the 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rat through activation of ATP-sensitive potassium channels and suppression of ER stress. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2021 423.115558