بسم الله الر حمن الرحيم

دانشکده علوم

بخش زیست شناسی

پایان نامه تحصیلی برای دریافت درجه کارشناسی ارشد زیست شناسی گرایش فیزیولوژی جانوری

بررسی اثر ارکسین آ بر سمیت سلولی ناشی از ٦-هیدروکسی دوپامین بر سلول‌های SH-SY5Y

مؤلف:

سمیه وظیفه خواه ده جبار

استاد راهنما:

دکتر سعید اسماعیلی ماهانی

استاد مشاور:

دکتر مهدی عباس نژاد

بهمن ماه ۱۳۹۱

این پایان نامه به عنوان یکی از شرایط درجه کارشناسی ارشد به

بخش زیست شناسی

دانشکده علوم

دانشگاه شهید باهنر کرمان

تسلیم شده است و هیچگونه مدرکی به عنوان فراغت از تحصیل دوره مزبور شناخته نمی شود.

دانشجو : سمیه وظیفه خواه ده جبار

استاد راهنما : دکتر سعید اسماعیلی ماهانی

استاد مشاور : دکتر مهدی عباس نژاد

داور ۱ : دکتر ایران پورابولی

داور۲ : دکتر علی گل

معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشکده :

حق چاپ محفوظ و مخصوص به دانشگاه شهید باهنر کرمان

تقدیم به:

پدر، مادر و همسر مهربانم

و آنان که به من آموختند از ازل تا به ابد

تشکر و قدردانی:

پیش از سپاس ناتوانی‌ام بر سپاس را بپذیر ای بی‌همتا، که یکایک لطف‌های بی‌دریغت را تا انتهای بی‌نهایت سپاس گزارم.

آقای دکتر سعید اسماعیلی ماهانی، استاد راهنمای محترم

تا همیشه سپاس، بهر بی‌دریغ یاری‌هایتان، بهر صبوری‌های بی‌وصف و درک والایتان.

بهره‌مندی‌ام از محضر علم و اخلاقتان را همیشه با افتخار یاد خواهم کرد.

و با سپاس از جناب آقای دکتر مهدی عباس نژاد استاد مشاور محترم

به پاس رهنمودهای راهگشایشان

داوران محترم جناب آقای دکتر گل و سر کار خانم پورابولی

آغازین تا واپسین راهنماییهایتان را تا هماره سپاس می‌گویم و همکاری صمیمانه شما را در پذیرفتن داوری این پایان‌نامه و نظرات مفیدتان بی‌نهایت سپاس‌گزارم.

و

از اساتید و کارکنان محترم بخش زیست شناسی دانشگاه شهید باهنر کرمان که از محضرشان کسب علم و معرفت نمودم کمال سپاسگزاری را دارم

همچنین از دوستان عزیزم آقایان ، حمزه پاسبان و رسول سمندری، و خانم ها نسرین جنگجو، محدثه چهکندی، سعیده صدیقی، زهرا حاجعلیزاده، بهاره ابراهیمی، لیلا الیاسی، فرزانه فلاحی، فاطمه درویش زاده، و کمال تقدیر و تشکر را دارم.

چکیده:

بیماری پارکینسون یک اختلال تخریب کننده نورونی شدید و پیش رونده سیستم عصبی مرکزی است. برای اکثر بیماری‌های تخریب کننده عصبی اقدامات درمانی موجود فقط به صورت تسکین دهنده هستند. به علت اینکه شواهد علمی متعدد پیشنهاد می‌کنندکه دربسیاری از بیماری‌های تخریب کننده نورونی مرگ سلولی غیر عادی رخ می‌دهد، لذا داروهایی که بتوانند مرگ سلولی را متوقف کنند ممکن است از تخریب نورونی بیشتر جلوگیری کرده و پیشرفت بیماری را آهسته کنند. تحریک گیرنده های ارکسینی اثرات محافظت کننده از خود نشان می‌دهد و در بیماری پارکینسون کاهش نورون‌های ارکسینرژیک و نقصان عملکرد اورکسینرژیکی رخ می دهد. بنابراین، مطالعه حاضر جهت بررسی نقش فعالیت گیرنده های ارکسین بر سمیت سلولی ناشی از ۶-هیدروکسی دوپامین بر روی سلول‌های SH-SY5Y به عنوان مدل *in vitro* بیماری پارکینسون طراحی شد. جهت القاء سمیت سلولی، سلول‌های SH-SY5Y با ۱۵۰ میکرومول ۶-هیدروکسی دوپامین تیمار شدند. در گروه‌های درمانی دوزهای مختلف ارکسین A (۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ پیکومول) جهت بررسی اثر احتمالی محافظت کننده آنها استفاده شد. سمیت سلولی توسط تست MTT تعیین شد. میزان ROS داخل سلولی توسط پروب فلورسنس دی‌کلرو فلورسین دی استات از طریق روش فلوریمتری ارزیابی شد. قطعه قطعه شدن DNA وپارامترهای بیوشیمیایی آپوپتوز (Bax, Bcl2، cytochorome c وcaspase3) به ترتیب توسط الکتروفورز در ژل آگارز و ایمونوبلاتینگ ارزیابی شدند. نتایج ما نشان دادند که ۶-هیدروکسی دوپامین منجر به افزایش میزان آسیب سلولی، تولید ROS داخل سلولی، فعال شدن کاسپاز۳، افزایش بیان cytochorome c، قطعه‌قطعه شدن DNA و همچنین افزایش نسبت Bax/Bcl2 می‌گردد. تیمار با ارکسین A (۸۰ پیکومول) اختلالات سلولی و مولکولی ذکر شده را کاهش می‌دهد. روی هم رفته نتایج پیشنهاد می‌کنند که ارکسین A در برابر آپوپتوز القاء شده در اثر ۶-هیدروکسی دوپامین اثر محافظت کننده نورونی دارد. حداقل بخشی از این اثر محافظت کننده به واسطه کاهش آپوپتوز نورونی اعمال می‌گردد و پیشنهاد کننده پتانسیل ارکسین A برای کاهش تخریب عصبی سلول‌های دوپامینرژیک می‌باشد.

کلمات کلیدی: ارکسین A ، ۶-هیدروکسی دوپامین، آپوپتوز، سلول‌هایSH-SY5Y.

فهرست مطالب:

فصل اول.....۱
۱-۱ معرفی بیماری پارکینسون.....۲
۱-۲ علائم زیستی بیماری پارکینسون.....۴
۱-۳ فاکتورهای دخیل در بیماری پارکینسون.....۵
۱-۳-۱ افزایش سن.....۵
۱-۳-۲ فاکتورهای محیطی.....۵
۱-۳-۳ ۶-هیدروکسی دوپامین و بیماری پارینسون.....۱۱
۱-٤ سیستم یوبی‌کوئیتین پروتئوزوم و بیماری پارکینسون ۱۶
۱-۵ فاکتورهای ژنتیکی دخیل در پارکینسون.....۱۶
۱-۶ التهاب عصبی و بیماری پارکینسون.....۲۰
۱-۷ اختلال عملکرد سد خونی مغزی در بیماری پارکینسون.....۲۱
۱-۸ عدم فیلترشدن سلول‌های ایمنی محیطی در بیماری پارکینسون ۲۱
۱-۹ کشف سیسم ارکسین.....۲۱
۱-۹-۱ ویژگی عمومی ارکسین‌ها و گیرنده‌هایش.....۲۲
۱-۹-۲ ارکسین در سیستم عصبی مرکزی.....۲۳
۱-۹-۳ اثرات عمومی ارکسین‌ها.....۲۵
۱-۹-۴ اثرات سلولی ارکسین‌ها.....۲۵
۱-۱۰ بیماری های مرتبط با سیستم ارسینرژیک.....۲۸
۱-۱۱ بیماری پارکینسون وسیستم ارکسینرژیک.....۲۸
۱-۱۲ اهداف تحقیق.....۲۹

فصل دوم ۳۰
۲-۱ مواد و روش ها ۳۱
۲-۱-۱ وسایل مورد استفاده: ۳۱
۲-۱-۲ مواد و داروهای مورد استفاده: ۳۱
۲-۱-۳ بافر ها و محلول های مورد استفاده ۳۲
۲-۱-۳-۱ محلول تشکیل دهنده ژل بالا با غلظت ۵ درصد ۳۲
۲-۱-۳-۲ محلول تشکیل دهنده ژل پایین با غلظت ۱۲ درصد ۳۲
۲-۱-۳-۳ بافر نمونه ۳۲
۲-۱-۳-۴ بافر رانینگ ۳۲
۲-۱-۳-۵ بافر TBS-T ۳۲
۲-۱-۳-۶ بافر انتقال ۳۳
۲-۱-۳-۷ بافر زداینده ۳۳
۲-۱-۳-۸ محلول برادفورد ۳۳
۲-۱-۳-۹ بافر TNE ۳۳
۲-۱-۳-۱۰ بافر TBE ۳۳
۲-۲ کشت سلول ۳۳
۲-۳ سنجش بقای سلولی ۳٤
۲-۳-۱ MTT assay ۳۴
۲-۳-۱-۱ گروهای مورد آزمایش در تست MTT ۳۵
۲-۴ سنجش ROS داخل سلولی ۳۶
۲-۴-۱ گروه‌های مورد استفاده در تست ROS داخل سلولی ۳۷
۲-۵ استخراج DNA از سلول های SH-SY5Y ۳۷
۲-۵-۱ گروه های مورد آزمایش جهت استخراج DNA ۳۸
۲-۶ قطعه قطعه شدن DNA ۳۹

۲-۷ بررسی میزان پروتئین‌های درگیر در آپوپتوز (Bax,Bcl-2, Caspase3,Cytochorome c) با استفاده از متد وسترن بلات..... ۳۹
۲-۷-۱ گروه های مورد آزمایش در وسترن بلات..... ۳۹
۲-۷-۲ استخراج پروتئین از سلول های SH-SY5Y..... ۳۹
۲-۷-۳ اندازه گیری کل پروتئین..... ۴۰
۲-۷-۴ الکتروفورز پروتئین ها روی ژل SDS-PAGE..... ۴۱
۲-۷-۵ انتقال از ژل به کاغذ PVDF..... ۴۲
۲-۷-۶ بلاکینگ..... ۴۳
۲-۷-۷ مرحله شستشو..... ۴۳
۲-۷-۸ اضافه کردن آنتی بادی اولیه..... ۴۴
۲-۷-۹ اضافه کردن آنتی بادی ثانویه ۴۴
۲-۷-۱۰ افزودن سوبسترا و ثبت باندهای نورانی روی فیلم رادیولوژی..... ۴۴
۲-۷-۱۱ ظهور فیلم..... ۴۵
۲-۷-۱۲ زدودن آنتی بادی های متصل به آنتی ژن از روی کاغذ و کنترل لودینگ نمونه ها..... ۴۵
۲-۷-۱۳ آنالیز تصاویر گرفته شده از باندهای پروتئینی..... ۴۶
۲-۷-۱۴ آنالیز آماری..... ۴۶
فصل سوم ۴۷
۳-۱ نتایج..... ۴۸
۳-۱-۱بررسی تأثیرات غلظت‌های متفاوت ٦-هیدروکسی دوپامین بر بقای سلول‌های SH-SY5Y.. ۴۸
۳-۱-۲ بررسی اثرات دوزهای متفاوت ارکسین A بر سلول‌های SH-SY5Y..... ۴۹
۳-۲-۳ بررسی اثرات دوزهای متفاوت ارکسین A بر بقای سلول‌های SH-SY5Y کشت شده در حضور ٦-هیدروکسی دوپامین..... ۴۹
۳-۱-۴ بررسی اثر دوز موثر ارکسین A بر میزان ROS داخل سلولی ناشی از ۶-هیدروکسی دوپامین..... ۵۰
۳-۱-۵ آنالیز نتایج به دست آمده از وسترن بلات برای پروتئین‌های درگیر در آپوپتوز سلولی..... ۵۱

۳-۱-٦ بررسی ارکسین A بر قطعه قطعه شدن DNA ناشی از ٦-هیدروکسی دوپامین.....۵۵
فصل چهارم.....۵٦
۴-۱ بحث و نتیجه‌گیری:.....۵۷
٤-۲ بروز استرس اکسیداتیو و آپوپتوز در بیماری پارکینسون.....۵۷
٤-۳ عملکردهای کانال‌های کلسیم و بیماری پارکینسون.....۶۱
۴-۳ نتیجه‌گیری.....۶۲
۴-۴ پیشنهادها.....۶۳

فهرست اشکال:

شکل ۱ - ۱: مکانسیم القاء سمیت عصبی توسط ٦-هیدروکسی دوپامین.....۱۳
شکل ۱-۲ ساختار ارکسین ها.....۲۲
شکل ۲-۱ روش برادفورد.....۴۰
شکل ۳ - ۱:بررسی اثر غلظت‌های متفاوت ٦-هیدروکسی دوپامین بر بقای سلول‌های SH-SY5Y با استفاده از تست MTT ۴۸
شکل ۳ - ۲: بررسی اثر غلظت‌های ارکسین A بر بقای سلول‌های SH-SY5Y با استفاده از تست MTT.....۴۹
شکل ۳ - ۳: بررسی اثردوز موثر ارکسین A بر بقای سلول‌های SH-SY5Y در حضور ۶-هیدروکسی دوپامین با استفاده از تست MTT.....۵۰
شکل ۳ - ۴: بررسی اثردوز موثر ارکسین A بر میزان ROS تولید شده در حضور ۶-هیدروکسی دوپامین.....۵۱
شکل ۳ - ۵: بررسی بیان کاسپاز ۳ فعال شده در گروه‌های تیمار شده با ۶-هیدروکسی دوپامین و ارکسین A.....۵۲
شکل۳ - ۶: بررسی بیان نسبت Bax/Bcl-2 در گروه‌های تیمار شده با ۶-هیدروکسی دوپامین و ارکسین A.....۵۳
شکل۳-۷: بررسی بیان cytochorome c در گروه‌های تیمار شده با ۶-هیدروکسی دوپامین و ارکسین A.....۵۴

شکل۳- ۸: بررسی قطعه قطعه شدن DNA در حالت تیمار شده با ۶-هیدروکسی دوپامین و ارکسین A.....**۵۵**

فهرست جدول‌ها:

جدول۱-۱: ژن های درگیر در PD، جایگاه و عملکردهای احتمالی آنها.....**۱۷**
جدول۳-۱: جایگاه، سیناپس و اعمال ارکسین ها.....**۲۷**

فصل اول

کلیات و پیشینه پژوهش

۱-۱ معرفی بیماری پارکینسون:

بیمار ی پارکینسون یک اختلال مزمن پیشرونده و تخریب کننده عصبی است که در سرتاسر جهان و در تمام گروه های قومی و در هر دو جنس رخ می دهد (Veldman et al., 1998) و به عنوان دومین بیماری تخریب کننده عصبی رایج در بین افراد پس از بیماری آلزایمر می‌باشد که اخیرا شیوع آن افزایش یافته است. میزان شیوع این بیماری درافراد بالای ۵۰ سال حدوداً ۲ درصد گزارش شده است (Schapira., 2008).

پارکینسونیسم یا پارکینسون ثانویه در اثر مسمومیت با منگنز، مسمومیت با مونوکسیدکربن، ضربه مزمن و مداوم به سر و برخی مواد مخدر تزریقی ممکن است ایجاد گردد که علائمی مشابه با پارکینسون دارد. اولین گزارشات مربوط به پارکینسونیسم به ۵۰۰۰ سال قبل از میلاد در هندوستان بر می‌گردد تا اینکه در سال ۱۸۱۷ دکتر جیمز پارکینسون اولین گزارشات مربوط به بیماری پارکینسون را ارائه داد(Elbaz et al., 2002).

بیماری پارکینسون همراه با اختلالات حرکتی می‌باشد که می‌توان به سفتی عضلانی ، لرزش در حال استراحت، آکینزی یا مشکل در شروع حرکات، کاهش حرکات خود بخودی و برادی کینزی یا آهسته بودن حرکات، ضعف در حفظ تعادل، کاهش حرکات وابسته یعنی حرکات ناخود آگاه طبیعی بدن مانند تغییر حالات چهره به هنگام صحبت کردن اشاره کرد (Barrett et al., 2009).

در بیماری پارکینسون کاهش نورون‌های جسم سیاه از یک الگوی ویژه با حساسیت بیشتر در ناحیه شکمی جسم سیاه پیروی می کند. در اثر این بیماری ۵۰ تا ۷۰ درصد نورون‌های دوپامینرژیک این ناحیه تخریب می شوند. علاوه بر نورون‌های دوپامینرژیک سایر جمعیت‌های نورونی نیزکه شامل بخش‌هایی از لوکوس سرلئوس[۱] (نورآدرنرژیک)، هسته‌های رافه[۲] (سروتونرژیک)،هسته‌های ماینرت[۳] و هسته حرکتی پشتی واگ[۴] (کولینرژیک)، قشر سینگولیت[۵]، قشر اینتورینال[۶]، پیاز بویایی[۷] و گانگلیون‌های سمپاتیک و پاراسمپاتیک در روده نیز متاثر می‌گردند. تخریب برخی از این نواحی غیر

---

[1] -Locus coeruleus
[2] -Raphe nucleus
[3] -Meynert nucleus
[4] -Dorsal motor nucleus of vagus
[5] -Cingulate cortex
[6] -Entorinal cortex
[7] -Olfactory bulb

دوپامینرژیک با علائم ثانویه بیماری پارکینسون از قبیل جنون، اختلالات شناختی، غیر حرکتی، خواب واتونومیک مرتبط می‌باشند(Lee and Liu., 2008).

یکی از نظریه‌هایی که در مورد علت بیماری پارکینسون مطرح است این است که این بیماری ناشی از یک عدم تعادل بین تحریک و مهار در عقده های قاعده ای در اثر مهار دوپامینی پوتامن می‌باشد. در نتیجه، خروجی مهاری از پوتامن به قطعه خارجی گلوبوس پالیدوس افزایش یافته و منجر به کاهش خروجی مهاری از گلوبوس پالیدوس خارجی به هسته زیر تالاموسی می‌گردد که این امر به نوبه خود موجب افزایش خروجی تحریکی به قطعه داخلی گلوبوس پالیدوس از هسته زیر تالاموسی می‌گردد. افزایش تحریک گلوبوس پالیدوس داخلی باعث افزایش مهار تالاموس شده، در نتیجه خروجی تحریکی از تالاموس کاهش یافته و در اثر کاهش تحریک قشر اختلالات حرکتی بروز می‌یابند(Barrett et al., 2009).

علاوه بر تخریب نورون‌های دو پامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه از دیگر علامت‌های بیماری پارکینسون وجود یکسری تجمعات سیتوپلاسمی داخل نورونی که به اجسام لوی معروف هستند می‌باشد. اجسام لوی اولین بار توسط فردریش لوی در سال ۱۹۱۲ معرفی شدند از نظر مورفولوژیکی اجسام لوی دو نوع اند، کلاسیک یا اجسام لوی ساقه مغزی و اجسام لوی قشری. اجسام لوی کلاسیک به صورت یکسری تجمعات کروی ائوزینوفیلی سیتوپلاسمی متشکل از یک هسته متراکم و یک هاله nm ۱۰از تعدادی پروتئین مانند آلفا سینوکلئین[1]، پارکین[2]، یوبی کوئیتین[3]، سین فیلین[4] و نوروفیلامنت[5] می‌باشند. در مقابل اجسام لوی قشری فاقد هاله است ولی اجزاء تشکیل دهنده همان پروتئین ها می‌باشد (Popescu et al., 2004). ضخامت اجسام لوی حدوداً ۱۵ میکرومتر است و پراکندگی آنها در سراسر مغز افراد پارکینسونی از فردی به فرد دیگر متفاوت است. پراکندگی آناتومیک اجسام لوی اغلب به طور مستقیم به میزان بیان و درجه علائم بالینی در هر فرد مرتبط است(Togo et al., 2001 و Spillantini et al., 1998) .

اجسام لوی علاوه بر بیماری پارکینسون در سایر بیماری ها مانند آلزایمر و در افراد سالم نیز با افزایش سن دیده می‌شوند. علی رغم وجود اجسام لوی در حالات بیماری، نقش اجسام لوی در مرگ

---

[1] -α-synuclein
[2] -Parkin
[3] -Ubiquitin
[4] -Synphilin
[5] -Neurofilament

سلول‌های عصبی نامشخص است و جای بحث دارد. اگر چه این تجمعات پروتئینی به علت اختلال در فرایند های سلولی طبیعی یا مصادره کردن پروتئین‌هایی که برای بقای سلولی مهم‌اند ممکن است برای نورون‌ها سمی باشند، احتمال دیگر این است که اجسام لوی ممکن است با به‌دام انداختن پروتئین‌های مضر در تجمعات پروتئینی محافظت کننده باشند (Lee and Liu., 2008) .

۱-۲ علائم زیستی بیماری پارکینسون:

شواهد قانع کننده‌ای وجود دارد که روند بیماری عصبی پارکینسون چند سال قبل از شروع تظاهرات حرکتی آغاز می‌شود. مطالعات اپیدمیولوژیک، تظاهرات غیر حرکتی زیادی را قبل از شروع اختلالات حرکتی نشان می‌دهند.

به نظر می رسد جسم سیاه در اوایل بیماری در امان مانده باشد، در حالیکه سایر نقاط مغز مانند، ساقه مغز، لوب بویایی، سیستم عصبی اتونوم، اجسام بادی در حال تجمع هستند بنابراین برآوردهای قبلی در مورد پیشرفت بیماری پارکینسون که متمرکز به ماده سیاه بود در حال حاضر به نظر نادرست می آید مطالعات نشان می دهد که تظاهرات ابتدایی بیماری پارکینسون خارج از سیستم عصبی مرکزی اتفاق می‌افتد(Savica et al., 2010).

۱-۲-۱ یبوست:

اختلال سیستم اتونوم در بیشتر بیماران پارکینسونی در طول دوره بیماری مشاهده می شود که یبوست احتمالا شایع ترین تظاهر می باشد یبوست مربوط به اختلال در حرکات کولون است مطالعات انجام شده پیشنهاد میکند که یبوست گاهی ممکن است ۱۰ تا ۲۰ سال قبل از شروع علائم حرکتی در بیماران وجود داشته باشد (Savica et al., 2010).

۱-۲-۲ اختلال رفتار خواب با حرکات سریع چشم[1](RBD) :

خواب با حرکات سریع چشم در بیماران پارکینسونی شایع است و غالبا از نشانه‌های است که قبل از علائم حرکتی بروز می کند. ۳۸ درصد از مبتلایان به پارکینسون این اختلال را دارند. در حقیقت RBD به طور کلی با آلفاسینوکلئوپاتی مرتبط است، و فقط شامل بیماران پارکینسونی نمی شود، بلکه در جنون همراه با اجسام بادی و آتروفی هم مشاهده می‌شود

همچنین اختلالات اضطرابی و بویایی، افسردگی و کم خونی نیز علائم زیستی بیماری پارکینسون قبل از علائم حرکتی می‌باشد(Boeve et al., 2001 و Savica et al., 2010).

[1] -rapid eye movement sleep behavior disorder

۱-۳ فاکتورهای دخیل در بیماری پارکینسون:

فاکتورهای دخیل در بیماری پارکینسون منجر به اختلال در عملکرد میتوکندریایی، استرس اکسیداتیو و فعال شدن مسیرهای آپوپتوزی می‌گردنند که در نهایت باعث تخریب نورون‌های دوپامینرژیک می‌گردند(lin et al., 2009).

این فاکتورها عبارتند از :

۱-افزایش سن

۲-فاکتورهای محیطی

۳-فاکتورهای ژنتیکی

۱-۳-۱ افزایش سن:

در افراد طبیعی با افزایش سن میزان دوپامین و تعداد رسپتورهای آن در داخل عقده‌های قاعده‌ای به طور دائم کاهش یافته و ظاهراً این تسریع درکاهش موجب بروز بیماری پارکینسون می‌گردد(Rascol et al., 2003).

۱-۳-۲ فاکتورهای محیطی:

اگر چه اکثر موارد بیماری پارکینسون غیر ارثی‌اند اما منشاء آن‌ها به میزان زیادی نامشخص باقی مانده است. مطالعات اپیدمیولوژیک مشخص کرده است که فاکتورهای محیطی در آسیب تخریب کننده عصبی نقش مهمی ایفا می‌کنند ایده مشارکت عوامل محیطی از کشف سم ۱-متیل۱-۴فنیل-۱،۲،۳۶-تتراهیدروپیریدین یا MPTP ناشی شده است که این محصول به صورت انتخابی در انسان و مدل‌های آزمایشگاهی باعث مرگ نورون‌های جسم سیاه می شود. مطالعات اپیدمیولوژیک حاکی از این است که قرار گرفتن در معرض آفت کش‌ها، فلزات، بی فنیل پرکلرات، برخی حلال‌ها، برخی مواد دیگر خطر ابتلا به بیماری پارکینسون را افزایش می‌دهند(Berry and Vecchia., 2010). فاکتورهای محیطی آسیب رسان توسط سه مکانیسم استرس اکسیداتیو ایجاد می‌کنند:

۱-القاء تولید ROS[1]

۲- تغییر متابولیسم میتوکندریایی

۳- تغییر سیکل اکسیداسیون احیاء (Franco.,2009).

[1]-Reactive oxygen spices

استرس اکسیداتیو اغلب به عنوان یکی از علل اصلی پیشبرد انحطاط جسم سیاه معرفی می شود. در چندین مطالعه آسیب پذیری بالای نورون‌های دوپامینرژیک جسم سیاه به گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن به اثبات رسیده است. استرس اکسیداتیو توسط عدم تعادل بین تولید گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن و توانایی غیرسمی کردن متابولیت های فعال تولید شده و ترمیم آسیب‌های ایجاد شده مشخص می‌گردد. گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن یاROS شامل رادیکال‌های آزاد مشتق از اکسیژن (مولکول‌های دارای یک یا تعداد بیشتری الکترون جفت نشده در خارجی ترین لایه والانسی) مانند آنیون سوپراکسید، رادیکال هیدروکسیل و همچنین مشتقات غیر رادیکالی اکسیژن مانند هیدروژن پراکسید می‌باشند (Franco et al., 2010).

منابع تولید ROS متعددی داخل سلول وجود دارند. یکی از تولید کننده‌های اصلی ROS خانواده‌ای از آنزیم‌های متصل به غشاء که جهت فعالیت‌شان متکی به NADPH[1] می‌باشند. منبع دیگر تولید اکسید کننده‌های داخل سلولی میتوکندری می‌باشد، شواهد زیادی وجود دارند که پیشنهاد می‌کنند اکسید کننده‌های میتوکندریایی غالباً در کمپلکس I وIII زنجیره تنفسی میتوکندری شکل می‌گیرند. علاوه بر میتوکندری و NADPH اکسیداز منابع دیگر تولید ROS داخل سلولی نیز، موجودند مانند گروهی از آنزیم‌های داخل سلولی شامل گزانتین‌اکسیداز[2]، سیکلواکسیژناز[3]، آنزیم سیتوکروم P۴۵۰ و لیپواکسیژناز[4]که به عنوان بخشی از فعالیت آنزیمی طبیعی‌شان اکسیدکننده‌ها را نیز تولید می‌کنند (Guiree and Lambeth., 2010).

آنیون سوپر اکسید تولید شده توسط این اکسیدکننده‌ها با نیتریک اکسید حاصل از فعالیت نیتریک اکسید سنتاز منجر به شکل گیری طیف وسیعی از اکسیدکننده‌ها و نیترات‌کننده‌ها مانند پراکسی نیتریت می‌گردند. آنیون سوپر اکسید همچنین به کمک سوپر اکسید دیسموتاز توسط فعالیت آنزیمی یا غیر آنزیمی تبدیل به هیدروژن پراکسید می‌گردد. هیدروژن پراکسید همچنین می‌تواند توسط میلو پراکسیداز (MPO[5]) هیپوکلروس‌اسید و سایر اکسیدکننده‌های مضر مشتق از کلر را تولید کند. بعلاوه از طریق واکنش فنتون[6] تبدیل به یون هیدروکسیل گردد.

---

[1] -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
[2] -Xanthine oxidase
[3] -Cyclooxygenase
[4] -Lipoxygenase
[5] -Myeloperoxidase
[6] -Fenton

بنابراین شکل‌گیری یک گونه واکنش پذیر می‌تواند نهایتاً منجر به تقویت یک زنجیره تولید کننده از سایر گونه‌های واکنش پذیر سمی گردد(Franco et al., 2010).

سلول‌ها دارای مکانیسم‌های آنتی اکسیدانی ذاتی_اند که ROS تولید شده تحت هر دو شرایط فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی را سمیت زدایی می‌کنند. گلوتاتیون احیاء شده[1](GSH) مهمترین مولکول آنتی اکسیدان سلول است و به علت غلظت سیتوزولی بالایش می‌تواند مستقیماً ROSهایی مانند آنیون سوپراکسید، هیدروکسیل و نیتریک اکسید را از سلول بزداید. هیدروژن پراکسید توسط کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) به آب احیاء می‌گردد. سیستم گلوتاتیون ردوکتاز[2](GR) و تیوردوکسین ردوکتاز[3](TRX)، گلوتاتیون و تیورودوکسین اکسید شده را با مصرف NADPH دوباره احیاء می‌کنند. سایر مولکول‌های آنتی اکسیدان مانند آسکوربات یا ویتامین E و آنزیم هایی مانند پراکسی ردوکسین[4] در برابر استرس اکسیداتیو حمایت های مهمی محسوب می‌گردند (Ryter et a.l., 2007). 2007

پراکسیداسیون لیپیدها اشاره به تخریب اکسید کننده لیپیدها دارد که طی آن به واسطه گرفتن اتم هیدروژن از اسیدهای چرب غیر اشباع آب و یک رادیکال اسید چرب تولید می‌گردد، رادیکال‌های اسید چرب آزاد نیز با آب واکنش داده و رادیکال‌های لیپید پراکسیل تولید می‌گردد که نهایتاً با سایر رادیکال‌های اسید چرب آزاد واکنش داده و باعث افزایش آسیب می‌گردد.

تغییرات اکسیداتیو پروتئین‌ها طیف وسیعی از فعالیت‌های کینازی، فسفاتازی، پروتئازی، چاپرون‌ها و فاکتورهای رونویسی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. اسیدهای آمینه مانند سیستئین، متیونین، تریپتوفان و تیروزین در برابر تغییرات اکسید کننده بسیار حساس‌اند(West and Marnett., 2006).

1-3-2-1 آفت‌کش ها و بیماری پارکینسون:

آفت‌کش‌ها تنها روی گونه هدفشان موثر نیستند بلکه اثراتی روی سایر گونه‌های غیر هدف مانند انسان نیز دارند. سمیت آفت کش‌ها به وضوح مشخص شده است که طیف وسیعی از فعالیت‌های فیزیولوژیکی را تغییر می‌دهند، بعلاوه شواهد موجود بیان می‌کنند که قرار گرفتن در معرض آفت

[1] -Reduced glutathione
[2] -Glutathione reductase
[3] -Thioreduxin reductase
[4] -Peroxiredoxin

کش‌ها همچنین خطر ابتلا به سرطان و بیماری‌های تخریب کننده عصبی را افزایش می‌دهند(Costa et al., 2008).

۱-۳-۲-۱-۱ پاراکوات:

پاراکوات (۱و/۱ دی متیل ۴و/۴ پی پیریدینیوم دی کلراید) یک علف کش با سمیت بالاست ، به علت قیمت پایین و عملکرد سریع به طور گسترده‌ای در سرتاسر جهان مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ترکیب به راحتی از مسیر گوارشی و پوست جذب می‌گردد. حتی پیشنهاد می‌گردد که متابولیت‌های پاراکوات خیلی راحتر از خودش جذب می‌گردند. هرچند پاراکوات به ندرت متابولیزه می‌گردد و تقریباً بدون تغییر در ادرار دفع می‌گردد اما برخی شواهد حاکی از این است که احتمالاً توسط میکروفلور روده متابولیزه می‌گردد (Shimada et al., 2002).

قرار گرفتن در معرض پاراکوات موجب اختلال در عملکرد پروتئازوم و تجمع آلفا سینوکلئین می‌گردد. عموماً آفت‌کش‌ها تعادل اکسایش- احیا سلولی را توسط مکانیسم‌های متعددی تغییر می‌دهند، شامل تبدیل آنزیمی‌شان به فراورده‌های اکسید کننده ثانویه یا ROS ، حذف حمایت آنتی اکسیدانی و آسیب به عملکرد آنزیم‌های آنتی اکسیدانی.

پاراکوات پس از عبور از سد خونی‌مغزی، از طریق ناقل دوپامین(DAT[1]) وارد نورون‌های دوپامینرژیک می‌گردد سپس از غشاء خارجی میتوکندری توسط یک ناقل عبور کرده و در غشاء داخلی توسط کمپلکس I زنجیره تنفسی میتوکندریایی احیاء می‌گردد و سمیت خود را ایجاد می‌کند. پاراکوات همچنین می‌تواند توسط منابع دیگری مانند آستروسیت‌ها و گلیال‌ها تولید ROS را فعال کند.

پاراکوات توسط آنزیم NADPH- Cytocrome p450 reductase تبدل به فرم تک کاتیونی خودش(PQ^{+}) می‌گردد این رادیکال به طور خود بخودی با اکسیژن وارد واکنش شده و منجر به تولید سوپراکسید و تولید دوباره فرم دوکاتیونی پاراکوات(PQ^{++}) می‌گردد. طی این واکنش NADPH مصرف می‌گردد که جهت احیاء گلوتاتیون اکسید شده (GSSG) به گلوتاتیون احیاء شده (GSH) ضروری است بنابراین پاراکوات با مصرف NADPH به عملکرد آنتی اکسیدانی نیز آسیب وارد می‌کند. (Suntres., 2002) .

[1] -Dopamine transporter

مشخص شده است که آپوپتوز القاء شده توسط پاراکوات اساساً مسیر داخلی میتوکندریایی را درگیر می‌کند. در بیماری پارکینسون مرگ سلولی توسط آپوپتوز در نتیجه اختلال عملکرد میتوکندریایی بوجود می‌آید که باعث افزایش استرس اکسیداتیو و کاهش تولید ATP می‌گردد. پاراکوات باعث القاء رهایش سیتوکروم c و فعال شدن کاسپاز ها می‌گردد که باعث فعال شدن پروتئین‌های پیش برنده آپوپتوزی Bax[1] و Bak[2] می‌گردد. القاء فعالیت پروتئین‌های پیش برنده آپوپتوز در پاسخ به پاراکوات وابسته به پروتئین p53 نیز می‌باشد. آسیب به DNA نیز مشخص شده است آپوپتوز را القاء می‌کند به طوری که بلوک کردن همانندسازی DNA همراه با آسیب DNA منجر به فعال شدن p53 می‌گردد که باعث فعال شدن رونویسی فاکتورهای پیش برنده آپوپتوز می‌گردد. علاوه بر آسیب به DNA مسیر آپوپتوزی دیگر استرس شبکه آندوپلاسمی می‌باشد که به طور مستقل یا وابسته به مسیر میتوکندریایی عمل می‌کند. شبکه آندوپلاسمی به استرسور هایی که سطوح انرژی سلولی، حالت اکسیداسیون-احیاء و غلظت کلسیم سلولی را دچار اختلال کنند به شدت حساس است، استرس شبکه آندوپلاسمی منجر به فعال شدن JNK[3]، IRE1[4] و ASK1[5] می‌گردد که پیام آپوپتوزی از شبکه آندوپلاسمی به میتوکندری منتقل و در نهایت منجر به فعال شدن کاسپاز ها می‌گردد.

همچنین مشخص شده است که پاراکوات از طریق اکسید کردن تیوردوکسین(TRX) احتمالاً منجر به فعال شدن مسیرهای پیام رسان ASK1/JNK می‌گردد(Youle and Strasser., 2008).

۱-۳-۲-۱-۲ دی کوات[6]:

این ترکیب (۱و/۱ اتیلن ۲و/۲ دی پیریدیلیوم دی بروماید) نیز یک آفت‌کش است که برای اهدافی مشابه پاراکوات استفاده می‌گردد و قرار گرفتن در معرض آن نیز همراه با خطر ابتلا به بیماری پارکینسون می‌باشد. دی کوات نیز منجر به استرس اکسیداتیو می‌گردد، گزارش شده است که این ترکیب از طریق مهار کمپلکس I و III میتوکندریایی موجب تولید ROS می‌گردد
(Barkay and Langston., 2005) .

---

[1] -Bcl2 associated x protein
[2] -Bcl2 homologous antagonist/killer
[3] -C-jun N-terminal kinase
[4] -Inositol-reguiring enzyme 1
[5] -Apoptosis signal regulating kinase 1
[6] -Diquat