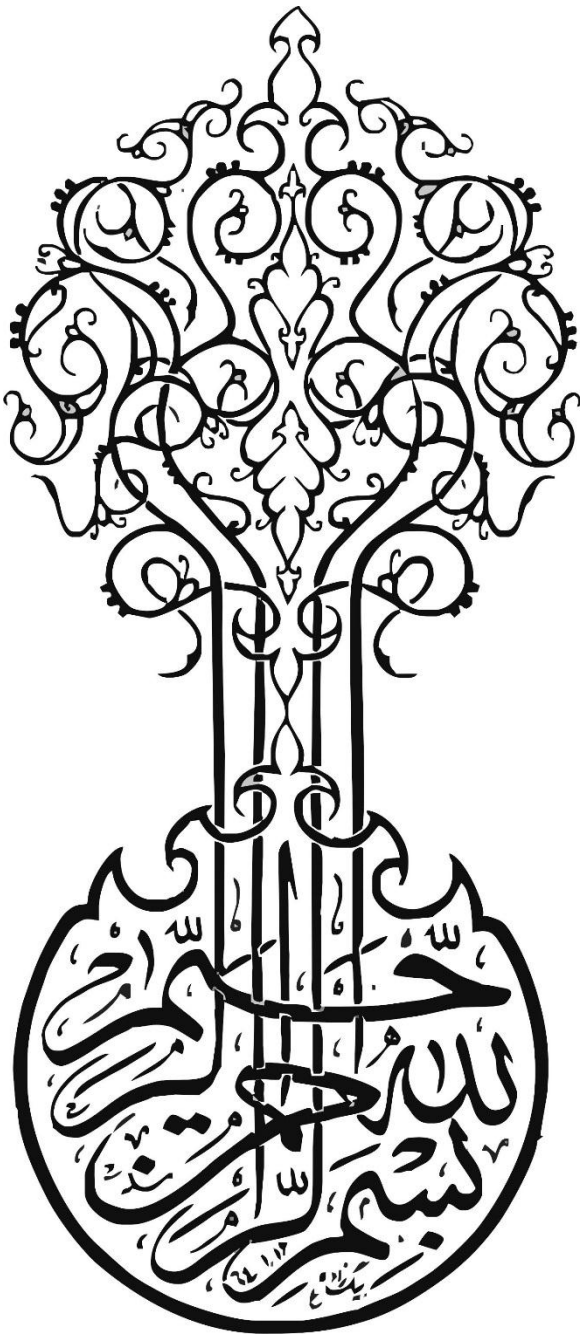

بسم الله الرحمن الرحيم

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

دانشگاه دامغان

دانشکده زیست شناسی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد زیست شناسی (گرایش فیزیولوژی جانوری)

بررسی اثر حفاظتی ملاتونین بر سلول‌های پورکنژ مخچه موش‌های صحرایی تیمار شده با سرب

توسط:

مریم بذرگر

استاد راهنما:

دکتر ایران گودرزی

اساتید مشاور:

دکتر تقی لشکر بلوکی

دکتر محمود اله‌دادی سلمانی

بهمن ۱۳۹۲

به نام خدا

بررسی اثر حفاظتی ملاتونین بر سلول‌های پورکنژ مخچه موش‌های صحرایی تیمار شده با سرب:

به وسیله‌ی:

مریم بذرگر

پایان نامه‌ی:

ارائه شده به تحصیلات تکمیلی دانشگاه به عنوان بخشی از فعالیت‌های تحصیلی لازم برای اخذ درجه‌ی کارشناسی ارشد

در رشته‌ی:

زیست‌شناسی (گرایش فیزیولوژی جانوری)

از دانشگاه دامغان

ارزیابی و تایید شده توسط کمیته پایان نامه با درجه:

دکتر ایران گودرزی، استادیار رشته زیست شناسی گرایش فیزیولوژی جانوری، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه دامغان (استاد راهنما)

دکتر تقی لشکر بلوکی، استادیار رشته زیست شناسی گرایش بیوشیمیایی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه دامغان (استاد مشاور)

دکتر محمود اله‌دادی سلمانی، استادیار رشته زیست شناسی گرایش فیزیولوژی جانوری، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه دامغان (استاد مشاور)

دکتر محمد تقی قربانیان، استادیار رشته زیست شناسی گرایش علوم تشریح، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه دامغان (داور)

دکتر کتانه ابراری، استادیار رشته زیست شناسی گرایش فیزیولوژی جانوری، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه دامغان (داور)

دکتر رضا نادری علمداردهی، استادیار رشته زیست شناسی گرایش سیستماتیک گیاهی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه دامغان (نماینده تحصیلات تکمیلی)

بهمن ۱۳۹۲

تو که یک گوشه ی چشمت غم عالم ببرد

حیف است که تو باشی و مرا غم ببرد

اللهم عجل لولیک الفرج

تقدیم به پدرم

نثار قامت همیشه استوار و خستگی ناپذیرش

که استاد استواریم است

و وجود آکنده از عشق و ایثار و خشنودیش مایه آرامش من

تقدیم به مادرم

آسمانی ترین مهتاب کوچه پس کوچه های کودکیم

مقدس ترین نجوای تنهایی هایم

او که از سرزمین خواب های مقدس آمده است

و جزء شبنم عشق ره توشه ای در حریر دست هایش نیست

او که زندگی ام برایش همه رنج بوده

و وجودش برایم همه مهر

تقدیم به خواهران مهربانم

راضیه، سمیرا، فاطمه

و برادران عزیزم

محسن و علیرضا

آنان که شاهدانی شایسته و کوشا به پویایی‌ام بوده‌اند

و

آنان که حضورشان الهامی پیوسته و جاری برای دانش اندوزیم بود

دوستتان می‌دارم با تمامی وجود

چرا که زلالید و شفاف

چون آب چشمه‌ساران در کوهسار

به فصل بهار

سپاسگزاری

به نام او و سپاس او را که بزرگترین حقیقت مسلم حیات و هستی و یگانه مرجع علم و آگاهی است.

در جریان مطالعات و تحقیقاتی که منجر به پیدایش این پایان نامه گردید از دانش و راهنمایی استادان و محققان ارجمند و همکاری دوستان بزرگواری بهره‌جویی شده است و فراهم آمدن این پایان نامه در حقیقت وامدار ایشان است نه من. گرچه مسولیت هر گونه لغزشی بر عهده من است لذا وظیفه خود می‌دانم که از زحمات، عنایات و ارشادات بی‌دریغ آنان قدردانی نمایم.

از استاد بزرگوارم سرکار خانم دکتر ایران گودرزی که دلسوزانه و صبورانه مرا در اجرا و نگارش این پروژه راهنمایی کردند کمال تشکر و قدردانی را دارم و خداوند رحمان را سپاسگزارم که افتخار شاگردی در محضر ایشان را به من عطا فرمود و از آن قادر متعال برای ایشان سلامتی و توفیق روز افزون را، مسئلت دارم.

از اساتید مشاورم جناب آقای دکتر تقی لشکر بلوکی و جناب آقای دکتر محمود اله‌دادی سلمانی که از مشاوره ایشان بهره‌مند شدم کمال تشکر و قدرانی را دارم.

صمیمانه‌ترین مراتب سپاس خود را حضور اساتید گرامی‌ام جناب آقای دکتر محمد تقی قربانیان و سرکار خانم دکتر کتانه ابراری که زحمت داوری این پایان‌نامه را بعهده گرفتند، تقدیم می‌دارم.

از کارشناسان آزمایشگاه خانم نفری و آقای کوشا بخاطر همکاریشان در اجرا مراحل آزمایش سپاسگزاری می‌نمایم.

در پایان از بهترین دوستان دوران زندگیم خانم‌ها زینب ماجونی و سمیه زمان پور که همیشه مرا حمایت روحی کردند، سپاسگزارم و از خداوند متعال برای ایشان آرزوی سلامتی و سربلندی را دارم.

چکیده

بررسی اثر حفاظتی ملاتونین بر سلول‌های پورکنژ مخچه موش‌های صحرایی تیمار شده با سرب:

توسط

مریم بذرگر

مقدمه: در معرض سرب قرار گرفتن طی دوره تکامل مخچه، می‌تواند منجر به کاهش رشد مخچه و از دست رفتن نورون‌ها شود. تشخیص و پیشگیری از مسمومیت با سرب مهم‌ترین مسئله در انجمن بین المللی سلامت است. اخیرا مهم‌ترین مکانیسم درگیر در اثرات سمی سرب، استرس اکسیداتیو گزارش شده است. ملاتونین یک آنتی اکسیدانت موثر و خنثی کننده رادیکالهای آزاد در برابر استرس اکسیداتیو است. از این نقطه نظر، در مطالعه حاضر خاصیت نوروپروتکتیو و آنتی‌اکسیدانتی ملاتونین در مسمومیت عصبی ناشی از سرب مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه موش‌های باردار از روز ۵ بارداری تا پایان شیردهی در معرض سرب قرار گرفتند (٪ ۰/۲ محلول در آب آشامیدنی). ملاتونین (۱۰ mg/kg) روزانه یکبار طی همین بازه زمانی از طریق گاواژ داده شد. در روز ۲۱ پس از تولد فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت سوپر اکسید دسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز سنجیده شد. میزان مالون‌دی‌آلدئید نیز به عنوان شاخص لیپید پراکسیداسیون، مورد ارزیابی قرار گرفت. مطالعات رفتاری شامل تست‌های روتارود و فعالیت‌های حرکتی در روزهای ۳۳-۳۱ پس از تولد و مطالعه‌ی بافتی پس از اتمام تست‌های رفتاری در روز ۳۳ انجام گرفت.

نتایج: یافته‌های حاصل از مطالعه‌ی حاضر نشان داد که سرب می‌تواند سبب لیپید پراکسیداسیون، افزایش میزان مالون‌دی‌الدئید و کاهش در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسیددسموتاز شود. همچنین سرب باعث اختلال در اجرای تست روتارود و فعالیت‌های حرکتی موش‌های صحرایی شد. تیمار با ملاتونین میزان لیپید پراکسیداسیون و اختلالات حرکتی را به طور معنی‌داری کاهش داد و توانست فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت را افزایش دهد. همچنین بررسی‌های بافتی نشان داد که سرب باعث کاهش تعداد سلول‌های پورکنژ مخچه گردید و ملاتونین از این اثر سمی جلوگیری کرد.

نتیجه‌گیری: این یافته‌ها پیشنهاد می‌کند که ملاتونین اثرات نوروپروتکتیو در برابر سمیت سرب دارد.

کلمات کلیدی: سرب، ملاتونین، سلول پورکنژمخچه، استرس اکسیداتیو، موش صحرایی

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول: کلیات و مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱- مقدمه: ۲

۱-۲-مخچه: ۵

۱-۲-۱- قشر مخچه: ۶

۱-۲-۲- ورودی‌های قشر مخچه: ۷

۱-۲-۳- خروجی قشر مخچه: ۸

۱-۲-۴- عملکرد مخچه: ۸

۱-۲-۵- یادگیری حرکتی در سطح سلول: ۹

۱-۲-۶- سلول‌های پورکنژ مخچه: ۹

۱-۳- سرب: ۱۰

۱-۳-۱- مسمومیت با سرب: ۱۰

۱-۳-۲- سرب و سیستم اعصاب مرکزی: ۱۲

۱-۳-۳- استرس اکسیداتیو: ۱۴

۱-۳-۳-۱- رادیکال‌های آزاد: ۱۴

۱-۳-۳-۱-۱- گونه‌های واکنشگر اکسیژن: ۱۴

۱-۳-۳-۱-۲- گونه‌های واکنشگر نیتروژن: ۱۵

۱-۳-۳-۲- آنتی اکسیدانت‌ها: ۱۶

۱-۳-۳-۲-۱- گلوتاتیون: ۱۸

۱-۳-۳-۲-۲- گلوتاتیون پراکسیداز: ۱۸

۱-۳-۳-۲-۳- سوپراکسیددسموتاز: ۱۹

۱-۳-۳-۲-۴- کاتالاز: ۱۹

۱-۳-۳-۳- استرس اکسیداتیو و سیستم اعصاب مرکزی: ۱۹

۱-۳-۳-۴- مکانیسم‌های پیشنهادی برای استرس اکسیداتیو ایجاد شده توسط سرب:..... ۱۹
۱-۳-۴- سرب و میتوکندری:..... ۲۱
۱-۳-۵- سرب و آپوپتوز (مرگ برنامه ریزی شده):..... ۲۲
۱-۳-۶- سرب و سلول‌های گلیا:..... ۲۴
۱-۳-۷- سرب و سیستم تکوینی نوروترانسمیتری:..... ۲۶
۱-۳-۸- سرب و مخچه:..... ۲۸
۱-۴- ملاتونین:..... ۳۰
۱-۴-۱- بیوسنتز ملاتونین:..... ۳۱
۱-۴-۲- متابولیسم ملاتونین:..... ۳۴
۱-۴-۳- مکانیسم عملکرد ملاتونین در سطح سلول:..... ۳۴
۱-۴-۴-ملاتونین به عنوان آنتی اکسیدانت:..... ۳۷
۱-۴-۴-۱- فعالیت آنتی اکسیدانتی مستقیم ملاتونین:..... ۳۹
۱-۴-۴-۲- فعالیت آنتی اکسیدانتی غیر مستقیم ملاتونین:..... ۴۱
۱-۴-۴-۲-۱- مکانیسم احتمالی از عملکرد ملاتونین بر آنزیمهای آنتی‌اکسیدانت:..... ۴۲
۱-۴-۵- تأثیرات ملاتونین بر هوموستازی میتوکندری:..... ۴۳
۱-۵- مروری بر مطالعات انجام شده:..... ۴۵
فصل دوم: مواد و روش‌ها
۲-۱- وسایل و مواد آزمایشگاهی:..... ۴۸
۲-۱-۱- وسایل و مواد مورد نیاز جهت مطالعه ی رفتاری:..... ۴۸
۳-۱-۲- وسایل و مواد مورد نیاز جهت مطالعه ی بافتی:..... ۴۸
۲-۱-۳- وسایل و مواد مورد نیاز جهت مطالعه ی بیوشیمیایی:..... ۴۸
۲-۱-۴- تهیه و آماده‌سازی داروهای استات سرب و ملاتونین:..... ۴۸
۲-۲- حیوانات:..... ۴۹
۲-۳- گروههای آزمایشی:..... ۴۹
۲-۴- مطالعه ی رفتاری:..... ۵۱
۲-۴-۱- Open field:..... ۵۱
۲-۴-۲- Rota-rod treadmill:..... ۵۲
۲-۵- مطالعه ی بافتی:..... ۵۳
۲-۵-۱- تهیه ی مقاطع بافتی:..... ۵۳

۲-۵-۱-۱- تثبیت بافت (Fixation): ۵۳
۲-۵-۱-۲- پردازش(Processing): ۵۴
۲-۵-۱-۳- قالبگیری و برش: ۵۵
۲-۵-۱-۴- رنگآمیزی با کرزیل ویوله: ۵۵
۲-۵-۱-۵- چسباندن: ۵۷
۲-۶- شمارش سلولهای پورکنژ: ۵۷
۲-۷- مطالعه بیوشیمیایی: ۵۷
۲-۷-۱- سنجش مالون دی آلدئید (MDA): ۵۷
۲-۷-۲- سنجش آنزیمی: ۵۹
۲-۷-۲-۱- فعالیت سوپر اکسید دسموتاز(SOD): ۵۹
۲-۷-۲-۲- فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز(GPx): ۶۰
۲-۸-سنجش پروتئین به روش لوری: ۶۱
۲-۹- سنجش غلظت سرب بافت مخچه: ۶۳
فصل سوم: نتایج
۳-۱- نتایج: ۶۵
۳-۱-۱- نتایج مطالعه رفتاری: ۶۵
۳-۱-۱-۱- تاثیر استات سرب و ملاتونین بر هماهنگی حرکتی و تعادلی: ۶۵
۳-۱-۱-۲- تاثیر سرب و ملاتونین بر فعالیتهای حرکتی جستجوگرانه: ۶۸
۳-۱-۲- نتایج مطالعه ی بافتی: ۷۲
۳-۱-۳- نتایج مطالعه ی بیوشیمیایی: ۷۹
۳-۱-۳-۱- تاثیر سرب و ملاتونین بر میزان لیپید پراکسیداسیون: ۷۹
۳-۱-۳-۲- تاثیر سرب و ملاتونین بر میزان استرس اکسیداتیو: ۸۱
۳-۱-۳-۳- غلظت سرب در بافت مخچه: ۸۴
۳-۱-۵- تاثیر سرب و ملاتونین بر وزن مغز و مخچه: ۸۵
فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری
۴-۱- بحث: ۸۹
۴-۲- نتیجه‌گیری: ۹۸
فصل پنجم: منابع
۵-۱ منابع: ۱۰۰

فهرست شکل‌ها:

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱- نمایی از مخ و مخچه ۵

شکل ۱-۲- نمایی از ساختار قشر خاکستری مخچه ۶

شکل ۱-۳- نمایی از ورودیهای قشر مخچه ۸

شکل ۱-۴- احیا ناقص مولکول اکسیژن در سلول و تولید گونههای واکنشگر اکسیژن و نیتروژن ۱۶

شکل ۱-۵- خلاصه‌ای از آنزیمهای آنتی اکسیدانت اصلی درسلول ۱۷

شکل ۱-۶- فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز و مصرف NADPH ۱۸

شکل۱-۷- برهم کنش سرب در مسیر بیوسنتزهم ۲۱

شکل۱-۸- مکانیسم‌های ایجاد کننده آپوپتوز: ۲۴

شکل ۱-۹- ساختار شیمیایی ملاتونین ۳۰

شکل ۱-۱۰- مکانیسم بیوسنتز ملاتونین ۳۳

شکل ۱-۱۱- متابولیسم ملاتونین ۳۴

شکل ۱-۱۲- مکانیسم عملکرد ملاتونین در سطح سلول ۳۶

شکل ۱-۱۳- روش تولید OH. و خنثی شدن توسط ملاتونین ۳۷

شکل ۱-۱۴- مسیر پیشنهادی برای خنثی شدن $OH^{\cdot}$ و H_2O_2 توسط ملاتونین ۴۰

شکل ۱-۱۵: مکانیسم احتمالی ملاتونین در برابر استرس اکسیداتیو: ۴۳

شکل ۱-۱۶- تاثیرات ملاتونین بر هوموستازی میتوکندری ۴۴

شکل۲-۱: دستگاه Open field ۵۲

شکل۲-۲: دستگاه روتارود ۵۲

شکل ۲-۳ واکنش مالون دی آلدئید با تیوباربیتوریک اسید ۵۹

شکل۲-۴: دستگاه اسپکتروفوتومتر ۶۰

شکل ۳-۱- فوتو میکروگراف قشر ورمیس مخچه در حیوان گروه کنترل ۷۳

شکل ۳-۲- فوتو میکروگراف قشر ورمیس مخچه در حیوان گروه سرب ۷۴

شکل ۳-۳- فوتو میکروگراف قشر ورمیس مخچه در حیوان گروه سرب + حلال ملاتونین ۷۵

شکل ۳-۴- فوتو میکروگراف قشر ورمیس مخچه در حیوان گروه سرب + ملاتونین ۷۶

شکل ۳-۵- فوتو میکروگراف قشر ورمیس مخچه در حیوان گروه ملاتونین ۷۷

فهرست جداول و نمودارها:

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱- لیست محققانی که اثبات کردند رادیکال $OH^{\cdot}$ توسط ملاتونین خنثی میگردد:..... ۳۸

نمودار۳-۱- تاثیر سرب و ملاتونین بر ظرفیت حرکتی اولیه..... ۶۶

نمودار ۳-۲- تاثیر سرب و ملاتونین بر هماهنگی حرکتی و تعادلی..... ۶۷

جدول ۳-۱- مقایسه آزمون Open field در گروههای مختلف آزمایشی..... ۶۸

نمودار ۳-۳- تاثیر سرب و ملاتونین بر Croosing..... ۶۹

نمودار۳-۴- تاثیر سرب و ملاتونین بر Rearing..... ۷۰

نمودار ۳-۵- تاثیر سرب و ملاتونین بر Grooming..... ۷۱

نمودار ۳-۶- تاثیر سرب و ملاتونین بر تعداد سلولهای پورکنژ مخچه..... ۷۸

نمودار ۳-۷- تاثیر سرب و ملاتونین بر میزان مالون دی‌آلدئید..... ۸۰

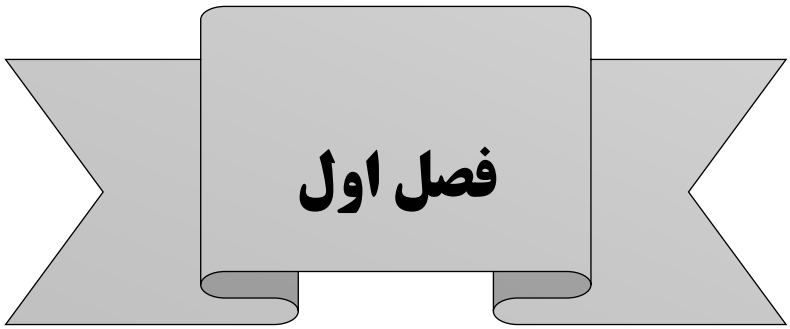
نمودار ۳-۸- تاثیر سرب و ملاتونین بر میزان فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز..... ۸۲

نمودار ۳-۹- تاثیر سرب و ملاتونین بر میزان فعالیت سوپراکسید دسموتاز..... ۸۳

نمودار ۳-۱۰- غلظت سرب در بافت مخچه..... ۸۴

نمودار ۳-۱۱- تاثیر سرب و ملاتونین بر وزن مغز..... ۸۶

نمودار ۳-۱۲- تاثیر سرب و ملاتونین بر وزن مخچه..... ۸۷



کلیات و مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱- مقدمه:

سرب شایع‌ترین آلوده‌کننده زیست محیطی در جهان است که به طور گسترده در سراسر پوسته زمین توزیع شده است و از همان اوایل ایجاد تمدن یکی از بیشترین فلزات مورد استفاده بوده است و امروزه نیز کاربرد وسیعی در صنایع مختلف دارد. حیوانات و انسان‌ها عمدتاً از طریق غذا، آب یا هوای آلوده ناشی از صنعت و سوختن بنزین حاوی سرب در معرض سرب قرار می‌گیرند [۱-۳]. سمیّت سرب قرن‌هاست شناخته شده است و علائم بالینی مسمومیت با آن در سیستم‌های هماتوپوئیتیک، معده‌ای روده‌ای، کلیوی، قلبی و عروقی و اعصاب مرکزی به خوبی توصیف شده است [۴, ۵]. مطالعات متعددی هم در حیوانات [۶, ۷] و هم در انسان‌ها [۸-۱۰] گزارش کردند که سرب بیشترین اثرات زیان آور خود را روی سیستم اعصاب مرکزی بویژه در زمان تکوین به علت تکثیر سلولی بیش از حد، تمایز و سیناپتوژنزی که در طی این دوره رخ می‌دهد اعمال می‌کند [۱۱]. نابالغ بودن سد خونی مغزی و فقدان کمپلکس‌های پروتئینی که قادرند مواد سمی را از مغز جدا کنند باعث افزایش آسیب پذیری مغز به سرب طی تکوین می‌شود [۱۲]. با توجه به توانایی عبور سرب از جفت و شیر مادر، در معرض سرب قرار گرفتن طی دوران بارداری و شیردهی برای جنین و نوزاد بسیار خطرناک است [۱۳]. میزان سربی که مادر به جنین و نوزاد منتقل می‌کند تنها وابسته به در معرض سرب قرار گرفتن طی بارداری و شیردهی نیست بلکه هم چنین سربی که از دراز مدت در بافت‌های مادر بخصوص استخوان ذخیره شده است در طی دوران بارداری و شیردهی متابولیزه شده و با آزادسازی به خون از طریق جفت وشیر به ترتیب به جنین ونوزاد منتقل می‌شود [۱۴]. سرب پس از ورود به بدن در رقابت با یون کلسیم از طریق پمپ Ca^{2+} ATpase از سد خونی مغزی عبور کرده و براحتی وارد مغز شده و باعث تخریب نورن‌ها می‌گردد [۱۵].

سرب با تغییر فعالیت‌های بیولوژیکی مغز در سطوح مولکولی، داخل سلولی و سلولی باعث تخریب مغز بویژه در نواحی کورتکس مغز جلویی، هیپوکمپ و مخچه می‌شود [۱۶] و به تبع آن اختلالات نورولوژیکال زیادی از قبیل ناتوانی‌های شناختی، عدم رشد فکری و هوشی، کاهش در فعالیت‌های حرکتی، بیش فعالی، کاهش در یادگیری و حافظه و بیماری‌های آلزایمر، پارکینسون، شیزوفرنی و انسفالوپاتی را بوجود می‌آورد [۱۲, ۱۷-۲۰].

از بین نواحی مغزی، مخچه بیشترین آسیب پذیری را به سرب نشان داده است. مطالعات نشان می‌دهند که سرب باعث آتروفی مغز و مخچه می‌گردد، به طوری که کاهش قابل توجهی در وزن مغز و مخچه دیده شده است گرچه کاهش وزن مخچه در برابر کاهش وزن مغز بسیار بیشتر بوده است که نشان دهنده حساسیت زیاد کورتکس مخچه به سرب است، پس سرب می‌تواند سبب تأخیر در بلوغ عصبی مخچه شود [۲۱, ۲۲]. در بین سلول‌های مخچه سلولهای پورکنژ بیشترین آسیب پذیری را به سرب نشان می‌دهند بطوری که هم تعدادشان کاهش

می‌یابد و هم تغییرات شدید مورفولوژیکی در آن‌ها ایجاد می‌شود [۲۱, ۲۳-۲۶]. آسیب وارده به سلول‌های پورکنژ توسط سرب با توجه به نقش مخچه در تعادل و یادگیری حرکتی [۲۷] منجر به نقایص حرکتی و رفتاری می‌گردد [۲۸].

آزمایشات زیادی حساسیت سیستم عصبی مرکزی در حال تکوین را نسبت به اثرات زیان آور سرب اثبات کرده است، اما هنوز مکانیسم عمل سمیت آن در مغز مشخص نیست. یکی از مکانیسم‌های احتمالی در نوروتوکسیسیته سرب برهم خوردن تعادل آنتی اکسیدانتی/ پراکسید انتی است که می‌تواند منجر به آسیب مغز از طریق تخریب اکسیداتیو در بیومولکولهای حیاتی از جمله لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA گردد [۲۹-۳۱].

پیشنهاد شده است که سرب به جهت مهار فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت شامل گلوتاتیون پراکسیداز،کاتالاز، سوپر اکسید دسموتاز از طریق اتصال به گروه سولفیدریل آن‌ها و افزایش تولید رادیکال‌های آزاد سبب استرس اکسیداتیو می‌گردد [۲, ۳۲].

اخیراً نقش سودمند آنتی اکسیدانت‌ها در پیشگیری و درمان مسمومیت حاد و مزمن سرب گزارش شده است [۳۳, ۳۴]. مکانیسم عملکرد این آنتی اکسیدانت‌ها هنوز نامشخص است، اگر چه معتقدند که آنتی اکسیدانت‌ها بوسیله پاکسازی رادیکال‌های آزاد تولید شده و جلوگیری از لیپید پراکسیداسیون، سپر سلولها در برابر اثر استرس اکسیداتیو هستند [۳۵]. گزارشات اخیر بیان کننده اثرات سودمند ملاتونین به عنوان یک آنتی اکسیدان در حمایت سلولها از اثرات سمی گونه‌های رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو است [۳۶, ۳۷].

ملاتونین یک ترکیب متوکسی ایندول(N- استیل- 5 متوکسی تریپتامین)، ترکیبی از سروتونین می‌باشد که به طور کلی هر شب توسط غده پینه آل سنتز و ترشح می‌شود.

ملاتونین در چندین عملکرد فیزیولوژیکی مهم از جمله تنظیم ریتم شبانه روزی و الگوی عمومی خواب، سیستم تولید مثل، سیستم ایمنی، جلوگیری از سرطان، افزایش طول عمر شرکت می‌کند، از طرفی مطالعات اخیر پیشنهاد می‌کنند که ملاتونین ویژگی‌های نوروپروتکتیو (محافظ نورونی) در برابر آسیب‌های اکسیداتیو دارد و به عنوان یک آنتی اکسیدانت عمل می‌نماید [۳۸-۴۰]. ملاتونین به عنوان یک آنتی اکسیدانت نه تنها در حفظ DNA و غشای لیپیدی از آسیب اکسیداتیو نقش دارد بلکه باعث تحریک و افزایش بیان آنزیم‌های آنتی اکسیدانت سوپر اکسید دسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز می‌شود [۴۱-۴۶]. در نهایت با توجه به مطالب ذکر شده در مورد اثر آنتی اکسیدانتی ملاتونین، بر آن شدیم تا اثرات ملاتونین بر سلولهای پورکنژ مخچه موش‌های تیمار شده با سرب طی دوران تکوینی قبل و بعد از تولد را از سه دیدگاه رفتاری، بافتی و بیوشیمیایی مورد بررسی قرار دهیم، فرضیه‌هایی که در این تحقیق به آن پرداخته شد شامل موارد ذیل می‌باشد:

۱) سرب در دوز پایین سلول‌های پورکنژ مخچه را دچار آسیب می‌نماید.

۲) قرارگیری در معرض دوز پایین سرب طی دوران تکوین، هماهنگی حرکتی را کاهش می‌دهد.

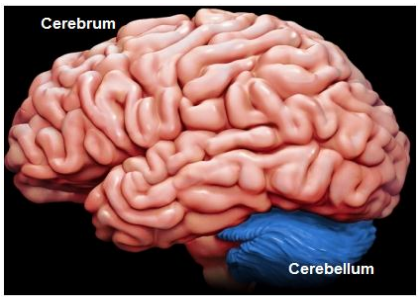
۳) اثرات سرب بر مخچه از طریق استرس اکسیداتیو اعمال می‌شود.

۴) ملاتونین اثرات ناشی از سرب را در سطح رفتار و بافت کاهش می‌دهد.

۵) ملاتونین استرس اکسیداتیو ناشی از سرب را کاهش می‌دهد.

در واقع هدف از این مطالعه پاسخ به این سوال است که آیا ملاتونین از طریق خاصیت آنتی اکسیدانتی می‌تواند سمیت ناشی از سرب را بر روی سلول‌های پورکنژ مخچه‌ی در حال تکوین کاهش دهد؟

۱-۲- مخچه:



شکل ۱-۱- نمایی از مخ و مخچه

مخچه در عقب بصل النخاع و پل مغزی قرار گرفته است و از دو نیمکره راست و چپ تشکیل شده است (شکل ۱-۱). این دو نیمکره به وسیله ساختمانی که در وسط قرار دارد و ورمیس[1] مخچه نامیده می‌شود با یکدیگر ارتباط دارند.

مخچه از نظر تکوینی از نئوکورتکس قدیمی تر بوده و از جمله ساختمان‌های مغزی است که در طی تکامل مهره داران به میزان زیادی ساختمان خود را حفظ نموده است [۴۷]. در حالی که فقط ۱۰٪ از کل مغز را تشکیل می‌دهد حاوی نیمی از کل نورن‌های موجود در مغز است . این نورون‌ها به طور کاملاً منظم و به صورت واحدهای تکراری سازمان دهی شده اند. علیرغم نظم ساختمانی، مخچه به چندین ناحیه مجزا تقسیم می‌شود که هر ناحیه انشعاباتی از قسمت‌های مختلف مغز و نخاع را دریافت نموده و به سیستم‌های حرکتی متفاوت انشعاباتی می‌فرستد [۴۸, ۴۹].

مخچه با ارزیابی تفاوت بین قصد[2] و عمل[3] و بوسیله تنظیم عمل مراکز حرکتی در قشر و ساقه مغز حین انجام حرکت و در مدت تکرار همان حرکت، سیستم‌های حرکتی را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

سه جنبه از سازمان دهی مخچه زیر بنای این عملکرد است:

۱) مخچه با اطلاعات وسیع در مورد اهداف، فرمان‌ها و سیگنال‌های بازخوردی مرتبط با برنامه ریزی و اجرای حرکت تجهیز می‌شود. اهمیت این ورودی‌ها از آن جهت مشخص است که آکسون‌های ورودی مخچه ۴۰ برابر آکسون‌هایی است که از آن خارج می‌گردند.

۲) خروجی‌های مخچه اساساً روی قشر پیش حرکتی و حرکتی مغز و ساقه مغز متمرکز می‌شوند. یعنی بخش‌هایی که نورون‌های حرکتی را مستقیماً کنترل می‌کنند.

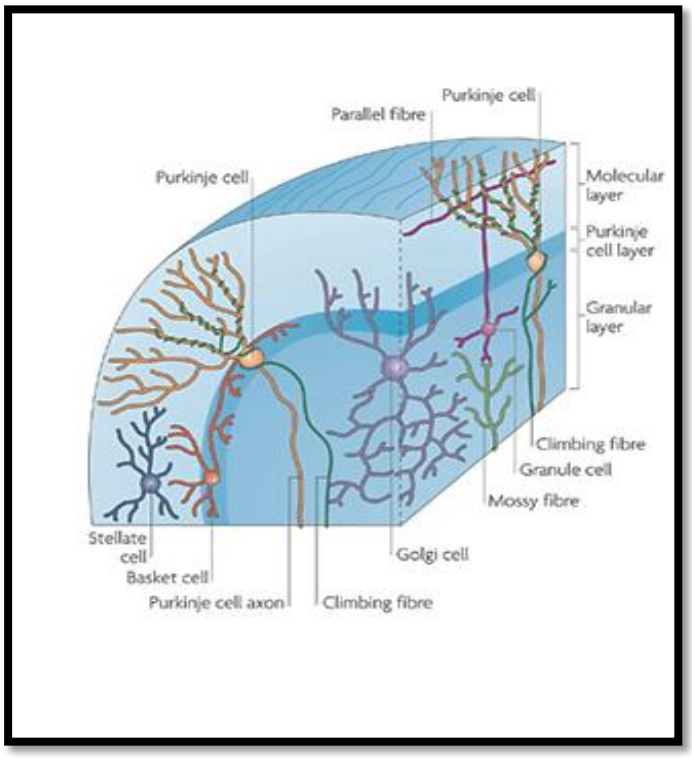
۳) انتقال سیناپسی می‌تواند در مدارهای مدول تغییر یابد که این خود یک ویژگی برای تطابق و یادگیری حرکتی محسوب می‌شود [۴۹]

1- Vermis.
2- Intention.
3- Action.

۱-۲-۱- قشر مخچه:

قشر مخچه یک ساختمان سه لایه است که حاوی ۵ نوع نورون می‌باشد: ستاره‌ای،[۱] سبدی[۲]،گلژی[۳] و پورکنژ[۴] که نورون‌های مهاری هستند و سلولهای گرانولی که تنها سلول‌های تحریکی قشر مخچه محسوب می‌شوند.

خارجی ترین لایه قشر مخچه، لایه مولکولی است که حاوی جسم سلولی اینترنورن‌های ستاره ای و سبدی است که در بین آکسون‌های سلول‌های گرانولی و دندریت‌های سلول‌های پورکنژ قرار دارند. زیر لایه مولکولی، لایه سلول‌های پورکنژ قرار دارد که از جسم سلولی نورون‌های پورکنژ تشکیل شده که کنار هم در یک لایه قرار گرفته اند (شکل ۱-۲). سلول‌های پورکنژ دارای جسم سلولی بزرگ (۲۵-۳۰μm) و دندریت‌های گسترده شبیه پنکه می‌باشند. داخلی ترین لایه، لایه گرانولی است که شامل سلول‌های گرانولی و اینترنورون‌های مهاری گلژی است. سلول‌های گرانولی هدف فیبرهای خزه ای با منشا ساقه مغز و طناب نخاعی است [۱].



شکل ۱-۲- نمایی از ساختار قشر خاکستری مخچه [۱]

1- Stellate cell.
2- Basket cell.
3- Golgi cell.
4- Granule cell.

۱-۲-۲- ورودی‌های قشر مخچه:

اطلاعات توسط دو ورودی، فیبرهای خزه ای[۱] و صعودی[۲] وارد قشر مخچه می‌شوند (شکل۱-۳). هر دو نوع ورودی تحریکی بوده و با نورن‌های مخچه سیناپس می‌دهند اما محل سیناپس آن‌ها با سلول پورکنژ والگوی شلیکی که در سلول پورکنژ بر می‌انگیزند با هم متفاوت است. فیبرهای خزه ای از هسته‌های ساقه مغز و طناب نخاعی منشأ می‌گیرند و حاوی اطلاعات از قشر مغز و محیط می‌باشند. این فیبرها با دندریت‌های سلول‌های گرانولی سیناپس می‌دهند و آکسون سلول‌های گرانولی (فیبر موازی) نیز با سر شاخه‌های دندریتی سلول‌های پورکنژ سیناپس می‌دهند. به طوری که تعداد زیادی از آن‌ها را تحریک نموده و پتانسیل‌های عمل سدیمی به نام اسپایک‌های ساده[۳] را شکل می‌دهند. در انسان هر سلول پورکنژ از یک میلیون سلول گرانولی و هر سلول گرانولی نیز از تعداد زیادی فیبر خزه‌ای ورودی دریافت می‌نماید [۵۰].

در حالی که، فیبرهای صعودی از هسته زیتون تحتانی منشأ می‌گیرند و حاوی اطلاعات حسی پیکری، بینایی و یا اطلاعاتی از قشر مغز می‌باشند که اطراف دندریت‌های پروگزیمال سلول پورکنژ می‌پیچند و ارتباطات سیناپسی فراوانی تشکیل می‌دهند. بعلاوه، فیبرهای صعودی و خزه ای شاخه‌های جانبی به نورون‌های هسته عمقی مخچه[۴] می‌فرستند . اطلاعات از این هسته‌ها توسط آکسون‌های تحریکی نورون‌های بزرگ به نواحی پیش حرکتی و تالاموس حمل می‌گردند [۵۱]. هر سلول پورکنژ فقط از یک فیبر صعودی اطلاعات دریافت می‌کند در حالی که هر فیبر صعودی با ۱ تا ۱۰ سلول پورکنژ تماس سیناپسی برقرار می‌نماید. این فیبرها اثرات سیناپسی قوی روی سلول‌های پورکنژ دارند [۵۲].

1- Mossy fibers.
2- Climbing fibers.
3- Simple spike.
4- Deep cerebellar nuclei.