بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم

بخش زیست شناسی

پایان نامه تحصیلی برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

رشته زیست شناسی گرایش فیزیولوژی جانوری

بررسی نقش اپلین بر سمیت سلولی ناشی از ٦-هیدروکسی دوپامین در سلول‌های نوروبلاستومای انسانی SH-SY5Y به عنوان مدل *in vitro* بیماری پارکینسون

مولف:

الهام پوراسمعیلی بابکی

استاد راهنما:

دکتر سعید اسماعیلی ماهانی

استاد مشاور:

دکترمهدی عباس نژاد

بهمن ماه۱۳۹۳

چکیده :

بیماری پارکینسون یک اختلال تخریب کننده‌ی نورونی شدید و پیش رونده‌ی سیستم عصبی مرکزی است. برای اکثر بیماری‌های تخریب کننده‌ی عصبی اقدامات درمانی موجود فقط به صورت تسکین دهنده هستند. به دلیل اینکه شواهد علمی متعدد پیشنهاد می‌کنند که در بسیاری از بیماری‌های تخریب کننده‌ی 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. پپتید اپلین دارای عملکرد محافظت نورونی است و آثار ضد آپوپتوزی از خود نشان می‌دهد. بنابراین، مطالعه‌ی حاضر جهت بررسی نقش فعالیت اپلین بر سمیت سلولی ناشی از ۶-هیدروکسی دوپامین بر روی سلول های SH-SY5Y به عنوان مدل *in vitro* بیماری پارکینسون طراحی شد. جهت القا سمیت سلولی، سلول های SH-SY5Y با ۱۵۰ میکرومول ۶-هیدروکسی دوپامین تیمار شدند. در گروه‌های درمانی دوزهای مختلف اپلین (۰/۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ نانومول)، جهت بررسی اثر احتمالی محافظت کننده‌ی آن‌ها استفاده شد. سمیت سلولی توسط تست MTT تعیین شد. میزان ROS داخل سلولی توسط پروب فلورسنس دی کلرو فلورسین دی استات از طریق روش فلوریمتری ارزیابی شد. پتانسیل غشا میتوکندری با ارزیابی تغییر در شدت فلورسنس سلول‌های رنگ شده با رنگ‌های کاتیونی مثل رودامین ۱۲۳ اندازه گیری شد. یکی از پارامترهای بیوشیمیایی آپوپتوز(Bcl-2) با روش ایمونوبلاتینگ ارزیابی شد. نتایج نشان دادند که ۶-هیدروکسی دوپامین منجر به افزایش میزان آسیب سلولی، تولید ROS داخل سلولی، از دست رفتن پتانسیل غشا میتوکندری و هم‌چنین کاهش Bcl-2 می‌گردد. تیمار با دوزهای موثر اپلین (۵ و ۱۰ نانومول) اختلالات سلولی و مولکولی ذکر شده را کاهش می‌دهد. نتایج پیشنهاد می‌کنند که اپلین در برابر آپوپتوز القا شده در اثر ۶-هیدروکسی دوپامین اثر محافظت کننده‌ی نورنی دارد.

کلمات کلیدی : اپلین، ۶-هیدروکسی دوپامین، آپوپتوز، سلول های SH-SY5Y.

فهرست مطالب

عنوان **شماره صفحه**

فصل اول

۱-۱معرفی بیماری پارکینسون..... ۲

۱-۲ علائم زیستی بیماری پارکینسون..... ۴

۱-۲-۱ یبوست..... ۴

۱-۲-۲ اختلال رفتارخواب با حرکت سریع چشم‌ها(RBD) ۵

۱-۳ فاکتورهای دخیل در بیماری پارکینسون..... ۵

۱-۳-۱ افزایش سن..... ۵

۱-۳-۲ فاکتورهای محیطی..... ۵

۱-۴ ۶ هیدروکسی دوپامین(6-OHDA) وبیماری پارکینسون..... ۸

۱-۴-۱ مکانیسم‌های سمیت عصبی ناشی از ۶-هیدروکسی دوپامین..... ۸

۱-۴-۱-۱ استرس اکسیداتیو..... ۸

۱-۴-۱-۲ اختلال عملکرد میتوکندریایی ناشی از ۶-هیدروکسی دوپامین..... ۱۰

۱-۴-۱-۳ سمیت اختصاصی ۶-هیدروکسی دوپامین و بیماری پارکینسون..... ۱۱

۱-۴-۱-۴استرس اکسیداتیو و اختلال عملکرد میتوکندریایی ناشی از دوپامین..... ۱۲

۱-۵ سیستم یوبی‌کوئیتین پروتئوزوم و بیماری پارکینسون..... ۱۳

۱-۶ فاکتورهای ژنتیکی دخیل در بیماری پارکینسون..... ۱۳

۱-۶-۱ آلفا سینوکلئین..... ۱۴

۱-۶-۲ داردارین یا LRRK2..... ۱۴

۱-۶-۳ پارکین..... ۱۴

۱-۶-۴ PINK1..... ۱۴

۱-۷التهاب عصبی و بیماری پارکینسون..... ۱۵

۱-۸ اختلال عملکرد سد خونی مغزی در بیماری پارکینسون..... ۱۵

۱-۹ عدم فیلترشدن سلول‌های ایمنی محیطی در بیماری پارکینسون..... ۱۶

۱-۱۰ معرفی اپلین..... ۱۶

۱-۱۰-۱ بیوسنتز اپلین..... ۱۷

۱-۱۰-۲تنظیم بیان ژن..... ۱۸

۱-۱۰-۳توزیع اپلین..... ۱۸

۱-۱۰-۴ گیرنده اپلین و سیگنالینگ آن..... ۱۸

۱-۱۰-۵عملکردهای فیزیولوژیکی اپلین..... ۲۰

۱-۱۰-۵-۱ عروقی..... ۲۰

۱-۱۰-۵-۲ قلبی..... ۲۰

۱-۱۰-۵-۳ گوارشی..... ۲۱

۱-۱۰-۵-۴ استخوان..... ۲۱

۱-۱۰-۵-۵ مغز..... ۲۱

۱-۱۰-۶ عملکردهای محافظت کننده‌ی نورونی اپلین..... ۲۲

۱-۱۱ اهداف تحقیق.....۲۳

فصل دوم

۲-۱ مواد و روش ها.....۲۵
۲-۱-۱ وسایل مورد استفاده.....۲۵
۲-۱-۲ مواد و داروهای مورد استفاده.....۲۵
۲-۱-۳ بافر ها و محلول های مورد استفاده.....۲۶
۲-۱-۳-۱ محلول تشکیل دهنده ژل بالا با غلظت ۵ درصد.....۲۶
۲-۱-۳-۲ محلول تشکیل دهنده ژل پایین با غلظت ۱۲ درصد.....۲۶
۲-۱-۳-۳ بافر نمونه.....۲۶
۲-۱-۳-۴ بافر رانینگ.....۲۶
۲-۱-۳-۵ بافر TBS-T.....۲۶
۲-۱-۳-۶ بافر انتقال.....۲۶
۲-۱-۳-۷ بافر زداینده.....۲۷
۲-۱-۳-۸ محلول برادفورد.....۲۷
۲-۱-۳-۹ بافر TNE.....۲۷
۲-۲ کشت سلول.....۲۷
۲-۳ سنجش بقای سلولی.....۲۸
۲-۳-۱ MTT assay.....۲۸
۲-۳-۱-۱ گروه های مورد آزمایش در تست MTT.....۲۹

۲-۴ سنجش ROS داخل سلولی..... ۲۹

۲-۴-۱ گروه های مورد استفاده در تست ROS..... ۳۰

۲-۵ سنجش پتانسیل غشا میتوکندری..... ۳۱

۲-۵-۱ گروه‌های مورد استفاده در تست رودامین..... ۳۱

۲-۶ بررسی میزان پروتئین ضدآپوپتوز(Bcl-2) و گیرنده اپلین..... ۳۲

۲-۶-۱گروه های مورد استفاده در وسترن بلت..... ۳۲

۲-۶-۲ استخراج پروتئین از سلول های SH-SY5Y..... ۳۲

۲-۶-۳ اندازه گیری کل پروتئین..... ۳۳

۲-۶-۴ الکتروفورز پروتئین ها روی ژل SDS-PAGE..... ۳۴

۲-۶-۵ انتقال از ژل به کاغذ PVDF..... ۳۵

۲-۶-۶ بلاکینگ..... ۳۶

۲-۶-۷ مرحله ی شستشو..... ۳۷

۲-۶-۸ اضافه کردن آنتی بادی اولیه..... ۳۷

۲-۶-۹ اضافه کردن آنتی بادی ثانویه..... ۳۷

۲-۶-۱۰ افزودن سوبسترا و ثبت باندهای نورانی روی فیلم رادیولوژی..... ۳۷

۲-۶-۱۱ ظهور فیلم..... ۳۸

۲-۶-۱۲ زدودن آنتی بادی های متصل به آنتی ژن از روی کاغذ و کنترل لودینگ نمونه ها..... ۳۸

۲-۶-۱۲آنالیز تصاویر گرفته شده از باندهای پروتئینی..... ۳۹

۲-۶-۱۴ آنالیز آماری..... ۳۹

فصل سوم

۳-۱ نتایج.....۴۱

۳-۱-۱ بررسی تأثیرات غلظت‌های مختلف ۶-هیدروکسی دوپامین بر بقای سلول‌های ۴۱

۳-۱-۲ بررسی اثرات دوزهای متفاوت اپلین بر بقای سلول‌های SH-SY5Y در حضور ۶-هیدروکسی دوپامین.....۴۲

۳-۱-۳ بررسی اثر دوز موثر اپلین بر میزان افزایش ROS داخل سلولی ناشی از ۶- هیدروکسی دوپامین.....۴۲

۳-۱-۴ بررسی اثر دوز موثر اپلین بر میزان پتانسیل غشا میتوکندری ناشی از ۶-هیدروکسی دوپامین.....۴۳

۳-۱-۵ آنالیز نتایج به دست آمده از وسترن بلات برای پروتئین درگیر در آپوپتوز سلولی.....۴۴

۳-۱-۶ بررسی بیان گیرنده ی اپلین در سلول های SH-SY5Y.....۴۶

فصل چهارم

۴-۱ بحث و نتیجه‌گیری.....۴۸

۴-۲ بروز استرس اکسیداتیو و آپوپتوز در بیماری پارکینسون.....۴۸

۴-۳ نتیجه‌گیری.....۵۲

۴-۴ پیشنهادها.....۵۳

فصل پنجم

منابع.....۵۵

فهرست اشکال

شکل **شماره صفحه**

شکل ۱-۱:اجسام لوی..... ۴

شکل ۱-۲: مکانیسم القاء سمیت عصبی توسط ۶-هیدروکسی دوپامین..... ۱۰

شکل ۱-۳: توالی اسیدآمینه ای ایزوفرم های مختلف اپلین در رت..... ۱۷

شکل ۱-۴: مسیر سیگنالینگ گیرنده‌ی اپلین..... ۱۹

شکل ۲-۱: روش برادفورد..... ۳۴

شکل ۳- ۱:بررسی اثر غلظت‌های مختلف ۶-هیدروکسی دوپامین بر بقای

سلول‌های SH-SY5Y با استفاده از تست MTT..... ۴۱

شکل ۳- ۲: بررسی اثر غلظت‌های متفاوت اپلین بر بقای سلول‌های SH-SY5Y..... ۴۲

شکل ۳-۳: بررسی اثر اپلین بر میزان ROS تولید شده در حضور ۶-هیدروکسی دوپامین.....۴۳

شکل ۳-۴: بررسی اثر اپلین در حفظ پتانسیل غشا میتوکندری در حضور ۶-هیدروکسی ۴۴

شکل ۳-۵: بررسی بیان نسبت Bcl-2/Beta-actin.....۴۵

شکل ۳-۶: بررسی بیان گیرنده ی اپلین..... ۴۶

فصل اول

کلیات و مروری بر

مطالعات گذشته

۱-۱ معرفی بیماری پارکینسون :

بیماری پارکینسون، یک اختلال پیشرونده‌ی تخریب کننده‌ی عصبی است که در تمام گروه‌های قومی ودر هر دو جنس رخ می‌دهد(Veldman et al. 1998) و به عنوان دومین بیماری تخریب کننده‌ی عصبی رایج در بین افراد پس از بیماری آلزایمر می‌باشد. میزان شیوع این بیماری در افراد بالای ۵۰ سال حدودا ۲ درصد است (Schapira 2009).

پارکینسونیسم(۲۰۰۶) 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 2010).

در بیماری پارکینسون کاهش نورون‌های جسم سیاه از یک الگوی ویژه با حساسیت بیشتر در ناحیه شکمی جسم سیاه پیروی می‌کند. در اثر این بیماری ۵۰ تا ۷۰ درصد نورون‌های دوپامینرژیک این ناحیه تخریب می‌شوند. 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 دوپامینرژیک با علائم ثانویه بیماری پارکینسون از قبیل جنون، اختلالات شناختی، غیر حرکتی، خواب واتونومیک مرتبط می‌باشند(Lee Frank JS and Liu 2008a).

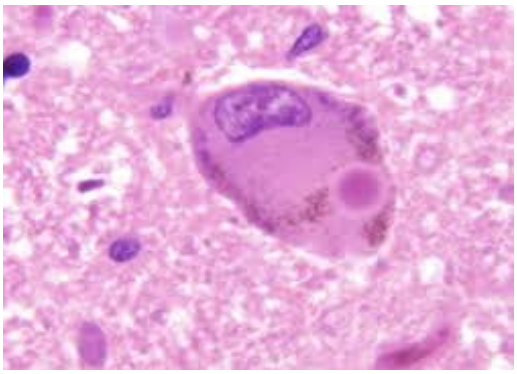
[1] -Locus coeruleus
[2] -Raphe nucleus
[3] -Meynert nucleus
[4] -Dorsal motor nucleus of vagus
[5] -Cingulate cortex
[6] -Entorinal cortex
[7] -Olfactory bulb

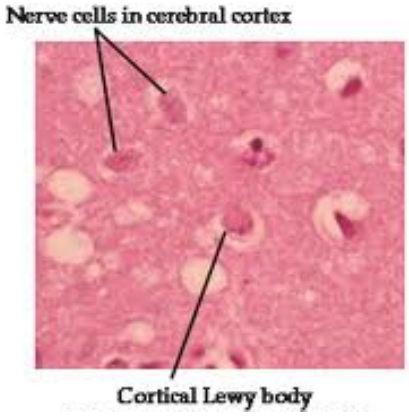
یکی از نظریه‌هایی که در مورد علت بیماری پارکینسون مطرح است این است که این بیماری ناشی از عدم تعادل بین تحریک و مهار در عقده‌های قاعده‌ای در اثر مهار دوپامینی پوتامن می‌باشد. در نتیجه، خروجی مهاری از پوتامن به قطعه خارجی گلوبوس پالیدوس افزایش یافته و منجر به کاهش خروجی مهاری از گلوبوس پالیدوس خارجی به 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 2010).

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 نوع‌اند: اجسام لوی کلاسیک و اجسام لوی قشری. اجسام لوی کلاسیک به صورت یک‌سری تجمعات کروی ائوزینوفیلی سیتوپلاسمی متشکل از یک هسته‌ی متراکم و یک هاله‌ی ۱۰ نانومتری از 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 ولی اجزاءتشکیل دهنده‌شان همان پروتئین‌ها می‌باشند(Popescu et al. 2004) . ضخامت اجسام لوی حدود 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 بیان و درجه‌ای از علائم بالینی در هر فرد مرتبط است(Togo et al. 2001).

اجسام لوی علاوه بر بیماری پارکینسون در سایر بیماری‌ها مانند آلزایمر و در افراد سالم نیز با افزایش سن دیده می‌شوند. علی‌رغم وجود اجسام لوی در حالات بیماری ، نقش اجسام لوی در مرگ سلول‌های عصبی نامشخص است و جای بحث دارد. اگر چه این تجمعات پروتئینی به علت اختلال در فرایندهای 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 Frank J. S. and Liu 2008b).

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





شکل ۱-۱: اجسام لوی(Mariu et al., 2004).

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 هستند بنابراین برآوردهای قبلی در مورد پیشرفت بیماری پارکینسون که متمرکز به جسم سیاه بود در حال حاضر به نظر نادرست می‌آید. مطالعات نشان می‌دهند 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 دوره‌ی بیماری مشاهده می شود که یبوست احتمالا شایع‌ترین تظاهر می‌باشد. یبوست مربوط به اختلال در تحرک کولون است مطالعات انجام شده، پیشنهاد می-کنند که یبوست گاهی ممکن است ۱۰ تا ۲۰ سال قبل از شروع علائم حرکتی در بیماران وجود داشته باشد (Savica et al. 2010).

۱-۲-۲اختلال رفتارخواب با حرکت سریع چشم‌ها (RBD[1]) :

1- Rapid eye movement sleep behavior disorder

خواب با حرکات سریع چشم در بیماران پارکینسونی شایع است و غالبا از نشانه‌های آن این است که قبل از علائم حرکتی بروز می‌کند. 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 نمی‌شود، بلکه در جنون همراه با آتروفی هم مشاهده می‌شود. هم‌چنین اختلالات اضطرابی و بویایی، افسردگی و کم خونی نیز علائم زیستی بیماری پارکینسون قبل از علائم حرکتی می‌باشند(Boeve et al. 2001, Savica et al. 2010) .

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 می‌گردند که در نهایت باعث تخریب نورون‌های دوپامینرژیک می‌شود(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 تخریب‌کننده عصبی نقش مهمی ایفا می‌کنند. ایده مشارکت عوامل محیطی از کشف سم ۱-متیل۱-۴ فنیل-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 می‌شود. 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 C et al. 2010). فاکتورهای محیطی آسیب‌رسان توسط سه مکانیسم استرس اکسیداتیو ایجاد می‌کنند :

۱-القاء تولیدROS[1]

۲- تغییر متابولیسم میتوکندریایی

۳- تغییر سیکل اکسیداسیون احیا (Franco and Panayiotidis 2009) .

استرس اکسیداتیو اغلب به عنوان یکی از علل اصلی پیشبرد انحطاط جسم سیاه معرفی می‌شود. در چندین مطالعه، آسیب پذیری بالای نورون‌های دوپامینرژیک جسم سیاه به گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن به اثبات رسیده است. استرس اکسیداتیو توسط عدم تعادل بین تولید گونه‌های واکنش گر اکسیژن و توانایی غیرسمی کردن متابولیت های فعال تولید شده و ترمیم آسیب‌های ایجاد شده مشخص می‌شود. گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن یا ROS 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 هم چنین مشتقات غیر رادیکالی اکسیژن مانند هیدروژن پراکسید می‌باشند(Franco et al. 2010) .

منابع تولید ROS متعددی داخل سلول وجود دارند. یکی از تولیدکننده‌های اصلی ROS خانواده‌ای از آنزیم‌های متصل به غشا است که جهت فعالیت‌شان متکی بهNADPH 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(Aguirre and Lambeth 2010) .

آنیون سوپر اکسید تولید شده توسط این اکسیدکننده‌ها با نیتریک اکسید حاصل از فعالیت نیتریک اکسید سنتاز منجر به شکل‌گیری طیف وسیعی از اکسیدکننده‌ها و نیترات‌کننده‌ها مانند پراکسی‌نیتریت می‌گردند. آنیون سوپر

1- Reactive oxygen spices
2- Xanthine oxidase
3- Cyclooxygenase
4- Lipooxygenase

اکسید هم چنین به کمک سوپر اکسید دیسموتاز توسط فعالیت آنزیمی یا غیرآنزیمی تبدیل به هیدروژن پراکسید می‌گردد. هیدروژن پراکسید هم چنین می‌تواند توسط میلوپراکسیداز (MPO[1])هیپوکلروس‌اسید و سایر اکسیدکننده‌های مضر مشتق از کلر را تولید کند. بعلاوه از طریق واکنش فنتون[2] تبدیل به یون هیدروکسیل گردد. بنابراین شکل‌گیری یک گونه واکنش گر می‌تواند نهایتاً منجر به تقویت یک زنجیره تولید کننده از سایر گونه‌های واکنش گر سمی گردد(Franco et al. 2010).

سلول‌ها دارای مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی ذاتی‌اند که ROS تولید شده، تحت هر دو شرایط فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی را سمیت‌زدایی می‌کنند.گلوتاتیون احیا شده مهم‌ترین مولکول آنتی‌اکسیدان 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 به آب احیا می‌گردد. سیستم گلوتاتیون ردوکتاز و تیوردوکسین ردوکتاز، گلوتاتیون و تیوردوکسین اکسید شده را با مصرف NADPH دوباره احیا می‌کنند. سایر مولکول‌های آنتی‌اکسیدان مانند آسکوربات یا ویتامین E و آنزیم‌هایی مانند پراکسی ردوکسین[3] در برابر استرس اکسیداتیو حمایت‌های مهمی محسوب می‌گردند(Ryter et al. 2007) .

پراکسیداسیون لیپیدها اشاره به تخریب اکسیدکننده‌ی لیپیدها دارد که طی آن به واسطه‌ی 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 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).

۱- ٤ ٦ -هیدروکسی دوپامین(6-OHDA) وبیماری پارکینسون :

1- Myeloperoxidase
2- Fenton
3- Peroxiredoxin

۶- هیدروکسی دوپامین یک آنالوگ هیدروکسیله شده از انتقال دهنده عصبی دوپامین است. این ترکیب توسط Senob در سال ۱۹۵۹ ایزوله شد. آثار بیولوژیکی آن اولین بار توسط Porter و همکارانش بررسی شد. آن‌ها نشان دادند که ۶- هیدروکسی دوپامین قادر به القا کاهش نورآدرنالین در سیستم عصبی خودمختار و قلب است(Thoenen and Tranzer 1968) . همچنین این سم قادر به تخریب پایانه‌های سلول‌های عصبی در سیستم سمپاتیک می‌باشد. این ترکیب توانایی عبور از سد خونی مغزی را ندارد، بنابراین باید جهت اعمال اثر به صورت داخل مغزی تجویز گردد. مطالعات متعددی وجود ۶- هیدروکسی دوپامین را در مغز رت‌ها و انسان‌های مبتلا تایید کرده است. نورون‌های دوپامینرژیک حاوی سطوح قابل ملاحظه‌ای از دوپامین، هیدروژن پراکسید و آهن آزاد می‌باشند که یک واکنش غیر آنزیمی بین این عناصر ممکن است منجر به شکل گیری ۶- هیدروکسی دوپامین گردد(Hefti et al. 1980) .

تولید ۶-هیدروکسی دوپامین به جای خود توسط سایر فاکتورها نیز می‌تواند انجام گردد. ملانین می‌تواند توسط جدا کردن آهن آزاد از فریتین سطوح آهن آزاد را افزایش داده بنابراین واکنش شیمیایی بین آهن و دوپامین را تقویت می‌کند. در حضور یون‌های نیتریت دوپامین می‌تواند توسط گستره‌ای از سیستم‌های وابسته به هیدروژن پراکسید میزان کمی ۶- هیدروکسی دوپامین و ۶- نیترودوپامین تولید کند. منگنز نیز یک عنصر مهم است که می‌تواند توسط اکسیداسیون دوپامین تولید ۶- هیدروکسی دوپامین را تحریک کند(Napolitano et al. 1999) .

۱-٤-۱ مکانیسم‌های سمیت عصبی ناشی از ٦-هیدروکسی دوپامین :

۱-٤-۱-۱ استرس اکسیداتیو :

۶-هیدروکسی دوپامین آسیب به نورون‌های دوپامینرژیک جسم مخططی-جسم سیاه را از طریق تولید هیدروژن پراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل القا می‌کند. مطالعات متعددی ایجاد استرس اکسیداتیو توسط این ترکیب را در محیط *in vivo* تایید کرده‌اند. این مطلب چرایی موثر واقع شدن اثر حفاظتی آنتی‌اکسیدان‌ها در برابر سمیت القا شده توسط ۶- هیدروکسی دوپامین را توضیح می‌دهد (Blum et al. 2000) .

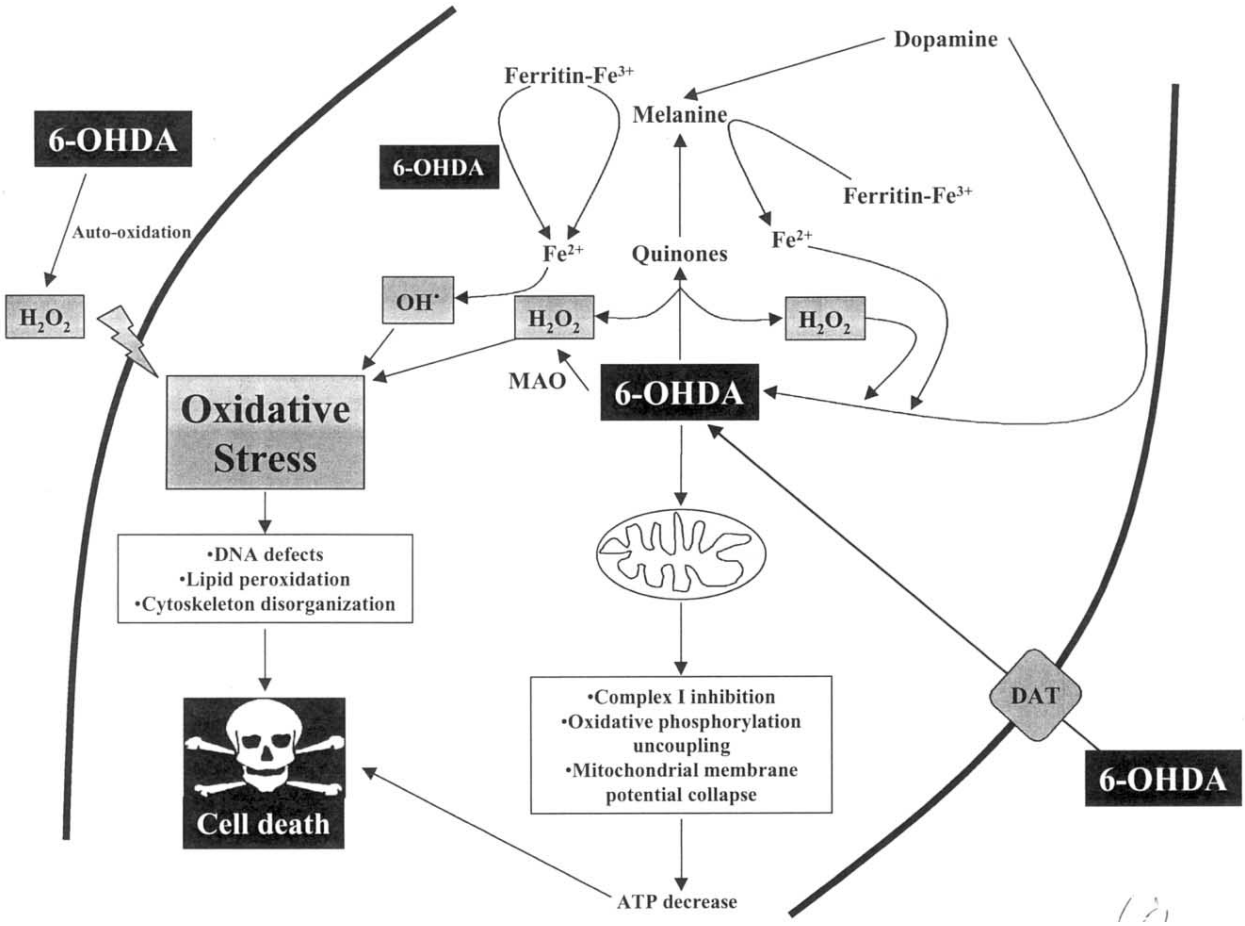
تولید ROS ممکن است توسط دو مکانیسم مجزا القا گردد. دآمیناسیون[1] توسط مونوآمین اکسیداز و اکسیداسیون خودبخودی که احتمالاً توسط آهن از طریق واکنش فنتون شروع یا تقویت می‌گردد. ۶-

1- Deamination

هیدروکسی دوپامین همانند دوپامین یک سوبسترا برای مونوآمین‌اکسیداز محسوب می‌گردد. این واکنش آنزیمی منجر به تولید هیدروژن پراکسید می‌گردد. این مطلب توسط مشاهدات ناشی از اثر جلوگیری کننده مهارکننده‌ی مونوآمین‌اکسیداز یعنی سلژیلین[۲] در ممانعت از سمیت القا شده توسط ۶- هیدروکسی دوپامین تایید می‌گردد (Wu Ying et al. 1996) .

مطالعات متعددی نشان داده‌اند که ۶-هیدروکسی دوپامین توسط یک فرایند غیر آنزیمی، اکسیداسیون خودبخودی، تولید هیدروژن‌پراکسید، کوئینون، رادیکال سوپراکسید و رادیکال‌های بسیار فعال هیدروکسیل را القا می‌کند. تولید ROS توسط مونوآمین‌اکسیداز و اکسیداسیون خودبخودی ممکن است توسط آهن تقویت گردد. پس از تزریق ۶- هیدروکسی دوپامین در جسم مخطط و جسم سیاه سطوح آهن افزایش می‌یابد. نقش آهن در سمیت ۶- هیدروکسی دوپامین توسط مطالعاتی که طی آن‌ها شلاته‌کننده‌های آهن آثار سمی ۶- هیدروکسی دوپامین را کاهش دادند نیز تایید می‌گردد. همچنین تزریق مستقیم آهن در جسم سیاه نیز شرایطی مشابه ۶- هیدروکسی دوپامین را ایجاد می‌کند. استرس اکسیداتیو ناشی از ۶- هیدروکسی دوپامین در نهایت منجر به شکستن DNA، رخ دادن جهش، به هم ریختن سازمان‌دهی اسکلت سلولی و اختلال در جذب گلوکز و آلفا آمینو بوتیریک اسید می‌گردد (Vroegop et al. 1995) .

2- Selegiline



شکل ۱-۲: مکانیسم القاء سمیت عصبی توسط ۶-هیدروکسی دوپامین (Blum et al. 2001) .

۱-٤-۱-۲ اختلال عملکرد میتوکندریایی ناشی از ٦- هیدروکسی دوپامین :

مطالعات متعددی پیشنهاد می‌کنند که ۶- هیدروکسی دوپامین توسط مکانیسم‌های متعددی عملکرد میتوکندریایی را دچار اختلال می‌کند. مطالعه Glinka و Yaudim در سال ۱۹۹۵ و Glinka و همکارانش در سال ۱۹۹۶ و ۱۹۹۸ مشخص کرد که ۶- هیدروکسی دوپامین مستقیماً زنجیره‌ی تنفسی میتوکندریایی را مورد هدف قرار می‌دهد. مطالعات دقیق‌تر نشان داد که ۶- هیدروکسی دوپامین قادر است با کمپلکس I زنجیره‌ی تنفسی میتوکندری بر همکنش کرده و آن را مهار کند. این اثر ۶- هیدروکسی دوپامین به نظر می‌رسد برگشت پذیر و مستقل از تولید ROS باشد چون نه آنتی‌اکسیدان ها و نه شلاته کننده‌های آهن توانایی کاهش مهار کمپلکس I میتوکندریایی توسط ۶- هیدروکسی دوپامین را ندارند. با وجود این برخی شواهد حاکی از این است که مهار کمپلکس I زنجیره‌ی تنفسی میتوکندریایی مکانیسم اصلی سمیت توسط ۶- هیدروکسی دوپامین

نمی‌باشد زیرا در مواردی هم‌چون مطالعات روی سلول‌های نوروبلاستومای انسانی تیمار شده با ۶- هیدروکسی دوپامین با وجود مشاهده اثر کشنده ۶- هیدروکسی دوپامین روی این سلول‌ها اما کاهش محتوای ATP، کاهش نسبت ATP/ADP و کاهش محتوای NAD^+ مشاهده نگردید (Storch et al. 2000) .

۱-٤-۱-۳ سمیت اختصاصی ٦- هیدروکسی دوپامین و بیماری پارکینسون :

دوپامین یک انتقال دهنده‌ی عصبی طبیعی در مغز است. در نورون های دوپامینرژیک این ترکیب عمدتاً در وزیکول‌ها حضور دارد که غلظت دوپامین در سیتوپلاسم و شکاف سیناپسی را تعدیل می‌کند. تحت شرایط خاص پاتولوژیک مانند ایسکمی یا هیپوکسی افزایش سطح دوپامین داخل سلولی یا خارج سلولی می‌تواند منجر به آسیب مغز گردد. بعلاوه با افزایش سن، اکسیداسیون خودبخودی دوپامین احتمالاً منجر به شکل گیری ۶- هیدروکسی دوپامین و نوروفیلامین می‌گردد و احتمالاً منجر به سمیت داخل سلولی می‌گردد. نتایج بدست آمده از مطالعات *in vitro* و *in vivo* حاکی از این است که دوپامین روی سلول‌های عصبی و غیر عصبی دارای اثر سمی می‌باشد (Jellinger et al. 1994) .

مطالعات قبلی نشان می دهد که ۶- هیدروکسی دوپامین به طور ویژه به علت بازجذب به وسیله انتقال دهنده‌های اختصاصی به سمت سلول‌های کاتکولامینرژیک می‌رود. این فرض بر پایه ی : (۱) مقایسه شیمیایی بین ۶- هیدروکسی دوپامین و دوپامین و نورآدرنالین (۲) بر تجمع ۶- هیدروکسی دوپامین در نورون‌های کاتکولامینرژیک (۳) برعمل مهاری، کاتکول‌آمین‌ها و بازجذب مهاری بر سمیت ناشی از ۶- هیدروکسی دوپامین استوار است هم‌چنین مشخص شد که سمیت ۶- هیدروکسی دوپامین بر روی سلول‌های اجدادی مگا کاریوسیت به طور مستقیم وابسته به فعالیت انتقال دهنده‌های کاتکول‌آمین‌ها(CA) می باشد(Gordon et al. 1991) .

در کشت مزنسفالیک، سمیت ۶- هیدروکسی دوپامین برای نورون‌های دوپامینرژیک غیر انتخابی است و چندین نوع از سلول‌ها مانند سلول‌های اندوتلیال، سلول‌های C6 گلیا، NIH3T3 ، CHO، نورون‌های قشری و مخچه ای به وسیله ۶- هیدروکسی دوپامین تخریب می‌شوند(Blum et al. 2001) . مسدودکننده‌های قوی