ORIGINAL ARTICLE

Dopaminergic Neuroprotection with Ginkgolide in 6-Hydroxydopamine Rat Parkinson's Disease Model

Alireza Moghadam[1],
Ali Noori-Zadeh[2],
Shahram Darabi[3],
Farzad Rajaei[4],
Hojjat-allah Abbaszadeh[5],
Hatef Ghasemi Hamidabadi[6]

[1] Dentistry Student, Student Research Committee, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Paramedicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran
[3] Associate Professor, Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
[4] Professor, Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
[5] Assistant Professor, Department of Biology and Anatomical Sciences, Hearing Disorders Research Center, Loghman Hakim Medical Center, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[6] Associate Professor, Department of Anatomy and Cell Biology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received April 9, 2018 ; Accepted September 24, 2018)

Abstract

Background and purpose: Parkinson's disease (PD) is a prevalent movement disorder in elderly with progressive motor complications due to antioxidant defense system deficiency and accumulation of degraded proteins in dopaminergic neurons of midbrain. Ginkgolide is biologically active terpenic lactones as a polyphenol, with potent antioxidant and anti-inflammatory properties. The present study aimed to evaluate the neuroprotective effects of Ginkgolide in 6-hydroxydopamine (6-OHDA) rat model of PD.

Materials and methods: Intrastriatal 6-OHDA-parkinson's disease rat model was pretreated with Ginkgolide at 50 mg/kg/day for 4 weeks. Apomorphine-induced rotation test was applied to evaluate the neuroprotective effects of Ginkgolide. In addition, the antioxidant effects of Ginkgolide were assessed by analyzing the levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), Glutathione-S-transferase (GST), reactive oxygen species (ROS) homovanillic acid (HVA), and dopamine (DA).

Results: Ginkgolide pretreatment led to reduced nigral and striatal TBARS, and ROS and increased the levels of GST, HVA, and DA. Meanwhile, Ginkgolide attenuates apomorphine-induced rotational bias and reduced contra-lateral rotation in Ginkgolide treatment group.

Conclusion: These findings indicated the neuroprotective potential of Ginkgolide in 6- OHDA rat model of PD via amelioration of oxidative stress.

Keywords: Parkinson's disease, 6-hydroxydopamine, ginkgolide, oxidative stress

J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 28 (170): 11-21 (Persian).

* **Corresponding Author: Shahram Darabi** - Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran (E-mail: shahram2005d@yahoo.com)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-10-30]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هشتم شماره ۱۷۰ اسفند سال ۱۳۹۷ (۲۱-۱۱)

محافظت نورون های دوپامینرژیکی به وسیله جینکولاید در بیماری پارکینسون مدل ۶-هیدروکسی دوپامین

علیرضا مقدم[۱]
علی نوری زاده[۲]
شهرام دارابی[۳]
فرزاد رجایی[۴]
حجت اله عباس زاده[۵]
هاتف قاسمی حمیدآبادی[۶]

چکیده

سابقه و هدف: بیماری پارکینسون یک بیماری شایع با عوارض حرکتی در سنین بالا است که به دلیل آسیب سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی و تجمع پروتئین‌های تخریب شده در نورون‌های دوپامینرژیکی در مغز میانی به وجود می‌آید. Ginkgolide، یکی از لاکتون‌های فعال ترپنیک به عنوان پلی فنل است که دارای خواص آنتی اکسیدانی و ضد التهابی است. در این مطالعه، اثرات محافظت نورونی Ginkgolide در موش‌های صحرایی مدل پارکینسونی ایجاد شده به وسیله 6-OHDA (6-Hydroxydopamine) ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها: موش‌های صحرایی مدل پارکینسونی ایجاد شده با تزریق داخل استریاتومی 6-OHDA، به‌وسیله تزریق روزانه ۵۰ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن از Ginkgolide پیش تیمار و درمان به مدت ۴ هفته ادامه یافت. برای بررسی اثر محافظت نورونی Ginkgolide، تست رفتاری به وسیله آپومورفین صورت گرفت. هم‌چنین برای بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره Ginkgolide میزان Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) ، Glutathione-S-transferase (GST)، Reactive oxygen species (ROS) ، Homovanillic acid (HVA) و Dopamine (DA) ارزیابی گردید.

یافته‌ها: پیش درمان با Ginkgolide باعث کاهش TBARS و ROS و افزایش GST، HVA و DA گردید. در ضمن، در بررسی رفتاری مشاهده شد که در گروه درمان، Ginkgolide باعث کاهش آسیب نورون‌های دوپامینرژیکی جسم سیاه گشت که با بهبود حرکتی و کاهش چرخش به سمت مخالف ضایعه، نسبت به گروه تخریب مشخص گردید.

استنتاج: نتایج نشان دادند که Ginkgoide در بیماری مدل پارکینسونی ایجاد شده به وسیله OHDA -6، از طریق کاهش استرس اکسیداتیو، توانایی محافظت نورونی دارد.

واژه های کلیدی: بیماری پارکینسون، ۶-هیدروکسی دوپامین، جینکولاید، استرس اکسیداتیو

مقدمه

بیماری پارکینسون یک اختلال حرکتی نورودژنراتیو است که ۵۰ درصد افراد بالای ۸۵ سال را درگیر می‌کند(۱). از علائم این بیماری بی حرکتی، دیسکینزی، لرزش و سختی حرکات است که شخص دچار اختلالات

مولف مسئول: شهرام دارابی– قزوین: دانشگاه علوم پزشکی قزوین، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی E-mail: shahram2005d@yahoo.com
۱. دانشجوی دندانپزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
۲. استادیار، گروه بیوشیمی، دانشکده پیرا پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران
۳. دانشیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
۴. استاد، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
۵. استادیار، گروه بیولوژی و علوم تشریحی، مرکز اختلالات شنوایی بیمارستان لقمان حکیم، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۶. دانشیار، گروه آناتومی و بیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۷/۲/۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :۱۳۹۷/۲/۱۱ تاریخ تصویب : ۱۳۹۷/۷/۲

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-10-30]

حرکتی می‌شود. داروی اصلی این بیماری لودوپا است، اما به دلیل جذب آن توسط سایر نواحی غیر اختصاصی سیستم عصبی عوارض شدیدی دارد. برای کاهش عوارض آن از داروهای مکمل استفاده می‌شود. اتیولوژی بیماری پارکینسون ناشناخته است، اما عواملی مانند آسیب میتوکندری و تجمع پروتئین‌های تخریب شده در ایجاد بیماری نقش دارند(۲) که همگی این عوامل در ارتباط نزدیک با استرس اکسیداتیو است(۵-۲). مطالعات متعدد ارتباط بین آسیب سیستم آنتی‌اکسیدانی و بیماری‌های نورودژنراتیو مانند پارکینسون را نشان داده‌اند(۶). بنابراین تنظیم سیستم آنتی‌اکسیدانی در سلول به‌عنوان یک استراتژی در درمان بیماری‌های نورودژنراتیو مورد توجه واقع شده است(۷). اخیراً برای درمان بیماری‌های سیستم عصبی سلول درمانی، ژن درمانی(۹،۸) و استفاده از داروهای پلی‌فنلیک(۱۰) مورد توجه واقع شده‌اند. ماده Ginkgolide دارای اثرات محافظت نورونی در بیماری‌های نورودژنراتیو است(۱۱). اما مکانیسم عمل محافظتی آن به خصوص در بیماری پارکینسون ناشناخته است. مطالعات نشان داده اند که رادیکال‌های آزاد (ROS) نقش مهمی در تخریب مسیر نیگرواستریاتال و ایجاد بیماری پارکینسون دارند(۱۲،۲). مطالعات پس از مرگ در انسان نشان داده است که آسیب شدیدی به لیپیدها، پروتئین‌ها و ژنوم جسم سیاه ساقه مغز در بیماران پارکینسونی وجود دارد(۵). Ginkgolide یک پلی‌فنل گیاهی است که دارای نقش آنتی‌اکسیدانی و ضد التهاب است(۱۳). در واقع Ginkgolide به وسیله فعال کردن سیستم آنتی‌اکسیدانی، باعث برداشتن تجمعات پروتئینی ناقص و هضم نشده در سلول در بسیاری بیماری‌های نورودژنراتیو می‌شود. هم‌چنین مغز و سیستم عصبی را در اثر صدمات ناشی از هیپوکسی و ایسکمی محافظت می‌کند(۱۳).

در مطالعه‌ای عصاره Ginkgo Biloba باعث محافظت نورون‌های جسم سیاه در برابر سم MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) ازطریق فعال کردن سیستم آنتی اکسیدانی و کاهش آپوپتوز شده است(۱۴).

6-OHDA ماده سمی است که در تحقیقات برای ایجاد مدل پارکینسون استفاده می‌شود. در مطالعات از تزریق ماده 6-OHDA به درون استریاتوم، برای ایجاد مدل بیماری پارکینسون استفاده می‌شود که دارای بیش‌ترین شباهت به مدل انسانی بیماری پارکینسون است. پس از تزریق، 6-OHDA در فضای خارج سلولی اکسیده شده و باعث تولید عوامل اکسیدانی در سلول و ایجاد شوک اکسیدانی به سلول‌ها و در نهایت منجر به تخریب کمپلکس یک میتوکندری و تخریب زنجیره انتقال الکترونی میتوکندی می‌شود، که تمامی این رخدادها در نهایت منجر به مرگ سلولی می‌شود(۱۵). هم‌چنین سم 6-OHDA باعث فعال شدن NF-Kb در جسم سیاه و ایجاد بیماری پارکینسون می‌شود(۱۶). در مطالعه‌ای مشاهده شده است که عصاره Bilobalide که از نظر ساختاری مشابه به Ginkgolide است، از طریق مهار NF-κB جلوی تخریب نورون‌های دوپامینرژیکی جسم سیاه را می‌گیرد(۱۷).

مطالعات زیادی در مورد خواص Ginkgo biloba در سیستم عصبی صورت گرفته است(۲۰-۱۸)، اما به تازگی اثبات شده است که Ginkgolide از طریق فعال کردن مسیر آنتی‌اکسیدانی باعث افزایش مقاومت سلول‌ها می‌گردد(۲۱). بنابراین ما این فرضیه را مطرح کردیم که Ginkgolide از طریق فعال کردن سیستم آنتی‌اکسیدانی (GST)، باعث کاهش TBARS و ROS و افزایش میزان DA و HVA در جسم سیاه می‌شود و در نهایت علائم با بهبود در رفتار چرخشی موش‌های صحرایی مشخص می‌گردد.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی، ۳۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۱۸۰-۲۵۰ گرم به صورت تصادفی به ۳ گروه ۱۰ تایی (الف) کنترل (ب) تخریب و (ج) درمان تقسیم شدند. در گروه کنترل، رت‌ها جراحی استریوتاکسیک شده و به داخل استریاتوم چپ ۵ میکرولیتر سالین اسکوربات ۰/۲ درصد تزریق شد.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-10-30]

درگروه تخریب به داخل استریاتوم چپ حیوانات ۵ میکرولیتر سالین اسکوربات ۰/۲ درصد حاوی۵ میکروگرم بر میکرولیتر 6-OHDA تزریق گردید. در گروه درمان، یک روز قبل از تخریب استریاتوم، حیوانات با دوز ۵۰ میلی‌گرم Ginkgolide به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن، پیش تیمار و درمان با همان دوز روزانه به مدت چهار هفته ادامه یافت. حیوانات در دمای کنترل شده حیوانخانه (۲°C ± ۲۲) در ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی و به میزان کافی به آب و غذا دسترسی داشتند. تمام مطالعات براساس دستورالعمل کار با حیوانات آزمایشگاهی کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی قزوین (کد اخلاق: IR.QUMS.REC.1396.114) انجام شد. تمام دستورالعمل‌های اخلاقی برای کاهش درد و رنج حیوانات انجام شد.

جراحی استریوتاکسیک ایجاد مدل پارکینسون به وسیله تزریق 6-OHDA

موش‌ها توسط تزریق داخل صفاقی مخلوطی از کتامین (۱۰۰ mg/kg) و گزیلازین (۵ mg/kg) بیهوش شدند. سپس سر آن‌ها در دستگاه استریوتاکس با مختصات ۳ mm لترال به سمت چپ، ۴/۵ mm شکمی از سطح سخت شامه و ۹/۲mm+ قدامی خلفی نسبت به فاصله بین دو گوش (interural) تنظیم و میله دندانی (incisor bar) ۳/۳ میلی‌متر زیر سطح افق قرار گرفت. پس از نمایان شدن سطح سخت شامه، ۵ میکرولیتر سالین اسکوربات ۰/۲ درصد حاوی ۵ میکروگرم بر میکرولیتر 6-OHDA به وسیله سرنگ همیلتون تزریق گردید.

تست رفتاری

قبل از انجام جراحی و چهار هفته پس از آن، از حیوانات در گروه‌های مختلف، تست رفتاری گرفته شد. تست رفتاری، توسط تزریق داخل صفاقی ماده اپومورفین هیدروکلراید (شرکت sigma) به میزان ۲/۵ mg/kg صورت گرفت. ۱۰ دقیقه قبل از جراحی (base line) موش‌ها در محفظه استوانه‌ای مدرج شفاف به نور از جنس شیشه یا پلاستیک خشک، با ابعاد قطر ۳۳ و ارتفاع ۳۵ سانتی متر نگهداری شدند. پس از تزریق دارو تعداد چرخش کامل ۳۶۰ درجه در فواصل زمانی ۱۰ دقیقه ای به مدت ۶۰ دقیقه به صورت دستی اندازه‌گیری شد. تعداد چرخش کونترولترال (به سمت مخالف محل ضایعه به سمت راست) به عنوان عدد مثبت و چرخش ایپسی لترال (به سمت چپ یا محل ضایعه) به عنوان عدد منفی در نظر گرفته شد. تعداد خالص چرخش پس از تفاضل چرخش‌ها در دو جهت محاسبه شد.

بررسی پارامترهای نوروشیمیایی

چهار هفته پس از تیمار دارویی، پس از تست رفتاری مغز موش‌ها خارج شده و جسم سیاه مغز میانی جدا شد. برای بررسی فعالیت آنزیمی سوپراکسی دیسموتاز و کاتالاز جسم سیاه به وسیله phosphate buffer saline (PBS) pH 7.0 (0.01 M) به میزان 10% w/v هموژنایز شده و برای به‌دست آوردن مایع رویی حاوی میتوکندری، در ۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد.

بررسی فعالیت آنزیم GST

برای بررسی فعالیت GST یک محلول واکنشی حاوی M phosphate buffer saline (PBS) pH 6.5 ۰/۱ , 1.0 mM GSH 1.0 mM CDNB و 0.1 mL PMS به حجم ۲ میلی لیتر رسانده شد. تغییرات جذب نوری در ۳۴۰ نانومتر به صورت نانومول CDNB تشکیل شده در هر میلی‌گرم پروتئین در یک دقیقه (nmol CDNB formed/min /mg protein) خوانده شد.

بررسی میزان رادیکال های آزاد اکسیژن ROS

میزان ROS به‌وسیله رنگ غیر فلوئورسنت لیپوفیلیک دی‌کلروفلورسین دی‌استات اندازه‌گیری شد. این رنگ در حضور رادیکال‌های آزاد اکسیژن ROS و آنزیم استراز درون سلولی به رنگ فلوئورسنت dichlorofluorescein 2,7 تبدیل می‌گردد. میزان رنگ

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-10-30]

فلوئورسنت بازتاب شده به میزان ROS بستگی دارد(۲۲). میزان فلوئورسنت در تابش نور تحریکی ۴۸۸ نانومتر و تابشی ۵۳۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. نتایج بر اساس روش برادفورد برای بررسی میزان DCF (معادل ROS) بر حسب نانوگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد.

بررسی میزان TBARS

برای بررسی TBARS، ۲ میلی‌لیتر از PMS در میکروتیوب ریخته شد و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به وسیله شیکر، بالا پایین شد. یک میکروتیوب دیگر در دمای صفر درجه با همان شرایط روی شیکر قرار داده شد. پس از یکساعت ۰/۴ میلی‌لیتر از TCA 5% و ۰/۴ میلی لیتر از TBA 0.67% (Thiobarbituric Acid) به هر دو میکروتیوب اضافه شد. محلول واکنشی در g ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی جدا شد و در میکروتیوب دیگر به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. سپس میکروتیوب‌ها سرد شده و در طول موج ۵۳۵ نانومتر خوانده شد. میزان پراکسیداسیون لیپیدی به صورت نانومول از TBARS تشکیل شده در دقیقه از هر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

بررسی میزان دوپامین DA و HVA

برای بررسی دوپامین و متابولیت آن جسم سیاه جدا و به‌وسیله perchloric acid (0.17 M) 10% w/v به میزان برای مدت ۳۰ ثانیه هموژنایز شد تا DA از بافت استخراج شود(۲۳). به‌طور خلاصه به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد و مایع رویی به درون میکروتیوب ریخته شد و در ۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ و غلظت DA و HVA اندازه‌گیری شد.

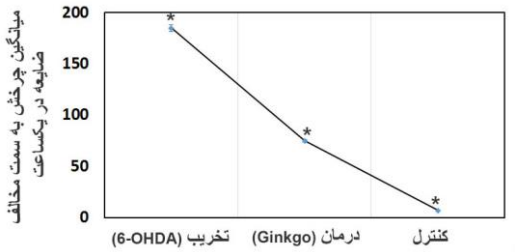
آنالیز آماری

تمامی داده‌ها به صورت Mean±SEM بیان شدند. هم‌چنین از آنالیز واریانس یکطرفه (one way ANOVA) و در صورت اختلاف معنی‌دار از آزمون پارامتریک Tukey جهت مقایسه استفاده گردید. جهت رسم نمودار از برنامه Microsoft Excel 2017 استفاده گردید. در مورد کلیه یافته‌ها اختلاف در سطح $p < ۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

تست رفتاری القا شده با آپومورفین

تست رفتاری در هفته اول و چهارم پس از جراحی انجام شد. نتایج نشان می‌دهد که همه گروه‌ها اختلاف معنی‌دار ($p < ۰/۰۵$) در تعداد چرخش داشتند. میانگین تعداد چرخش (MEAN±SEM)، چهار هفته پس از جراحی در گروه‌های تخریب، درمان و کنترل به ترتیب برابر با ۱۸۵±۳/۱، ۷۵±۱/۲۸ و ۷±۰/۵۹ بود. پس از جراحی (After surgery) و ایجاد مدل پارکینسون در گروه تخریب مشاهده شد که میانگین تعداد چرخش‌های کونترولترال (به سمت مخالف ضایعه) حیوانات به ۱۸۵±۳/۱ رسید که نشان دهنده ایجاد صحیح تخریب در مدل حیوانی است. در گروه درمان، Ginkgolide باعث کاهش آسیب نورون‌های دوپامینرژیکی جسم سیاه شد که با بهبود حرکتی و کاهش چرخش در گروه درمان نسبت به گروه تخریب مشخص شد. تعداد چرخش بین همه گروه‌ها اختلاف معنی‌دار ($p < ۰/۰۵$) بود (نمودار شماره ۱).

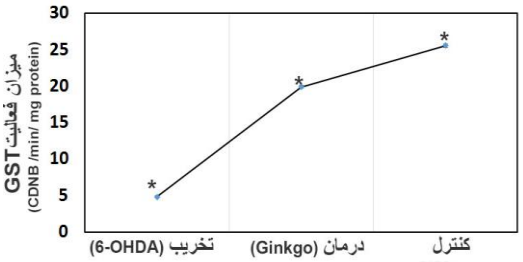


نمودار شماره ۱: تست رفتاری چرخشی القا شده بر اثر آپومورفین در زمان یکساعت در گروه های مختلف. در گروه تخریب عدم تقارن حرکتی ناشی از تزریق سم 6-OHDA و چرخش کونترالترال زیاد بود، اما در گروه درمان Ginkgolide جلوی عدم تقارن حرکتی را گرفت و تعداد چرخش‌های کونترالترال کاهش یافت، * ($P < 0.05$). ستاره نشان دهنده معنی داری در سطح $P < 0.05$ بین گروه ها است. مقادیر در نمودار به صورت (MEAN±SEM)، محاسبه شده اند.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-10-30]

بررسی میزان فعالیت Glutathione-S-transferase (GST)

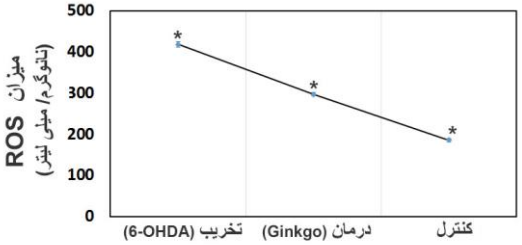
میـزان فعالیـت آنـزیم GST (MEAN±SEM)، در گـروه تخریـب (۴/۸۲±۰/۱۴) بـه صـورت معنـی داری (p <۰/۰۵) کم‌تر از گروه درمـان (۱۹/۹±۰/۲۲) و کنتـرل (۲۵/۵۵±۰/۲۲) بود، امـا پـیش درمـان بـا Ginkgolide تـا حدودی جلوی این تغییرات را گرفت و در گـروه درمـان میزان GST نسبت به گروه تخریب بیش تر شد کـه نشـان دهنـده نقـش حفـاظتی Ginkgolide در جلـوگیری از تخریب در ناحیه جسم سیاه است (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۲: بررسی میزان فعالیـت Glutathione-S-transferase (GST) در گروه‌های تجربی. درگروه تخریب تزریق سم 6-OHDA باعث کاهش فعالیت آنزیم GST شد، اما در گـروه درمـان، Ginkgolide مانع کاهش فعالیـت آنزیمـی شـد. میـزان فعالیـت آنزیمـی GST بـه صورت CDNB /min/ mg protein ارائه شده است. علامـت سـتاره نشان دهنـده معنـی داری در سـطح $P < 0.05$ بـین گـروه هـا اسـت. مقادیر در نمودار به صورت (MEAN±SEM)، محاسبه شده اند.

بررسی میزان ROS

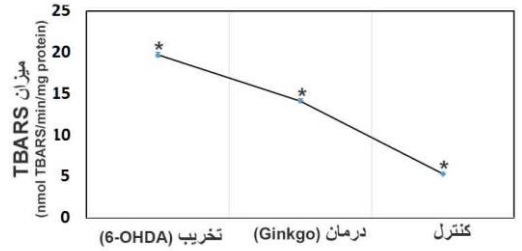
در بررســی مارکرهــای اســترس اکســیداتیو در نـورون‌هـای جسـم سـیاه نشـان داد کـه میـزان ROS (MEAN±SEM)، در گروه تخریب (۴۱۸/۹±۶/۲۲) به صورت معنی‌داری (p <۰/۰۵) بـیش‌تـر از گـروه درمـان (۲۹۷/۱±۴/۰۴) و کنترل (۱۸۵/۸±۴/۰۱) بود. در گـروه پیش درمان با Ginkgolide میزان ROS نسبت بـه گـروه تخریب به صورت معنی‌داری کم‌تر (p <۰/۰۵) بود کـه نشان‌دهنده تاثیر Ginkgolide در کـاهش رادیکـال‌هـای آزاد اکسیژن اسـت (نمـودار شـماره ۳). میـزان ROS بـر حسب نانوگرم بر میلی‌لیتر ارائه شده است.



نمودار شماره ۳: بررسـی میـزان فعالیـت Reactive oxygen species (ROS) در گروه‌های تجربی. درگروه تخریب تزریق سم 6-OHDA باعث افزایش میزان رادیکال های آزاد اکسیژن (ROS) شـد، امـا در گروه درمان، Ginkgolide مانع تولید بیش‌تر رادیکال‌هـای آزاد اکسـیژن شد. ستاره نشان دهنده معنی داری در سطح $P < 0.05$ بین گروه هـا است. مقادیر در نمودار به‌صورت (MEAN±SEM)، محاسبه شده‌اند.

بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدی (TBARS)

در بررســی مارکرهــای اســترس اکســیداتیو در نـورون‌هـای جسـم سـیاه نشـان داد کـه میـزان TBARS (MEAN±SEM)، در گروه تخریـب (۱۹/۷۱±۰/۳) بـه صورت معنی‌داری (p <۰/۰۵) بـیش‌تـر از گـروه درمـان (۱۴/۱۴±۰/۲۵) و کنتـرل (۵/۳۲±۰/۱۲) بـود. در گـروه پیش درمان با Ginkgolide میزان TBARS نسبت به گـروه تخریب به صورت معنی‌داری کم‌تر (p <۰/۰۵) بود کـه نشان‌دهنده تاثیر Ginkgolide در کاهش پراکسیداسـیون لیپیدی است (نمودار شماره ۴). میزان TBARS به صـورت nmol TBARS/min/mg protein ارائه شده است.

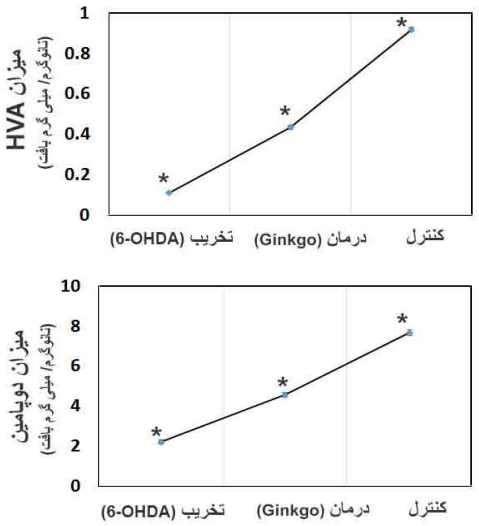


نمودار شماره ۴: بررسی میزان فعالیت میـزان پراکسیداسـیون لیپیـدی Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) در گروه‌هـای تجربی. در گروه تخریب تزریق سم 6-OHDA باعث افزایش میـزان TBARS شد، اما در گروه درمان، Ginkgolide مانع تولیـد بـیش‌تـر TBARS شد. میزان TBARS به‌صورت nmol TBARS/min/mg protein ارائه شده است. ستاره نشـان دهنـده معنـی داری در سـطح $P<0.05$ بین گروه ها است. مقـادیر در نمودارب‌ـه صـورت (MEAN±SEM)، محاسبه شده اند.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-10-30]

بررسی میزان دوپامین (DA) و متابولیت آن Homovanillic acid (HVA)

برای بررسی میزان عملکرد نورون‌های دوپامینرژیکی و بهبود آن‌ها و ارتباط بین تغییرات نوروبی هویورال (neurobehavioral alterations) و نوروشیمیایی (neurochemical changes) میزان دوپامین و HVA (MEAN±SEM)، در استریاتوم و جسم سیاه ناحیه ایپسی لترال درگروه‌های مختلف ارزیابی شد. همان‌طورکه در نمودار شماره ۵ مشاهده می‌شود، در گروه کنترل میزان DA (۷/۶۶±۰/۱۵) و HVA (۰/۹±۰/۰۱) بیش‌تر از سایر گروه‌ها است. در گروه تخریب، میزان DA (۲/۱۸±۰/۱) و HVA (۱) به شدت به صورت معنی‌داری ($p <$ ۰/۰۵) کاهش یافت. اما در گروه درمان، میزان DA (۴/۵۵±۰/۱۴) و HVA (۰/۴۵±۰/۱۴)، Ginkgolide مانع کاهش بیش‌تر DA و HVA نسبت به گروه تخریب شد (نمودار شماره ۵). بنابراین افزایش میزان DA و HVA در حیوانات گروه درمان نسبت به گروه تخریب نشان‌دهنده افزایش بقا و بهبود عملکرد نورون‌های دوپامینرژیکی در جسم سیاه است. مقادیر DA و HVA به صورت نانوگرم بر میلی‌گرم بافت ارائه شده است.



نمودار شماره ۵: بررسی میزان دوپامین(DA) و متابولیت آن (HVA) homovanillic acid در گروه های تجربی. در گروه تخریب تزریق سم 6-OHDA باعث کاهش میزان DA و HVA شد، اما در گروه درمان، Ginkgolide مانع کاهش بیش‌تر DA و HVA شد. میزان دوپامین و HVA به‌صورت نانوگرمبر میلی‌گرم پروتئین ارائه شده است. علامت ستاره نشان دهنده معنی‌داری در سطح $P < 0.05$ بین گروه ها است. مقادیر در نمودار به صورت (MEAN±SEM)، محاسبه شده اند.

بحث

در این مطالعه، Ginkgolide باعث (الف): بهبود رفتار حرکتی و کاهش چرخش القا شده به وسیله آپومورفین، (ب): افزایش DA و HVA، (ج) افزایش بیان عوامل رونویسی آنتی‌اکسیدانی مانند GST و کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و پراکسیداسیون لیپیدی شد. تزریق 6-OHDA باعث تغییرات رفتاری شد که مطرح‌کننده ایجاد مدل بیماری پارکینسون است. این مدل یکطرفه ایجاد بیماری پارکینسون، شایع ترین مدل پیش کلینیکی است که اثرات این مدل بر روی سیستم دوپامینرژیکی نیگرواستریاتال به خوبی شناخته شده است(۲۴). Cao و همکاران در مطالعه ای نشان دادند که تجویز عصاره گیاه Ginkgo Biloba به مدت ۷ روز جلوی آپوپتوز ناشی از مصرف لودوپا در رت‌های آزمایشگاهی را گرفت و از کاهش نورون‌ها در جسم سیاه پیشگیری کرد(۲۵). در مطالعات Cao و Yang و همکاران، تزریق سم به صورت مستقیم در جسم سیاه صورت گرفت(۲۵،۱۴) که این مدل ایجاد بیماری، باعث تخریب سریع جسم سیاه می‌شود و شباهت کم‌تری به مدل انسانی دارد، اما در این مطالعه تزریق 6-OHDA، به صورت یکطرفه در سمت چپ استریاتوم حیوانات صورت گرفت که ماده سمی 6-OHDA به صورت رتروگراد باعث تخریب نورون‌های دوپامینرژیکی واقع در جسم سیاه می‌شود(۲۶)، در نتیجه میزان دوپامین کم می‌شود و میزان گیرنده‌های دوپامینی پس‌سیناپسی افزایش می‌یابد. این عدم تقارن گیرنده‌های دوپامینی در سمت راست و چپ جسم سیاه به وسیله تست رفتاری القا شده به وسیله آپومورفین ارزیابی شد. آپومورفین آگونیست دوپامین است و باعث چرخش کونترولترال موش به سمت مخالف ناحیه آسیب دیده می‌شود. در این مطالعه Ginkgolide از راه کاهش عدم تقارن حرکتی و کاهش

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-10-30]

چرخش، باعث بهبود حرکتی حیوانات شد. هم‌چنین Ginkgolide جلوی کاهش DA را گرفت که می‌تواند توجیه‌کننده دلیل کاهش تقارن حرکتی در گروه درمان نسبت به تخریب است. این یافته مطابق یافته‌های سایر محققین است که میزان محتوای DA تحت تاثیر اندوتوکسین 6-OHDA کاهش می‌یابد(۲۷). هم‌چنین تفاوت دیگر این مطالعه با مطالعات قبلی در زمان آن بود؛ در مطالعه Cao و همکاران، مدت زمان مطالعه ۷ روز بود(۲۵)، اما در مطالعه ما مدت زمان یک ماه بود که به مدل بیماری پارکینسون در انسان که مزمن است، شباهت بیش‌تری دارد. مطالعات متعددی نقش محافظت نورونی عصاره گیاه Ginkgo Biloba در بیماری پارکینسون را نشان داده اند.

Rojas و همکاران نقش این دارو را در تنظیم هموستازیس مس در مغز موش مدل بیماری پارکینسون با سم MPP^+ نشان داده‌اند(۲۸). Ahmad و همکاران نقش این دارو را در بهبود حرکتی، عضلانی، افزایش GSH و کاهش TBARS در جسم سیاه موش مدل پارکینسونی نشان داده‌اند(۲۹).

Gagn و همکاران در مطالعه‌ای مشاهده کردند که این دارو جلوی مرگ سلول‌های رده PC12 (pheochromocytoma) در برابر سمیت ناشی از MPP^+ را گرفت(۳۰).

مطالعات نشان داده‌اند که در مغز میزان مارکرهای استرس اکسیدانی اندوژنز مانند TBARS، ROS و GST با افزایش استرس دچار تغییرات می‌شوند(۳۲،۳۱). سم 6-OHDA باعث ایجاد استرس اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپیدی، کاهش GSH و آسیب میتوکندری می‌شود(۳۳). استرس اکسیداتیو به معنای عدم تعادل بین تولید و جذب رادیکال‌های آزاد در سیتوپلاسم سلول است. این افزایش رادیکال‌های آزاد یا عدم پاکسازی آن‌ها باعث اختلال عملکرد و مرگ سلول‌های post mitotic مانند نورون‌ها می‌شود. در شرایط عادی سیستم آنتی‌اکسیدان درونی سلول باعث پاکسازی عوامل اکسیدانی می‌شود اما در شرایط پاتولوژیک به عوامل آنتی اکسیدان بیرونی نیاز است(۳۵،۳۴،۳). آنزیم GST باعث پاکسازی مغز از رادیکال‌های آزاد می‌شوند(۳۶). یک عامل مهم پاتوژنیک در ایجاد بیماری پارکینسون، استرس اکسیداتیو است. در این مطالعه استرس اکسیداتیو به‌وسیله 6-OHDA ایجاد شد. در مطالعات قبلی نشان داده شده است که آسیب ناشی از 6-OHDA باعث کاهش میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود(۳۷،۳۴). به موازات سایر مطالعات، در این تحقیق در گروه تخریب، میزان ROS و پراکسیداسیون لیپیدی افزایش یافت، اما میزان GST کاهش یافت که نشان‌دهنده اختلال در سیستم آنتی‌اکسیدانی به وسیله 6-OHDA است که در نتیجه میزان DA و HVA هم کاهش یافت. افزایش استرس اکسیداتیو و اختلال سیستم آنتی‌اکسیدانی باعث بیماری‌های نورودژنراتیو مانند پارکینسون می‌شود. بنابراین تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی منجر به پیشگیری از پیشرفت بیماری پارکینسون می‌شود. Ginkgolide از طریق تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی باعث پیشگیری از تخریب نورون‌های جسم سیاه و به تبع آن بهبود رفتار حرکتی شد. در گروه درمان مشاهده شد که Ginkgolide باعث کاهش TBARS و ROS و افزایش DA و HVA شد، در نتیجه با بهبود میزان دوپامین و متابولیت آن در نورون‌های دوپامینرژیکی ساقه مغز، شاهد بهبود حرکت چرخشی القا شده به وسیله آپومورفین بودیم.

Ginkgolide به وسیله خواص آنتی‌اکسیدانی، باعث بازگرداندن دوپامین ازطریق جلوگیری ازتخریب نورون‌های دوپامینرژیکی مغز میانی شد، در نتیجه احتمالاً می‌تواند در درمان بیماری‌های نورودژنراتیو مانند بیماری پارکینسون که همراه با آسیب سیستم آنتی‌اکسیدانی هستند، موثر باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی قزوین (طرح شماره ۲۵۱) و کارشناسان، خانم‌ها فهیمه حاج آقایی و هاجر صادقی تقدیر و تشکر می‌گردد.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-10-30]

References

1. Collier TJ, Kanaan NM, Kordower JH. Aging and Parkinson's disease: Different sides of the same coin? Mov Disord 2017; 32(7): 983-990.
2. Guo JD, Zhao X, Li Y, Li GR, Liu XL. Damage to dopaminergic neurons by oxidative stress in Parkinson's disease (Review). Int J Mol Med 2018; 41(4): 1817-1825.
3. Haghdoost-Yazdi H, Faraji A, Fraidouni N, Movahedi M, Hadibeygi E, Vaezi F. Significant effects of 4-aminopyridine and tetraethylammonium in the treatment of 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease. Behav Brain Res 2011; 223(1): 70-74.
4. Haghdoost-Yazdi H, Hosseini SS, Faraji A, Nahid D, Jahanihashemi H. Long term exposure to norharman exacerbates 6-hydroxydopamine-induced parkinsonism: possible involvement of L-type Ca2+ channels. Behav Brain Res 2010; 215(1): 136-140.
5. Henchcliffe C, Beal MF. Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. Nat Clin Pract Neurol 2008; 4(11): 600-609.
6. Hamidi GA, Faraji A, Zarmehri HA, Haghdoost-Yazdi H. Prolonged hyperoxia preconditioning attenuates behavioral symptoms of 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism. Neurol Res 2012; 34(7): 636-642.
7. Haghdoost-Yazdi H, Sarookhani M, Faraj A, Fraidouni N, Dargahi T, Yaghoubidoust MH, et al. Evaluation of the association between blood homocysteine concentration and the degree of behavioral symptoms in the 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rat. Pharmacol Biochem Behav 2014; 124: 297-304.
8. Darabi S, Tiraihi T, Noori-Zadeh A, Rajaei F, Darabi L, Abbaszadeh HA. Creatine and retinoic acid effects on the induction of autophagy and differentiation of adipose tissue-derived stem cells into GABAergic-like neurons. J Babol Univ Med Sci 2017; 19(8): 41-49 (Persian).
9. Kazemi Mehrjerdi H, Noori-Zadeh A, Darabi S, Fajaei R. Lithium prevents cell apoptosis through autophagy induction. Bratisl Med J 2018; 119(4): 234-239.
10. Hosseini A, Hosseinzadeh H. Antidotal or protective effects of Curcuma longa (turmeric) and its active ingredient, curcumin, against natural and chemical toxicities: A review. Biomed Pharmacother. 2018; 99: 411-421.
11. Christen Y. Ginkgo biloba and neurodegenerative disorders. Front Biosci. 2004; 9: 3091- 3104.
12. Piri H, Haghdoost-Yazdi H, Fraidouni N, Dargahi T, Yaghoubidoust M, Azadmehr A. The Anti-Parkinsonism Effects of KATP Channel Blockade in the 6-Hydroxydopamine-Induced Animal Model: The Role of Oxidative Stress. Basic Clin Neurosci (BCN) 2017; 8(3): 183-192 (Persian).
13. Nabavi SM, Habtemariam S, Daglia M, Braidy N, Loizzo MR, Tundis R, et al. Neuroprotective Effects of Ginkgolide B Against Ischemic Stroke: A Review of Current Literature. Curr Top Med Chem 2015; 15(21): 2222-2232.
14. Yang SF, Wu Q, Sun AS, Huang XN, Shi JS. Protective effect and mechanism of Ginkgo biloba leaf extracts for Parkinson disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Acta Pharmacol Sin 2001; 22(12): 1089-1093.
15. Kumar A, Sharma N, Gupta A, Kalonia H, Mishra J. Neuroprotective potential of atorvastatin

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-10-30]

and simvastatin (HMG-CoA reductase inhibitors) against 6-hydroxydopamine (6-OHDA) induced Parkinson-like symptoms. Brain Res 2012; 1471: 13-22.

16. Tarabin V, Schwaninger M. The role of NF-kappaB in 6-hydroxydopamine- and TNFalpha-induced apoptosis of PC12 cells. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2004; 369(6): 563-569.
17. Li LY, Zhao XL, Fei XF, Gu ZL, Qin ZH, Liang ZQ. Bilobalide inhibits 6-OHDA-induced activation of NF-kappaB and loss of dopaminergic neurons in rat substantia nigra. Acta Pharmacol Sin 2008; 29(5): 539-547.
18. Cohen G. Monoamine oxidase, hydrogen peroxide, and Parkinson's disease. Adv Neurol 1987; 45: 119-125.
19. Rojas P, Rojas C, Ebadi M, Montes S, Monroy-Noyola A, Serrano-Garcia N. EGb761 pretreatment reduces monoamine oxidase activity in mouse corpus striatum during 1-methyl-4-phenylpyridinium neurotoxicity. Neurochem Res 2004; 29(7): 1417-1423.
20. Wu WR, Zhu XZ. Involvement of monoamine oxidase inhibition in neuroprotective and neurorestorative effects of Ginkgo biloba extract against MPTP-induced nigrostriatal dopaminergic toxicity in C57 mice. Life Sci 1999; 65(2): 157-164.
21. Ma S, Liu X, Xun Q, Zhang X. Neuroprotective effect of Ginkgolide K against H2O2-induced PC12 cell cytotoxicity by ameliorating mitochondrial dysfunction and oxidative stress. Biol Pharm Bull 2014; 37(2): 217-225.
22. Arya A, Sethy NK, Singh SK, Das M, Bhargava K. Cerium oxide nanoparticles protect rodent lungs from hypobaric hypoxia-induced oxidative stress and inflammation. Int J Nanomedicine 2013; 8: 4507-4520.
23. Zafar KS, Siddiqui A, Sayeed I, Ahmad M, Salim S, Islam F. Dose-dependent protective effect of selenium in rat model of Parkinson's disease: neurobehavioral and neurochemical evidences. J Neurochem 2003; 84(3): 438-446.
24. Shams Nooraei M, Noori-Zadeh A, Darabi S, Rajaei F, Golmohammadi Z, Abbaszadeh HA. Low Level of Autophagy-Related Gene 10 (ATG10) Expression in the 6-Hydroxydopamine Rat Model of Parkinson's Disease. Iran Biomed J 2018; 22(1): 15-21 (Persian).
25. Cao F, Sun S, Tong ET. Experimental study on inhibition of neuronal toxical effect of levodopa by ginkgo biloba extract on Parkinson disease in rats. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci 2003; 23(2): 151-153.
26. Haghdoost-Yazdi H, Piri H, Najafipour R, Faraji A, Fraidouni N, Dargahi T, et al. Blockade of fast A-type and TEA-sensitive potassium channels provide an antiparkinsonian effect in a 6-OHDA animal model. Neurosciences (Riyadh) 2017; 22(1): 44-50.
27. Zhang XX, Liu J, Fu Y, Hu GY, Jin GZ. Action sites of rotation and unit firing induced by l-stepholidine and DA agonists in basal ganglia of 6-OHDA-lesioned rats. Zhongguo Yao Li Xue Bao 1999; 20(11): 979-986.
28. Rojas P, Montes S, Serrano-Garcia N, Rojas-Castaneda J. Effect of EGb761 supplementation on the content of copper in mouse brain in an animal model of Parkinson's disease. Nutrition 2009; 25(4): 482-485.
29. Ahmad M, Saleem S, Ahmad AS, Yousuf S, Ansari MA, Khan MB, et al. Ginkgo biloba affords dose-dependent protection against 6-hydroxydopamine-induced parkinsonism in

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-10-30]

rats: neurobehavioural, neurochemical and immunohistochemical evidences. J Neurochem 2005; 93(1): 94-104 (Persian).

30. Gagne B, Gelinas S, Bureau G, Lagace B, Ramassamy C, Chiasson K, et al. Effects of estradiol, phytoestrogens, and Ginkgo biloba extracts against 1-methyl-4-phenyl-pyridine-induced oxidative stress. Endocrine 2003; 21(1): 89-95.
31. Haghdoost-Yazdi H, Piri H, Faraji A, Fraidouni N, Dargahi T, Mahmudi M, et al. Pretreatment with potassium channel blockers of 4-aminopyridine and tetraethylammonium attenuates behavioural symptoms of Parkinsonism induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine; the role of lipid peroxidation. Neurol Res 2016; 38(4): 294-300.
32. Haghdoost-Yazdi H, Fraidouni N, Faraji A, Jahanihashemi H, Sarookhani M. High intake of folic acid or complex of B vitamins provides anti-Parkinsonism effect: no role for serum level of homocysteine. Behav Brain Res 2012; 233(2): 375-381.
33. Schober A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. Cell Tissue Res 2004; 318(1): 215-224.
34. Wang T, Liu B, Qin L, Wilson B, Hong JS. Protective effect of the SOD/catalase mimetic MnTMPyP on inflammation-mediated dopaminergic neurodegeneration in mesencephalic neuronal-glial cultures. J Neuroimmunol 2004; 147(1-2): 68-72.
35. Gheibi N, Saboury AA, Haghbeen K, Rajaei F, Pahlevan AA. Dual effects of aliphatic carboxylic acids on cresolase and catecholase reactions of mushroom tyrosinase. J Enzyme Inhib Med Chem 2009; 24(5): 1076-1081.
36. Allen M, Zou F, Chai HS, Younkin CS, Miles R, Nair AA, et al. Glutathione S-transferase omega genes in Alzheimer and Parkinson disease risk, age-at-diagnosis and brain gene expression: an association study with mechanistic implications. Mol Neurodegener. 2012; 7:13.
37. Kumar R, Agarwal AK, Seth PK. Free radical-generated neurotoxicity of 6-hydroxydopamine. J Neurochem 1995; 64(4): 1703-1707.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-10-30]