



## آسیب شدید نوروهای دپامینرژیک جسم سیاه همراه با کاهش سطح سرمی مس می باشد

اروین بابایان تازه کند، هاشم حق دوست یزدی<sup>۱\*</sup>

۱- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده جلوگیری از بیماری‌های غیرواگیر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۰۹، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۲۷

### چکیده

**مقدمه:** مس از فلزات فعال در واکنش‌های اکسید و احیا می‌باشد و تجمع آن در مغز، می‌تواند منجر به استرس اکسیداتیو شود. مطالعات انسانی که ارتباط بیماری پارکینسون با سطح پلاسمایی مس را بررسی کرده‌اند، نتایج متضادی ارائه داده‌اند. در این مطالعه ارتباط بین سطح سرمی مس و مرگ نوروهای دپامینرژیک جسم سیاه در مدل ۶- هیدروکسی دپامین بیماری پارکینسون بررسی شد.

**مواد و روش‌ها:** سم ۶- هیدروکسی دپامین توسط جراحی استرئوتاکسیک به دسته مغز میانی جلویی موش‌های صحرایی تزریق شد. آزمون‌های رفتاری به‌منظور ارزیابی شدت پارکینسون در هفته‌های دوم، چهارم و هشتم پس از سم از موش‌ها به عمل آمد. خون‌گیری در هفته هشتم انجام شد. شدت مرگ نوروهای دپامینرژیک توسط ایمونوهیستوشیمی بررسی شد. اندازه‌گیری مس با روش اسپکتروفتومتری جذب اتمی صورت گرفت.

**نتایج:** شدت علائم رفتاری در موش‌های دریافت‌کننده سم به تدریج افزایش یافت. از طرف دیگر تفاوت معنی‌داری در سطح سرمی مس بین گروه‌های آزمایشی مشاهده نشد. بر اساس شدت علائم رفتاری، موش‌های دریافت‌کننده سم به دو زیرگروه علامت‌دار و بی‌علامت تقسیم شدند. بقاء نوروهای دپامینرژیک در زیرگروه‌های علامت‌دار  $16 \pm 83$  و بدون علامت  $10 \pm 45$  درصد کمتر از گروه کنترل بود. سطح سرمی مس در زیرگروه علامت‌دار به‌صورت معنی‌داری کمتر از آن در زیرگروه بدون علامت و گروه حلال بود.

**نتیجه‌گیری:** مرگ گسترده و شدید نوروهای دپامینرژیک جسم سیاه همراه با کاهش در سطح سرمی مس باشد.

**واژه‌های کلیدی:** بیماری پارکینسون، سطح سرمی مس، ۶- هیدروکسی دپامین، نوروهای دپامینرژیک، جسم سیاه.

\*نویسنده مسئول: دانشیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده جلوگیری از بیماری‌های غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، تلفن: ۰۲۸-۳۳۳۳۶۰۰۱، نمابر:

Email: hhaghdoost@gmail.com, hhaghdoost@qums.ac.ir, .????

**ارجاع:** اروین بابایان تازه کند، هاشم حق دوست یزدی. آسیب شدید نوروهای دپامینرژیک جسم سیاه همراه با کاهش سطح سرمی مس می‌باشد. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۱؛ ۱۸(۱): ۳۹-۳۱.

## مقدمه

مرگ پیشرونده نوروپاتی‌های دوپامینرژیک در بخش متراکم جسم سیاه مکانیسم پاتوفیزیولوژیک اصلی در ایجاد بیماری پارکینسون می‌باشد. کاملاً مشخص نیست چه عواملی منجر به این مرگ نوروپاتی می‌شوند اما شواهد نشان می‌دهند که استرس اکسیداتیو و اختلال در عملکرد میتوکندری‌ها نقش مهمی دارند (۱-۲). علائم بالینی بیماری پارکینسون شامل علائم حرکتی همچون لرزش در حالت استراحت، برادی کینزیا، سفتی عضلانی و بی‌ثباتی در وضعیت است که پس از مرگ حدود ۷۰٪ از نوروپاتی‌های دوپامینرژیک جسم سیاه آشکار می‌شوند (۳). همچنین حتی پس از مرگ گسترده نوروپاتی ۵۰-۱۰٪ خطا در تشخیص بیماری پارکینسون وجود دارد (۴). بنابراین، ردیابی و تشخیص نشانگرهای زیستی که مرگ زودرس این نوروپاتی‌ها را نشان دهند می‌تواند برای تشخیص زودهنگام این بیماری و حتی افتراق این بیماری از دیگر بیماری‌های نورودژنراتیو که دارای ویژگی‌های کلینیکی مشترک می‌باشند با ارزش باشد (۵).

عناصر کمیاب نقش حیاتی و گوناگونی را در سیستم عصبی مرکزی اجرا می‌کنند و برای پیشرفت و عملکرد بهتر سیستم عصبی مرکزی ضروری هستند. اختلال در تعادل عناصر کمیاب موجب استرس اکسیداتیو و اختلال در عملکرد میتوکندری‌ها می‌شود (۶). مس از عناصر نورواکتیوی هست که بر قسمت‌های مختلف بدن از جمله سیستم عصبی مرکزی تأثیر می‌گذارد. این یون به همراه آهن و روی، در ساخت میلین و نوروترانسمیترها و نیز انتقال سیناپسی دخالت دارد و در بسیاری از عملکردهای سلولی از قبیل تقسیم سلولی، انتقال الکترون و تولید ATP نیز ایفای نقش می‌کند (۷-۹). مس همچنین از فلزات فعال در واکنش‌های اکسیداسیون و احیا است و تجمع آن در مغز، می‌تواند منجر به استرس اکسیداتیو شود (۱۰). این عنصر پیش‌اکسیدانی همچنین باعث تشدید تشکیل آمیلوئید از آلفا سینوکلئین می‌شود (۱۱). مطالعات انسانی متعددی ارتباط بین سطح مس در مایعات و بافت‌های بدن انسان با بیماری‌های نورودژنراتیو را بررسی کرده‌اند. واز و همکاران در سال ۲۰۱۸ در بررسی ۳۲ بیمار آلزایمری افزایش میزان سطح سرمی مس را در این بیماری گزارش کردند (۱۲). همچنین فوکوشیما و همکاران در سال ۲۰۱۱ در چین افزایش سطح سرمی مس در بیماران مبتلا به پارکینسون را گزارش کردند (۱۳). از طرف دیگر نتایج فورته و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان می‌دهد سطح سرمی مس در بیماری پارکینسون کاهش می‌یابد (۱۴) که توسط مطالعات بعدی که به‌وسیله نیکام و همکاران در سال ۲۰۰۹ (۱۵) و ایلائیکووا و همکاران در سال ۲۰۱۸ (۱۶) انجام گرفته است، تأیید شده است.

در این مطالعه ارتباط بین بیماری پارکینسون القاء شده توسط سم ۶-هیدروکسی دوپامین و سطح سرمی مس در موش‌های صحرایی بررسی

شد. اگرچه علائم رفتاری در این مدل حیوانی با علائم بالینی بیماری پارکینسون در انسان متفاوت است، لکن این مدل می‌تواند فرآیندهای سلولی اصلی درگیر در تخریب نوروپاتی‌های دوپامینرژیک مانند استرس اکسیداتیو، تخریب و التهاب نوروپاتی و همچنین مرگ نوروپاتی توسط آپوپتوز را بازتولید کند (۱۷). از آنجایی که در مطالعات حیوانی عوامل مداخله‌گری همچون تغذیه، کوموربیدیت، داروها و غیره وجود ندارند می‌توان در این نوع مطالعات تصویر واضح‌تری از ارتباط مرگ نوروپاتی دوپامینرژیک با شاخص‌های سرمی به‌دست آورد.

## مواد و روش‌ها

## حیوانات و گروه‌های آزمایشی

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۸ در دانشگاه علوم پزشکی قزوین بر روی موش‌های صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار (مؤسسه رازی، کرج، ایران) که در ابتدای تحقیق در محدوده وزنی ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم بودند انجام گرفت. موش‌ها در حیوانخانه دانشگاه در قفس‌های بزرگ با ابعاد  $20 \times 59 \times 38$  cm در اتاقی با درجه حرارت کنترل شده و شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگه داری شدند و به آب و غذا دسترسی نامحدود داشتند. تمام قسمت‌های این مطالعه مطابق با دستورالعمل آزمایشات حیوانی شورای تحقیقات در دانشگاه علوم پزشکی قزوین انجام شده است. موش‌ها به سه گروه آزمایشی تقسیم شدند: گروه کنترل ( $n=9$ )، گروه حلال ( $n=10$ ) و گروه ۶-OHDA ( $n=29$ ). گروه ۶-OHDA و گروه حلال به ترتیب ۶-هیدروکسی دوپامین و حلال آن را بصورت درون مغزی دریافت کردند.

شکل ۱ برنامه زمانی آزمایشات در این مطالعه را نشان می‌دهد. ابتدا آزمون چرخشی القاء شده با آپومورفین انجام شد و حیواناتی که کمتر از ۱۰ چرخش خالص در مدت سی دقیقه به سمت راست یا چپ داشتند، وارد آزمایش شدند. پس از چند روز، آزمایش عدم تقارن استفاده از دست‌ها (آزمون سیلندر) بر روی موش‌های انتخاب شده انجام گرفت و سپس سم ۶-هیدروکسی دوپامین یا حلال آن به مغز تزریق شد. آزمون‌های چرخشی و سیلندر با حداقل ۱ روز فاصله از هم انجام شد تا از تأثیر آپومورفین بر آزمون سیلندر جلوگیری شود.

## جراحی استریوتاکسی

۶-هیدروکسی دوپامین (سیگما) یا حلال آن از طریق سرنگ ۱۰ میکرولیتری هاملتون و با استفاده از جراحی استریوتاکسی به داخل ناحیه دسته مغزی جلویی میانی نیمکره راست تزریق شد. حیوانات ابتدا با ترکیبی از کتامین (۷۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، داخل صفاقی) و زایلازین (۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم، داخل صفاقی) بیهوش شدند. سپس ۱۶ میکروگرم ۶-هیدروکسی دوپامین حل شده در ۴ میکرولیتر سرم نمکی (NaCl) حاوی

$$I + C + B - C \setminus I + C + B =$$

که در آن I و C به ترتیب تعداد تماس‌های دست طرف آسیب (راست) و دست مقابل را نشان می‌دهند و B نشان‌دهنده تعداد تماس‌ها با هر دو دست می‌باشد. امتیازات مربوط به عدم تقارن دست‌ها از ۱ - تا ۱ است. نمرات مثبت و منفی نشان می‌دهند که دست طرف آسیب و یا دست طرف سالم به ترتیب برای تماس با دیواره ظرف غالب بودند. بنابراین انتظار می‌رود که یک موش مبتلا به پارکینسون نمره عدم تقارن مثبت را نشان دهد.

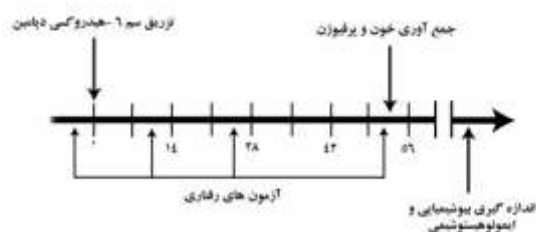
#### ارزیابی بافت‌شناسی

ایمونوهیستوشیمی برای ارزیابی شدت از دست دادن نوروهای دپامینرژیک (DA) در بخش متراکم هسته جسم سیاه (SNc) انجام گرفت. سه موش از هر گروه کنترل و شم و هشت موش از گروه OHDA-6 وارد این آزمایش شدند. پس از بیهوشی با کتامین و زیلازین، مغز هر موش از طریق قلب با ۵۰ میلی‌لیتر فسفات بافر سالین (PBS) و حدود ۱۰۰ میلی‌لیتر پارافورمالدئید ۴٪ پرفیوز شد. پس از آن مغز موش‌ها بیرون آورده شد و یک شب در پارافورمالدئید در ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بخش مغز میانی به صورت دو طرفه جدا شده و به وسیله پارافین غالب‌گیری شد و سپس برش‌های کرونال (ضخامت ۸ میکرومتر) با استفاده از میکروتوم Thermo Shandon Microtome (انگلستان) تهیه و از هر سه برش یکی انتخاب شد. برش‌های انتخاب شده پس از خشک شدن در طول شب، از پارافین جدا گشته و با ۰/۲ درصد ترتیتون X-100 آب‌رسانی شدند و اتصالات غیراختصاصی با استفاده از ۱۰٪ سرم طبیعی بز مسدود شدند. به دنبال آن، نمونه‌ها ابتدا یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با آنتی‌بادی اولیه ضد تیروزین هیدروکسیلاز (TH) (1: 200) سانتا کروز) و سپس با آنتی‌بادی ثانویه (۶۰ دقیقه، IgG خرگوش، سانتا کروز) انکوبه شدند. پس از آن برش‌ها در معرض ترکیبی از پراکسیداز هورسرادیش (HRP) و دی آمینو بنزیدین به مدت ۶۰ دقیقه قرار گرفتند تا رنگ‌آمیزی مؤثر برای مشاهده میکروسکوپ نوری حاصل شود. پس از آن، برش‌ها دهی‌ده شده، توسط زایلین پاکسازی و پوشانده شدند. آنها در میکروسکوپ Olympus با بزرگنمایی ۱۰ مشاهده شدند و برش‌هایی از جسم سیاه که در محدوده برگما، ۴/۸- تا ۵/۲- بودند انتخاب شدند. سپس شش برش در هر حیوان از بین تقریباً ۵۰ برش که به طور سری به پنج گروه تقسیم شده بودند، انتخاب شد. بین دو نمونه انتخاب شده حداقل پنج برش فاصله وجود داشت. سلول‌های TH مثبت با استفاده از میکروسکوپ نوری در بزرگنمایی ۴۰۰ مشاهده و شمارش شدند.

خون‌گیری و اندازه‌گیری سطح سرمی مس

خون‌گیری در هفته هشتم و پس از اتمام آزمون‌های رفتاری و قبل از پرفیوژن از قلب صورت گرفت. قبل از خون‌گیری حیوان با ترکیب کتامین و

اسید اسکوربیک (۲/۰٪) به دو نقطه در ناحیه دسته مغزی جلویی با مختصات زیر: قدامی خلفی (AP): 4، جانبی (L): -1.8، پشتی شکمی (DV): 9 و AP: -4.4، L: -2، DV: 8.8 بر طبق مختصات ارایه شده توسط اطلس پاکسینوز و واتسون ۲۰۰۷ تزریق شد (۲۱). برگما مرجع محاسبه AP و L و سطح مجمله مرجع محاسبه DV بود.



شکل ۱- زمان بندی آزمایش‌ها

آزمایش‌های رفتاری یک هفته قبل از تزریق سم و در هفته‌های دوم، چهارم و هشتم پس از آن انجام شد. جمع‌آوری خون و استخراج سرم در هفته هشتم پس از پایان آزمون‌های رفتاری صورت گرفت. پس از آن برخی از موش‌ها در هر گروه پرفیوژن شدند و مغز آنها برای مطالعات ایمونوهیستوشیمی خارج شد. اعداد روزهای بعد از تزریق سم را نشان می‌دهند.

#### آزمون‌های رفتاری

آزمون چرخش القا شده با اپومرفین بر طبق روشی که قبلاً توضیح داده شده است انجام گرفت (۲۲). به طور خلاصه ابتدا به موش‌ها اجازه داده شد تا برای ۵ دقیقه در یک ظرف استوانه‌ای (قطر، ۲۸ سانتی‌متر، ارتفاع، ۳۸ سانتی‌متر) با محیط مانوس شوند و سپس هیدروکلراید اپومورفین (سیگما، ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت داخل صفاقی تزریق شد. پس از یک دقیقه، تعداد چرخش‌های کامل در مدت ۳۰ دقیقه توسط افراد خیره ثبت شد. تعداد چرخش‌ها به طرف محل تزریق سم (عدد منفی) یا خلاف آن (عدد مثبت) ثبت گردید. تعداد خالص چرخش‌ها با کسر نمرات منفی از نمرات مثبت محاسبه شد. تعداد بالای چرخش‌های خالص به طرف مقابل نیمکره تزریق سم نشان می‌دهد که مدل بیماری به خوبی ایجاد شده است.

#### آزمون سیلندر

در این آزمون نحوه استفاده از دست‌ها بدون کمک داروی خاص و براساس مطالعات قبلی مورد بررسی قرار گرفت (۲۳). موش‌ها در ظرف استوانه‌ای قرار گرفته و به مدت ده دقیقه اجازه حرکت آزادانه در محیط به آنها داده شد. در این مدت، تعداد تماس‌های دست راست یا چپ یا هر دو با دیواره ظرف به منظور حفظ تعادل و یا وزن بدن توسط شخصی که برای این آزمایش آموزش دیده بود، شمارش شد. سپس، نمره عدم تقارن با معادله زیر محاسبه گردید:

در موش‌های دریافت‌کننده سم شدت علائم رفتاری یکسان نبود. به‌منظور بررسی بیشتر و دقیق‌تر، آنها بر اساس شدت رفتار چرخشی به دو زیر گروه تقسیم شدند. زیر گروه علامت‌دار (Symptomatic) که چرخش‌های زیاد و معنی‌داری (بیش از ۱۰۰) در این آزمون نشان دادند ( $n=16$ ) و زیر گروه بدون علامت (Asymptomatic) که یا چرخش معنی‌داری نشان ندادند و یا تعداد چرخش‌ها کمتر از ۳۰ چرخش در نیم ساعت بود ( $n=13$ ). شکل ۴ نتایج آزمون چرخش القاء شده با اپومرفین و سطح سرمی مس در این دو زیر گروه را نشان می‌دهد. در حالی که موش‌های علامت‌دار تعداد چرخش‌های زیادی را در آزمون‌های رفتاری پس از سم نشان دادند، تعداد چرخش‌ها در موش‌های زیر گروه بدون علامت بسیار کم بود. همچنین در این زیر گروه افزایش پیش رونده در شدت چرخش‌ها مشاهده نشد. از طرف دیگر اختلاف معنی‌داری در سطح سرمی مس بین دو زیر گروه مشاهده شد و سطح سرمی مس در زیر گروه علامت‌دار به‌صورت معنی‌داری کمتر از آن در گروه بدون علامت بود ( $3/50 \pm 99$  در گروه علامت‌دار و  $4 \pm 111$  در گروه بدون علامت). بررسی آماری داده‌ها نشان داد که همبستگی (**correlation**) معنی‌داری بین شدت چرخش‌ها با سطح سرمی مس وجود دارد به این صورت که با افزایش تعداد چرخش‌ها سطح سرمی مس کاهش یافت ( $n=29$ ،  $r=0.27$ ،  $P=0.0362$ ) بین شدت چرخش‌ها در آزمون هفته هشتم با سطح سرمی مس در موش‌های دریافت‌کننده سم و یافت ( $n=17$ ،  $P=0.035$ ،  $r=-0.45$ ) بین شدت چرخش‌ها در آزمون هفته هشتم با سطح سرمی مس در زیر گروه علامت‌دار دریافت‌کننده سم.

ارتباط بین مرگ نورون‌های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه و سطح سرمی مس

ارتباط بین از دست دادن سلول‌های عصبی **SNC DA** و سطح سرمی ارتباط **SNC DA** رفتن نورون‌ها و سطوح لی سرم

میکروگراف‌ها در شکل ۵ نتایج بررسی ایمونوهیستوشیمیایی بقاء نورون‌های دوپامینرژیک (TH مثبت) را در بخش متراکم جسم سیاه نشان می‌دهند. همان‌طور که مشاهده می‌شود تزریق سم منجر به آسیب وسیع به این نورون‌ها شد (میکروگراف‌های وسط و پایین). آسیب در زیر گروه علامت‌دار بسیار شدیدتر از زیر گروه بدون علامت بود. با این وجود مرگ نورونی در گروه بدون علامت نیز در مقایسه با گروه شم و کنترل قابل ملاحظه و معنی‌دار بود. در زیر گروه علامت‌دار درصد تخریب نسبت به گروه کنترل  $16 \pm 83$  و در گروه بدون علامت  $10 \pm 45$  بود (پلات در شکل ۵). تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که همبستگی منفی و معنی‌داری بین شدت مرگ نورونی با سطح سرمی مس وجود داشت ( $r=-0.358$ ،  $P=0.04$ ،  $n=8$ ).

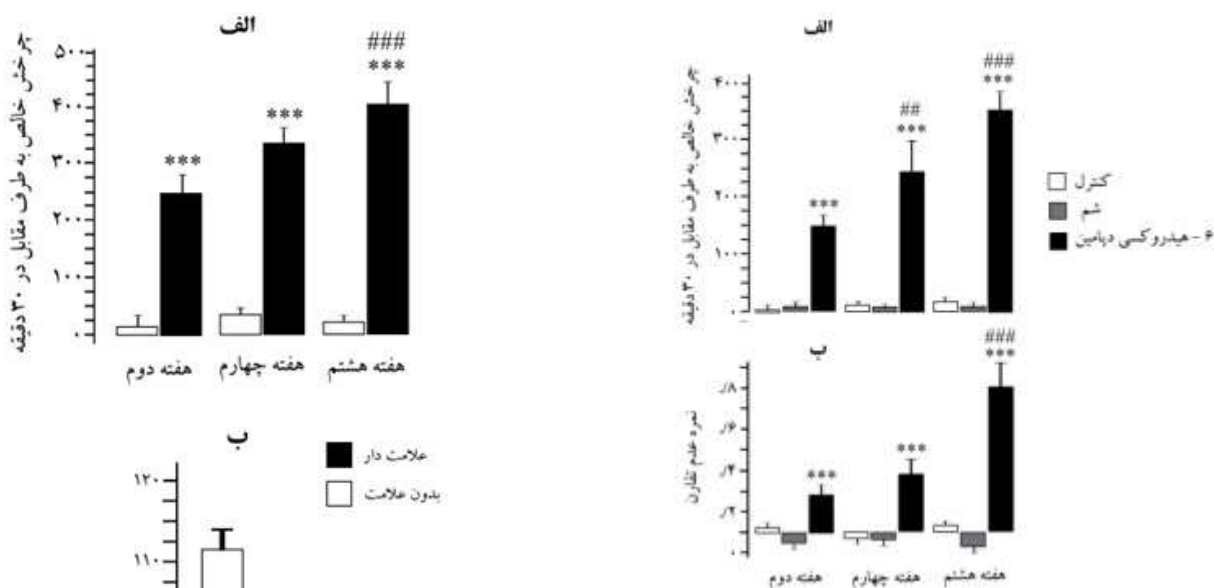
زایلازین بیهوشی شدند. سپس سوزن یک سرنگ ۵ سی‌سی وارد بدن‌های حیوان گردید و به مقدار لازم خون جمع‌آوری شد. اجازه داده شد تا خون درون یک لوله آزمایش و دریک محفظه پر از یخ منعقد شده و پس از آن سرم با استفاده از سانتریفوژ جدا گردید. سرم‌ها در  $-80$  درجه تا زمان اندازه‌گیری مس نگهداری شدند. غلظت مس در سرم با روش اسپکتروفتومتری جذب اتمی تعیین شد. در این روش مقدار نور جذب شده به‌وسیله اتم‌های تهییج نشده موجود در شعله است که با غلظت نمونه متناسب است. برای تجزیه کمی ابتدا صفر دستگاه با آب تنظیم شد و بعد منحنی را بر حسب استانداردهای مختلف و درجات خوانده شده رسم کردیم. سپس نمونه سرم را در دستگاه قرار داده و عدد موردنظر یادداشت شد.

## نتایج

آزمون‌های رفتاری چرخش القاء شده با اپومرفین و سیلندر به‌منظور اطمینان از ایجاد مدل و همچنین ارزیابی شدت پارکینسونیسم در هفته‌های دوم، چهارم و هشتم پس از تزریق سم از موش‌ها به‌عمل آمد. شکل ۲ نتایج این آزمون‌ها را نشان می‌دهد. قبل از سم، هیچ یک از موش‌ها رفتار چرخشی قابل توجهی نشان ندادند. بعد از تزریق سم فقط موش‌های متعلق به گروه ۶-هیدروکسی دوپامین چرخش‌های زیادی به سمت چپ نشان دادند. تعداد چرخش‌ها در هفته چهارم و هشتم به‌طور معنی‌داری بیشتر از آن در هفته دوم بود ( $148 \pm 22$  در هفته دوم،  $58 \pm 241$  در هفته چهارم و  $35 \pm 252$  در هفته هشتم). نمودار پایین در شکل ۲ نتایج آزمون‌های سیلندر را نشان می‌دهند. همان‌طور که این نمودار نشان می‌دهد، قبل از سم نمره عدم تقارن در همه گروه‌ها در حد صفر بود، به این معنی که حیوانات هیچ ترجیحی برای استفاده از دست راست یا چپ برای لمس دیواره ظرف نداشتند. همین نتایج برای گروه‌های کنترل و شم پس از سم تکرار شد اما در گروه **6-OHDA** نمره عدم تقارن به میزان قابل توجهی افزایش یافت و در هفته‌های دوم، چهارم و هشتم به ترتیب به  $0.09 \pm 0.28$ ،  $0.38 \pm 0.14$  و  $0.14 \pm 0.08$  رسید. این نتایج نشان می‌دهند که موش‌های دریافت‌کننده سم عمدتاً از دست راست برای لمس دیواره ظرف استفاده کردند.

شکل ۳ سطح سرمی مس را در گروه‌های مختلف آزمایشی به تصویر می‌کشد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری در سطح سرمی مس بین گروه‌های آزمایشی در هفته هشتم پس از سم وجود نداشت. کمترین و بیشترین مقدار به‌دست آمده برای سطح سرمی مس در گروه کنترل  $88$  و  $138$ ، در گروه شم  $88$  و  $135$  و در گروه **6-OHDA**  $83$  و  $136$  میکروگرم در هر دسی‌لیتر بود.

ارتباط بین شدت علائم رفتاری و سطح سرمی مس



شکل ۲- نتایج آزمون‌های رفتاری

نمودارهای الف و ب به ترتیب یافته‌های آزمون چرخش القاء شده با آپومورفین و آزمون سیلندر در هفته‌های دوم، چهارم و هشتم پس از سم را نشان می‌دهند. همان‌طور که مشاهده می‌شود شدت علائم رفتاری به تدریج پس از سم در گروه ۶-هیدروکسی دپامین افزایش یافت.

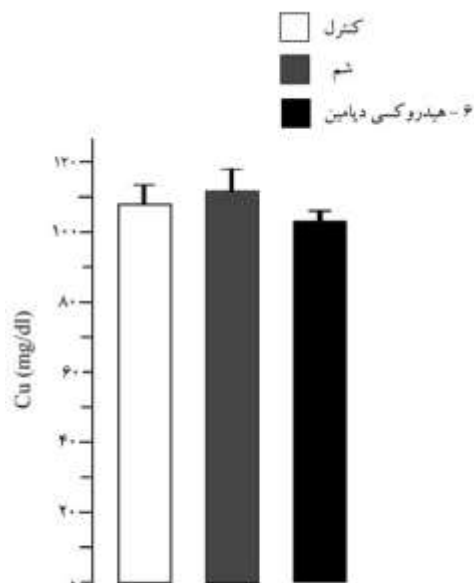
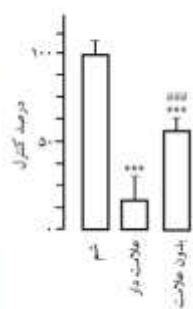
\*\*\* $P < 0.001$ : نسبت به گروه کنترل و شم،  $P < 0.01$ : ##  $P < 0.001$

### نسبت به نتایج هفته دوم

شکل ۴- نمودار الف نتایج آزمون چرخش القاء شده با اپومورفین در موش‌های دریافت‌کننده سم با تعداد چرخش زیاد (زیر گروه علامت‌دار) و موش‌های دریافت‌کننده سم با چرخش بسیار کم و یا بدون چرخش (زیر گروه بدون علامت) را نشان می‌دهد. نمودار ب سطح سرمی مس در این دو زیرگروه را نشان می‌دهد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود سطح مس در زیر گروه علامت‌دار به صورت معنی‌داری کمتر از آن در گروه بدون علامت بود.

\*\* $P < 0.01$ ، \*\*\* $P < 0.001$  نسبت به زیر گروه بدون علامت

### $P < 0.001$  نسبت به نتایج هفته دوم



شکل ۳- نمودار و جدول سطح سرمی مس را در گروه‌های مختلف آزمایشی تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های آزمایشی مشاهده نشد.

نتایج مطالعه ما تأییدکننده مطالعات انسانی می‌باشد که نشان داده‌اند سطح سرمی مس در بیماران پارکینسونی کمتر از گروه کنترل می‌باشد. محققان با مطالعه ۲۳۸ بیمار پارکینسونی در مقابل ۳۰۲ فرد کنترل در چین دریافتند که ابتلا به پارکینسون همراه با کاهش سطح سرمی مس و روی می‌باشد (۲۸). همچنین با بررسی سرم ۴۸ بیمار پارکینسونی و ۳۶ فرد کنترل سازگار شده با سن (age-matched control) در تونس مشخص گردید که سطح سرمی سه عنصر کمیاب مس، روی و سلیوم در افراد مبتلا به پارکینسون کاهش می‌یابد (۲۹). در مطالعه دیگر که توسط Gangania و همکاران در هند انجام گرفت سطح سرمی مس و آهن در بیماران پارکینسونی کمتر از آن در گروه کنترل بود (۳۰). در مقابل کوکاتورک و همکاران در سال ۲۰۰۰ (۳۱) و همچنین هدجی و همکاران در سال ۲۰۰۴ (۳۲) گزارش کردند که سطح پلاسما می‌باشد که پارکینسون در مقایسه با افراد کنترل افزایش می‌یابد. در مطالعه‌ای که توسط میمار و همکاران در سال ۲۰۱۶ منتشر شد (۳۳) گزارش شده است که سطح پلاسما می‌باشد که در بیشتر افراد مبتلا به پارکینسون در محدوده بالای طبیعی بوده است. از طرف دیگر، مطالعه فورته و همکاران در سال ۲۰۰۵ (۱۴) نشان داد که سطح سرمی و خونی مس در بیماران پارکینسونی تغییر نمی‌کند. شاید مهمترین علتی که این تناقض در نتایج مطالعات انسانی را توجیه کند میزان مس در رژیم غذایی باشد. بیان شده است که کاهش مس در رژیم غذایی ممکن است به کاهش سطح مس منجر شود (۳۴). همچنین در یک مطالعه نشان داده شد که سن می‌تواند بر سطح سرمی مس تأثیر بگذارد (۲۸). از آنجایی که محدوده سنی بیماران در تمامی مطالعات انسانی یکسان نبوده است این عامل نیز می‌تواند در این تناقض سهیم باشد.

مطالعه ما و مطالعات مشابه انسانی نشان می‌دهند که سطح سرمی و پلاسما می‌باشد که می‌تواند در بیماری پارکینسون تغییر کند. یک سوال مهم در اینجا مطرح می‌شود که آیا تغییر در سطح سرمی مس سبب مرگ نورون‌های دپامینرژیک و از این رو ایجاد و پیشرفت پارکینسونیسم می‌شود و یا مرگ این نورون‌ها و خود بیماری سبب کاهش سطح خونی مس می‌شوند؟ ژائو و همکاران در سال ۲۰۱۳ (۲۸)، با استفاده از بررسی ارتباط سطح مس با انواع کلینیکال بیماری پارکینسون، شدت بیماری و ریسک ابتلا آن و همچنین بررسی ارتباط سن با کاهش سطح سرمی مس، نتیجه گرفتند که کاهش مس در ایجاد و پیشرفت بیماری سهم اندکی دارد. همچنین از آنجایی که این کاهش در بیماران مس‌تر مشاهده شد آنها نتیجه گرفتند که کاهش سطح سرمی مس از عواقب ابتلا به بیماری می‌باشد. این نتیجه‌گیری توسط جیلین و همکاران در سال (۳۵) نیز مطرح شده است. از طرف دیگر نتایج مهنیتی و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان می‌دهند که ارتباطی بین کاهش سطح سرمی مس با سن، مدت زمان بیماری و همچنین مصرف لوودوپا وجود ندارد (۳۶). در مطالعه ما سطح

شکل ۵- میکروگراف‌ها سلول‌های TH مثبت در بخش متراکم جسم سیاه (در حدود برگما ۵-) را در گروه شم (الف)، زیر گروه علامت‌دار دریافت‌کننده سم (ب) و زیر گروه بدون علامت دریافت‌کننده سم (ج) نشان می‌دهند. نمودار شمار نورون‌های TH مثبت شمارش شده در این گروه‌ها را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد. توجه کنید که در زیرگروه بدون علامت تعداد این نورون‌ها به صورت کاملاً مشخص و معنی‌دار بیشتر از زیرگروه علامت‌دار و کمتر از گروه شم بود. خط مقیاس: ۱۰۰ میکرومتر

\*\*\* $P < 0.001$  در مقایسه با گروه شم و  $#### P < 0.0001$  در مقایسه با

زیرگروه علامت‌دار

## بحث

نتایج این تحقیق نشان می‌دهند که ایجاد بیماری پارکینسون توسط تزریق درون مغزی سم ۶- هیدروکسی دپامین در موش‌های صحرایی و مرگ نورون‌های دپامینرژیک جسم سیاه می‌تواند همراه با کاهش سطح سرمی مس باشد. این کاهش تنها در زیرگروهی از موش‌های دریافت‌کننده سم مشاهده شد که علائم رفتاری شدید و مرگ نورونی گسترده داشتند. از این رو داده‌های ما نشان می‌دهند که در موارد شدید بیماری پارکینسون ممکن است کاهش در سطح سرمی مس رخ دهد.

مطالعات نشان می‌دهند که مرگ یک طرفه نورون‌های دپامینرژیک در بخش متراکم جسم سیاه در مغز میانی مکانیسم پاتوفیزیولوژیک اصلی ایجاد کننده علائم رفتاری در مدل ۶- هیدروکسی دپامین بیماری پارکینسون می‌باشد (۲۴ و ۲۵). البته همین مطالعات نشان می‌دهند که شدت علائم رفتاری لزوماً همبستگی مثبت با شدت مرگ این نورون‌ها ندارد و شدت‌های خفیف تا متوسط آسیب در جسم سیاه ممکن است سبب بروز علائم رفتاری نشود. داده‌های ما نیز مؤید این نکته می‌باشد زیرا بررسی ایمونوهیستوشیمیایی مغز نشان داد که موش‌های دریافت‌کننده سم با علائم رفتاری شدید آسیب نورونی دپامینرژیک نیز داشتند. از طرف دیگر در موش‌های بدون علامت نیز مرگ این نورون‌ها مشاهده شد اگرچه شدت مرگ تقریباً ۵۰ درصد کمتر از آن در زیرگروه علامت‌دار بود. این یافته که کاهش در سطح سرمی مس تنها در موش‌ها با پارکینسونیسم شدید مشاهده شد می‌تواند تا اندازه‌ای ناامیدکننده باشد زیرا مطالعات انسانی نشان می‌دهند که در شدت‌های بالای مرگ نورونی علائم کلینیکی بیماری بروز می‌کنند که تشخیص بیماری را ممکن می‌سازند (۵، ۲۶ و ۲۷). ولی در شدت‌های پایین مرگ نورونی علائم کلینیکی آشکار نمی‌شوند و اینجاست که بیومارکرها می‌توانند تأثیرگذار باشند. با این وجود داده‌های این تحقیق می‌توانند مفید باشند زیرا حتی پس از این مرگ گسترده نورونی ۵۰-۱۰٪ خطا در تشخیص بیماری پارکینسون وجود دارد (۴). از این رو با بررسی سطح سرمی مس شاید بتوان برای افتراق این بیماری از دیگر بیماری‌های نورودژنراتیو که دارای ویژگی‌های کلینیکی مشترک می‌باشند استفاده کرد.



شدت‌های بالای مرگ نورون‌های دپامینرژیک جسم سیاه علائم کلینیکی بیماری پارکینسون بروز می‌کنند، این مطالعه نشان می‌دهد که تغییر در غلظت یون مس نمی‌تواند به‌عنوان بیومارکر برای تشخیص زود هنگام این بیماری در نظر گرفته شود. همچنین بر اساس داده‌های این مطالعه و مطالعات انسانی مشابه می‌توان نتیجه گرفت که کاهش سطح سرمی مس در نتیجه ابتلا به بیماری رخ می‌دهد.

### تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از خانم ازیلا مینایی و نفیسه راستگو که در جراحی استریوتاکسی و شماره‌گذاری نمونه‌ها ما را یاری کردند تشکر و قدردانی می‌شود. این مقاله حاصل پایان‌نامه تحقیقاتی با کد اخلاق IR.QUMS.REC.1399.381 می‌باشد.

### References

- Mullin S, Schapira AH. Pathogenic mechanisms of neurodegeneration in Parkinson disease. *Neurologic Clinics* 2015;33:1-17. doi: 10.1016/j.ncl.2014.09.010
- Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkman J, et al. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers* 2017;3:1-21. doi: 10.1038/nrdp.2017.13
- Harris RE. *Epidemiology of chronic disease: global perspectives*: Jones & Bartlett Learning. 2nd ed;2019. ISBN-10:1284151018
- Brooks DJ. Parkinson's disease: diagnosis. *Parkinsonism & Related Disorders* 2012;18:S31-S3. doi: 10.1016/S1353-8020(11)70012-8
- Alberio T, Bucci EM, Natale M, Bonino D, Di Giovanni M, Bottacchi E, et al. Parkinson's disease plasma biomarkers: an automated literature analysis followed by experimental validation. *J Proteomics* 2013;90:107-14. doi: 10.1016/j.jprot.2013.01.025
- Grabrucker A, Rowan M, C Garner C. Brain-delivery of zinc-ions as potential treatment for neurological diseases: mini review. *Drug Deliv Lett* 2011;1:13-23. doi: 10.2174/2210303111101010013
- Genoud S, Senior AM, Hare DJ, Double KL. Meta-analysis of copper and iron in parkinson's disease brain and biofluids. *Mov Disord* 2020;35:662-71. doi: 10.1002/mds.27947
- Moemeni H, Qujeq D, Ahmadi Ahangar A, Hajian K, Parsian H. Evaluation of serum Magnesium, Iron, Copper and Zinc levels in ischemic and hemorrhagic stroke patients and healthy controls. *J Clinic Basic Res* 2018;2:6-10. doi: 10.29252/jcbr.2.1.6
- Sensi SL, Granzotto A, Siotto M, Squitti R. Copper and zinc dysregulation in Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 2018;39:1049-63. doi: 10.1016/j.tips.2018.10.001
- Wolozin B, Golts N. Iron and Parkinson's disease. *Review. The Neuroscientist* 2002;8:22-32. doi: 10.1177/107385840200800107
- Binolfi A, Rodriguez EE, Valensin D, D'Amelio N, Ippoliti E, Obal G, et al. Bioinorganic chemistry of Parkinson's disease: structural determinants for the copper-mediated amyloid formation of alpha-synuclein. *Inorg Chem* 2010;49:10668-79. doi: 10.1021/ic1016752
- Vaz FNC, Fermino BL, Haskel MVL, Wouk J, de Freitas GBL, Fabbri R, et al. The relationship between copper, iron, and selenium levels and Alzheimer disease. *Biol Trace Elem Res* 2018;181:185-91. doi: 10.1007/s12011-017-1042-y
- Fukushima T, Tan X, Luo Y, Kanda H. Serum vitamins and heavy metals in blood and urine, and the correlations among them in Parkinson's disease patients in China. *Neuroepidemiology* 2011;36:240-4. doi: 10.1159/000328253

سرمی مس هشت هفته پس از تزریق سم و از این رو پس از القاء مرگ نورونی دپامینرژیک اندازه‌گیری شد. به‌دلیل محدودیت در جمع‌آوری سرم از حیوان زنده ما نتوانستیم سطح سرمی مس را قبل از تزریق سم اندازه‌گیری کنیم. از این رو داده‌های ما نمی‌توانند تأیید کنند که کاهش مس در ایجاد بیماری پارکینسون نقش دارد و بیشتر مؤید این نکته می‌باشند که خود بیماری عامل کاهش می‌باشد. البته نتایج ما نشان می‌دهند که رژیم غذایی و فعالیت بدنی نمی‌تواند دلیل این کاهش باشد چرا که همه گروه‌های آزمایشی با رژیم غذایی یکسان تغذیه می‌شدند و همچنین همه آنها در دوره آزمایش افزایش وزن داشتند. بنابراین به‌نظر می‌رسد که شدت‌های بالای مرگ نورون‌های دپامینرژیک جسم سیاه عامل کاهش مس در سرم باشد.

اختلال در هموستاز مس می‌تواند با افزایش استرس اکسیداتیو سبب آسیب سلولی و مرگ نورون‌ها شود. نکته حایز اهمیت نقش مس در عملکرد آنزیم میتوکندریایی سیتوکروم سی اکسیداز یا همان کمپلکس IV می‌باشد (۳۷). نشان داده شده است که فعالیت این آنزیم توسط سم 6-OHDA تحت تأثیر قرار گرفته و کاهش می‌یابد و یا حتی به‌طور کامل مهار می‌شود که مکانیسم غالب پیشنهادی برای فعالیت نوروتوکسیک این سم می‌باشد (۳۷). از این‌رو ممکن است جهت جبران در اختلال فعالیت این آنزیم در مغز به‌ویژه جسم سیاه، مغز برداشت مس از پلاسما را افزایش داده باشد. گزارش شده است که عناصر نادر از جمله مس و آهن از سد خونی مغزی عبور می‌کنند (۳۰). مس از طریق انتقال‌دهنده مس ۱ (copper transporter 1, Ctr1) و با دخالت ادنوزین تری‌فسفاتاز نوع ATP7A از خون به مغز منتقل می‌شود (۳۸). اپ‌رگولیشن و افزایش فعالیت این سیستم انتقالی ممکن است مکانیسمی جبرانی برای کاهش اثر کمبود فعالیت آنزیم سیتوکروم اکسیداز سی القاء شده به‌وسیله سم باشد. چنین مکانیسمی برای افزایش تولید بیلی روبین در افراد مبتلا به بیماری پارکینسون نیز پیشنهاد شده است. بیلی روبین یکی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی موجود در سرم بدن انسان می‌باشد که نشان داده شده است در بیماران پارکینسونی افزایش می‌یابد (۳۹ و ۴۰). از آنجایی که یکی از مهمترین مکانیسم‌های پیشنهادی برای مرگ نورون‌های دپامینرژیک در بیماری پارکینسون اختلال در عملکرد میتوکندری‌ها و کمپلکس‌های آنزیمی آن می‌باشد می‌توان چنین مکانیسمی را برای کاهش سطح مس در میان بیماران پارکینسونی در نظر گرفت.

داده‌های ما نشان می‌دهند که ایجاد بیماری پارکینسون و تخریب نورون‌های دپامینرژیک جسم سیاه در مغز میانی توسط سم ۶-هیدروکسی دپامین می‌تواند همراه با کاهش سطح سرمی مس باشد. این تغییر غلظت وابسته به شدت مرگ این نورون‌ها می‌باشد به‌صورتی که مرگ خفیف تا متوسط تغییری در غلظت مس ایجاد نمی‌کند ولی مرگ شدید این نورون‌ها همراه با کاهش سطح سرمی مس می‌باشد. از آنجایی که در

14. Forte G, Bocca B, Senofonte O, Petrucci F, Brusa L, Stanzione P, et al. Trace and major elements in whole blood, serum, cerebrospinal fluid and urine of patients with Parkinson's disease. *J Neural Transm* 2004;111:1031-40. doi: 10.1007/s00702-004-0124-0
15. Nikam S, Nikam P, Ahaley S. Role of free radical and antioxidant imbalance in pathogenesis of Parkinson's disease. *Biomed Res* 2009;20:55-8.
16. Ilyechova EY, Miliukhina IV, Orlov IA, Muruzheva ZM, Puchkova LV, Karpenko MN. A low blood copper concentration is a comorbidity burden factor in Parkinson's disease development. *Neurosci Res* 2018;135:54-62. doi: 10.1016/j.neures.2017.11.011
17. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 2003;39:889-909. doi: 10.1016/s0896-6273(03)00568-3
18. Sarukhani MR, Haghdoost-Yazdi H, Khandan-Chelarci G. changes in the serum urate level can predict the development of parkinsonism in the 6-hydroxydopamine animal model. *Neurochem Res* 2018;43:1086-95. doi: 10.1007/s11064-018-2522-y
19. Sophiabadi M, Rastgoo N, Haghdoost-Yazdi H. dopaminergic neuronal death in substantia nigra associates with serum levels of total bilirubin, selenium, and zinc: evidences from 6-hydroxydopamine animal model of parkinson's disease. *Biol Trace Elem Res* 2022;200:4058-4067. doi: 10.1007/s12011-021-03012-6
20. Sarbazi-Golezari A, Haghdoost-Yazdi H. Chronic and progressive dopaminergic neuronal death in substantia nigra associates with a decrease in serum levels of glucose and free fatty acids, the role of interleukin-1 beta. *Metab Brain Dis* 2022;37:373-381. doi: 10.1007/s11011-021-00868-4
21. Paxinos G and Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. 2007; San Diego, CA: Academic Press.
22. Minaei A, Haghdoost-Yazdi H. Dexmedetomidine attenuates the induction and reverses the progress of 6-hydroxydopamine- induced Parkinsonism; involvement of KATP channels, alpha 2 adrenoceptors and anti-inflammatory mechanisms. *Toxicol Appl Pharmacol* 2019;382:114743. doi: 10.1016/j.taap.2019.114743
23. Prasad EM, Hung SY. Behavioral Tests in Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson's disease. *Antioxidants* 2020;9:1007. doi: 10.3390/antiox9101007
24. Yuan H, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y. Histological, behavioural and neurochemical evaluation of medial forebrain bundle and striatal 6-OHDA lesions as rat models of Parkinson's disease. *J Neurosci Methods* 2005;144:35-45. doi: 10.1016/j.jneumeth.2004.10.004
25. Iancu R, Mohapel P, Brundin P, Paul G. Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. *Behav Brain Res* 2005;162:1-10. doi: 10.1016/j.bbr.2005.02.023
26. Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008;79:368-76. doi: 10.1136/jnnp.2007.131045
27. Shulman LM, Gruber-Baldini AL, Anderson KE, Vaughan CG, Reich SG, Fishman PS, et al. The evolution of disability in Parkinson disease. *Mov Disord* 2008;23:790-6. doi: 10.1002/mds.21879
28. Zhao H-W, Lin J, Wang X-B, Cheng X, Wang J-Y, Hu B-L, et al. Assessing plasma levels of selenium, copper, iron and zinc in patients of Parkinson's disease. *PLoS One* 2013;8:e83060. doi: 10.1371/journal.pone.0083060
29. Younes-Mhenni S, Aissi M, Mokni N, Boughammoura-Bouatay A, Chebel S, Frih-Ayed M, et al. Serum copper, zinc and selenium levels in Tunisian patients with Parkinson's disease. *Tunis Med* 2013;91:402-5.
30. Gangania MK, Batra J, Kushwaha S, Agarwal R. Role of Iron and Copper in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Indian J Clin Biochem* 2017;32:353-6. doi: 10.1007/s12291-016-0614-5
31. Kocatürk PA, Akbostanci MC, Tan F, Kavas GÖ. Superoxide dismutase activity and zinc and copper concentrations in Parkinson's disease. *Pathophysiology* 2000;7:63-7. doi: 10.1016/s0928-4680(00)00030-4
32. Hegde ML, Shanmugavelu P, Vengamma B, Rao TS, Menon RB, Rao RV, et al. Serum trace element levels and the complexity of inter-element relations in patients with Parkinson's disease. *J Trace Elem Med Biol* 2004;18:163-71. doi: 10.1016/j.jtemb.2004.09.003
33. Meamar R, Nikyar H, Dehghani L, Basiri K, Ghazvini MRA. Assessing of plasma levels of iron, zinc and copper in Iranian Parkinson's disease. *Adv Biomed Res* 2016;5:31. doi: 10.4103/2277-9175.178788
34. Vural H, Demirin H, Kara Y, Eren I, Delibas N. Alterations of plasma magnesium, copper, zinc, iron and selenium concentrations and some related erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with Alzheimer's disease. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2010;24:169-73. doi: 10.1016/j.jtemb.2010.02.002
35. Gellein K, Syversen T, Steinnes E, Nilsen TIL, Dahl OP, Mitrovic S, et al. Trace elements in serum from patients with Parkinson's disease—a prospective case-control study: The Nord-Trøndelag Health Study (HUNT). *Brain Res* 2008;1219:111-5. doi: 10.1016/j.brainres.2008.05.002
36. Younes-Mhenni S, Aissi M, Mokni N, Boughammoura-Bouatay A, Chebel S, Frih-Ayed M, et al. Serum copper, zinc and selenium levels in Tunisian patients with Parkinson's disease. *Tunis Med* 2013;91:402-5.
37. Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M-F, Benabid A-L, Sadoul R, et al. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2001;65:135-72. doi: 10.1016/s0301-0082(01)00003-x
38. Hettlinger BD, Lee A, Linden J, Rosin DL. Ultrastructural localization of adenosine A2A receptors suggests multiple cellular sites for modulation of GABAergic neurons in rat striatum. *J Comp Neurol* 2001;431:331-46. doi: 10.1002/1096-9861(20010312)431:3<331::aid-cne1074>3.0.co;2-w
39. Scigliano G, Girotti F, Soliveri P, Musicco M, Radice D, Caraceni T. Increased plasma bilirubin in Parkinson patients on L-dopa: evidence against the free radical hypothesis? *Ital J Neurol Sci* 1997;18:69-72. doi: 10.1007/BF01999565
40. Songsomboon C, Tanprawate S, Soontornpun A, Wantaneeayong C, Louthrenoo W. Serum uric acid, serum uric acid to serum creatinine ratio and serum bilirubin in patients with parkinson's disease: a case-control study. *J Clin Med Res* 2020;12:172-9. doi: 10.14740/jocmr4079





## Severe Lesion in Dopaminergic Neurons in Substantia Nigra Associates with a Decrease in Serum Level of Copper

Arvin Babayan Tazehkand (M.D.)<sup>1</sup>, Hashem Haghdoost-Yazdi (Ph.D.)<sup>1\*</sup>

1- Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Prevention of Non- Communicable Disease, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.

Received: 30 November 2021, Accepted: 17 May 2022

### Abstract:

**Introduction:** Copper (Cu) involves in oxidation-reduction reactions, and its aggregation in the brain induces oxidative stress. However, previous studies reported a correlation between Cu plasma level and the risk of Parkinson's disease (PD). In this study, the association between serum Cu level and dopaminergic neuronal death in substantia nigra was assessed in a 6-hydroxydopamine animal model of PD.

**Methods:** The 6-OHDA was injected into the medial forebrain bundle of rats by stereotaxic surgery. Behavioral tests were carried out in the second, fourth, and eighth weeks after the toxin injection to assess the severity of PD. Bloodletting was performed in the eighth week after the toxin injection. Then, dopaminergic neuron death in substantia nigra was evaluated by immunohistochemistry. Copper content was determined by atomic absorption spectrophotometry.

**Results:** The severity of behavioral symptoms increased gradually after the toxin injection. However, there was no significant difference in serum copper levels among the experimental groups. According to the severity of behavioral symptoms, 6-OHDA-treated rats were divided into two subgroups symptomatic and asymptomatic. DAergic cell survival in symptomatic and asymptomatic subgroups was  $83 \pm 16$  and  $45 \pm 10$  %, respectively, which was lower than that in the control group. The serum copper level in the symptomatic subgroup was significantly lower than in the asymptomatic and solvent groups.

**Conclusion:** In conclusion, the decrease in serum copper level leads to intensive dopaminergic neuronal death in the substantia nigra.

**Keywords:** Parkinson's disease, Serum copper level, 6-hydroxydopamine, Dopaminergic neurons, Substantia nigra.

Conflict of Interest: No

\*Corresponding author: H. Haghdoost Yazdi, Email: hhaghdoost@gmail.com hhaghdoost@qums.ac.ir

**Citation:** Babayan Tazehkand A, Haghdoost-Yazdi H. Severe lesion in dopaminergic neurons in substantia nigra associates with a decrease in serum level of copper. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2023;18(1):31-39.