

IMPLICAȚIILE STRESULUI OXIDATIV ÎNTR-UN MODEL DE BOALĂ PARKINSON LA ȘOBOLAN

Lector dr. Lucian Hrițcu

*Departamentul de Biologie, Universitatea "Al.I.Cuza", Iași,
Laboratorul de Fiziologie Animală
B-dul Carol I, nr. 20A, Iași, 700506, România
hritcu@uaic.ro*

Introducere

- Boala Parkinson este o maladie neurodegenerativă caracterizată în principal de degenerarea masivă și progresivă a neuronilor dopaminergici din substanța neagră. Boala este asociată cu deficiențe senzomotorii și cognitive (20% din cazuri).
- Deși etiologia bolii Parkinson este necunoscută, studii recente au sugerat implicarea stresului oxidativ în patogeneza acestei boli, prin generarea speciilor reactive de oxigen (ROS), anionii superoxid, H_2O_2 , radicalilor hidroxil în fazele inițiale de declanșare a bolii.

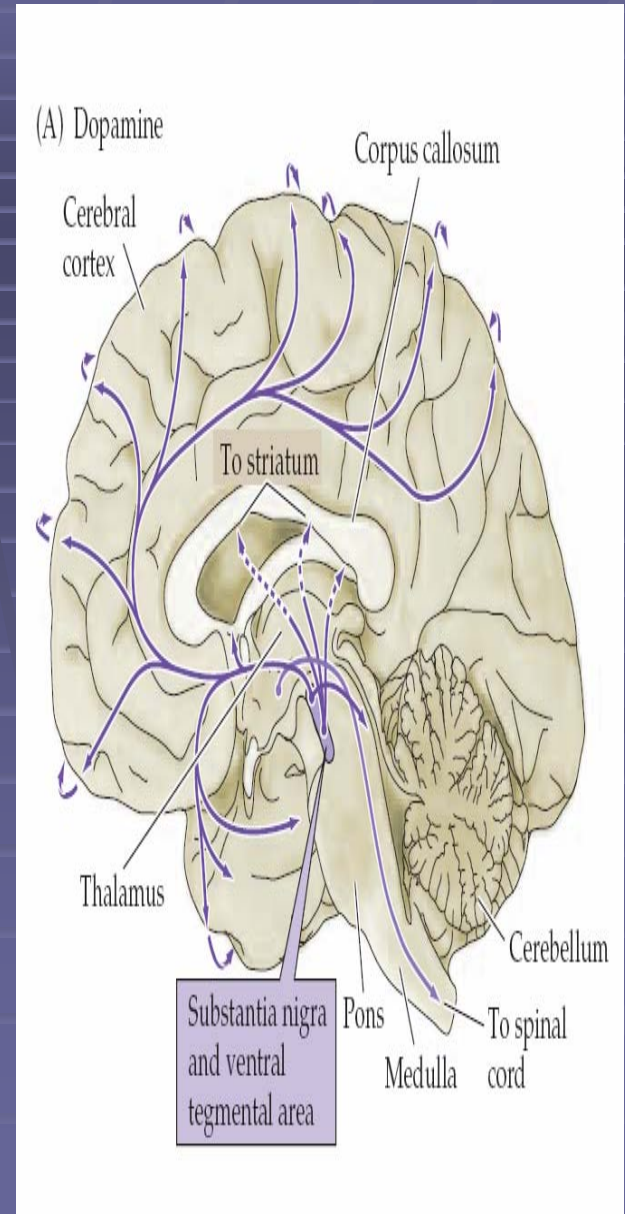
➤ În prezentul studiu s-au urmărit efectele leziunii unilateral-dreapta ale ariei ventral tegmentale (VTA) și ale substanței negre (SN) asupra proceselor de învățare și memorie la șobolani evaluate cu ajutorul testelor labirintului Y (Y-maze) și condiționării active (shuttle-box), precum și activitatea enzimelor antioxidante (SOD, GPX) și nivelul MDA. Datele noastre sugerează existența unei legături între VTA, SN, stresul oxidativ și expresia capacităților cognitive.

6-hidroxiopamina (6-OHDA)

- 6-OHDA este o toxină specifică a neuronilor dopaminergici
- Administrarea 6-OHDA în creierul de șobolan induce un model experimental al bolii Parkinson (Betarbet, 2002).
- Studiile comportamentale implică distrugerea unilaterală a căilor nigrostriatale cu 6-OHDA în vederea evitării apariției dizabilităților induse de leziunea bilaterală.
- Efectele neurotoxice ale 6-OHDA implică generarea H_2O_2 și a radicalilor hidroxil, reducerea activității GSH și SOD și intensificarea sintezei MDA în striatum.

Objective

- În prezentul studiu se urmărește evaluarea efectului stresului oxidativ generat în SN și VTA la șobolanii tratați cu 6-OHDA, prin determinarea activității enzimelor antioxidante din omogenatele de creier din lobi temporali și frontali.



Materiale și metode

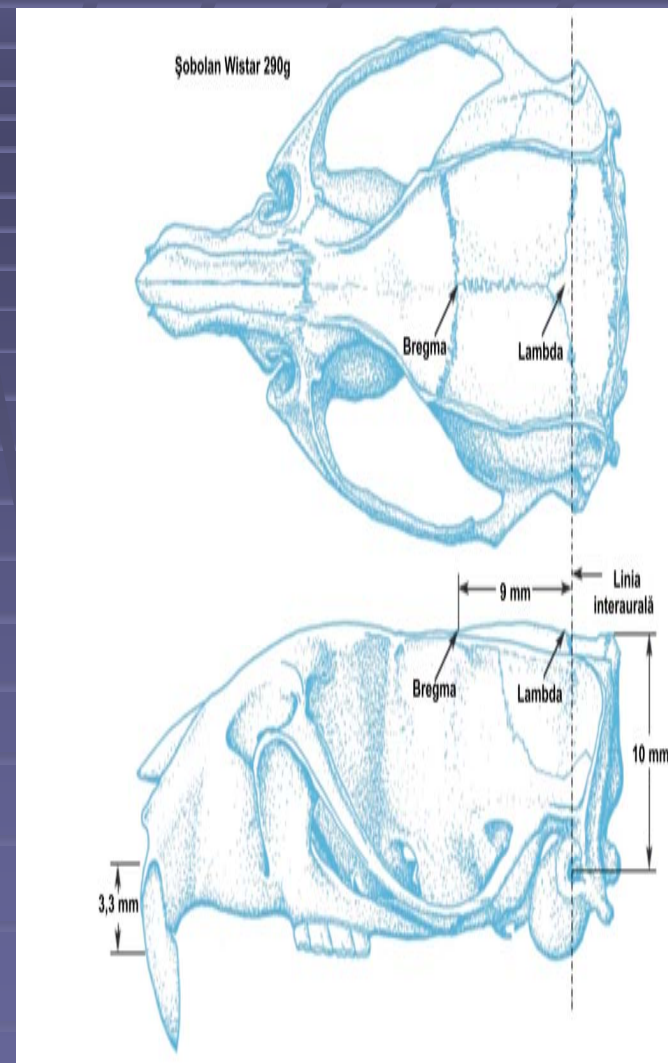
- Șobolani masculi, Wistar, cu vârsta de 22-23 luni, cântărind 250-300g la începutul experimentului.
- 3 șobolani/cușcă
- Acces liber la hrană și apă în condiții controlate de laborator
- Ciclu 12h zi/noapte, 22°C
- Leziuni 6-OHDA: SN și VTA;
- Teste comportamentale: testul labirintului cu brațe radiale (Y-maze) și testul de condiționare prin evitare activă (shuttle-box)
- Determinări biochimice: Determinarea activității SOD, GPX și nivelul MDA

Neurochirurgie

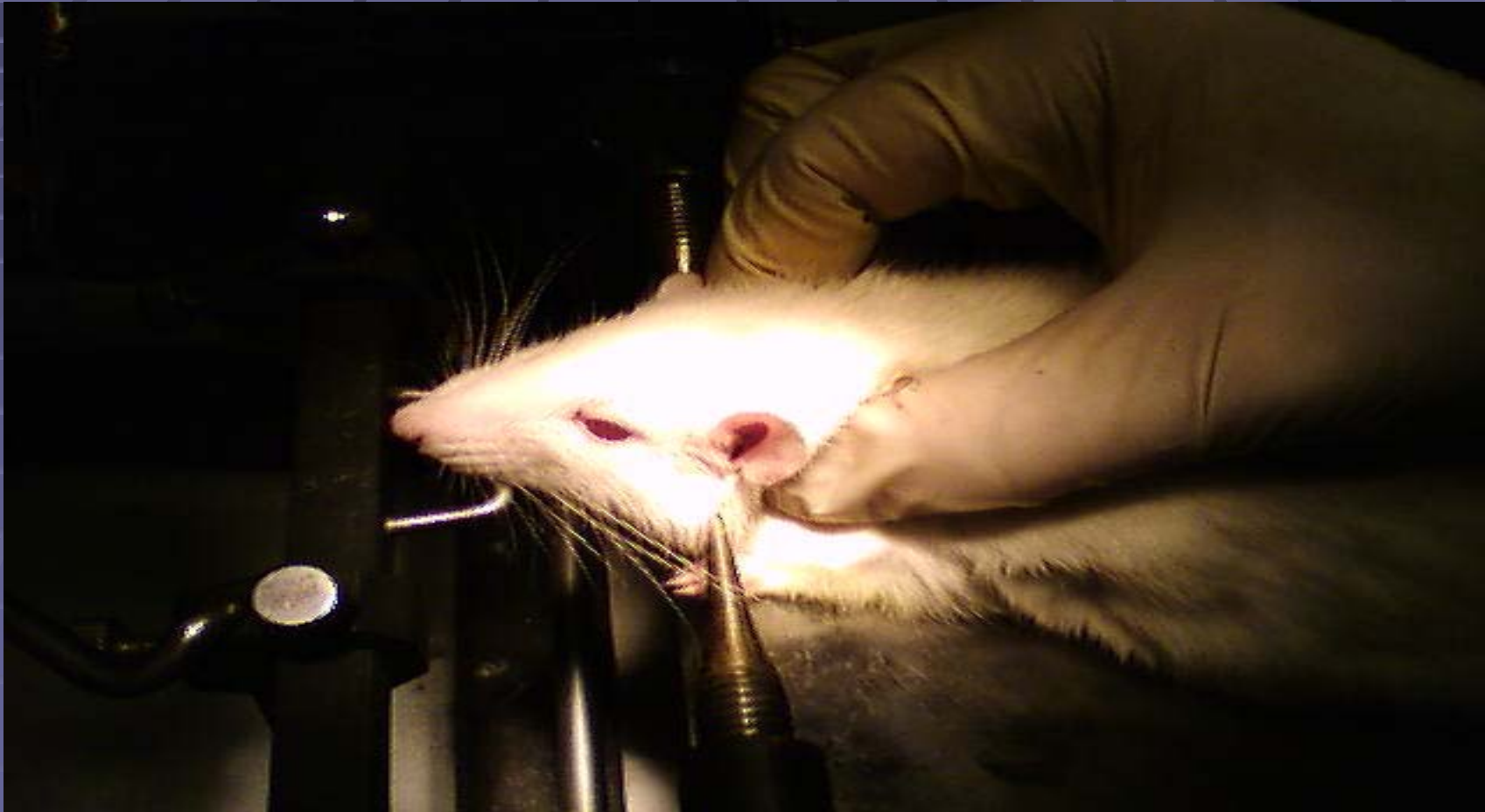
Coordonate stereotaxice

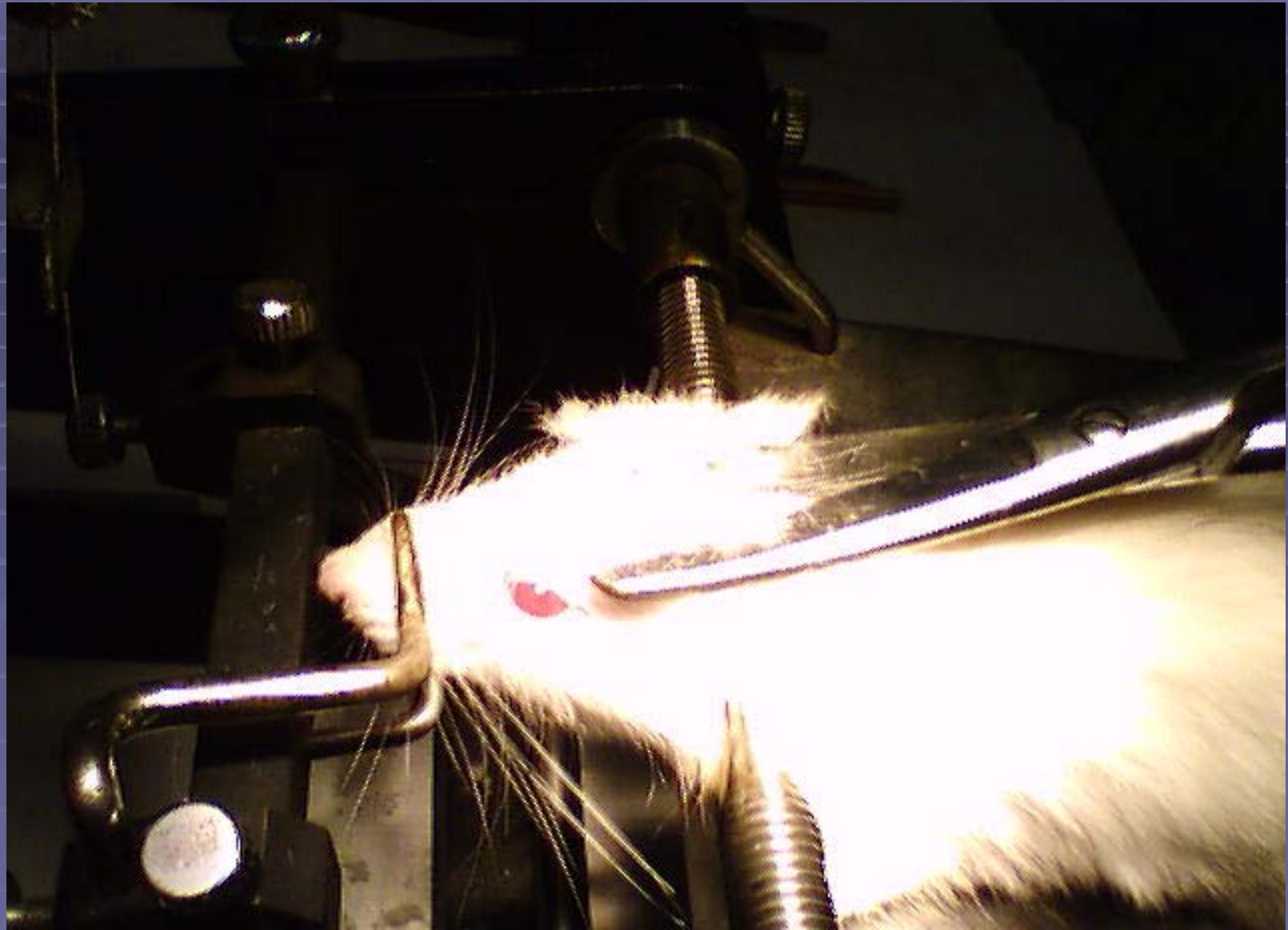
SN: 5.5 mm posterior de bregma;
2.0 mm lateral de linia mediană;
7.4 mm ventral față suprafața
cortexului

VTA: 5.6 mm posterior de bregma;
0.5 mm lateral de linia mediană;
7.6 mm ventral față de suprafața
cortexului (Paxinos and Watson,
2005).

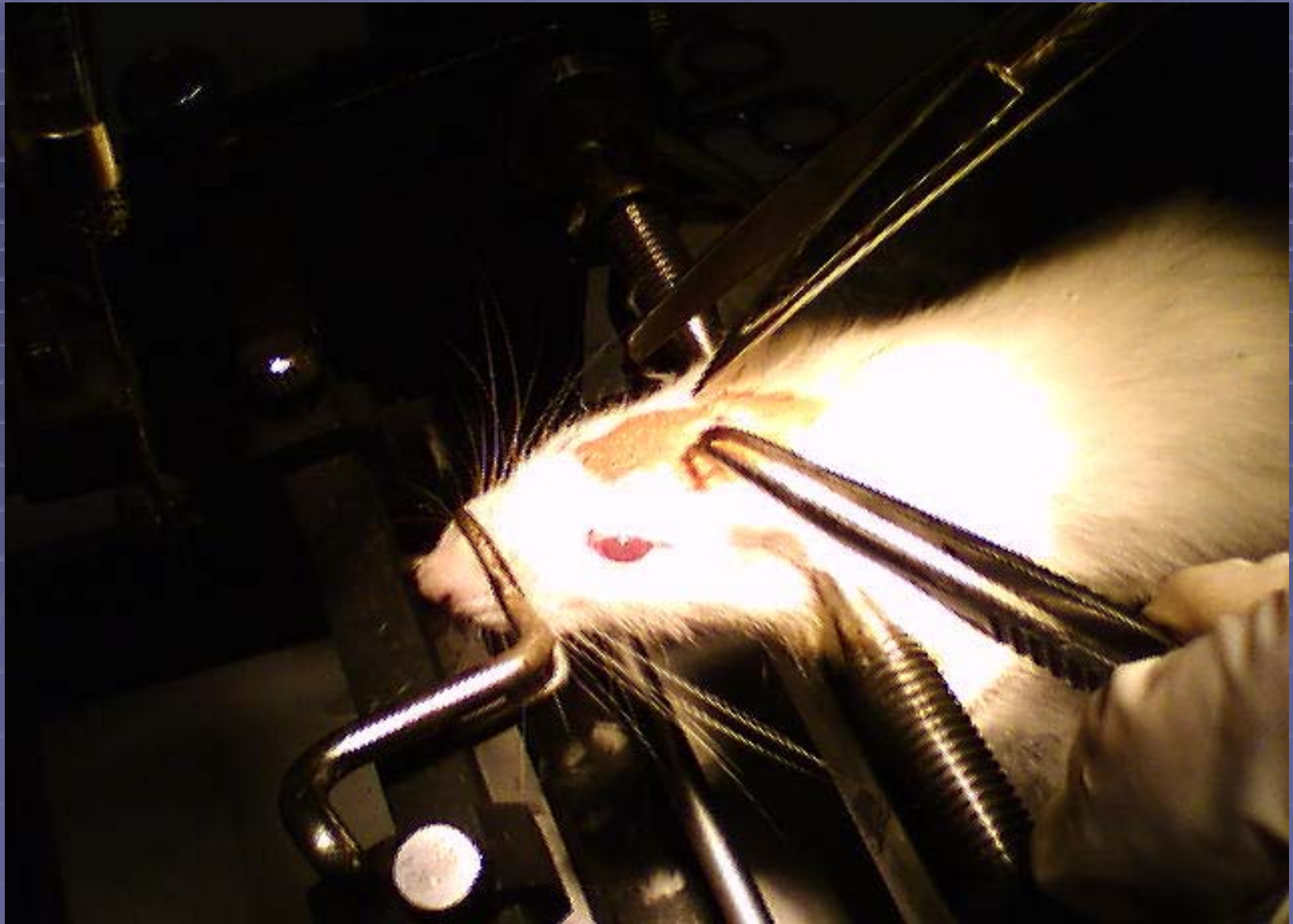


Etapele tehnicii stereotaxice













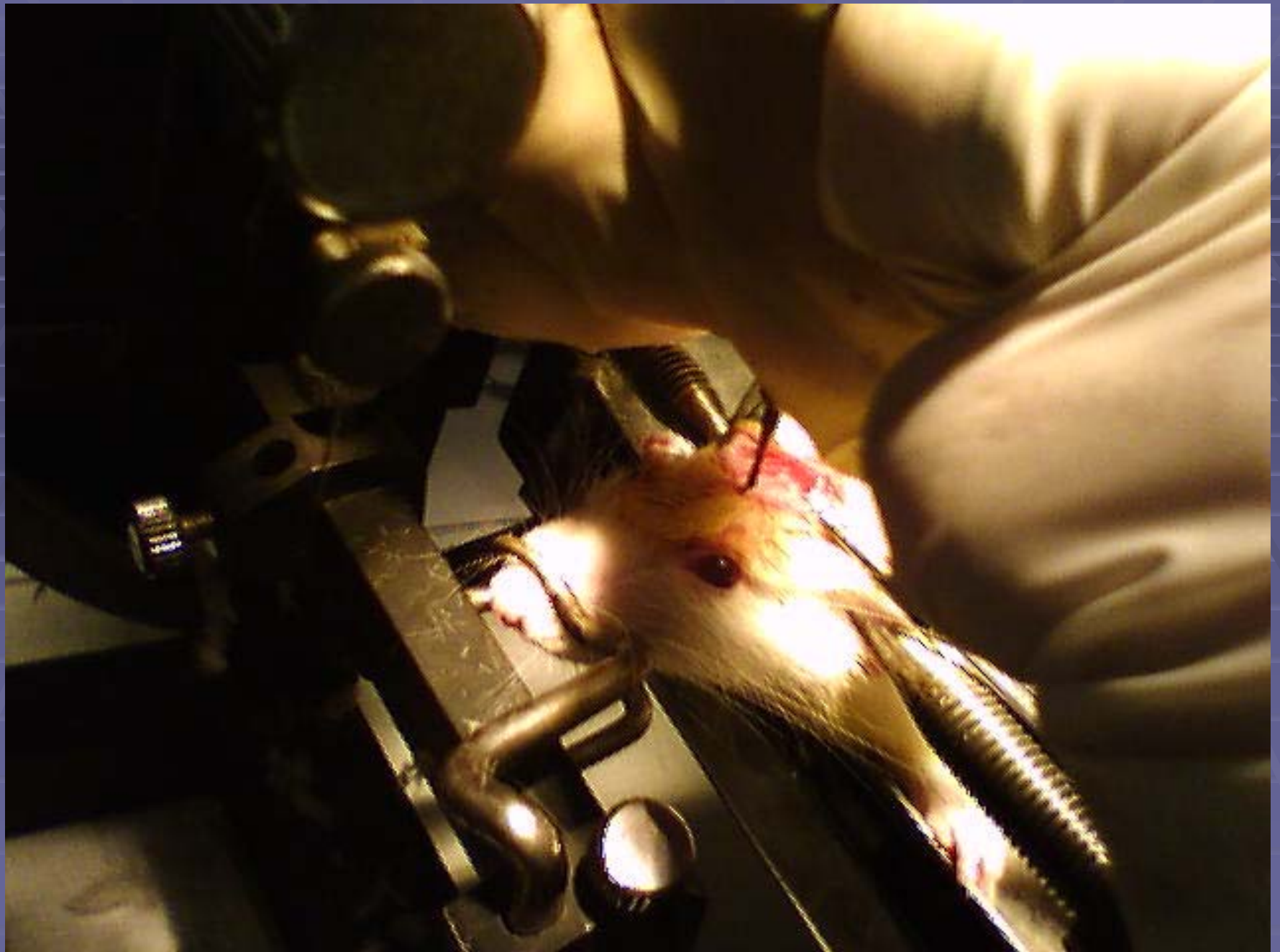


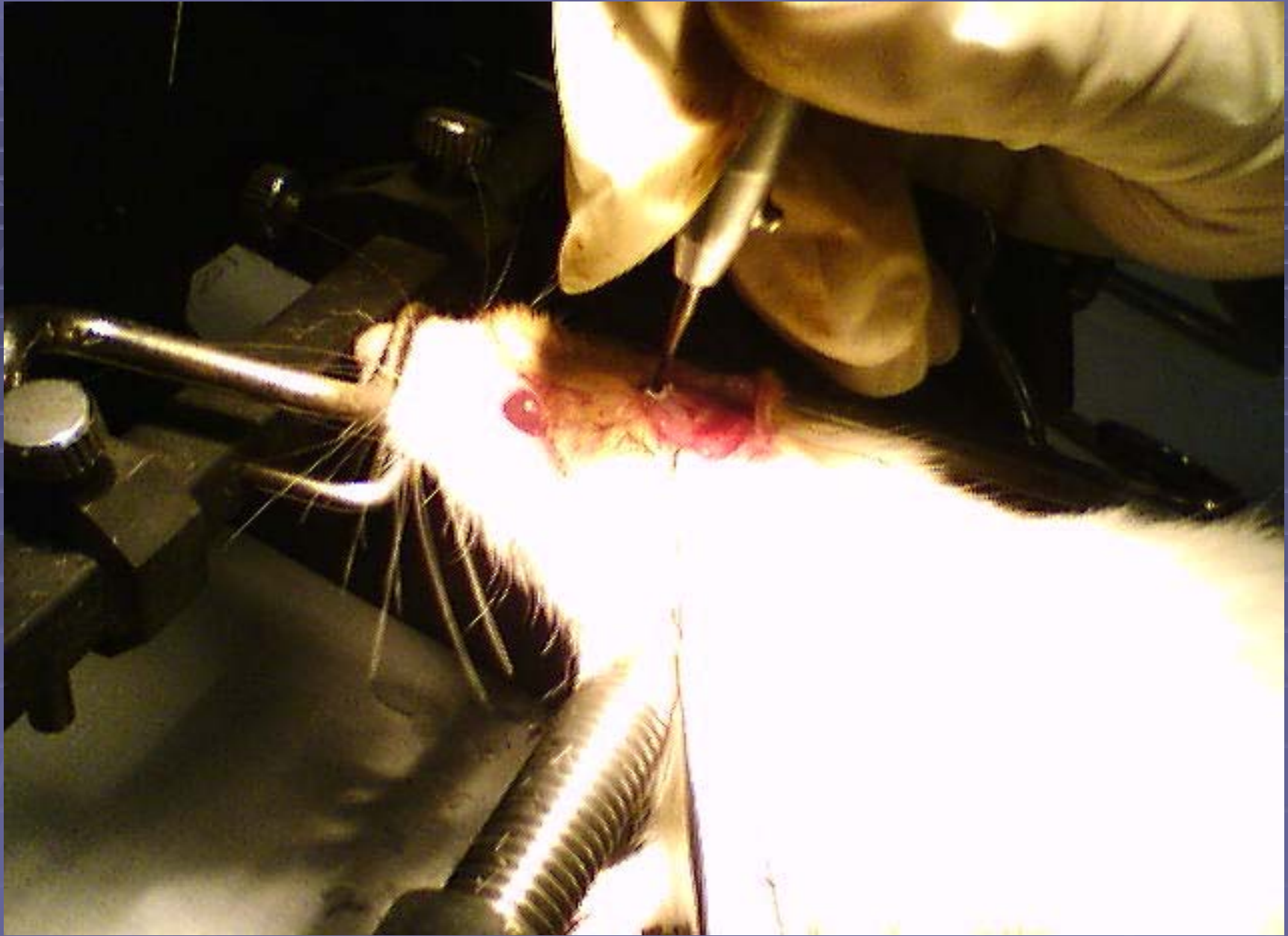


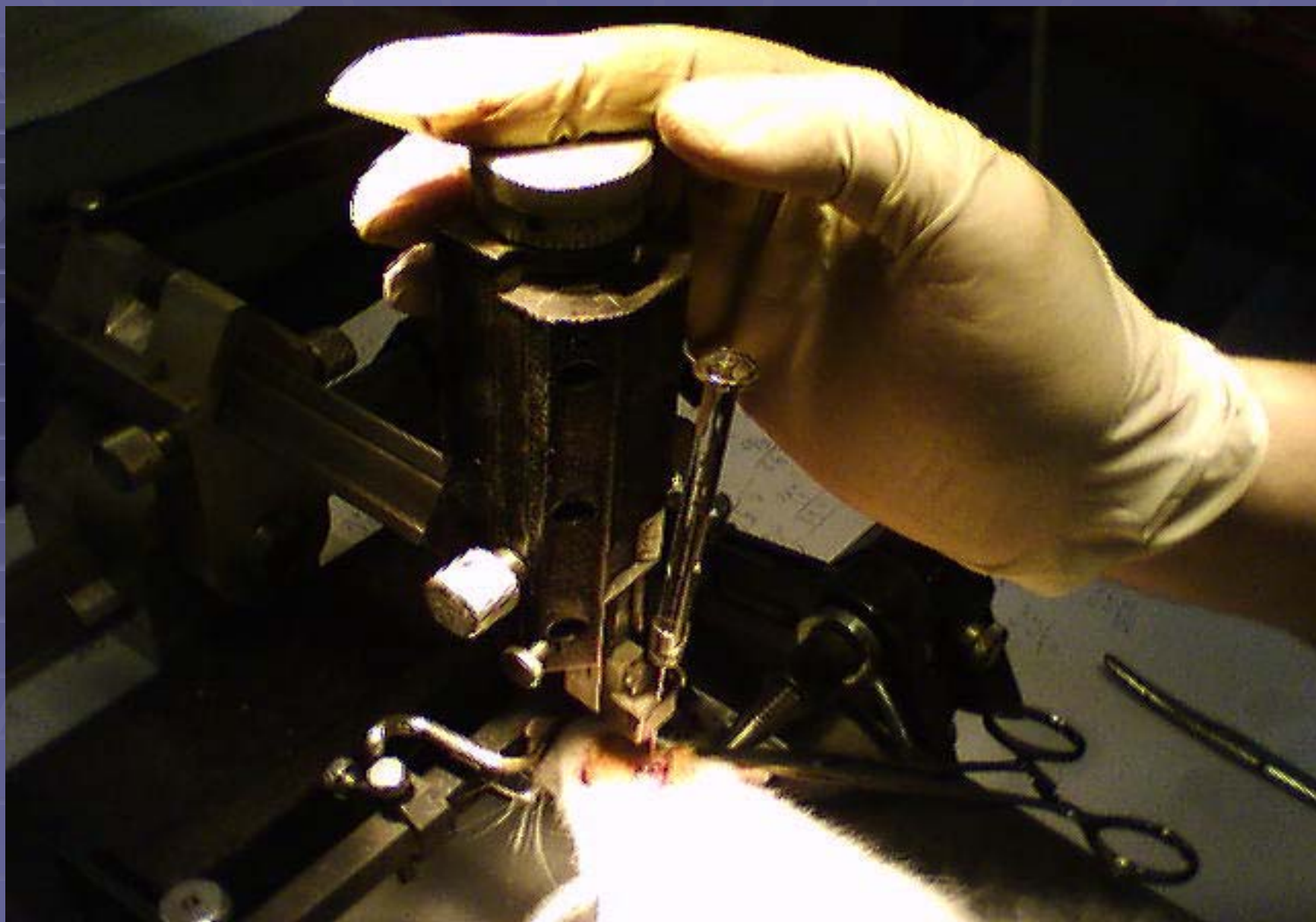




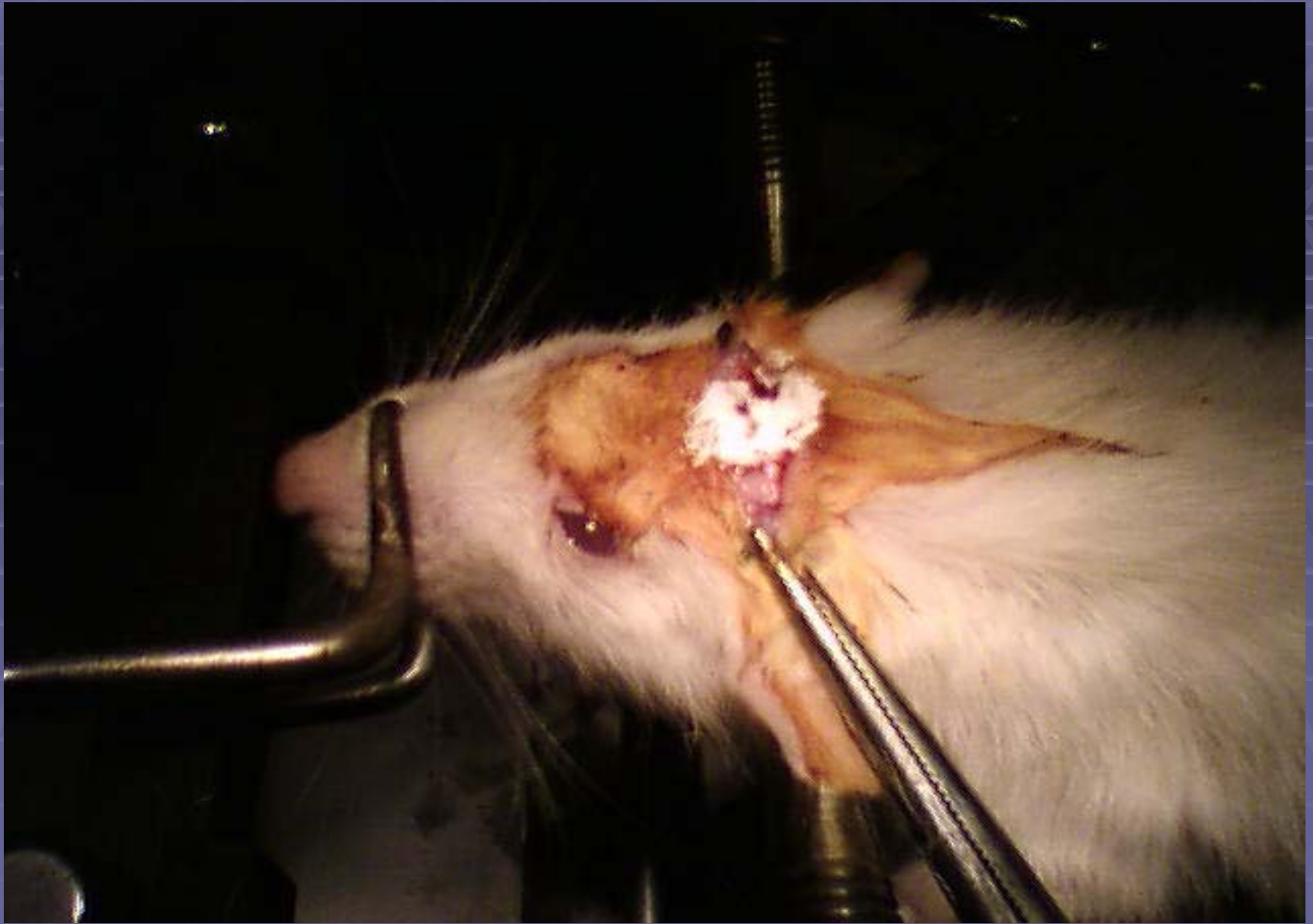














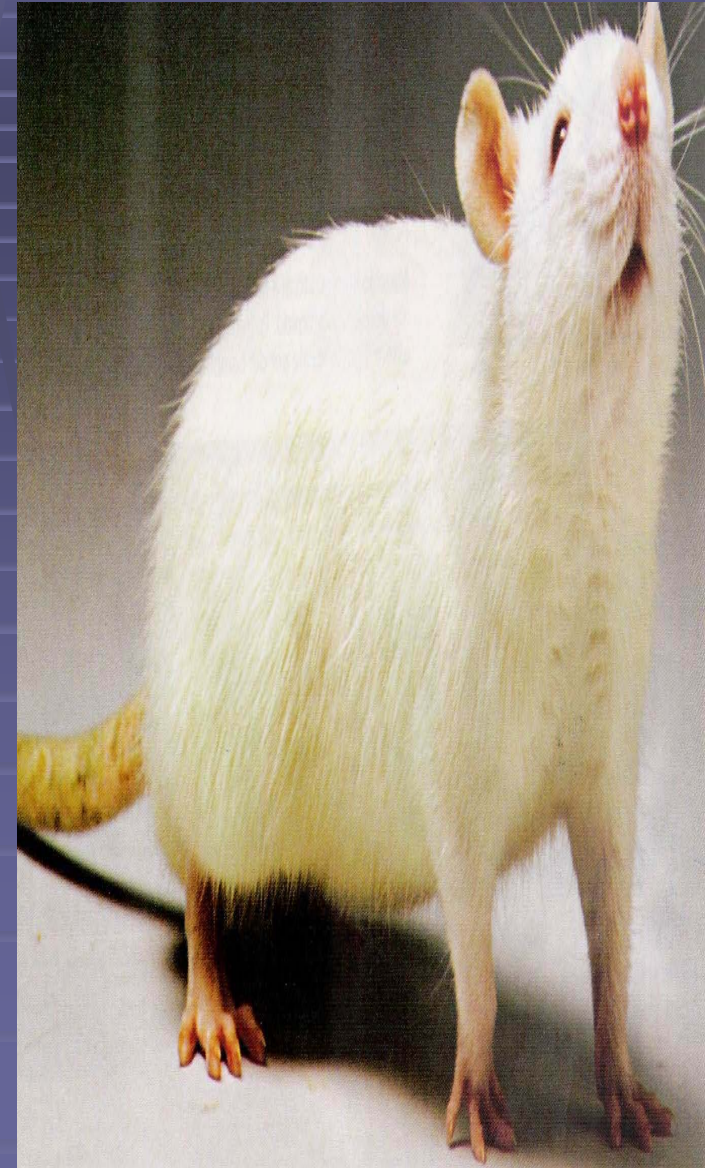






Teste comportamentale

- Studii recente asupra maladiei Parkinson indică perturbări de natură cognitivă variind de la dereglări minore ale memoriei sau ale funcțiilor intelectuale până la demență.
- Teste comportamentale – la 2 săptămâni de la operație
- *Testul labirintului cu brațe radiale (Y-maze)*
- *Testul de condiționare prin evitare activă (shuttle box)*

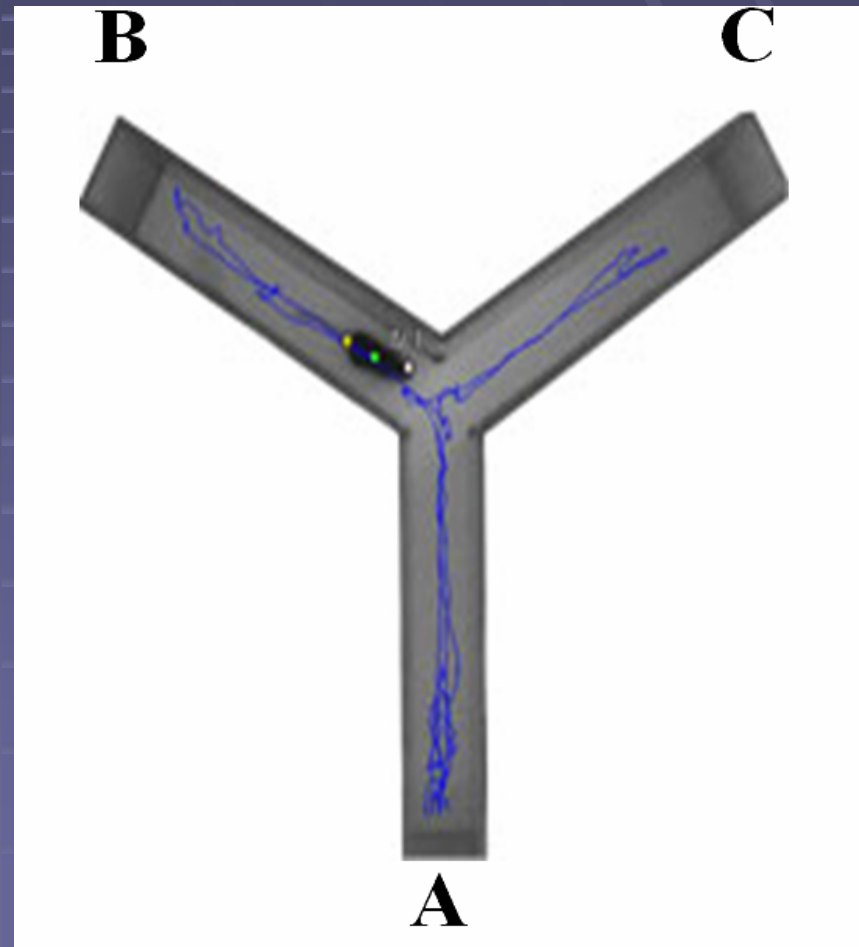


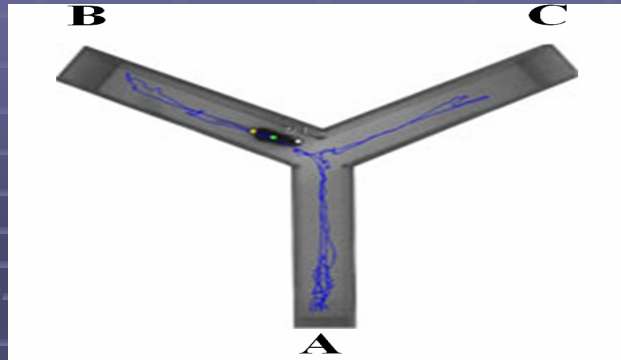
Etapele testelor comportamentale



Testul labirintului cu brațe radiale (Y-maze)

- 3 brațe unite printr-o zonă centrală triunghiulară (35x25x10 cm)
- Șobolanul este plasat la capătul brațului A și lăsat să se deplaseze în labirint timp de 8 min (timp limită).





- Comportamentul de alternare spontană este definit ca intrarea succesivă în cele trei brațe (notată în seturi de triplet: ABC, BCA, CAB, CBA, ACB, BAC).
- Procentul de alternare spontană este definit ca raportul dintre numărul de alternări efectuate și cele posibile (definit ca numărul total de intrări în brațe minus doi), totul de înmulțit cu 100 (Yamada și colab., 1996).
- Testul este bazat pe tendința rozătoarelor de a explora brațul aparatului Y-maze care a fost mai puțin vizitat. Prin acest test putem obține date despre *memoria de scurtă durată* (Nitta și colab., 1994).

Testul de condiționare prin evitare activă (shuttle-box)

- Aparatul (48,5x23x20,5 cm) prezintă două compartimente prevăzute cu un grilaj metalic pe podea, conectat la o surs[de curent.
- Cele două compartimente comunică între ele printr-un spațiu central, permițând animalului să treacă dintr-un compartiment în altul.





- Fiecare sesiune de antrenamente începe cu habituarea (3 minute) în care animalul explorează aparatul. S-au înregistrat numărul de traversări dintr-un compartiment în altul.
- Animalele au fost supuse la 50 de antrenamente/zi (5 secunde sonerie; 5 sec șoc electric 0,6 mA).



- **Răspuns pozitiv** – animalul trece dintr-un compartiment în altul înainte de administrarea șocului electric (în 5 sec)
- **Răspuns negativ** - animalul trece dintr-un compartiment în altul după administrarea șocului electric (în 5 sec)



- Memoria de lungă durată
- După fiecare animal aparatul se curăță cu soluție alcoolică 70%.

Rezultate

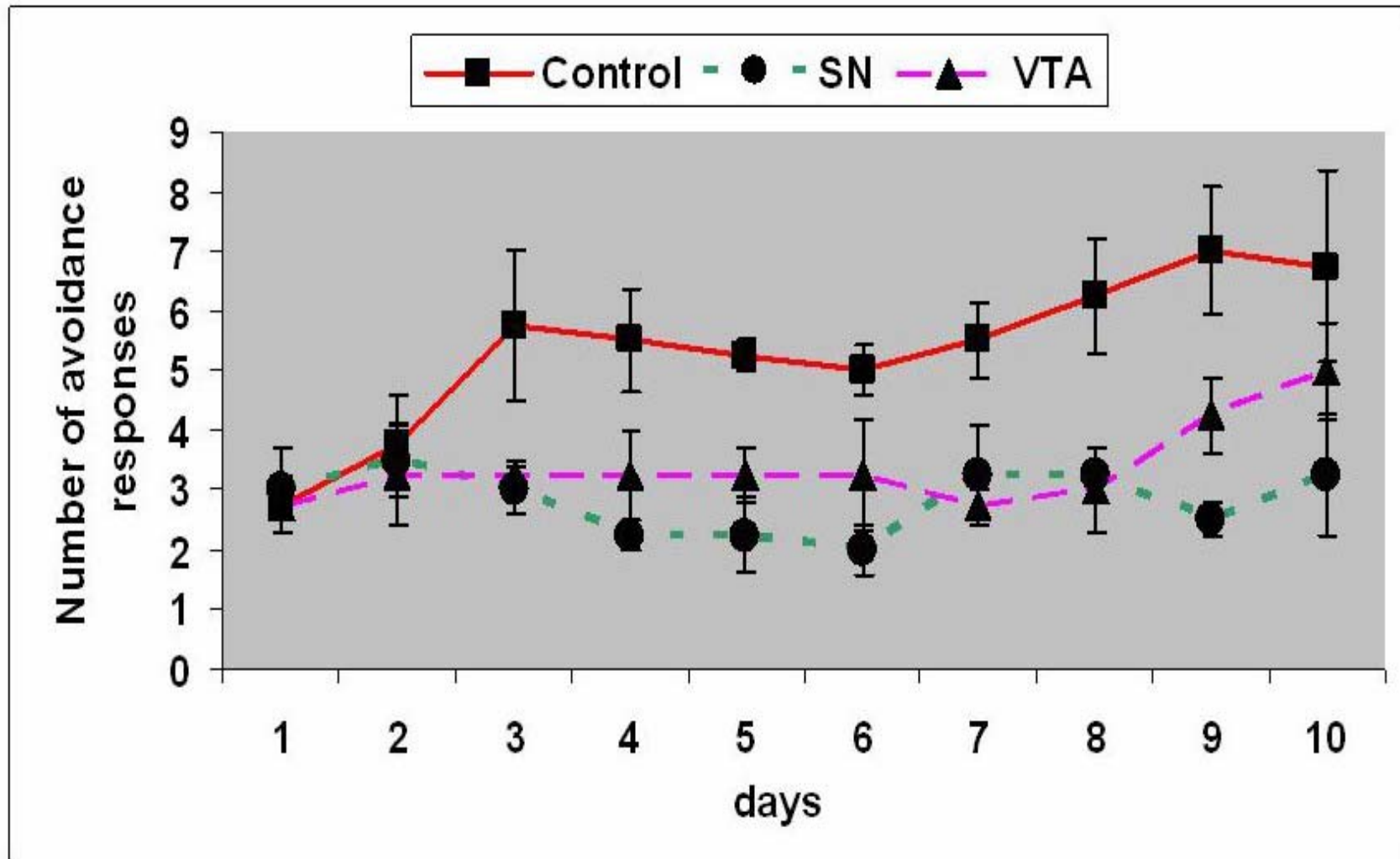


Figure. 1. The effects of 6-OHDA lesion in the SN and VTA on number of avoidance responses tested by means of shuttle-box task. $F(9,18)=2.05, p<0.04$

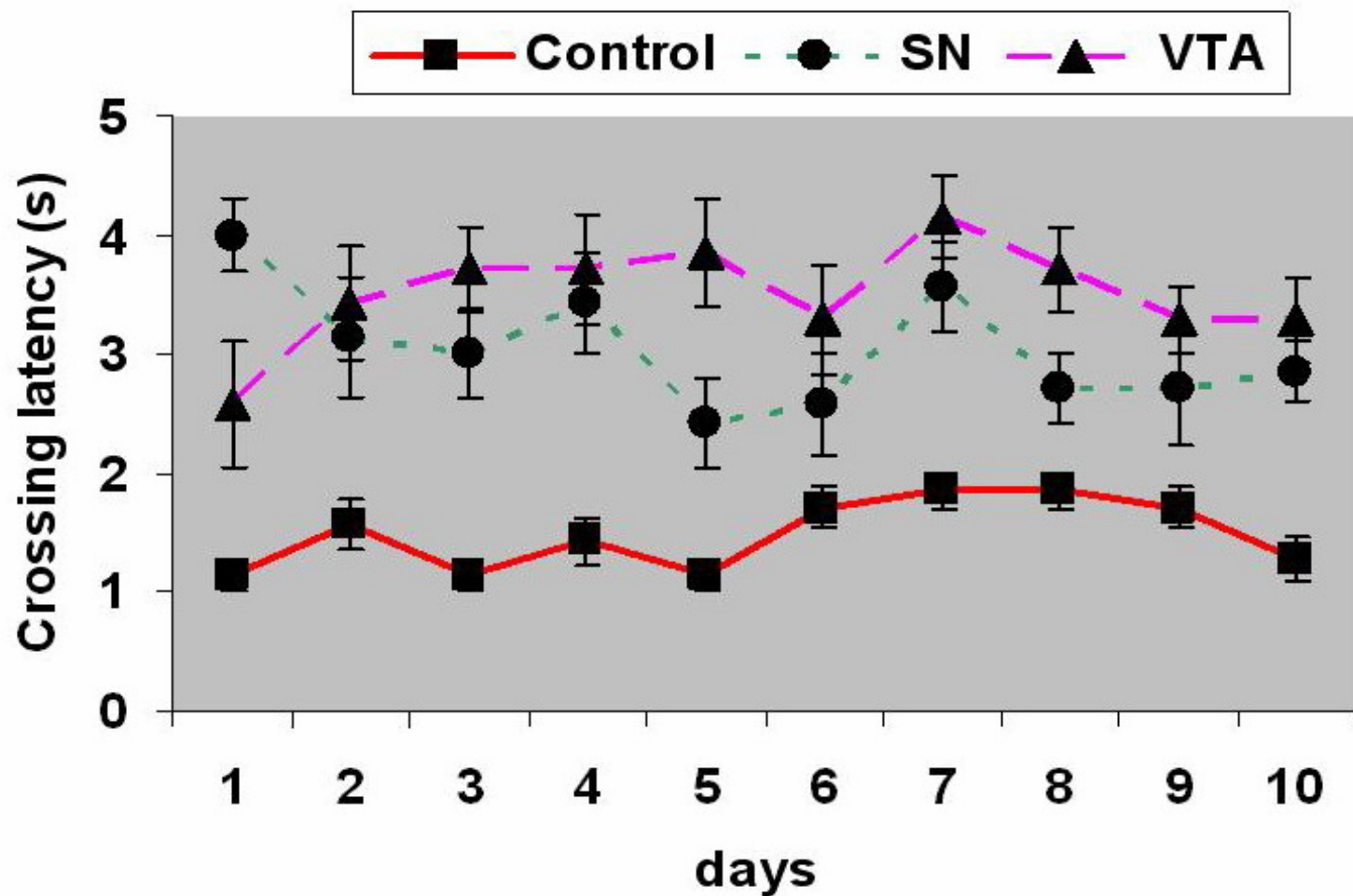


Figure. 2. The effects of 6-OHDA lesion in the SN and VTA on crossing latency tested by means of shuttle-box task. $F(9,18)=94.21$, $p<0.00006$

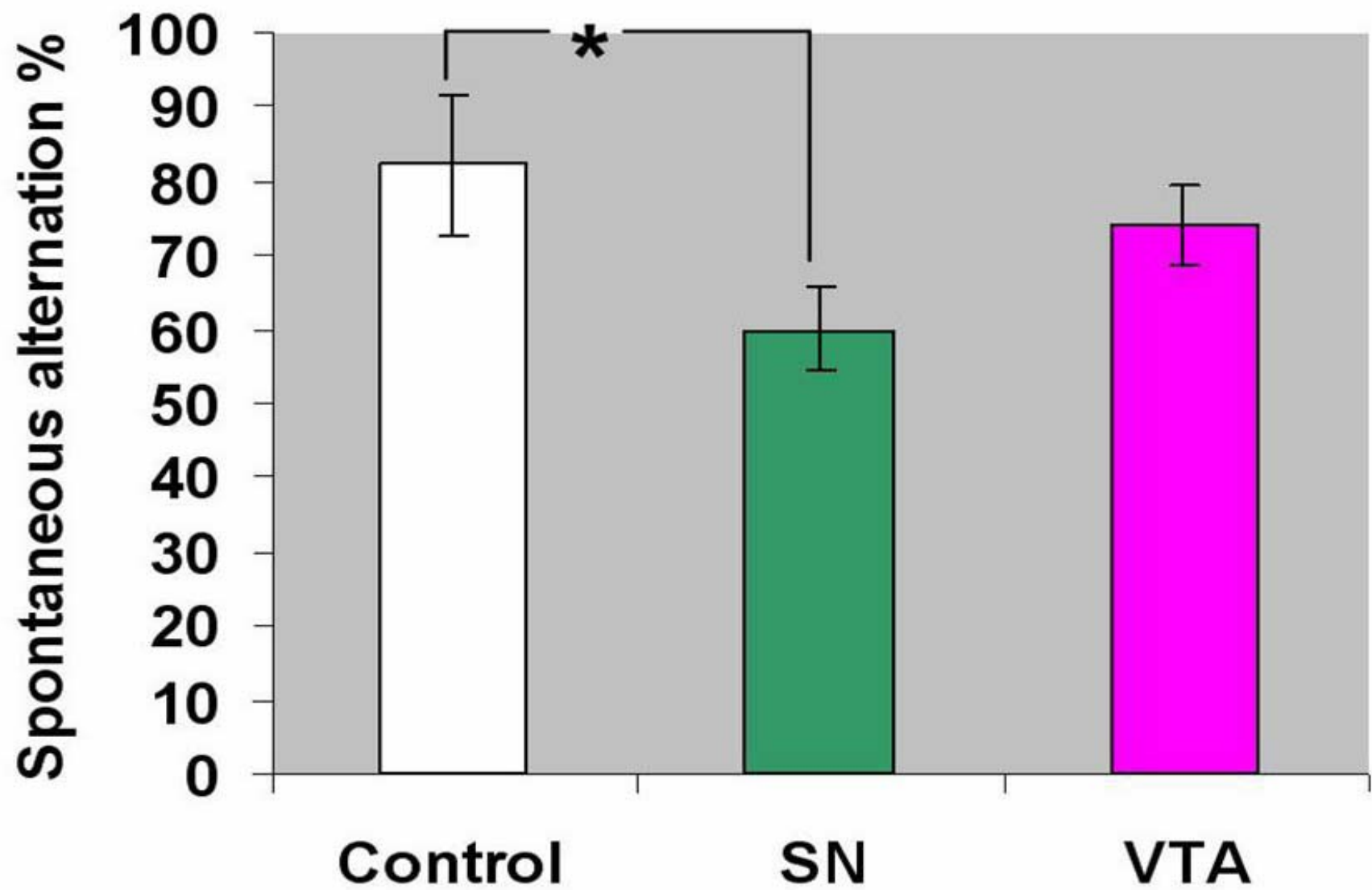


Figure 1. The effects of 6-OHDA lesion in the SN and VTA on spontaneous alternation % tested by means of Y maze task. $p < 0, 05$.

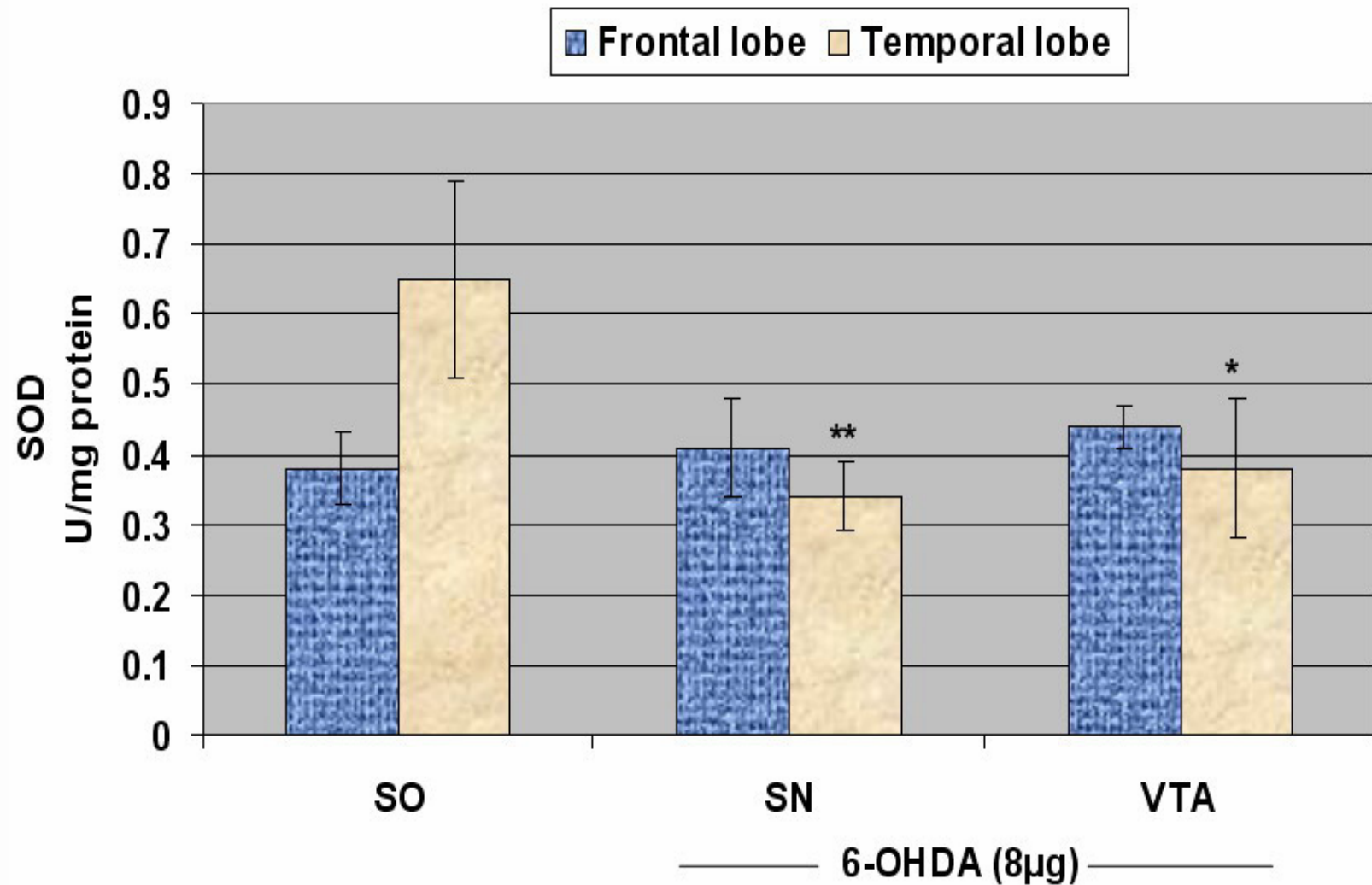


Fig. 1. The effects of 6-OHDA lesion in the substantia nigra and ventral tegmental area on SOD specific activity. * $p < 0.02$; ** $p < 0.01$ vs. sham-operated group

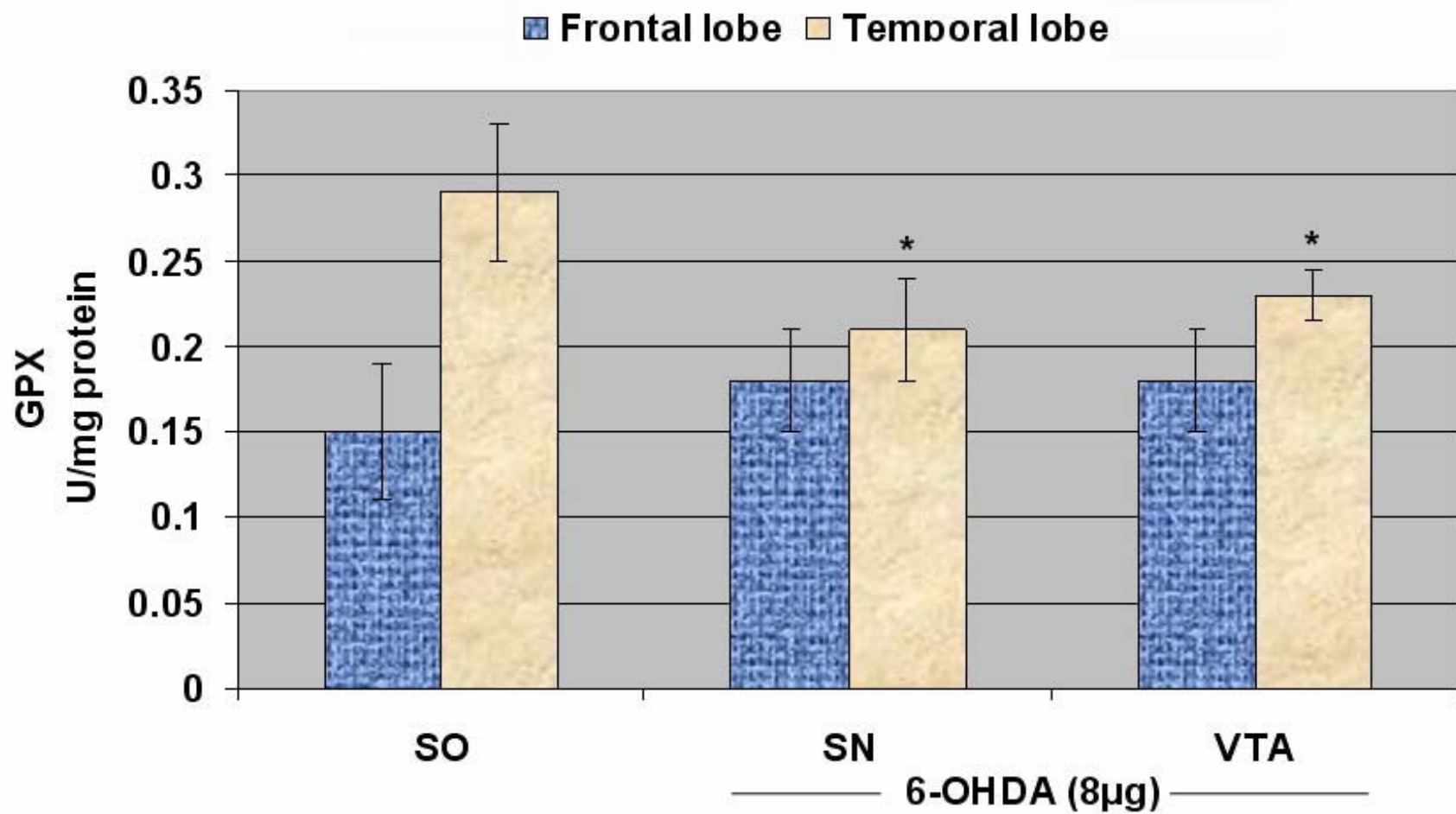


Fig. 2. The effects of 6-OHDA lesion in the substantia nigra and ventral tegmental area on GPX specific activity. * $p < 0.02$ vs. sham-operated group.

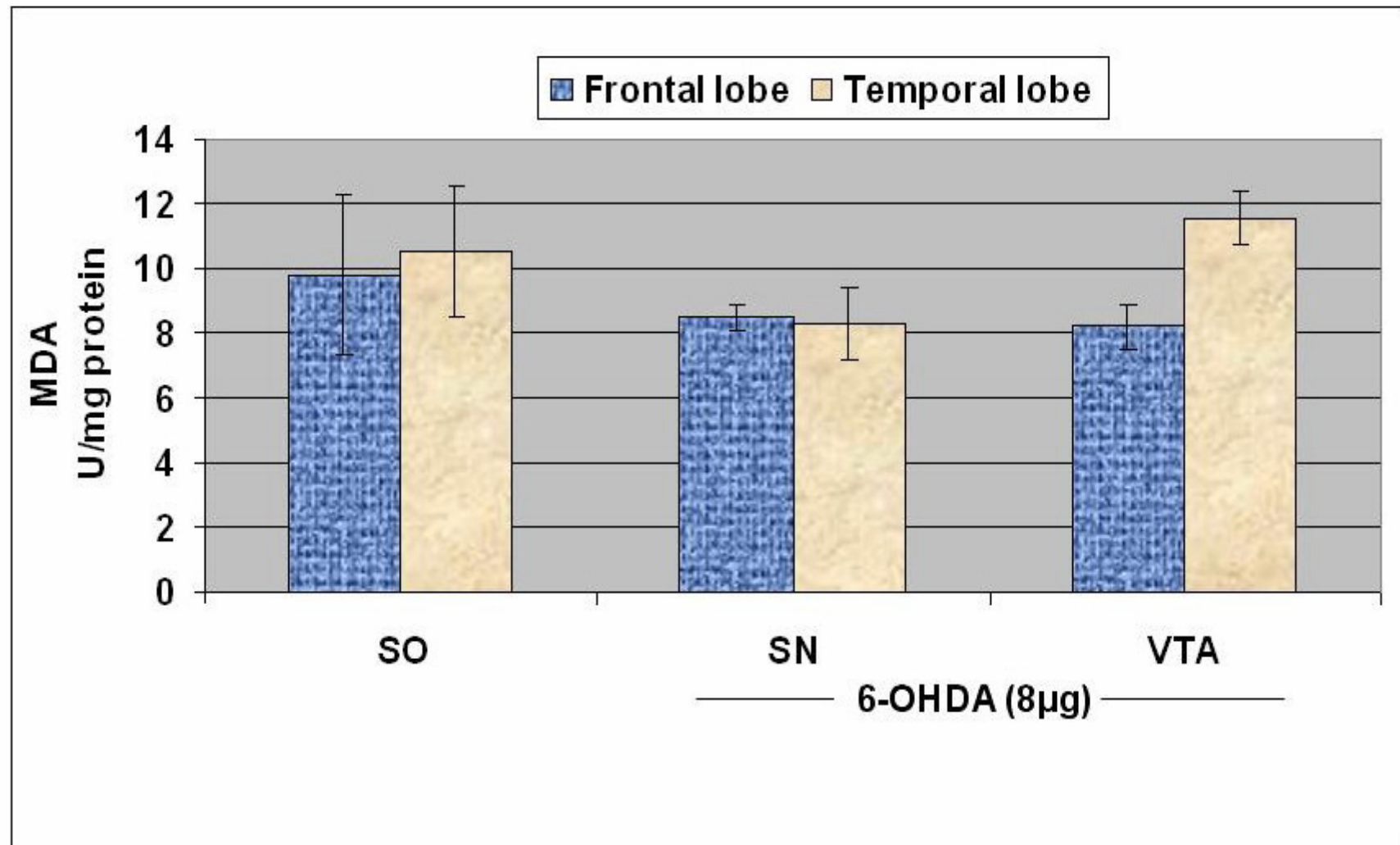


Fig. 3. The effects of 6-OHDA lesion in the substantia nigra and ventral tegmental area on MDA specific activity. $p < 0.05$ vs. sham-operated group

Concluzii

- Datele noastre experimentale sugerează rolul facilitator al VTA și SN în procesele de învățare și memorie.
- Rezultatele noastre sugerează că leziunea SN și VTA cu 6-OHDA determină stres oxidativ.
- SN pare să aibă un rol determinant.