

Evaluation of the role of endoplasmic reticulum stress in the progress of 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rat

Azita Minaei, Hashem Haghdoost Yazdi*, Mohammad Reza Sarookhani

Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Prevention of Noncommunicable Disease, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

* Corresponding author e-mail: hhaghdoost@gmail.com

Citation: Minaei A, Haghdoost-Yazdi H, Sarookhani MR. Evaluation of the role of endoplasmic reticulum stress in the progress of 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rat. *Daneshvar Medicine* 2021; 29(5):56-70.
doi: 10.22070/DANESHMED.2021.14983.1110

Abstract

Objective: In this study, using evaluation of the expression of two specific proteins of endoplasmic reticulum (ER) stress, GRP78 and CHOP in the striatum and substantia nigra (SN) in the 6-hydroxydopamine (6-OHDA) animal model of Parkinson's disease (PD), the role of this stress was evaluated in the progress of Parkinson's disease (PD).

Materials and Methods: 6-OHDA was injected into medial forebrain bundle. Behavioral tests were carried out in the second, fourth, sixth and eighth weeks after the toxin. In the eighth week, the brain of some rats was perfused and immunohistochemical (IHC) assessments were performed to evaluate the survival of dopaminergic neurons in SN and also the expression of GRP78 and CHOP in striatum. The brain of other rats was freshly removed and the expression of GRP78 and CHOP in SN was evaluated using western blotting.

Results: The severity of behavioral symptoms increased progressively in 6-OHDA- treated rats and reached to maximum in the eighth week. IHC assessments revealed that more than 80% of dopaminergic neurons in SN were lost in these rats. These assessments also showed that only 5% of the cells in striatum of control rats expressed GRP78 and CHOP. On the other hand, about 42% of these cells in 6-OHDA- treated rats expressed these proteins. Furthermore, expression of GRP78 and CHOP in SN of 6-OHDA- treated rats increased 400% as compared to control rats.

Conclusion: ER stress involves in progress of 6-OHDA-induced parkinsonism in rat indicating this stress may have a role in progress of PD in human beings.

Keywords: Parkinson's disease, 6-hydroxydopamine, GRP78, CHOP, Striatum, Substantia nigra, Rat

Received: 28 Jun 2021
Last revised: 26 Oct 2021
Accepted: 15 Sep 2021

بررسی نقش استرس شبکه اندوپلاسمی در پیشرفت پارکینسونیسم القاء شده با سم ۶-هیدروکسی دپامین در موش بزرگ آزمایشگاهی

نویسندگان: آریتا مینایی، هاشم حق دوست یزدی*، محمد رضا ساروخانی

مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، پژوهشکده جلوگیری از بیماری های غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

Email: hhaghdoost@gmail.com

*نویسنده مسئول: هاشم حق دوست یزدی

چکیده

هدف: در این مطالعه با بررسی بیان دو پروتئین شاخص استرس شبکه آندوپلاسمی (ER)، GRP78 و CHOP در استریاتوم و جسم سیاه (SN) در مدل حیوانی ۶-هیدروکسی دپامین (۶-OHDA) بیماری پارکینسون نقش این استرس در پیشرفت این بیماری بررسی شد.

مواد و روش ها: سم ۶-OHDA به ناحیه دسته مغزی جلویی میانی تزریق شد. آزمون های رفتاری در هفته های دوم، چهارم، ششم و هشتم پس از سم انجام شد. در هفته هشتم مغز برخی موش ها پرفیوز و بررسی های ایمونوهیستوشیمی برای ارزیابی بقاء نورون های دپامینرژیک در جسم سیاه و میزان بیان GRP78 و CHOP در استریاتوم صورت گرفت. مغز دیگر موش ها تازه درآورده شد و بیان GRP78 و CHOP در SN بوسیله وسترن بلاتینگ بررسی شد.

نتایج: شدت علائم رفتاری در موش های دریافت کننده سم بتدریج افزایش یافت و در هفته هشتم به حداکثر رسید. ردیابی ایمونو هیستوشیمی در SN نشان داد که بیش از ۸۰ درصد از نورون های دپامینرژیک جسم سیاه در موش های دریافت کننده سم تخریب شدند. همچنین با وجود آنکه در گروه کنترل تنها ۵٪ از سلول ها در استریاتوم پروتئین های GRP78 و CHOP را بیان کردند در گروه دریافت کننده سم میزان بیان این پروتئین ها ۴۲٪ بود. در جسم سیاه گروه سم نیز بیان این پروتئین ها نزدیک به ۴۰٪ افزایش یافت.

نتیجه گیری: استرس ER در پیشرفت پارکینسونیسم القاء شده با ۶-OHDA در موش بزرگ آزمایشگاهی نقش دارد که دلالت می کند این استرس ممکن است نقشی در پیشرفت بیماری پارکینسون در انسان داشته باشد.

واژه های کلیدی: بیماری پارکینسون، ۶-هیدروکسی دپامین، GRP78، CHOP، استریاتوم، جسم سیاه، موش بزرگ آزمایشگاهی

مقاله پژوهشی

دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۰۷

آخرین اصلاح ها: ۱۴۰۰/۰۸/۰۴

پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۱۹

مقدمه

نیزافزایش ظرفیت تا کردن پروتئین ها، باعث کاهش تجمع پروتئین های بد تاخورد می شود.

پاسخ UPR با شناسایی پروتئین های بد تاخورد توسط GRP78^۶ آغاز می شود. این پروتئین، چپرون اصلی ER بوده و کنترل و راه اندازی حسگرهای مسیر سیگنالینگ UPR را بر عهده دارد (۱۱). افزایش میزان پروتئین های بد تاخورد در ER باعث جدا شدن GRP78 از حسگرهای ER stress و فعال شدن آن ها می شود (۱۲)، (۱۳). بعد از این حالت ابتدا فاکتور PERK و سپس فاکتورهای ATF6 و IRE1 فعال می شوند. فاکتور IRE1 با فعال کردن فاکتور γ eIF2 α ، سنتز پروتئین های بیشتر را متوقف می کند و سپس با فعال کردن پروتئینی به نام CHOP^۷ مرگ سلول را رقم می زند (۱۴، ۱۵). آغازگر مسیر آپوپتوز و میانجیگر مرگ است (۱۶، ۱۷) و با افزایش بیان ژن های مرتبط با آپوپتوز از جمله کاسپاز ۱۲ و کاسپاز ۳ موجب مرگ سلول می شود (۱۸، ۱۹، ۲۰).

6-OHDA نوروٹوکسینی است که از ۱۹۶۰ تا کنون برای ایجاد مدل حیوانی پارکینسون مورد استفاده بوده است. این نوروٹوکسین بصورت اختصاصی توسط ناقلین دپامین در پایانه های دپامینرژیک برداشت شده و با مهار کمپلکس میتوکندریایی I و به دنبال آن ایجاد استرس اکسیداتیو نهایتاً منجر به مرگ این نورون ها می شود (۲۲-۲۰). تزریق یک طرفه این سم به استریاتوم و یا دسته مغز جلویی میانی در مغز منجر به مرگ انتخابی نورون های دوپامینرژیک جسم سیاه و همی پارکینسونیسم در موش بزرگ آزمایشگاهی می شود. اخیراً شواهدی مبنی بر القاء پاسخ UPR توسط 6-OHDA بدست آمده است که نشان می دهد استرس ER ممکن است یکی از مکانیسم های مرگ نوروئی ناشی از 6-OHDA باشد (۲۳، ۲۴). بررسی های انجام شده نشان می دهند که پارکینسونیسم القاء شده توسط 6-OHDA پیشرونده بوده و می توان آن را به دو فاز تقسیم کرد: فاز القاء که در هفته های ابتدایی پس از تزریق سم و به علت تخریب شدید نورون های DA ناحیه SNC اتفاق می افتد و فاز پیشرفت که چندین

بیماری پارکینسون (PD) دومین بیماری نورودژنراتیو شایع در دنیاست که حدود یک درصد افراد بالای ۶۰ سال را درگیر می کند (۱). مهمترین شاخص پاتوفیزیولوژیک این بیماری تخریب نورون های دوپامینرژیک (DA) جسم سیاه در ناحیه SNC^۱ می باشد (۲). علت دقیق مرگ این نورون ها هنوز مشخص نیست و استراتژی درمانی مؤثری که قادر به متوقف کردن فرایند تخریب آنها باشد وجود ندارد (۳). مهمترین مکانیسم های مطرح که مرگ این نورون ها را پیش می برند استرس اکسیداتیو، اختلال در هومئوستاز کلسیم، نقص در عملکرد میتوکندری ها، اختلال در فرایند میتوفاژی و عملکرد پروتازوم می باشد (۴).

اخیراً شواهد فراوانی مبنی بر نقش استرس شبکه اندوپلاسمی (ER) در پاتوژنز و پیشرفت بیماری پارکینسون ارائه شده است (۵-۷). ER یک اندامک درون سلولی حیاتی است که در عملکردهای مختلف سلولی از جمله: تا خوردگی و بلوغ پروتئین ها، هومئوستاز کلسیم و بقای سلول نقش دارد (۸). افزایش تقاضای سلول برای تولید پروتئین و ناتوانی ER در تا کردن صحیح پروتئین ها منجر به تجمع پروتئین های بد تاخورد^۲ و در نتیجه ایجاد شرایطی به نام استرس ER می شود (۹). در پاسخ به سیگنال های استرس و در نتیجه ی تجمع پروتئین های بد تاخورد پاسخ ی تحت عنوان UPR (unfolded protein response) فعال می شود که هدف اولیه آن بازگرداندن ER به فعالیت طبیعی خود است اما در صورت طولانی شدن استرس، این مسیر منجر به آپوپتوز سلول می شود تا از آسیب دیدن سلول های مجاور جلوگیری کند (۱۰). سه مسیر سیگنالینگ برای UPR شناسایی شده است که توسط سه حسگر مولکولی اصلی موجود بر روی غشاء ER هدایت می شوند. این حسگرها شامل پروتئین های IRE1 α ^۳، PERK^۴ و ATF6^۵ می باشند. فعال شدن مسیرهای سیگنالینگ در پایین دست این حسگرها، با سرکوب کردن سنتز پروتئین در قسمت سیتوزولی ER و

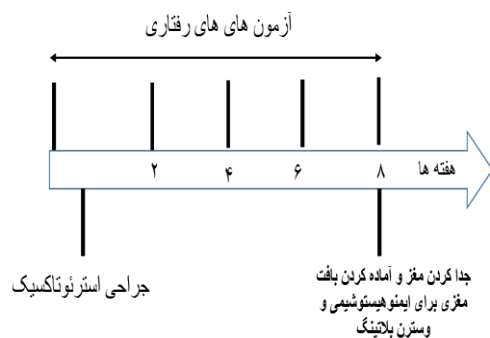
- 1 . Substantia nigra pars compacta
- 2 . Misfolded proteins
- 3 . Inositol-requiring enzyme/endonuclease 1 α
- 4 . Double stranded RNA-activated protein kinase(PKR)-like ER kinase
- 5 . Activating transcription factor 6

6 . Glucose-regulated protein 78

7 . Eukaryotic initiation factor-2 α

8 . C/EBP homologous protein

anterior-posterior (AP): -4, lateral (L): -1.8, dorso-ventral (DV): 9 و AP: -4.4, L: -2, DV: 8.8



شکل ۱. برنامه زمان بندی آزمایش های این مطالعه

ابتدا آزمون چرخشی انجام شد و حیواناتی که بیش از ۱۰ چرخش خالص در مدت زمان ۳۰ دقیقه نشان دادند انتخاب شدند. عدم تقارن در استفاده از دست‌ها از طریق آزمون سیلندر در موش‌های انتخاب شده تعیین شد و سپس جراحی استرئوتاکسیک روی آن‌ها صورت گرفت. آزمون‌های رفتاری در هفته‌های دوم، چهارم، ششم و هشتم پس از جراحی تکرار شد. در هفته هشتم مغز موش‌ها پس از پرفیوژن و یا فرس از جمجمه خارج شد و آزمایشات ایمونوهیستوشیمی و وسترن بلاتینگ بر روی آنها صورت گرفت.

آزمون‌های رفتاری

آزمون چرخشی القاء شده با آپومورفین

این آزمون بر اساس روش شرح داده شده در مطالعات قبلی (۳۰، ۳۱) انجام شد. به طور خلاصه، ابتدا به حیوانات اجازه داده شد تا برای ۵ دقیقه در محیط یک ظرف استوانه‌ای شفاف تطابق یابند و سپس آپومورفین هیدروکلراید (سیگما، ۰/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم) بصورت درون صفاقی تزریق شد. یک دقیقه بعد، تعداد چرخش‌های کامل به مدت ۳۰ دقیقه در یک ظرف استوانه‌ای (با قطر ۲۸ سانتی‌متر و ارتفاع ۳۸ سانتی‌متر) محاسبه شد. چرخش‌های به سمت مقابل طرف تزریق سم (سمت چپ) و همان طرف تزریق سم (سمت راست) به ترتیب نمرات مثبت و منفی در نظر گرفته شدند. تعداد خالص چرخش‌ها بصورت نمرات مثبت منهای موارد منفی محاسبه شد.

هفته پس از تزریق سم و به علت مرگ پیش رونده باقیمانده نورون‌های DA ایجاد می‌شود (۱۷، ۲۴-۲۸). در این مطالعه نقش استرس ER در مرگ نورونی دپامینرژیک جسم سیاه در فاز پیشرفت پارکینسونیسم بررسی شد. به این منظور میزان بیان دو مارکر شاخص ER stress یعنی پروتئین‌های GRP78 و CHOP در استریاتوم و SN موش‌های دریافت کننده سم بررسی شد.

مواد و روش‌ها

حیوانات و گروه‌های آزمایشی

موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نر بالغ نژاد ویستار (موسسه رازی، کرج، ایران)، با وزن ۲۵۰-۲۸۰ گرم در قفس‌های بزرگ (۳۸×۵۹×۲۰ سانتی‌متر) در یک اتاق با دمای تحت کنترل و تحت چرخه ۱۲ ساعت نور/۱۲ ساعت تاریکی با دسترسی آزاد به آب لوله کشی و غذای استاندارد قرار گرفتند. تمام مراحل مطالعه مطابق با دستورالعمل آزمایشات حیوانی شورای تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی قزوین انجام شد. موش‌ها به سه گروه آزمایشی تقسیم شدند: کنترل، حلال (Vehicle) و 6-OHDA. هر گروه شامل ۸ موش بود و تمام موش‌ها بجز گروه کنترل، 6-OHDA یا حلال آن را بصورت داخل مغزی از طریق جراحی استرئوتاکسیک دریافت کردند. برنامه زمان بندی آزمایش در شکل ۱ نشان داده شده است.

جراحی استرئوتاکسیک

6-OHDA (سیگما) یا حلال آن به ناحیه دسته مغز جلویی میانی (MFB)^۱ نیمکره راست با استفاده از جراحی استرئوتاکسی و از طریق سرنگ همیلتون ۱۰ میکرولیتری تزریق شد. موش‌ها ابتدا با تزریق درون صفاقی محلول حاوی کتامین و زایلازین (به ترتیب ۷۰ و ۶ میلی‌گرم/کیلوگرم) بیهوش شدند. سپس، ۴ میکرولیتر 6-OHDA (۴ میکروگرم/میکرولیتر) حل شده در محلول سالین ایزوتونیک (NaCl) حاوی ۰/۲٪ اسید اسکوربیک به دو ناحیه در MFB نیمکره راست با مختصات ذیل بر اساس اطلس پاکسینوز و واتسون (۲۹) تزریق شد.

^۱ Medial forebrain bundle

آنتی ژن، برش ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق با Triton X-100 5% و BSA 5% تیمار شدند و سپس به مدت یک شب در ۴ درجه سانتیگراد با آنتی بادی اولیه انکوبه شدند. آنتی بادی های اولیه مورد استفاده به این شرح بود:

Anti-tyrosine hydroxylase (TH) antibody (Sc-25269; Santa Cruz Inc., USA), Anti-GRP78/BiP antibody (ab227865; Abcam., Germany), and Anti- CHOP antibody (ab11419; Abcam., Germany).

روز بعد برش ها با PBS شسته شده و با آنتی بادی ثانویه کونژوگه شده با HRP به مدت یک ساعت انکوبه شدند.

آنتی بادی های ثانویه مورد استفاده به این شرح بود:

(ab6721; Abcam., Germany for GRP78 and Sc-516102; Santa Cruz Inc., USA for TH and CHOP).

در مرحله بعد اتصال آنتی ژن و آنتی بادی با استفاده از ۳-۳ دی آمینو بنزیدین بعنوان کروموژن قابل مشاهده شد.

رنگ زمینه توسط Mayer's hematoxylin (Sigma- Mayer's hematoxylin (Sigma-Aldrich Inc.) انجام گرفت و در

مرحله نهایی آبیگری با قرار دادن برش ها در محلول اتانول آبی درجه بندی شده از ۷۰ تا ۱۰۰ درصد صورت گرفت.

در نهایت برش ها بعد از غوطه ورسازی در زایلین روی لام قرار داده شدند. واکنش ایمنی در سه فیلد که بصورت

زندوم انتخاب شده و هم پوشانی نداشتند در ناحیه SNc و Striatum توسط آزمایشگری که از ترتیب گروه های

آزمایشی بی اطلاع بود بررسی شد. برش ها با میکروسکوپ Olympus با بزرگنمایی ۱۰× مشاهده شدند. سپس از

لام های مربوط به هر حیوان از میان ۵۰ برش ۶ عدد انتخاب شد. سلول های TH مثبت با استفاده از

میکروسکوپ نوری در بزرگنمایی ۴۰۰× مشاهده و شمارش شدند. تعداد سلول های TH مثبت به عنوان میانگین تعداد

بدست آمده از شش قطعه نماینده بیان شد. سطح پروتئین ها توسط تراکم سنجی با استفاده از نرم افزار

Image J بصورت کمی درآمد. همین مراحل در مورد بیان پروتئین های GRP78 و CHOP در استریاتوم انجام گرفت.

بررسی وسترن بلائینگ

برای تعیین استرس ER درون SN، سر حیوانات از بدن جدا شد، مغز آن ها به سرعت روی یخ قرار گرفت و برش

داده شد. سپس مغز میانی با استفاده از بافر RIPA(Sigma) هموژنایز شد. پس از سانتریفیوژ (۱۰ دقیقه ۱۲۰۰۰g در

دمای ۴ درجه سانتیگراد)، مایع رویی جمع آوری شد.

در این آزمون نحوه استفاده از دست ها در جریان فعالیت غریزی و اکتشافی موش ها در یک محیط جدید مورد بررسی قرار می گیرد (۳۲). موش ها به صورت جداگانه در داخل یک ظرف استوانه ای شفاف قرار گرفتند و به مدت ۱۰ دقیقه اجازه حرکت آزادانه و کشف محیط را داشتند. در طی این زمان دفعات استفاده از دست طرف آسیب دیده (دست راست)، دست طرف سالم (دست چپ) و هر دودست برای لمس دیواره ظرف توسط آزمایشگری که برای انجام این آزمون آموزش دیده بود شمارش شد. سپس نمره عدم تقارن (Asymmetry score) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{Asymmetry score} = \frac{|I+C+B-C|}{I+C+B}$$

که در آن I و C نشان دهنده تعداد لمس دیواره با دست طرف آسیب دیده^۱ و دست مقابل ناحیه آسیب دیده^۲ و B^۳ نشان دهنده تعداد تماس ها با هر دو دست می باشد. عدد نهایی بدست آمده نسبتی مابین ۱- و ۱ است. مثبت و منفی بودن این نسبت به ترتیب نشان دهنده این است که دست طرف سالم و دست طرف آسیب در لمس دیواره غالب بودند. بنابراین، انتظار می رود در همی پارکینسونیسم شدید نمره عدم تقارن مثبت ثبت شود.

رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی

حیوانات عمیقاً بیهوش شده و پرفیوژن از مسیر قلب با استفاده از PBS و به دنبال آن محلول پارافرمالدهید ۴٪ در

PBS (pH=7.2) با جریان مداوم یک میلی لیتر در دقیقه انجام شد. مغز های فیکس شده به سرعت جدا شده و به

مدت ۲۴ ساعت در پارافرمالدهید ۴٪ غوطه ور شدند. سپس مغزها از ناحیه حاوی SN (از ۴ تا ۶ میلی متر از

سمت caudal به سمت bregma) برش داده شدند و در پارافین غوطه ور شدند. قطعه rostral مغز نیز برای

جداسازی ناحیه استریاتوم مورد استفاده قرار گرفت. قطعات پارافینه سپس توسط میکروتوم با روش استاندارد

بصورت برش هایی با قطر ۵ میکرومتر برش داده شدند. سپس مراحل دپارافینه کردن و آبدهی انجام گرفت و

پراکسیداز اندوژن با قرار دادن برش ها در H2O2 3% به مدت ۳۰ دقیقه غیرفعال شد. بعد از مرحله آشکار سازی

- 1 . Ipsilateral
- 2 . Contralateral
- 3 . Both

نتایج

داده های رفتاری

همانطور که در شکل ۲-۲ نشان داده شده است موش های گروه ۶-OHDA در پاسخ به آپومورفین چرخش های زیادی در جهت مخالف نیمکره تزریق سم نشان دادند که تأیید می کرد مدل پارکینسونی به خوبی ایجاد شده است. برای بررسی شدت چرخش ها در طی زمان، این آزمون تا هفته هشتم پس از جراحی بصورت هر دو هفته یکبار تکرار شد. همانطور که انتظار می رفت و در شکل ۲-۲ نشان داده شده است، شدت چرخش ها در این مدت تا ۷۵٪ افزایش یافت و از $18/03 \pm 216/55$ چرخش در هفته دوم به $26/36 \pm 380/46$ چرخش در هفته هشتم رسید. موش های گروه های کنترل و حلال رفتار چرخشی قابل توجهی در هیچ کدام از آزمون های انجام شده نشان ندادند.

آزمون سیلندر

همانطور که در شکل ۲-۲ C نشان داده شده است، قبل از جراحی نمره عدم تقارن در تمام گروه های آزمایشی نزدیک به صفر بود که نشان می دهد موش های سالم ترجیحی در استفاده از یک دست برای لمس دیواره ظرف آزمایش نداشتند. بعد از جراحی، نمره عدم تقارن در گروه های کنترل و حلال همچنان نزدیک به صفر ماند در حالیکه در گروه دریافت کننده سم به طرز چشمگیری افزایش یافت و به $0/49 \pm 0/02$ در هفته دوم رسید که نشان می دهد موش های این گروه غالباً از دست راست برای لمس دیواره ظرف آزمایش استفاده کردند. همچنین نمره عدم تقارن در این گروه مشابه افزایشی تعداد چرخش ها در آزمون چرخشی روند افزایشی داشت و به $0/71 \pm 0/05$ در هفته هشتم رسید (شکل ۲-D).

رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی نورون های TH+

تخریب شدید نورونی در ناحیه SNc در موش های دریافت کننده سم مشاهده شد. رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی درجه و شدت آسیب نورونی دپامینرژیک در SNc را آشکار نمود. مشاهدات ما در شکل ۳ نمایش داده شده است. در گروه های کنترل و حلال نورون های دپامینرژیک ناحیه SNc کاملاً سالم و بدون آسیب بودند اما در گروه ۶-OHDA آسیب شدید نورونی مشاهده شد و تعداد نورون های TH+ در مقایسه با گروه

غلظت پروتئین با روش بردفورد (Germany, Bio-Rad) تعیین شد. نمونه های مختلف با مقدار مساوی پروتئین با ۱۰٪ SDS-PAGE جدا شده، به غشاهای PVDF منتقل شده و در ۵٪ شیر بدون چربی به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. غشاها با آنتی بادی های اولیه به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. از آنتی بادی های اولیه زیر استفاده شد:

GRP78/Bip (ab227865; Abcam., Germany), CHOP (ab11419; Abcam., Germany), and GAPDH antibody (ab181602; Abcam., Germany).

غشاها سپس با TBS حاوی ۰/۱٪ Tween 20 شسته و با آنتی بادی های ثانویه متصل به HRP مناسب به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. از آنتی بادی های ثانویه زیر استفاده شد:

GRP78 and GAPDH (ab6721; Abcam., Germany), CHOP (Sc-516102; Santa Cruz Inc., USA).

در نهایت، اتصال آنتی بادی با استفاده از رنگ آمیزی دی امینو بنزیدین (DAB) مشاهده شد. سطح پروتئین به روش تراکم سنتی با استفاده از نرم افزار Image J بصورت کمی درآمد.

تجزیه و تحلیل آماری

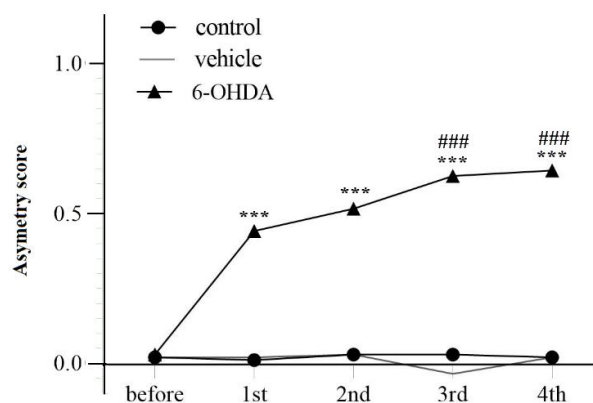
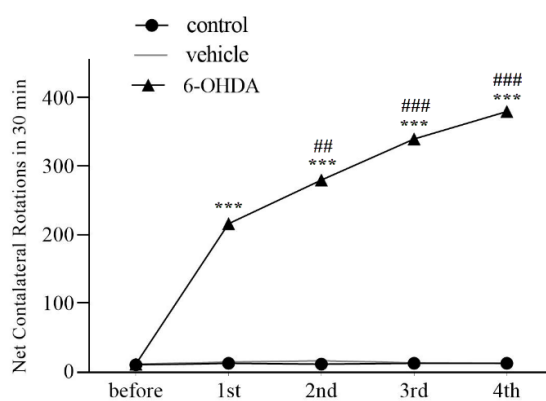
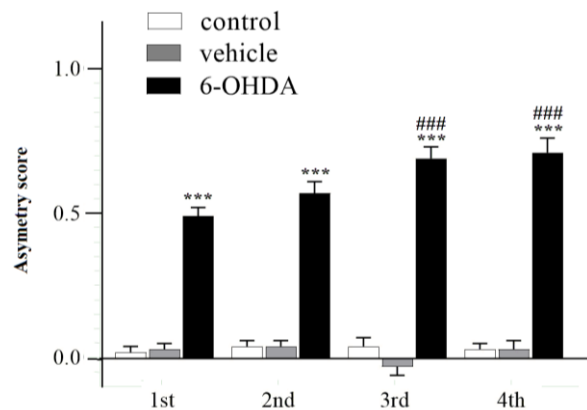
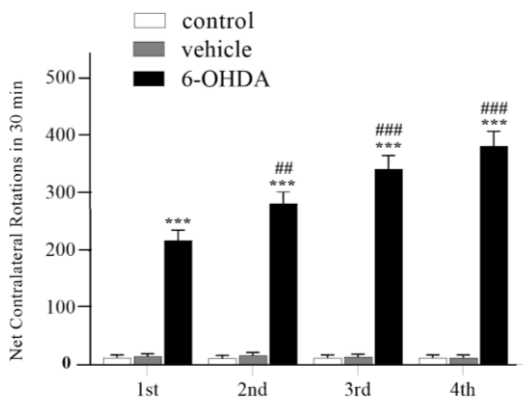
داده ها به صورت میانگین \pm خطای معیار بیان شدند. ابتدا با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov از نرمال بودن توزیع داده ها مطمئن شدیم. سپس برای تجزیه و تحلیل داده های رفتاری از آزمون تحلیل واریانس با اندازه گیری مکرر (Repeated measured ANOVA) استفاده شد تا اختلاف معنی دار احتمالی بین گروه ها بدست آید. داده های دیگر با استفاده از ANOVA یک طرفه و به دنبال آن آزمون post hoc (Bonferroni) برای مقایسه چند گروه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. به منظور بررسی همبستگی (correlation) بین شدت مرگ نورون های دپامینرژیک با بیان پروتئین های شاخص استرس ER از محاسبه ضریب همبستگی پیرسون استفاده شد. تمام تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ (SPSS software, Inc., Chicago, IL, USA) انجام شد. تفاوت آماری معنی دار در $P \leq 0.05$ در نظر گرفته شد.

کنترل بیش از ۸۰ درصد کاهش یافت.

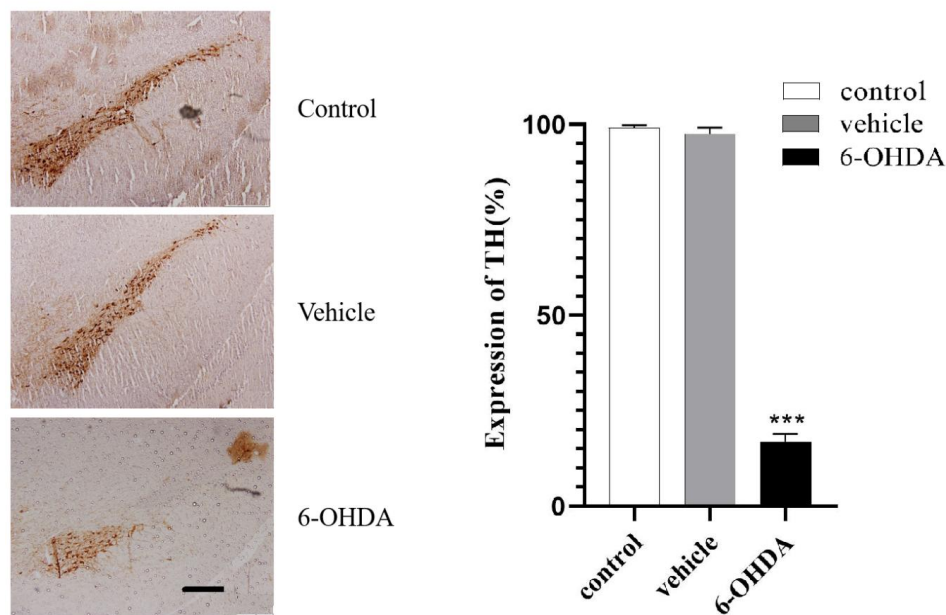
مارکرهای ER stress

بیان مارکرهای ER stress در استریاتوم و SN موش‌های دریافت کننده سم افزایش چشمگیری یافت. به منظور بررسی نقش ER stress در مرگ نورون‌های دوپامینرژیک، بیان پروتئین‌های شاخص این استرس (GRP78 و CHOP) در استریاتوم سمت راست بررسی شد (شکل ۴). نتایج ما نشان می‌دهند که در گروه کنترل و حلال کمتر از ۵٪ از سلول‌ها این پروتئین‌ها را در سیتوپلاسم خود بیان کردند اما در گروه ۶-OHDA نزدیک به ۴۲/۲۵ درصد از سلول‌ها این پروتئین‌ها را بیان کردند. همچنین میزان بیان این دو

پروتئین در ناحیه SN نیمکره راست به روش وسترن بلائینگ بررسی شد. همانطور که در شکل ۶ نمایش داده شده است، میزان بیان پروتئین‌های GRP78 و CHOP در گروه دریافت کننده سم نسبت به گروه‌های کنترل و حلال نزدیک به چهارصد درصد افزایش یافت. بررسی اماری داده‌ها نشان داد که بین بیان مارکرهای استرس ER و شدت مرگ نورون‌های دوپامینرژیک جسم سیاه همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود داشت ($r = 0.662, P = 0.007, n = 4$) بین مرگ نورون‌ها با بیان GRP78 و ($r = 0.750, P = 0.005, n = 4$) بین مرگ نورون‌ها با بیان CHOP).

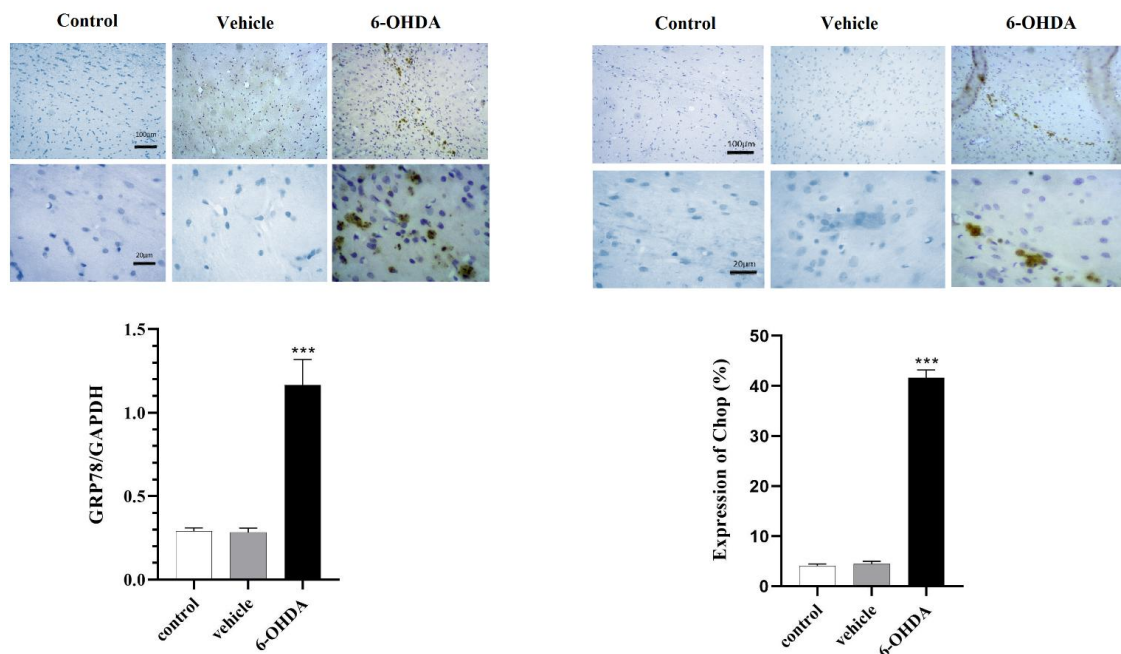


شکل ۲. نتایج آزمون‌های رفتاری. نمودار A تعداد چرخش‌های ناشی از آپومورفین را در هفته‌های دوم (1st)، چهارم (2nd)، ششم (3rd) و هشتم (4th) پس از تزریق سم نشان می‌دهد. نمودار B تغییر در تعداد چرخش‌ها را از قبل از تزریق سم و بعد از آن در طی این هفته‌ها نشان می‌دهد. نمودار C نمره عدم تقارن در گروه‌های آزمایشی مختلف را در همین هفته‌ها نشان می‌دهد. نمودار D تغییر در نمره عدم تقارن را از قبل از تزریق سم و بعد از آن در طی این هفته‌ها نمایش می‌دهد. اعداد مثبت و منفی به ترتیب نشان می‌دهد دست طرف آسیب (دست راست) و دست مقابل طرف آسیب (دست چپ) برای لمس دیواره ظرف آزمایش غالباً مورد استفاده بوده است. $***: P < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل و حلال. $###: P < 0.001$ و $##: P < 0.01$ در مقایسه با داده‌های هفته دوم پس از سم

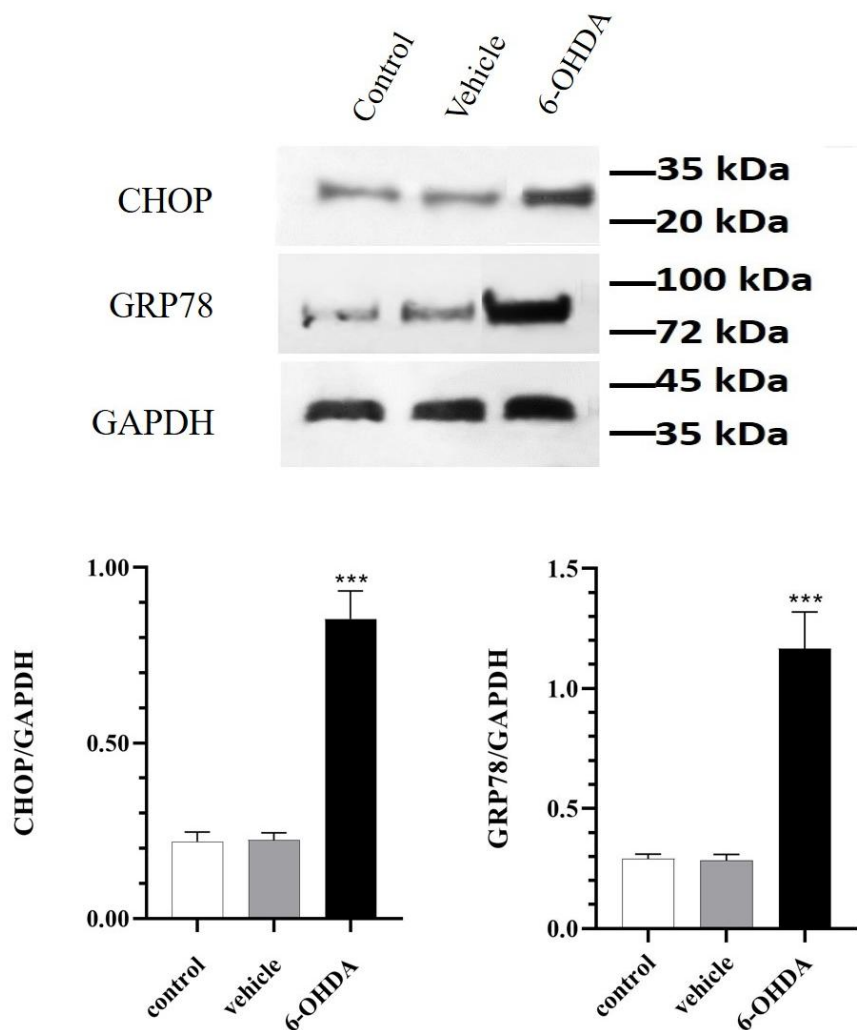


شکل ۳. فوتومیکروگراف ها در چپ رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی تیروزین هیدروکسیلاز (TH) را برای بررسی شدت تخریب نورون های دپامینرژیک در ناحیه SNc نیمکره راست در گروه های مختلف آزمایشی نشان می دهد. نورون های دپامینرژیک سالم با انتی بادی TH نشاندار شدند. نمودار در سمت راست تعداد نورون های TH⁺ شمارش شده را در این گروه ها نمایش می دهد (Scale bar = 200µm). ***: P<0.001 در مقایسه با گروه کنترل و حلال

SNR: substantia nigra, pars reticulata, cp: cerebral peduncle, hif: hippocampal fissure



شکل ۴. رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی برای بیان پروتئین های GRP78 (چپ) و CHOP (راست) در ناحیه استریاتوم نیمکره راست. فوتومیکروگراف ها شدت بیان این پروتئین را بصورت لکه های قهوه ای رنگ در گروه های مختلف آزمایشی نشان می دهند. درصد سلول های بیان کننده این پروتئین بصورت نمودار در پایین نشان داده شده است. ***: P<0.001 در مقایسه با گروه کنترل و حلال



شکل ۵. میزان بیان پروتئین های **CHOP** و **GRP78** در جسم سیاه به روش وسترن بلات اندازه گیری شد. نمودارها شدت بیان این پروتئین ها را بصورت کمی در مقایسه با گروه کنترل و حلال دهند. ***: $P < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل و حلال

پیشبرد تجمع پروتئین آلفا سینوکلئین سبب مرگ نورون های دپامینرژیک می شود (۳۳). شبکه اندوپلاسمی یک نقطه کانونی برای اعمال تغییرات بر روی پروتئین هاست که تجمع پروتئین های تانخورده/ بدتاخورده در آن منجر به عدم موفقیت ER در مواجهه با پروتئین های اضافی و نهایتاً ایجاد موقعیتی به نام استرس ER می شود (۳۴،۳۵).

در این مطالعه با ردیابی دو پروتئین شاخص در استرس ER یعنی **GRP78** و **CHOP** در استریاتوم و جسم سیاه

بحث

قرارگیری غیرطبیعی پروتئین ها و همچنین بد تاخوردن آنها در مغز یکی از ویژگی های چندین بیماری نورودژنراتیو مرتبط با سن از جمله پارکینسون می باشد. اگر چه ترکیب و محل قرار گیری پروتئین ها در بیماری های مختلف متفاوت می باشد ولی این ویژگی مشترک نشان می دهد که تجمع و بد تاخوردن پروتئین ها می تواند برای نورون ها مرگ آور باشد (۵). شواهد قابل توجهی ارائه شده است که نشان می دهد استرس ER با

سیاه مقاوم می باشند (۱۹) و موش های وحشی پس از دریافت درون بطنی این سم افزایشی در بیان CHOP نشان دادند (۴۴).

بیماری پارکینسون یک بیماری پیشرونده می باشد که در آن شدت علائم و مرگ نورون های دپامینرژیک با گذشت زمان افزایش می یابد. مطالعات مختلف نشان داده اند که علائم رفتاری در مدل حیوانی ۶- هیدروکسی دپامین نیز بتدریج افزایش می یابند (۱۷، ۲۸-۲۴، ۴۵). از این رو در این مطالعه آزمون های رفتاری را تا هشت هفته پس از تزریق سم ادامه دادیم. نتایج ما نشان می دهند که شدت علائم رفتاری در این مدت نزدیک به دو برابر افزایش یافت. بررسی های ایمونوهیستوشیمی و وسترن بلاتینگ ما برای شاخص های استرس ER در هفته هشتم پس از تزریق سم صورت گرفت. از این رو بیان گسترده این مارکرها حاکی از نقش این استرس در پیشرفت مرگ نورونی و افزایش شدت علائم رفتاری دارد. هم راستا با این نتایج، مطالعات دیگری نیز نقش اساسی استرس ER در پیشرفت PD را پشتیبانی می کنند. به عنوان مثال Yan, Cheng و همکاران در سال ۲۰۱۹ نشان دادند که مسیر سیگنالینگ IRE1 (یک حسگر استرس ER) موجب القاء اتوفاژی و مرگ نورونی شده و به عنوان یک مسیر پاتوژنیک حفاظت شده در طی مراحل پیشرفت بیماری پارکینسون عمل می کند (۴۶). همچنین مطالعه Mercado, Gabriela و همکارانش نیز بر نقش اساسی ER stress در مراحل پیشرفت پارکینسون تاکید دارد. بر طبق مطالعه آن ها استرس ER در فاز علامت دار بیماری پارکینسون، یک فرایند مزمن و پیش رونده است که در آسیب غیر قابل بازگشت نورون ها و مرگ آن ها دخالت دارد (۴۷). از طرف دیگر نتایج آزمون های رفتاری در این مطالعه نشان می دهند که موش های دریافت کننده سم چرخش های زیادی در هفته دوم پس از سم نشان دادند. طبق گزارشات رفتار چرخشی هنگامی آشکار می شود که آسیب به نورون های دپامینرژیک جسم سیاه وسیع و گسترده باشد (۴۸، ۳۶). در تأیید این مطلب Yuan et al., 2005 نشان دادند که سه هفته پس از تزریق سم به ناحیه MFB بیش از ۸۰٪ نورون های دپامینرژیک می میرند (۳۶). از آنجاییکه در هفته های ابتدایی پس از سم میزان بیان GRP78 و

نقش این استرس در مرگ نورون های دپامینرژیک جسم سیاه در مدل حیوانی ۶- هیدروکسی دپامین بیماری پارکینسون بررسی شد. تزریق این نوروٹوکسین به نواحی خاصی از مغز منجر به مرگ انتخابی نورون های دپامینرژیک جسم سیاه می شود. اگر تزریق و مرگ متعاقب آن در یک نیمکره از مغز موش های بزرگ آزمایشگاهی صورت گیرد، شرایطی به نام همی پارکینسونیسم در موش ها ایجاد می شود که با علائم رفتاری مشخص آشکار می شود (۳۶). بررسی های ایمونوهیستوشیمی و وسترن بلاتینگ در این مطالعه نشان دادند که بیان هر دو این پروتئین ها در استریاتوم و جسم سیاه موش های تیمار شده با ۶- هیدروکسی دپامین نسبت به گروه کنترل افزایش چشم گیری می یابد. این نتایج در تأیید گزارش های دیگر محققین می باشد که نشان داده اند ER استرس توسط نوروٹوکسین ها از جمله ۶-OHDA فعال شده و منجر به مرگ نورون های دپامینرژیک می شود (۳۷، ۲۳، ۷).

تصور می شود که بیان چپرون ها همچون GRP78 در ER پاسخی در برابر استرس ER می باشد تا ظرفیت تاخوردن پروتئین ها را افزایش داده و از این طریق استرس را برطرف کند (۳۸). در همین ارتباط نشان داده شده است که در نورون های سمپاتیکی کشت داده شده از موش هایی که ژن PERK در آنها سرکوب شده است (PERK-/- knockout) نسبت به نورون ها از موش های وحشی بیشتر مستعد مرگ القاء شده توسط ۶-OHDA می باشند (۷). از طرف دیگر CHOP تنظیم کننده اصلی آپوپتوزیس القاء شده توسط ER استرس می باشد. CHOP سیگنال اولیه ای می باشد که مسیر آپوپتوز را شروع کرده و پروموتور ژن bcl-2 را که سلول ها را به اثرات پرو آپوپتوتیک حساس می کند، مهار می کند (۳۹). مطالعات *in vivo* و *in vitro* مختلف نشان داده اند که در سلول هایی که بیان ژن CHOP در آنها سرکوب شده است کمتر مستعد آپوپتوز القاء شده با ER استرس می باشند (۳۳، ۴۰-۴۱). این نتایج توسط مطالعاتی تایید می شود که نشان دادند با سرکوب بیان CHOP بقاء نورونی در نورون های کشت شده پس از در معرض قرار گرفتن با تونیکامایسین یا تاپسی گارگین افزایش می یابد (۴۳). موش های CHOP^{-/-} در برابر تزریق 6-OHDA به جسم

نتیجه گیری

در مجموع نتایج ما نشان می دهند که هشت هفته پس از تزریق سم ۶-هیدروکسی دپامین به ناحیه MFB موش های بزرگ آزمایشگاهی سطح بیان دو مارکر اصلی استرس ER یعنی GRP78 و CHOP در استریاتوم و جسم سیاه نیمکره تزریق سم به میزان زیادی افزایش می یابد. این افزایش بیان همراه با مرگ گسترده نورون های دپامینرژیک جسم سیاه در این نیمکره بود که دلالت می کند استرس ER در مرگ نورون های دپامینرژیک نقش دارد. از آنجایی که این بررسی ها در فاز پیشرفت پارکینسونیسم در این موش ها بود، نتایج ما نشان می دهند که استرس ER یکی از مکانیسم های درگیر در پیشرفت مرگ نورونی دپامینرژیک و پارکینسونیسم می باشد. نتایج ما به روشن شدن مکانیسم های مولکولی دخیل در پیشرفت بیماری پارکینسون کمک می کند و سرخ های جدیدی برای توسعه استراتژی های درمانی نوین از طریق مهار استرس ER فراهم می کند.

تعارض منافع

تعارض منافع وجود ندارد.

CHOP بررسی نشد، نتایج ما نمی توانند تایید کنند که آیا این استرس در مرگ اولیه نورون های دپامینرژیک و از این رو الفاء پارکینسونیسم دخالت دارد یا خیر. لکن مطالعات مختلفی نشان می دهند که ظاهراً این استرس در مرگ اولیه نورون های دپامینرژیک در این مدل دخالت دارد. در مطالعه انجام شده توسط Coppel-Segovia et al., 2017 نشان داده شد که یک هفته پس از تزریق 6-OHDA به درون جسم سیاه موش های بزرگ آزمایشگاهی بیان GRP78 و CHOP در جسم سیاه نسبت به کنترل افزایش قابل ملاحظه ای می یابد (۳۳). در مطالعه ای دیگر Cai و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که سه هفته پس از تزریق 6-OHDA به درون استریاتوم موش های بزرگ آزمایشگاهی بیان پروتئین های GRP78 و CHOP در جسم سیاه موش ها افزایش می یابد (۳۹). افزون بر این Ning et al., 2016 نشان دادند که ۴ هفته پس از تزریق 6-OHDA بدرون ناحیه MFB سطح mRNA GRP78 و CHOP در استریاتوم موش ها به میزان چشمگیری افزایش می یابد (۴۹). همچنین Wei و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که تزریق درون استریاتومی 6-OHDA منجر به افزایش بیان سلول های GRP78⁺ و CHOP⁺ در استریاتوم موش های بزرگ آزمایشگاهی ۴ هفته پس از تزریق سم می شود (۵۰).

منابع

- Mercado G, Castillo V, Soto P, Sidhu A. ER stress and Parkinson's disease: pathological inputs that converge into the secretory pathway. *Brain Research* 2016; 1648:626-632. doi: 10.1016/j.brainres.2016.04.042.
- Lang AE, Lozano AM. Parkinson's disease. first of two parts. *New England Journal of Medicine* 1998; 1130-1143. doi: 10.1056/NEJM199810083391506.
- Dong J, Cui Y, Li S, Le W. Current pharmaceutical treatments and alternative therapies of Parkinson's disease. *Current Neuropharmacology* 2016; 14(4):339-355. doi: 10.2174/1570159x14666151120123025.
- Cali T, Ottolini D, Brini M. Mitochondria, calcium, and endoplasmic reticulum stress in Parkinson's disease. *BioFactors* 2011; 37(3):228-240. doi: 10.1002/biof.159.
- Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 2003; 39(6):889-909. doi: 10.1016/s0896-6273(03)00568-3.

6. Goswami P, Gupta S, Biswas J, Joshi N, Swarnkar S, Nath C, et al. Endoplasmic reticulum stress plays a key role in rotenone-induced apoptotic death of neurons. *Molecular Neurobiology* 2016; 53(1):285-298. doi: 10.1007/s12035-014-9001-5 .
7. Ryu EJ, Harding HP, Angelastro JM, Vitolo OV, Ron D, Greene LA. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience* 2002; 22(24):10690-10698. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-24-10690.2002.
8. Hetz C, Mollereau B. Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience* 2014; 15(4):233-249. doi: 10.1038/nrn3689.
9. Zhang K, Kaufman RJ. The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease. *Neurology* 2006; 66:S102-S109. doi: 10.1212/01.wnl.0000192306.98198.ec.
10. Bhandary B, Marahatta A, Kim H-R, Chae H-J. An involvement of oxidative stress in endoplasmic reticulum stress and its associated diseases. *International Journal of Molecular Sciences* 2012; 14(1):434-456. doi: 10.3390/ijms14010434.
11. Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 2011; 334(6059):1081-1086. doi: 10.1126/science.1209038.
12. Doultzinos D, Avril T, Lhomond S, Dejeans N, Guédât P, Chevet E. Control of the unfolded protein response in health and disease. *SLAS Discovery* 2017; 22(7):787-800. doi: 10.1177/2472555217701685.
13. Walter P, Ron D. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007; 8(7):519-529. doi: 10.1038/nrm2199.
14. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature Cell Biology* 2000; 2(6):326-332. doi: 10.1038/35014014.
15. Clarke R, Cook KL, Hu R, Facey CO, Tavassoly I, Schwartz JL, et al. Endoplasmic reticulum stress, the unfolded protein response, autophagy, and the integrated regulation of breast cancer cell fate. *Clinical Cancer Research* 2012; 72(6):1321-1331. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3213.
16. Wan XS, Lu XH, Xiao YC, Lin Y, Zhu H, Ding T, et al. ATF4-and CHOP-dependent induction of FGF21 through endoplasmic reticulum stress. *BioMed Research International* 2014; 2014:807874. doi: 10.1155/2014/807874.
17. Zhang HY, Wang ZG, Lu XH, Kong XX, Wu FZ, Lin L, et al. Endoplasmic reticulum stress: relevance and therapeutics in central nervous system diseases. *Molecular Neurobiology* 2015; 51(3):1343-1352. doi: 10.1007/s12035-014-8813-7.
18. Sano R, Reed JC. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta* 2013; 1833(12):3460-3470. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.028.
19. Silva RM, Ries V, Oo TF, Yarygina O, Jackson-Lewis V, Ryu EJ, et al. CHOP/GADD153 is a mediator of apoptotic death in substantia nigra dopamine neurons in an in vivo neurotoxin model of parkinsonism. *Journal of Neurochemistry* 2005; 95(4):974-986. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03428.x

20. Li B, Xiao L, Wang ZY, Zheng P. Knockdown of STIM1 inhibits 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress through attenuating calcium-dependent ER stress and mitochondrial dysfunction in undifferentiated PC12 cells. *Free Radical Research* 2014; 48(7):758-768. doi: 10.3109/10715762.2014.905687
21. Oh, Y-M, Jang E-H, Ko J-H, J.-H. Kang J-H, Park C-S, Han S-B, et al. Inhibition of 6-hydroxydopamine-induced endoplasmic reticulum stress by l-carnosine in SH-SY5Y cells. *Neuroscience Letter* 2009; 459(1): 7-10. doi: 10.1016/j.neulet.2009.04.047
22. Hernandez-Baltazar D, Zavala-Flores LM, Villanueva-Olivo A. The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model. *Neurología* 2017; 32(8):533-539. doi: 10.1016/j.nrl.2015.06.011
23. Holtz WA, O'Malley KL. Parkinsonian mimetics induce aspects of unfolded protein response in death of dopaminergic neurons. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278(21):19367-19377. doi: 10.1074/jbc.M211821200
24. Blandini F, Levandis G, Bazzini E, Nappi G, Armentero MT. Time-course of nigrostriatal damage, basal ganglia metabolic changes and behavioural alterations following intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine in the rat: new clues from an old model. *European Journal of Neuroscience* 2007; 25(2): 397-405. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.05285.x
25. Glajch KE, Fleming SM, Surmeier DJ, Osten P. Sensorimotor assessment of the unilateral 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Behavioural Brain Research* 2012; 230(2):309-16. doi: 10.1016/j.bbr.2011.12.007 .
26. 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. *Neurological Research* 2016; 38(4):294-300. doi: 10.1080/01616412.2015.1114290
27. Hu LF, Lu M, Tiong CX, Dawe GS, Hu G, Bian JS. Neuroprotective effects of hydrogen sulfide on Parkinson's disease rat models. *Aging cell* 2010; 9(2):135-146. doi: 10.1111/j.1474-9726.2009.00543.x.
28. 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. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2019; 382:114743. doi: 10.1016/j.taap.2019.114743
29. Paxinos G. Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition.* 2006: Elsevier.
30. 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. *Behavioural Brain Research* 2011; 223(1):70-74. doi: 10.1016/j.bbr.2011.04.021.
31. 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. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour* 2014; 124:297-304. doi: 10.1016/j.pbb.2014.06.020.
32. Schallert T, Kozlowski DA, Humm JL, Cocke RR. Use-dependent structural events in recovery of function. *Advances in Neurology and Neuroscience* 1997; 73:229-238.
33. C ppola-Segovia V, Cavarsan C, Maia FG, Ferraz AC, Nakao LS, Lima MM, et al. ER stress induced by Tunicamycin triggers α -Synuclein oligomerization, dopaminergic neurons death and locomotor impairment: a new model of Parkinson's disease. *Molecular Neurobiology* 2017; 54(8):5798-5806. doi: 10.1007/s12035-016-0114-x
34. Harding HP, Calton M, Urano F, Novoa I, Ron D. Transcriptional and translational control in the mammalian unfolded protein response. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2002; 18:575-99. doi: 10.1146/annurev.cellbio.18.011402.160624.
35. Kopito RR. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends in Cell Biology* 2000; 10(12):524-530. doi: 10.1016/s0962-8924(00)01852-3.
36. 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. *Journal of Neuroscience Methods* 2005; 144(1):35-45. doi: 10.1016/j.jneumeth.2004.10.004.
37. Tao K, Wang B, Feng D, Zhang W, Lu F, Lai J, et al. Salidroside protects against 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity by attenuating ER stress. *Neuroscience Bulletin* 2016; 32(1):61-69. doi: 10.1007/s12264-015-0001-x.
38. Gardner BM, Pincus D, Gotthardt K, Gallagher CM, Walter P. Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2013; 5(3):a013169. doi: 10.1101/cshperspect.a013169.
39. Cai P, Ye J, Zhu J, Liu D, Chen D, Wei X, et al. Inhibition of endoplasmic reticulum stress is involved in the neuroprotective effect of bFGF in the 6-OHDA-induced Parkinson's disease model. *Aging and Disease* 2016; 7(4):336-449. doi: 10.14336/AD.2016.0117.
40. Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, Nagata K, et al. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes & Development* 2004; 18(24):3066-3077. doi: 10.1101/gad.1250704.
41. Rutkowski DT, Arnold SM, Miller CN, Wu J, Li J, Gunnison KM, et al. Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLOS Biology* 2006; 4(11):e374. doi: 10.1371/journal.pbio.0040374.
42. Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, et al. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes & Development* 1998; 12(7):982-995. doi: 10.1101/gad.12.7.982.
43. Galehdar Z, Swan P, Fuerth B, Callaghan SM, Park DS, Cregan SP, et al. Neuronal apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress is regulated by ATF4-CHOP-mediated induction of the Bcl-2 homology 3-only member PUMA. *Journal of*

- Neuroscience 2010; 30(50):16938-16948. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1598-10.2010.
44. Tanaka K-I, Fukuoka S, Kawahara S, Kimoto N, Ogawa N. Effect of cabergoline on increase of several ER stress-related molecules in 6-OHDA-lesioned mice. *Neurological Sciences* 2013; 34(2):259-61. doi: 10.1007/s10072-012-0993-1
45. Kirik D, Rosenblad C, Björklund A. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Experimental Neurology* 1998; 152(2):259-277. doi: 10.1006/exnr.1998.6848
46. Yan C, Liu J, Gao J, Sun Y, Zhang L, Song H, et al. IRE1 promotes neurodegeneration through autophagy-dependent neuron death in the *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Cell Death and Disease* 2019; 10(11):1-15. doi: 10.1038/s41419-019-2039-6.
47. Mercado G, Valdés P, Hetz C. An ERcentric view of Parkinson's disease. *Trends in Molecular Medicine* 2013; 19(3):165-175. doi: 10.1016/j.molmed.2012.12.005.
48. Iancu R, Mohapel P, Brundin P, Paul G. Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. *Behavioural Brain Research* 2005; 162(1):1-10. doi: 10.1016/j.bbr.2005.02.023.
49. Ning B, Deng M, Zhang Q, Wang N, Fang Y. β -Asarone inhibits IRE1/XBP1 endoplasmic reticulum stress pathway in 6-OHDA-induced parkinsonian rats. *Neurochemistry Research* 2016; 41(8):2097-2101. doi: 10.1007/s11064-016-1922-0
50. Wei HJ, Xu JH, Li MH, Tang JP, Zou W, Zhang P, et al. Hydrogen sulfide inhibits homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and neuronal apoptosis in rat hippocampus via upregulation of the BDNF-TrkB pathway. *Acta Pharmacologica Sinica* 2014; 35(6):707-715. doi: 10.1038/aps.2013.197.