



Physiology and Pharmacology, 17 (3), 266-276

Autumn 2013 [Article in Persian]

Physiology
and
Pharmacology**Effect of tetraethylammonium and B vitamins group on the efficacy of cell replacement therapy in the treatment of Parkinson's disease in the 6-hydroxydopamine animal model****Mohammad Sophiabadi, Negin Fraidouni, Ayda Faraji, Tahereh Dargahi, Hassan Yaghubi-Dust, Hashem Haghdoost-Yazdi ****Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran*

Received: 12 June 2013

Accepted: 27 Aug 2013

Abstract

Introduction: Transplantation of embryonic ventral mesencephalic (VM) dopamine neurons into the striatum is a currently explored therapeutic strategy for treatment of patients with Parkinson's disease (PD). However, this strategy has been limited with poor cell survival, generally ranging from 5-20%. In this study, we investigated the effect of potassium channel blocker of tetraethylammonium (TEA) and B vitamins supplementation on the efficacy of cell replacement therapy in the treatment of 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced Parkinsonism.

Methods: Cell suspension was prepared from embryonic day 14 (E14) VM of rat fetuses and was transplanted into striatum of Parkinsonian rats after overnight hibernation with TEA or B vitamins. The Parkinsonian rats were also treated with TEA or B vitamins for two weeks after transplantation. Severity of Parkinsonism was assessed by apomorphine-induced rotational test in several steps before and after transplantation.

Results: 1- Transplantation of VM cell suspension significantly decreased behavioral symptoms of Parkinsonism in the apomorphine-induced rotational test. 2-TEA treatment further decreased these symptoms. 3- B vitamins treatment had no additional effect in amelioration of the symptoms. 4-Treatment with both TEA and B vitamins also further decreased behavioral symptoms, which in one post-transplantation test was even more than the effect of TEA alone.

Conclusion: TEA, especially in combination with B vitamins supplementation, can increase the efficacy of cell replacement therapy in the 6-OHDA rat PD model.

Key words: Parkinson's disease, ventral mesencephalic neurons, cell replacement therapy, striatum, 6-hydroxydopamine, apomorphine-induced rotational test

* Corresponding author e-mail: hhaghdoost@yahoo.com
Available online at: www.phypha.ir/ppj

بررسی اثر تترائیل آمونیوم و ویتامین‌های گروه ب بر اثربخشی پیوند سلولی در درمان بیماری پارکینسون در مدل حیوانی ۶-هیدروکسی دوپامین

محمد صوفی آبادی، نگین فریدونی، آیدا فرجی، طاهره درگاهی، حسن یعقوبی دوست، هاشم حقدوست یزدی*
مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین

پذیرش: ۵ شهریور ۹۲

دریافت: ۲۲ خرداد ۹۲

چکیده

مقدمه: پیوند سلول‌های مزانسفال شکمی جنینی (VM) به استریاتوم بیماران پارکینسونی به عنوان یک استراتژی برای درمان بیماری پارکینسون پیشنهاد شده است. لکن تنها ۲۰-۵٪ از سلول‌های پیوندی زنده می‌مانند. در این مطالعه اثر تترائیل آمونیوم (TEA)، مهار کننده کانال‌های پتاسیمی و ویتامین‌های گروه ب بر اثر بخشی پیوند سلولی در درمان بیماری پارکینسون در مدل حیوانی مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: سوسپانسیون سلولی از ناحیه VM جنین‌های ۱۴ روزه موش‌های صحرایی تهیه گردید و پس از کشت شبانه در محلول حاوی TEA یا ویتامین‌های ب به استریاتوم موش‌های پارکینسونی پیوند زده شد. پس از پیوند موش‌ها تا دو هفته TEA یا ویتامین‌های گروه ب را دریافت می‌نمودند. شدت علائم پارکینسون بوسیله آزمون چرخش القاء شده با آپومرفین در چندین مرحله قبل و پس از پیوند مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: ۱- پیوند سوسپانسیون سلولی به میزان قابل ملاحظه ای سبب کاهش علائم رفتاری موش‌های پارکینسونی گردید. ۲- تیمار با TEA سبب کاهش بیشتر این علائم نسبت به گروه کنترل شد. ۳- ویتامین‌های ب به تنهایی اثری در کاهش بیشتر این علائم نداشت. ۴- تیمار با هر دو TEA و ویتامین‌های ب نیز منجر به کاهش بیشتر علائم رفتاری گردید که در یک آزمون حتی بیش از اثر TEA به تنهایی بود.

نتیجه گیری: TEA بویژه همراه با ویتامین‌های گروه ب می‌تواند سبب افزایش اثر بخشی پیوند سلولی در درمان علائم پارکینسون القاء شده توسط سم ۶-هیدروکسی دوپامین گردد.

واژه‌های کلیدی: بیماری پارکینسون، پیوند سلولی، مزانسفال شکمی، ۶-هیدروکسی دوپامین، آزمون چرخش القاء شده با آپومرفین

مقدمه

جراحی و تحریک نواحی عمقی مغز و برداشت هسته پالیدوم می‌باشد که هیچ کدام نمی‌توانند جلو پیشرفت بیماری را بگیرند لذا پس از مدتی برخی از علائم عود می‌نمایند که سبب پایین آمدن کیفیت زندگی می‌گردد [۳۴، ۲۸، ۶]. از این رو در حال حاضر تحقیقات به سمت شناخت روش‌های نوین برای درمان و یا پیشگیری از ایجاد این بیماری می‌باشد. در طی سه دهه اخیر تحقیقات وسیعی به منظور استفاده از پیوند سلول‌های بنیادی و جانشین سازی سلولی (cell replacement therapy) جهت درمان بیماری پارکینسون صورت گرفته و پیشرفت‌های قابل ملاحظه ای در

بیماری پارکینسون دومین بیماری شایع تخریب نورونی (neurodegenerative) می‌باشد که ۲۰۰ نفر را در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر مبتلا می‌سازد. سبب اصلی ایجاد این بیماری تخریب پیش رونده نورون‌های دوپامینرژیک در مغز میانی می‌باشد. درمان‌های متداول عبارتند از درمان دارویی با لوودپا،

hhghdoost@yahoo.com

* نویسنده مسئول مکاتبات:

www.phypha.ir/ppj

وبگاه مجله:

می‌شود که اختلال در این پروتئین ممکن است در فرایند تخریب نورونی بیماری آلزایمر نقش داشته باشد [۱۱]. از طرف دیگر نشان داده شده است که ویتامین های گروه ب برای انجام بسیاری از واکنش های بیوشیمیایی و همچنین عملکرد طبیعی میتوکندری ها ضروری می‌باشند. این ویتامین ها بویژه درگیر در متابولیسم هموسیستئین (Hcy) می‌باشند به گونه ای که کمبود این ویتامین ها سبب انباشت Hcy در بدن می‌گردد. گزارشات زیادی نشان داده‌اند که سطح Hcy در پلاسما و مایع مغزی نخاعی بیماران مبتلا به پارکینسون افزایش می‌یابد. بیان شده است که افزایش سطح هموسیستئین پلاسما، تخریب نورون های دوپامینرژیک را تسریع کرده و سبب پیشرفت بیماری پارکینسون می‌گردد [۶، ۲۷]. دووان و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند که Hcy موجب تشدید استرس اکسیداتیو، نقص عملکرد میتوکندری ها و آپوپتوزیس در سلول های دوپامینرژیک انسانی می‌گردد که در معرض روتنون (یک نوع افت کش) و یا یون آهن (که یک اکسیدانت بالقوه می باشد) قرار گرفته‌اند [۷]. همچنین مطالعات حیوانی نشان می‌دهند که تزریق موضعی Hcy به درون هسته جسم سیاه و یا استریاتوم علائم پارکینسون القاء شده با سم 6-OHDA و یا سم MPTP را تشدید می‌نماید [۷، ۲۹].

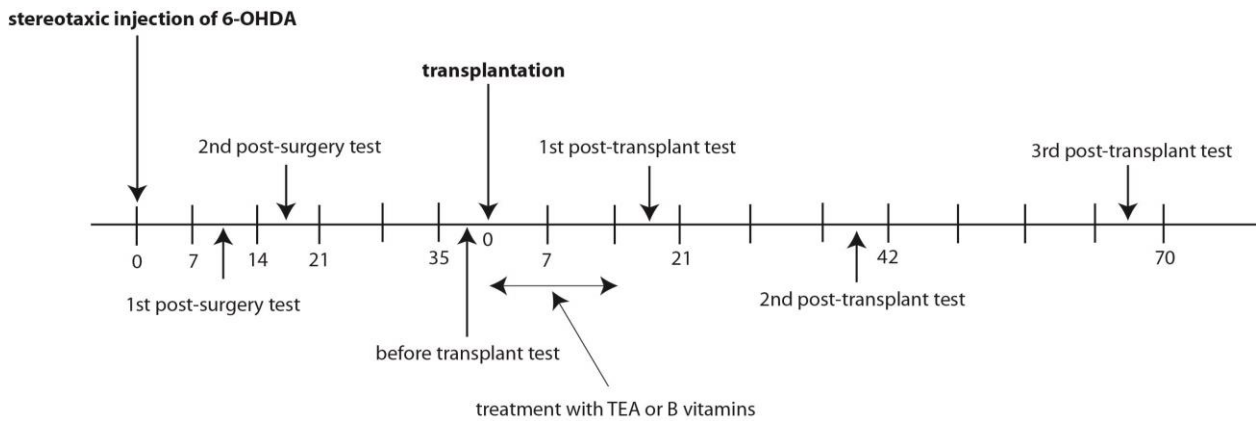
با توجه به مطالب ذکر شده در این مطالعه اثر TEA و ویتامین های گروه ب بر افزایش اثربخشی پیوند سلول های مزانسفال شکمی جنینی در کاهش علائم رفتاری بیماری پارکینسون در مدل حیوانی 6-OHDA مورد بررسی و تحقیق قرار گرفت.

مواد و روش ها

نمونه حیوانی. جامعه مورد مطالعه موشهای صحرایی ماده بالغ در محدوده وزنی ۳۰۰-۲۰۰ گرم بودند. موش ها در حیوان خانه دانشگاه در قفس های بزرگ با ابعاد ۳۸×۵۹×۲۰ در اتاقی با درجه حرارت کنترل شده و شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی درحالی که به آب و غذا به صورت نامحدود دسترسی داشتند نگه داری می‌شدند. این تحقیق در ۶ مرحله اجرا گردید: ۱- ایجاد مدل حیوانی

این زمینه به دست آمده است. بخش بزرگی از این تحقیقات به پیوند نورون های دوپامینرژیک مشتق از جنین به مغز به منظور جایگزینی نورون های دوپامینرژیک تخریب شده اختصاص یافته است. این روش به دلیل آنکه قابلیت درمان طولانی مدت بیماری را دارا می باشد بسیار مورد توجه و حائز اهمیت می باشد. با وجود این علی رغم پیشرفت های بسیار در این زمینه، بیش از ۹۰٪ از نورون های دوپامینرژیک پیوند شده در عرض یک هفته می‌میرند. از این رو لازم است که حجم نسبتاً بالایی از سلول های بنیادی به بافت میزبان پیوند داده شود که در مورد تکنیک پیوند سلول های دوپامینرژیک جنینی نیاز به استفاده از ۸-۶ جنین برای تأمین سلول های لازم می باشد. تهیه این تعداد جنین در مورد انسان مشکلات تکنیکی و اخلاقی عدیده ای به دنبال دارد. از این رو در حال حاضر درمان از طریق سلول های بنیادی و پیوند آنها به مغز تنها جنبه تجربی داشته و بر روی مدل های حیوانی به منظور یافتن راه هایی جهت افزایش درصد بقاء سلول های دوپامینرژیک پیوندی انجام می‌گیرد [۱، ۲، ۱۹، ۲۰، ۲۲].

نشان داده شده است که مرگ بیشتر نورون های دوپامینرژیک پیوندی از طریق مرگ برنامه ریزی شده و یا همان آپوپتوزیس صورت می‌گیرد [۳۲، ۳۸]. از این رو بسیاری از مطالعات به سمت استفاده از مهار کننده های آپوپتوز جهت افزایش بقاء نورون های پیوندی هدایت شده‌اند. تترائیل آمونیوم (TEA) یک مهار کننده وسیع الطیف کانال های پتاسیمی delayed rectifier و کانال های پتاسیمی وابسته به کلسیم با هدایت بالا را مهار می‌نماید [۳۱]. نشان داده شده است که فعالیت آنزیم ها، نوکلئازها و کاسپازها که سیگنال های مرگ را هدایت و تقویت می‌نمایند و از این طریق سبب آپوپتوز می‌شوند، وابسته به یون پتاسیم می باشد. در نورون های قشری موش، جریان پتاسیمی حساس به TEA شناسایی شده است که مسئول آپوپتوز نورونی می باشد [۳۷]. از طرف دیگر گزارش شده است که پروتئین آمیلوئید بتا (Aβ)، یک پروتئین غشایی که به میزان زیادی در سیستم عصبی بیان شده و در یادگیری و بقاء سلولی دارای نقش می باشد، می‌تواند از طریق فعال کردن جریان پتاسیمی وابسته به کلسیم با هدایت بالا و حساس به TEA سبب سمیت نورونی گردد. از این رو تصور



شکل ۱- برنامه زمانی آزمایشات صورت گرفته در تحقیق حاضر. تزریق سم به ناحیه MFB (medial forebrain bundle) نیمکره راست مغز صورت گرفت. عمل پیوند در هفته ششم پس از تزریق سم صورت گرفت. آزمون چرخش القاء شده با آپومرفین در هفت مرحله زمانی مختلف انجام شد (آزمون قبل از تزریق سم نشان داده نشده است).

زمان متفاوت انجام گرفت (شکل ۱): ۱: قبل از جراحی استرئوتاکسیک و تزریق سم 6-OHDA. این آزمون در ابتدای تحقیق انجام گرفت و موش‌هایی جهت کار انتخاب شدند که در مدت یک ساعت کمتر از ۱۰ چرخش خالص در جهت یا خلاف جهت عقربه‌های ساعت نشان می‌دادند. ۲ و ۳: در هفته‌های دوم و سوم پس از تزریق سم. موش‌هایی که در این دو آزمون بیش از ۲۰۰ چرخش خالص در جهت مخالف تزریق سم نشان می‌دادند انتخاب شده و به گروه‌های مختلف آزمایشی تقسیم می‌شدند. ۴: قبل از انجام پیوند سوسپانسیون سلولی. نتایج این آزمون برای مقایسه با نتایج آزمون‌های رفتاری پس از پیوند استفاده شدند. ۵، ۶ و ۷: در هفته‌های سوم، ششم و دهم پس از پیوند. چرخش‌ها توسط دستگاه روتومتر ثبت و ذخیره گردید.

۲- تهیه سوسپانسیون سلولی از مزانسفال شکمی جنینی. این قسمت به میزان زیادی با استفاده از پروتوکل ارائه شده توسط [Dunnett & Bjorklund 1997] انجام گرفت. بطور خلاصه مراحل زیر جهت انجام این قسمت اجرا گردید:

۱- موش‌های صحرایی باردار دارای جنین‌های ۱۴ روزه انتخاب شده و به طریقه سزارین جنین‌ها از رحم خارج شده و به یک پتری دیش حاوی گلوکزسالین منتقل شدند.

۲- مغز جنین‌ها بیرون آورده شده و بخش شکمی ناحیه مزانسفال از مغز جدا گردیده و به میکروتیوب‌های حاوی محلول کشت شبانه منتقل شده و تمام مدت شب در یخچال نگه داری شدند.

۱- ایجاد مدل حیوانی پارکینسون. این مرحله شامل ۲ بخش می‌باشد:

الف- جراحی استرئوتاکسی و تزریق سم 6-OHDA: سم نوروتوکسیک 6-OHDA (۱۵-۱۰ میکروگرم حل شده در سالین حاوی ۰/۲ درصد اسید اسکوربیک) به وسیله جراحی استرئوتاکسی به دو نقطه در (medial forebrain bundle) MFB یک طرف مغز (سمت راست) تزریق گردید. مختصات محل‌های تزریق بر حسب برگما عبارت بودند از ۱- AP: -4.4، L: -1.2 و DV: -7.8 در TB: -2.3 و ۲- AP: -4، L: -8 و DV: +3.4 در TB: +3.4. تزریق سم به ناحیه MFB که محل عبور فیبرهای دوپامینرژیک نیگرواستریاتال می‌باشد سبب تخریب وسیع نورون‌ها در هسته جسم سیاه همان طرف شده و بیماری پارکینسون شدید ایجاد می‌نماید. تمامی گروه‌ها این سم را دریافت نمودند.

ب- آزمون رفتاری: تزریق سم سبب تخریب نورون‌های دوپامینرژیک جسم سیاه در همان طرف می‌گردد. علائم پارکینسون در این حیوانات به صورت رفتار چرخشی به طرف مقابل محل تزریق (در خلاف جهت عقربه‌های ساعت) بلافاصله پس از تزریق آپومرفین (0.5 mg/kg, i.p) بروز می‌نماید. آزمون رفتاری چرخش القاء شده با آپومرفین در ۷

ویتامین های ب، موشهای پارکینسونی شده که پیوند دریافت نمودند به مدت ۲ هفته توسط تجویز درون صفاقی TEA (1 mg/kg) و یا نوشیدن آب حاوی کمپلکس ویتامین های ب به میزان ۴ برابر نیاز روزانه [۹، ۱۰، ۱۵] و یا هردو تیمار شدند. موش های گروه شم نیز توسط هر دو TEA و ویتامین های ب تیمار می شدند.

۶- آزمون های رفتاری. جهت آزمون اثر TEA و ویتامین های گروه ب، موش ها تحت آزمون چرخشی با آپومرفین در هفته های سوم، ششم و دهم پس از پیوند با همان روش ارائه شده در مرحله ۱ قرار گرفتند. تعداد چرخشهای خالص در واحد زمان معیاری از اثر تیمار می باشد. گروه های آزمایشی. پس از انجام دومین آزمون رفتاری پس از تزریق سم 6-OHDA موش هایی که بیش از ۲۰۰ چرخش در ساعت را نشان دادند در ۵ گروه قرار گرفتند: ۱- کنترل (con, n=6) که سوسپانسیون سلولی بدون تیمار با TEA و ویتامین های ب را دریافت نمودند ۲- گروه شاهد (sham, n=6) که تنها ترکیب محیط کشت بدون سوسپانسیون سلولی را دریافت نمودند. ۳ و ۴ و ۵- گروه هایی که سوسپانسیونهای سلولی تیمار شده با گروه ویتامین های ب (Vit B, n=6) یا TEA (TEA, n=7) و یا هردو (Vit B+TEA, n=6) را دریافت نمودند. تمامی موش ها هفته ها قبل از پیوند، سم 6-OHDA را دریافت نموده و پارکینسونی شدند.

تجزیه و تحلیل داده ها: داده ها بر حسب میانگین بعلاوه منهای خطای معیار بیان شده اند. برای تجزیه و تحلیل آماری نتایج آزمون های رفتاری از آزمون تی زوجی (paired t-test) برای مقایسه نتایج قبل با پس از پیوند و از آزمون آنوا با آزمون تعقیبی دانت برای مقایسه نتایج گروه ها با گروه کنترل در هر آزمون استفاده گردید. $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی دار بودن اختلافها در نظر گرفته می شد.

یافته ها

درصد سلول های زنده و تراکم سلولی در سوسپانسیون سلولی. قبل از انجام عمل پیوند درصد سلول های زنده و تراکم سلولی در سوسپانسیون های سلولی بررسی گردید. همانطور

۳- صبح روز بعد قطعات مزانسفال جدا شده به محیط (Dulbeco's modified Eagle's medium DMEM) دارای آنزیم های تریپسین و DNase منتقل شده و در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه می شوند.

۴- سپس قطعات بافتی ۴ بار با DMEM-DNase شسته شده و فرایند trituration یا جدا کردن سلول ها از یکدیگر صورت می گرفته و سوسپانسیون سلولی تهیه گردید. سوسپانسیون سلولی تا هنگام پیوند در یخچال با درجه حرارت ۴-۰ درجه سانتیگراد نگه داری شدند.

۳- تخمین درصد سلول های زنده (cell viability) در سوسپانسیون. این عمل پس از کشت شبانه و قبل از انجام عمل پیوند با استفاده از رنگ آمیزی با رنگ حیاتی trypan blue صورت گرفت. به این ترتیب که اندکی (5µl) از سوسپانسیون سلولی به نسبت ۱:۱ با رنگ تریپان بلو ۰/۴٪ ترکیب شده و به لام هموسایتومتر منتقل شدند. سپس با میکروسکوپ نوری شمارش سلول های زنده و مرده برای ارزیابی درصد سلول های زنده و همچنین تراکم سلولی در سوسپانسیون انجام گرفت.

۴- کاشت یا پیوند سوسپانسیون سلولی به موشهای پارکینسونی. در این تحقیق زمان پیوند بر اساس گزارش [Nikkhah et al (2009) ۲۵] هفته ششم پس از تزریق سم تعیین گردید. سوسپانسیون سلولی تهیه شده به مدت یک شب در محلول کشت شبانه حاوی TEA (5 mM) یا گروه ویتامین های ب و یا هر دو در درجه حرارت ۰ درجه سانتیگراد قرار می گرفت. سپس در روز بعد با کمک جراحی استرئوتاکسی و سرنگ هامیلتون به ۴ نقطه در استریاتوم طرف راست (همان طرف تزریق سم) موش های پارکینسونی با مختصات بر حسب برگما و میلی متر

1: L: -2.6, AP: -1.3 و V: -5

2: L: -3.2, AP: +1.3 و V: -5

3: L: -4.3, AP: -0.4 و V: -5

4: L: -4.5, AP: +0.4 و V: -5

با TB: -3.3 تزریق گردید. سوسپانسیون اگر دارای بیش از ۸۰٪ سلول زنده بود پیوند زده می شد. حجم سوسپانسیون تزریقی به هر موش ۲ میکرولیتر بود.

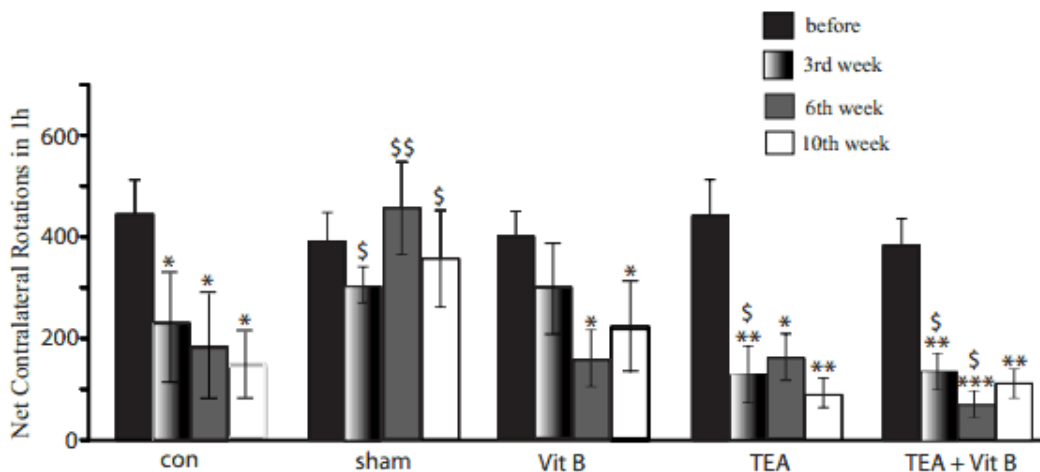
۵- تیمار موش های دریافت کننده پیوند با TEA یا

groups	% alive cells	cell density
con	84%	40000
Vit B	87%	45000
TEA	81%	45000
Vit B + TEA	85%	43000

جدول ۱- درصد سلول‌های زنده و تراکم سلولی در سوسپانسیون‌های سلولی پیوند زده شده به گروه‌های مختلف موش‌های صحرایی پارکینسونی شده. به گروه شاهد محلول محیط کشت حاوی تتراپیل آمونیوم (TEA) و ویتامین‌های گروه ب بدون سوسپانسیون سلولی تزریق گردید. درصد سلول‌های زنده و تراکم سلولی در سوسپانسیون‌های پیوندی به گروه‌های آزمایشی تفاوت قابل ملاحظه‌ای با یکدیگر نداشت. Con: گروه کنترل، Vit B: گروه دریافت کننده سوسپانسیون سلولی حاوی ویتامین‌های ب، TEA: گروه دریافت کننده سوسپانسیون سلولی حاوی TEA و Vit B + TEA: گروه دریافت کننده سوسپانسیون سلولی حاوی TEA و ویتامین‌های گروه ب.

groups	number of rotations ± S.E
Con	441 ± 70
sham	398 ± 53
Vit B	401 ± 49
TEA	433 ± 68
Vit B + TEA	388 ± 46

جدول ۲- تعداد خالص چرخش‌ها در جهت مخالف محل تزریق سم در آزمون چرخش القاء شده با آپومرفین در گروه‌های مختلف آزمایشی. آزمون در هفته ششم پس از تزریق سم و قبل از انجام عمل پیوند به عمل آمد.



شکل ۲- تعداد خالص چرخش‌ها به طرف مقابل محل تزریق سم در آزمون چرخش القاء شده با آپومرفین در قبل از پیوند و هفته‌های سوم، ششم و دهم پس از پیوند. $P < 0.05$: * در مقایسه با نتایج بدست آمده در آزمون قبل از پیوند در همان گروه. آزمون تی زوجی. $P < 0.01$: ** در مقایسه با نتایج بدست آمده در آزمون قبل از پیوند در همان گروه. آزمون تی زوجی. $P < 0.001$: *** در مقایسه با نتایج بدست آمده در آزمون قبل از پیوند در همان گروه. آزمون تی زوجی. $P < 0.05$: \$ در مقایسه با نتایج گروه کنترل در همان آزمون. آزمون آنوا با تعقیبی دانت.

آزمون چرخش القاء شده با آپومرفین. آزمون چرخش القاء شده با آپومرفین در دو بخش انجام شد: ۱- پس از تزریق سم و قبل از پیوند و ۲- پس از انجام عمل پیوند. ۱- در این بخش آزمون در سه مرحله انجام شد. مراحل اول و دوم در هفته‌های دوم و سوم پس از تزریق سم بود.

که در جدول ۱ مشاهده می‌شود درصد سلول‌های زنده در گروه‌های مختلف بسیار نزدیک به یکدیگر بوده و در تمامی آن‌ها بیش از ۸۰٪ بود. این نتیجه در رابطه با تراکم سلولی نیز بدست آمد و در تمامی گروه‌ها تراکم سلولی بیش از ۴۰۰۰۰ سلول (زنده و مرده) در هر میکرولیتر بود.

بدست آمده از آزمون چرخشی در موش‌های گروه کنترل نشان می‌دهد که بهبود علائم پارکینسون از هفته سوم پس از پیوند آشکار شده و در هفته دهم میزان به حداکثر رسید. در گروه‌های دیگر رشد میزان بهبود به اندازه گروه کنترل آشکار نبود. در گروه‌های TEA، Vit B و TEA + Vit B به ترتیب حداکثر بهبود در هفته ششم، دهم و ششم پس از پیوند مشاهده گردید. البته میزان افزایش بهبود در تمامی گروه‌ها معنی دار نبود.

بحث

نتایج ما نشان می‌دهند که:

- ۱- پیوند سلول‌های ناحیه VM جنین‌های ۱۴ روزه به ناحیه استریاتوم موش‌های صحرایی پارکینسونی به میزان قابل ملاحظه‌ای سبب کاهش علائم رفتاری پارکینسون گردید که در هفته دهم پس از پیوند بیشترین میزان بهبود مشاهده شد.
 - ۲- تیمار با ویتامین‌های ب اثری بر درصد سلول‌های زنده در سوسپانسیون سلولی و کاهش بیشتر علائم رفتاری پارکینسون نداشت.
 - ۳- تیمار با TEA اثری بر درصد سلول‌های زنده در سوسپانسیون سلولی نداشت ولی میزان بهبود را بویژه در هفته سوم پس از پیوند به میزان معنی داری افزایش داد.
 - ۴- تیمار با ترکیب هر دو TEA و ویتامین‌های گروه ب اثری بر درصد سلول‌های زنده در سوسپانسیون سلولی نداشت ولی میزان بهبود را بویژه در هفته‌های سوم و ششم پس از پیوند به میزان معنی داری افزایش داد.
- در مجموع نتایج ما نشان می‌دهند که TEA بویژه هنگامی که با ویتامین‌های گروه ب همراه شود می‌تواند سبب افزایش اثربخشی پیوند سلولی در درمان بیماری پارکینسون در موش‌های صحرایی شود.
- محتمل‌ترین علت افزایش اثربخشی پیوند سلولی توسط TEA و تلفیق آن با ویتامین‌های گروه ب می‌تواند ناشی از اثر این ماده در افزایش میزان بقاء نورون‌های پیوند زده شده در مغز موش‌های پارکینسونی باشد. مرگ نورون‌های پیوندی عمدتاً از طریق آپوپتوز صورت می‌گیرد [۳۳، ۳۹] و شواهد قابل توجهی وجود دارد که نشان می‌دهد TEA از طریق مهار

موش‌هایی که در این دو آزمون بیش از ۲۰۰ چرخش خالص در جهت مخالف محل تزریق سم نشان می‌دادند انتخاب شده و به گروه‌های مختلف آزمایشی تقسیم شدند به گونه‌ای که متوسط تعداد چرخش‌ها و از این رو شدت پارکینسون ایجاد شده در گروه‌ها نزدیک به یکدیگر باشد. سپس در هفته ششم پس از تزریق سم و درست قبل از پیوند مجدداً موش‌ها برای مرحله سوم تحت آزمون قرار گرفتند. جدول ۲ نتایج این آزمون را در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد. اختلاف معنی داری بین گروه‌ها در نتایج این آزمون مشاهده نگردید.

۲- پس از پیوند نیز آزمون در سه مرحله در هفته‌های سوم، ششم و دهم پس از پیوند انجام گرفت. هیستوگرام‌های ارائه شده در شکل ۲ نتایج این آزمون‌ها را به تصویر می‌کشند. همانطور که مشاهده می‌شود پیوند سوسپانسیون سلولی سبب کاهش معنی دار تعداد چرخش‌ها در هر سه این آزمون در گروه‌های مختلف گردید. در گروه کنترل شمار خالص چرخش‌ها در آزمون‌های هفته‌های سوم، ششم و دهم پس از پیوند نسبت به آزمون قبل از پیوند به ترتیب ۴۷، ۵۹ و ۶۵٪ کاهش یافت. این درحالی‌که است که تزریق محیط کشت بدون سوسپانسیون سلولی اثری در کاهش تعداد چرخش‌ها نداشت (نتایج گروه شاهد).

کاهش در تعداد چرخش‌ها در آزمون‌های پس از پیوند نسبت به آن در قبل از پیوند در گروه‌های TEA، Vit B و TEA + Vit B همانند گروه کنترل قابل ملاحظه و از نقطه نظر آماری معنی دار بود. در گروه Vit B کاهش در تعداد چرخش‌ها به ترتیب ۲۶، ۶۰ و ۴۷٪ در هفته‌های سوم، ششم و دهم پس از پیوند بود. این میزان برای گروه‌های TEA و TEA + Vit B به ترتیب ۷۲، ۶۲ و ۷۸٪ و ۶۷، ۸۰ و ۷۰٪ بود. آنالیز آماری نشان می‌دهد که کاهش تعداد چرخش‌ها در هفته‌های سوم و دهم پس از پیوند در گروه TEA بیش از آن در گروه کنترل بود که از نقطه نظر آماری تفاوت در هفته سوم معنی دار بود. در گروه TEA + Vit B کاهش تعداد چرخش‌ها در تمامی آزمون‌های پس از پیوند بیش از گروه کنترل بود که در هفته‌های سوم و ششم تفاوت معنی دار بود. از طرف دیگر کاهش در تعداد چرخش‌ها در گروه Vit B تفاوت قابل ملاحظه‌ای با گروه کنترل نداشت.

فرایند بهبود در هفته‌های پس از پیوند، بررسی نتایج

ویتامین‌های گروه ب به گروه شاهد نیز تجویز گردید لکن بهبودی در این گروه ملاحظه نگردید که خود دلیل قاطعی برای رد این مکانیسم در بهبود علائم رفتاری در نتایج ما می‌باشد. از سوی دیگر مطالعات نشان داده‌اند که تجویز TEA می‌تواند در درمان علائم پارکینسونیسم در مدل 6-OHDA موثر باشد [۱۴]. TEA سبب فعال شدن نورون‌های خاموش، افزایش فرکانس شلیک در نورون‌ها و تبدیل الگوی شلیک تونیک به الگوی شلیک انفجاری می‌گردد [۴، ۱۲، ۲۴]. نشان داده شده است که چرخش‌های ایجاد شده در قبال تزریق آپومرفین در موش‌های صحرایی دریافت کننده سم 6-OHDA هنگامی آشکار می‌شوند که ۹۰-۵۰٪ از نورون‌ها در هسته جسم سیاه طرف تزریق سم تخریب گردند [۳۸]. از این رو TEA می‌تواند با افزایش فعالیت نورون‌های باقی مانده و یا فعال کردن نورون‌های خاموش و یا آسیب دیده در جسم سیاه طرف آسیب سبب کاهش علائم رفتاری این بیماری گردد. در صورت وجود این اثرات حاد می‌باشند و بررسی‌ها نشان داده است که از ۱۵ دقیقه پس از تزریق شروع شده و حداکثر چند ساعت پس از آن از بین می‌روند [۳]. بنابراین تنها در صورت تزریق TEA در زمان انجام آزمون چرخشی احتمال ایجاد این اثرات ممکن بود حال آن که در مطالعه حاضر تجویز TEA روزها و هفته‌ها قبل از انجام آزمون‌های رفتاری متوقف گردید.

نتایج ما همچنین نشان داد که اگر چه تجویز ویتامین‌های ب به تنهایی سبب افزایش اثربخشی پیوند سلولی نمی‌شوند ولی می‌تواند اثرات TEA را به میزان قابل ملاحظه‌ای تقویت نماید. مطالعات مختلفی اثر افزودنی ویتامین‌های ب را بر ایجاد و پیشرفت بیماری پارکینسون مورد مطالعه قرار داده‌اند و در این ارتباط نتایج ضد و نقیضی ارائه شده است [۵، ۹، ۱۰، ۱۵، ۱۶، ۲۳]. مطالعه انجام شده توسط جیا و همکاران نشان می‌دهد که تیمار با دوزهای بالای ویتامین‌های گروه ب به صورت سینرژیک از آسیب میتوکندریایی و استرس اکسیداتیو القاء شده بر اثر سم روتنون بر مدل سلولی پارکینسون جلوگیری نموده و نتیجه گرفتند که تجویز دوزهای بالای ویتامین‌های ب می‌تواند کوفاکتورهای آنزیم‌های میتوکندریایی را بالا برده و از این رو در جلوگیری از ایجاد پارکینسون موثر می‌باشند [۲۱]. استرس اکسیداتیو و

کانال‌های پتاسیمی سبب مهار و یا تضعیف فرایند آپوپتوزیس می‌شود [۱۳، ۱۷، ۱۸، ۳۵، ۷۳]. ونگ و همکاران (2008) نشان دادند که کاربرد TEA سبب کاهش آپوپتوزیس القاء شده با استاروسپورین (ST) در سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌شود [۳۵]. ST خروج پتاسیم از طریق کانال‌های وابسته به ولتاژ را افزایش می‌دهد. این مطالعه مشخص نمود که TEA از افزایش بیان پروتئین پیش آپوپتوزیس Bax و همچنین کاهش پروتئین ضد آپوپتوز Bcl-2 که توسط ST القاء می‌شوند جلوگیری می‌نماید. مطالعه ای دیگر نشان داد که فعال شدن جریان پتاسیمی delayed rectifier حساس به TEA در سلول‌های بنیادی در حال تمایز مرتبط با آپوپتوزیس می‌باشد [۱۸]. همچنین خروج پتاسیم از طریق کانال‌های پتاسیمی برای پیشرفت آپوپتوزیس در انتروسیت‌ها ضروری بوده و کاربرد TEA با جلوگیری از گسیختگی DNA، فعال شدن کاسپازها، آزاد شدن سیتوکروم c از میتوکندری‌ها و کاهش پتانسیل غشاء میتوکندری‌ها از آپوپتوزیس در این سلول‌ها جلوگیری می‌نماید [۱۳]. در مطالعه صورت گرفته توسط یو و همکاران (2006) مشخص گردید که TEA مرگ نورونی القاء شده توسط AB₁₋₄₀ را در نورون‌های قشری کشت داده شده از طریق اثر بر اندیکاتورهای آپوپتوز مهار می‌نماید [۳۷]. بررسی‌های صورت گرفته نشان می‌دهند که TEA می‌تواند آپوپتوز القاء شده بوسیله روی را در نورون‌های دوپامینرژیک مهار نماید [۲۷]. TEA همچنین آپوپتوز القاء شده توسط camptothecin را در نورون‌های گرانولی مخچه کشت داده شده مهار می‌نماید [۱۷].

مکانیسم‌های دیگری نیز محتمل می‌باشد. به عنوان مثال نشان داده شده است که TEA می‌تواند پلاستیسیته یا انعطاف پذیری در سیناپس بین فیبرهای گلوتاماتینرژیک قشری با نورون‌های استریاتوم را بهبود بخشیده و تولید LTP در این سیناپس‌ها را تقویت نماید [۲۲]. البته این مکانیسم نمی‌تواند در مدل 6-OHDA قابل قبول باشد زیرا اساس چرخش‌های القاء شده با آپومرفین غالب بودن فعالیت مدارها در عقده‌های قاعده‌ای در یک طرف مغز می‌باشد. چنانچه TEA با تقویت LTP فعالیت این مدارها را بهبود بخشد این بهبود دو طرفه بوده و تغییری در میزان چرخش‌ها بوجود نمی‌آورد. همچنین در این تحقیق برای برطرف نمودن این مشکل TEA و

ویتامین‌های ب پیش ساز کوفاکتورهای آنزیم‌های میتوکندریایی می‌باشند.

نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهند که کاربرد مهار کننده‌های کانال‌های پتاسیمی همچون TEA اثربخشی روش درمانی جانشین سازی سلولی از طریق پیوند سلول‌های ناحیه مزانسفال شکمی جنین‌های ۱۴ روزه موش‌های صحرایی به استریاتوم موش‌های پارکینسونی شده بر اثر تجویز درون مغزی 6-OHDA را به میزان قابل توجهی افزایش می‌دهد. استفاده از افزودنی کمپلکس ویتامین‌های ب به تنهایی اثر قابل توجهی در افزایش اثربخشی این روش ندارد ولی تلفیق مهار کننده کانال‌های پتاسیمی با افزودنی ویتامین‌های ب می‌تواند مؤثرتر از اثر مهار کننده کانال‌های پتاسیمی به تنهایی باشد. اثر TEA احتمالاً از طریق مهار آپوپتوزیس و افزایش بقاء نورون‌های پیوند زده شده اعمال می‌شود.

سپاسگزاری

تمامی هزینه های این طرح تحقیقاتی توسط صندوق حمایت از پژوهشگران کشور معاونت تحقیقات و فناوری ریاست جمهوری بابت طرح شماره ۸۹۰۰۳۵۹۷ تأمین شده است.

References

- [1] Andereggen L, Meyer M, Guzman R, Ducray AD, Widmer HR, Effects of GDNF pretreatment on function and survival of transplanted fetal ventral mesencephalic cells in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *Brain Res* 1276 (2009) 39-49.
- [2] Bjorklund LM, Sánchez-Pernaute R, Chung S, Andersson T, Chen IY, McNaught KS, Brownell AL, Jenkins BG, Wahlestedt C, Kim KS, Isacson O., Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *PNAS* 19 (2002) 2344-2349.
- [3] Capacio BR, Chang FC, Spriggs D, Byers CE, Matthews RL, Benton BJ, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 4-aminopyridine in awake guinea pigs. *Drug Chem Toxicol* 20 (1997) 151-172.
- [4] Cavelier P, Pouille F, Desplantez T, Beekenkamp H, Bossu JL, Control of the propagation of dendritic low-threshold Ca^{2+} spikes in Purkinje cells from rat cerebellar slice cultures. *J Physiol* 540 (2002) 57-72.
- [5] Chen H, Zhang SM, Schwarzschild MA, Hernán MA, Logroscino G, Willett WC, Folate intake and risk of Parkinson's disease. *Am J Epidemiol* 160 (2004) 368-375.
- [6] Dauer W, Przedborski S, Parkinson's disease: Mechanisms and Models. *Neuron* 39 (2003) 889-909.
- [7] Duan W, Ladenheim B, Cutler RG, Kruman II, Cadet JL, Mattson MP, Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J Neurochem* 80 (2002) 101-110.
- [8] Dunnett SB, Bjorklund A, Basic neural transplantation techniques. I. Dissociated cell suspension grafts of embryonic ventral mesencephalon in the adult rat brain.

- Brain Res Brain Res Protoc* 1 (1997) 91-99.
- [9] Esmaeili MH, Fraidouni N, Sophiabadi M, Sarookhani M, haghdoost-Yazdi H, High intake of B complex attenuates 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rat. *Daneshvar* 102 (2013), in press.
- [10] Fraidouni N, Sarookhani M, Sophiabadi M, Haghdoost-Yazdi H, High intake of folic acid attenuates 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rats independent of serum level of homocysteine. *Physiol Pharmacol* 16 (2012) 231-244.
- [11] Furukawa K, Barger SW, Blalock EM, Mattson MP, Activation of K¹ channels and suppression of neuronal activity by secreted beta-amyloid-precursor protein. *Nature* 379 (1996) 74-78.
- [12] Gavelier P, Desplantez T, Beekenkamp H, Bossu JL, K⁺ channel activation and low-threshold Ca²⁺ spike of rat cerebellar Purkinje cells in vitro. *Neuroreport* 14 (2003) 167-171.
- [13] Grishin A, Ford H, Wang J, Li H, Salvador-Recatala V, Levitan ES, Attenuation of apoptosis in enterocytes by blockade of potassium channels. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 289 (2005) 815-821.
- [14] 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* 223 (2011) 70-74.
- [15] 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* 233 (2012) 375- 381.
- [16] Hellenbrand W, Boeing H, Robra BP, Seidler A, Vieregge P, Nischan P, Diet and Parkinson's disease. II: a possible role for the past intake of specific nutrients. Results from a selfadministered food frequency questionnaire in a case-control study. *Neurology* 47 (1996) 644-650.
- [17] Hernández-Enríquez B, Arellano RO, Morán J, Role for ionic fluxes on cell death and apoptotic volume decrease in cultured cerebellar granule neurons. *Neuroscience* 167 (2010) 298-311.
- [18] Hribar M, Bloc A, Medilanski J, Nüsch L, Eder-Colli L, Voltage-gated K⁺ current: a marker for apoptosis in differentiating neuronal progenitor cells? *Eur J Neurosci* 20 (2004) 635-648.
- [19] Jensen P, Bauer M, Jensen CH, Widmer HR, Gramsbergen JB, Blaabjerg M, Expansion and Characterization of Ventral Mesencephalic Precursor Cells: Effect of Mitogens and Investigation of FA1 as a Potential Dopaminergic Marker. *J Neurosci Res* 85 (2007) 1884-1893.
- [20] Jensen P, Pedersen EG, Zimmer J, Widmer HR, Meyer M, Functional effect of FGF2- and FGF8-expanded ventral mesencephalic precursor cells in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res* 1218 (2008) 13-20.
- [21] Jia H, Liu Z, Li X, Feng Z, Hao J, Li X, Synergistic anti-Parkinsonism activity of high doses of B vitamins in a chronic cellular model. *Neurobiol Aging* 31 (2010) 636-646.
- [22] Kaminski Schierle Gs, Hansson O, Brundin P, Flunarizine improves the survival of grafted dopaminergic neurons. *Neuroscience* 94 (1999) 17-20.
- [23] Lau LM, Koudstaal PJ, Van Meurs JBJ, Uitterlinder AG, Hofman A, Breteler MMB, Methylene tetrahydrofolate reductase C677T genotype and PD. *Ann Neurol* 57 (2005) 927-930.
- [24] Matsumoto S, Yoshida S, Takahashi M, Saiki C, Takeda M, The roles of I(D), I(A) and I(K) in the electrophysiological functions of small diameter rat trigeminal ganglion neurons. *Curr Mol Pharmacol* 3 (2010) 30-36.
- [25] Nikkhah G, Rosenthal C, Falkenstein G, Roedter A, Papazoglou A, Brandis A, Microtransplantation of dopaminergic cell suspensions: further characterization and optimization of grafting parameters. *Cell Transplant* 18 (2009) 119-133.
- [26] Norman ED, Egli RE, Colbran RJ, Winder DG, A potassium channel blocker induces a long-lasting enhancement of corticostriatal responses. *Neuropharmacology* 48 (2005) 311-321.
- [27] Olaf S, Fowler B, Piertz K, Huemer M, Haschke-Becher E, Semmler A, et al, M. Homocysteine, folate & vitamin B12 in neuropsychiatric diseases: review & treatment recommendations. *Expert Rev Neurother* 9 (2009) 1393-1412.
- [28] Przedborski S, Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 11 (2005) 3-7.
- [29] Sachdev PS, Valenzuela M, Wang XL, Looi JC, Brodaty

- H, Relationship between plasmahomocysteine levels and brain atrophy in healthy elderly individuals. *Neurology* 58 (2002) 1539-1541.
- [30] Sharma RK, Netland PA, Kedrov MA, Johnson DA, Preconditioning protects the retinalpigment epithelium cells from oxidative stress-induced cell death. *Acta Ophthalmol* 87 (2009) 82-88.
- [31] Shi L, Song N, Jiang H, Wang J, Ma Z, Xie J, Potassium channels are involved in zinc-induced apoptosis in MES23.5 cells. *J Neurosci Res* 87 (2009) 514-521.
- [32] Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M, Potassium channels: moleculardefects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev* 52 (2000) 557-594.
- [33] Sortwell CE, Camargo MD, Pitzer MR, Gyawali S, Collier TJ, Diminished survival ofmesencephalic dopamine neurons grafted into aged hosts occurs during the immediate postgrafting interval. *Exp Neurol* 169 (2001) 23-29.
- [34] Tsang AHK, and Chung KKK, Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1792 (2009) 643-650.
- [35] Wang S, Wang JA, Li J, Zhou J, Wang H, Voltage-dependent potassium channels areinvolved in staurosporine-induced apoptosis of rat mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int* 32 (2008) 312-319.
- [36] Yu HB, Li ZB, Zhang HX, Wang XL, Role of potassium channels in Abeta(1-40)-activated apoptotic pathway in cultured cortical neurons. *J Neurosci Res* 84 (2006) 1475-1484.
- [37] Yu SP, Yeh CH, Gottron F, Wang X, Grabb MC, Choi DW, Role of the outward delayedrectifier K1 current in ceramide-induced caspase activation and apoptosis in cultured cortical neurons. *J Neurochem* 73 (1999) 933-941.
- [38] 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* 144 (2005) 35-45.
- [39] Zawada WM, Zastrow DJ, Clarkson ED, Adams FS, Bell KP, Freed CR, Growth factors improve immediate survival of embryonic dopamine neurons after transplantation into rats. *Brain Res* 786 (1998) 96-103.