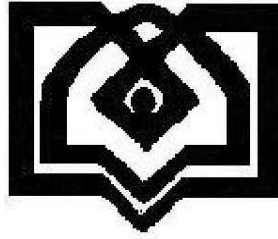


بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین

دانشکده پزشکی گروه علوم تشریح

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد رشته علوم تشریحی

عنوان:

**بررسی اثر مهار کننده ی کانال های پتاسیمی تترائیل امونیوم بر پیشگیری از
ایجاد بیماری پارکینسون در مدل حیوانی 6- هیدروکسی دوپامین**

نگارش:

سهیلا صحت بخش

استاد راهنما:

دکتر حسین پیری

استاد مشاور:

دکتر هاشم حق دوست یزدی

دکتر شهرام دارابی

«حق هرگونه انتشار و بهره‌برداری از نتایج این پایان‌نامه برای دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین محفوظ است»

تقدیم به :

پدرم

و

مادرم

چکیده

زمینه. فعالیت انزیم ها، نوکلئازها و کاسپازها که سیگنال های مرگ را هدایت و تقویت می کنند و از این طریق سبب آپوپتوز می شوند، وابسته به یون پتاسیم می باشد.

هدف. در این تحقیق اثر مهار کننده کانال های پتاسیمی تترا اتیل آمونیوم (TEA) در پیشگیری از ایجاد بیماری پارکینسون مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها. موش های صحرایی نر از قبل از دریافت سم 6-هیدروکسی دپامین (6-OHDA) تا 15 روز پس از آن دوز های مختلف (TEA) را دوبار در روز دریافت نمودند. 6-OHDA به ناحیه استریاتوم مغز تزریق گردید و شدت پارکینسونیسم توسط آزمون های رفتاری چرخش القاء شده با اپومرفین، آزمون پیچش بدن بالا رفته (EBST) و روتارد مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها. اثر دوز کم TEA یعنی 2 میلی گرم به ازای هر کیلو وزن بدن در کاهش شدت چرخش های القا شده با اپومورفین معنی دار نبود اما دوز زیاد TEA یعنی دوز 5 میلی گرم به ازای هر کیلو وزن بدن سبب کاهش شدید و معنی دار شدت چرخش ها نسبت به گروه سالین گردید. در آزمون روتارود نیز TEA منجر به بهبود قابل ملاحظه اجرای حرکتی موش ها شد به گونه ای که در هر دو دوز TEA توانست بطور معنی داری زمان ماندن موشها بر میله چرخان دستگاه روتارد را افزایش دهد. همچنین الگوی یادگیری در گروه TEA زیاد به الگوی موش های سالم نزدیک بود.

نتیجه گیری. نتایج ما نشان می دهند که پیش درمان با TEA می تواند تا اندازه ای شدت علائم رفتاری بیماری پارکینسون را در مدل مزمز پارکینسونیسم القاء شده با سم 6-OHDA کاهش دهد. این اثرات در گروه مدل مزمز هر دو دوز 2 و 5 میلی گرم به ازای هر کیلو وزن بدن مشاهده شد ولی دوز بیشتر اثرات

قویتری در کاهش شدت علائم داشت و در گروه مدل حاد هر دو دوز اثرات مثبتی داشته اما دوز کم اثر قویتری در کاهش شدت علائم داشت.

کلید واژه ها . پتاسیم، تترائیل آمونیوم ، 6-هیدروکسی دپامین، هسته جسم سیاه، ازمون های رفتاری

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
4	چکیده فارسی

فصل اول: مقدمه

11	1-1-مقدمه و اهمیت موضوع
14	1-2- کلیات
14	1-2-1- بیماری پارکینسون
20	1-2-2- ساختمان و عملکرد عقده‌های قاعده‌ای
25	1-2-3- نوروترانسمیترها
27	1-2-4- مدل تجربی بیماری پارکینسون
27	1-2-5- مدل‌های حیوانی بیماری پارکینسون
35	1-2-6- آپوپتوز
40	1-2-7- کانال‌های پتاسیمی
46	1-2-8- مهارکننده‌های کانال‌های پتاسیمی
47	1-2-9- تترا اتیل آمونیوم
50	1-3- اهداف و فرضیات

فصل دوم: مروری بر متون

53	1-2- بررسی متون
----	-----------------

فصل سوم: مواد و روش‌ها

58	3-1- مواد
59	3-2- نمونه حیوانی و گروه‌های آزمایشی
60	3-3- طراحی تحقیق
61	3-4- روش انجام برای گروه‌های حاد
65	3-5- روش انجام برای گروه‌های مزمن
66	3-6- آزمون‌های رفتاری
69	3-7- روش جمع‌آوری و تجزیه و تحلیل داده‌ها

فصل چهارم: نتایج و یافته‌ها

- 71-1-4- نتایج مربوط به آزمون چرخش القا شده با آپومورفین -----
- 77-2-4- نتایج مربوط به آزمون پیچش بدن بالا رفته -----
- 81-3-4- نتایج مربوط به آزمون روتارود -----

فصل پنجم: بحث و نتیجه‌گیری

- 87-1-5- بحث -----
- 92-2-5- نتیجه‌گیری -----
- 3-5- پیشنهادات -----

93----- منابع -----

----- چکیده انگلیسی -----

فهرست تصاویر

صفحه	عنوان
19-----	شکل 1-1: اجزای عقده‌های قاعده‌های
23-----	شکل 1-2: مقایسه جسم سیاه در فرد سالم و فرد مبتلا به پارکینسون
39-----	شکل 1-3: مسیرهای آپوپتوز
61-----	شکل 3-1: قرار دادن موش در دستگاه استرئوتاکس
62-----	شکل 3-2: مشخص کردن محل تزریق
63-----	شکل 3-3: تزریق سم
68-----	شکل 3-4: تصویر دستگاه روتارود
73-----	شکل 4-1: نمودار مربوط به آزمون چرخش القا شده با آپومورفین برای گروه‌های حاد
75-----	شکل 4-2: نمودار مربوط به آزمون چرخش القا شده با آپومورفین برای گروه‌های مزمن
79-----	شکل 4-3: نمودار مربوط به آزمون EBST برای گروه‌های حاد
81-----	شکل 4-4: نمودار مربوط به آزمون EBST برای گروه‌های مزمن
83-----	شکل 4-5: نمودار مربوط به آزمون روتارود برای گروه‌های حاد
85-----	شکل 4-6: نمودار مربوط به آزمون روتارود برای گروه‌های مزمن

فصل اول

مقدمه

1-1- مقدمه و اهمیت موضوع:

بیماری پارکینسون (PD) دومین بیماری شایع نورودژنراتیو بعد از بیماری آلزایمر است که 200 نفر در هر 100000 نفر به این بیماری مبتلا هستند. این بیماری بر اثر تخریب نورون‌های دوپامینرژیک واقع در بخش متراکم جسم سیاه (substantial nigra) بوجود می‌آید. دوپامین نیز یک ماده شیمیایی است که پیام‌هایی را از جسم سیاه به مناطق حرکتی مغز ارسال می‌کند و حرکت را کنترل می‌کند. زمانیکه در حدود 60-80٪ این سلول‌ها تخریب شوند و دوپامین به اندازه کافی تولید نشود علائم حرکتی بیماری پارکینسون ظاهر می‌شود. روش‌های درمانی معمول شامل دارو (L-DOPA, L-deprenyl, ...) و جراحی است. گرچه درمان با داروی L-DOPA بسیاری از علائم بیماری را برطرف می‌کند ولی پس از چند سال برخی علائم مجدداً عود می‌کنند که سبب پائین آمدن کیفیت زندگی می‌گردد بنابراین درمان قطعی برای این بیماری وجود ندارد و درمان‌هایی که صورت می‌گیرد در جهت کاهش علائم بیماری است از این رو در حال حاضر تحقیقات به سمت شناخت روش‌های نوین برای پیشگیری از بروز این بیماری است (1-4)

کانال‌های پتاسیمی نقش مهمی در تنظیم خواص الکتروفیزیولوژیک نورون‌ها ایفا می‌نمایند. آنها الگو و فرکانس شلیک در نورون‌ها را تنظیم نموده و از این طریق در کد نمودن سیگنال‌ها در سیستم‌های عصبی، حسی و حرکتی نقش دارند (5, 6). فعالیت کانال‌های پتاسیمی همچنین نقش مهمی در مسیرهای سیگنالیتهایی که منجر به تکثیر و تمایز سلول‌ها می‌شوند ایفا می‌نمایند. نشان داده شده است که مهار کانال‌های پتاسیمی به وسیله عوامل فارماکولوژیک تکثیر سلولی را در سلول‌های لنفوسیت طبیعی انسانی، سلول‌های ملانوما انسانی، سلول‌های سرطانی ریه و پروستات مهار می‌نماید (7, 8). از طرف دیگر نشان داده شده است که فعالیت آنزیم‌ها، نوکلئازها و کاسپازها که سیگنال‌های مرگ را هدایت و تقویت می‌نمایند و از این طریق

سبب آپوپتوزیس می‌شوند، وابسته به یون پتاسیم می‌باشند. ورمز $Kv2.1$ کانال‌های پتاسیم مسئول بیان آپوپتوز در نورون‌های قشری در شرایط آزمایشگاهی است

کانال‌های پتاسیمی، پروتئین‌های اکتامری با دو زیر واحد مختلف هستند. این کانال‌ها هم در غشای سلول و هم در غشای میتوکندری وجود داشته و نقش مهمی در ثبات حالت متابولیک سلول‌ها دارد(9).

کاهش حجم سلول و فعال شدن کاسپاز یکی از ویژگی‌های اساسی آپوپتوز است. مطالعات جدید نشان می‌دهند که تغییراتی در جریان‌ات یونی به ویژه پتاسیم نقشی اساسی در پیشرفت آپوپتوز دارد. در سلول‌های ایمنی و عصبی در حال آپوپتوز، میزان (K^+) داخل سلولی به میزان قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد که باعث فعال شدن کاسپاز 3 و ایجاد آپوپتوز می‌گردد(10).

در نورون‌های قشری موش، جریان پتاسیمی حساس به TEA شناسایی شده است که مسئول آپوپتوزیس نورونی می‌باشد(11).

کانال‌های پتاسیمی در عملکرد نورون‌ها در عقده‌های قاعده‌ای نقش مهمی ایفا می‌نمایند. نشان داده شده است که جریان پتاسیمی نوع A در نورون‌های هسته جسم سیاه فعال بوده و مهار آن سبب افزایش شلیک انفجاری در این نورون‌ها می‌گردد(12).

تترااتیل امونیوم (TEA) یک مهار کننده وسیع الطیف کانال‌های پتاسیمی می‌باشد که به ویژه کانال‌های پتاسیمی **delayed rectifier** و کانال‌های پتاسیمی وابسته به کلسیم با کنداکتانس بالا را مهار می‌نماید(5, 13). و از طریق مهار این کانال‌ها، TEA تحریک پذیری نورون‌ها را افزایش داده و سبب افزایش شلیک پتانسیل عمل در آنها می‌شود، نورون‌های خاموش را فعال می‌نماید و در برخی نورون‌ها الگوی شلیک را از مد تونیک (شلیک با فرکانس ثابت برای مدت طولانی) به شلیک انفجاری (شلیک با

فرکانس بالا برای مدت زمان کم) تبدیل می نماید. شلیک انفجاری خروجی نورون ها را با فرکانس بالا برای مدت کوتاه سبب گردیده و اثرات قویتری بر سلولهای هدف نورون اعمال می نماید(1و3) .

مطالعات اندکی بر روی ارتباط بیماری پارکینسون با کانالهای پتاسیمی انجام شده است. برخی مطالعات بیان می نمایند که اختلال در عملکرد کانالهای پتاسیمی در عقدههای قاعدهای ممکن است در پاتوژنیز بیماری پارکینسون نقش داشته باشد(17). در تحقیقی که صورت گرفته مشخص گردیده که TEA دارای اثرات قابل توجهی در درمان بیماری پارکینسون در مدل حیوانی 6-OHDA می باشند. از این رو در این تحقیق با توجه به مطالب گفته شده اثرات این دارو در پیشگیری از ایجاد بیماری پارکینسون القاء شده با سم 6-OHDA مورد بررسی قرار می گیرد.

1-1-1- کلیات

2-1-1- بیماری پارکینسون

بیماری پارکینسون یک بیماری نورودژنراتیو و پیشرونده می‌باشد که با اختلالات حرکتی و ناتوان کننده متعدد شامل برادی‌کنیز (آهستگی حرکات)، سفت‌شدگی عضلات، لرزش در هنگام استراحت و عدم تعادل وضعیتی همراه است.

مشخصه بارز بیماری از نظر پاتولوژی دژنراسیون آهسته و تدریجی نورون‌های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم‌سیاه می‌باشد که منجر به کاهش سطح دوپامین، در استریاتوم (هسته‌های دمدار و پوتامن) می‌گردد (18-20).

1-2-1-1 اتیولوژی

1-1-2-1-1- ایدئوپاتیک شایعترین نوع پارکینسونیسم علت مشخصی ندارد. این نوع ایدئوپاتیک بیماری پارکینسون یا فلج آژیتان نامیده می‌شود.

2-1-2-1-1- انسفالیت لتارژیک در نیمه نخست قرن بیستم پارکینسونیسم اغلب به دنبال انسفالیت وناکونومو ایجاد می‌گشت. از آنجایی که این عفونت دیگر مشاهده نمی‌شود موارد پارکینسونیسم به دنبال انسفالیت به صورت فزاینده‌ای نادرگشته است.

3-1-2-1-1- داروها: بسیاری از داروها مانند فنوتیازین‌ها، بوتیروفنون‌ها، متوکلوپرامید، رزپین و تترابنازین ممکن است سبب سندرم پارکینسونیسمی برگشت‌پذیر شوند.

4-1-2-1-1- سمومی مانند غبار منگنز یادی سولفیدکربن ممکن است سبب پارکینسونیسم شوند. پارکینسونیسم از عوارض مسمومیت شدید با مونوکسیدکربن یا استنشاق غبار ناشی از جوشکاری است.

بررسی‌های آزمایشگاهی نشان داده که قرار گرفتن در معرض حشره‌کش‌ها نیز سبب بروز پارکینسونیسم می‌شود.

1-1-2-1-5-MPTP: (1 متیل-4 فنیل-او2 و5 و6 تراهایدروپیریدین) نوعی پارکینسونیسم دارویی در بیمارانی که ترکیبی مشابه مپریدین به نام MPTP ساخته و مصرف نموده‌اند گزارش شده است. این ماده به ترکیبی سمی متابولیزه می‌شود که منحصراً نورون‌های حاوی دوپامین ماده سیاه و نورون‌های آدرنژیک لوکوس سرلئوس را تخریب ساخته، سبب پارکینسونیسم شدید در انسان‌ها می‌شود. ایجاد تغییرات نوروشیمیایی، پاتولوژیک و مشخصه‌های بالینی بیماری پارکینسون توسط این ماده امکان ایجاد بیماری ایدیوپاتیک توسط نوعی سم محیطی را مطرح ساخته است. پارکینسونیسم ناشی از MPTP ممکن است نمونه‌ای را فراهم سازد که در تولید داروهای جدید جهت درمان این بیماری مورد استفاده قرار گیرد

1-1-2-1-6- پارکینسونیسم به همراه دیگر اختلالات نورولوژیک

1-1-2-1-7- پارکینسونیسم ارثی پارکینسونیسم به ندرت ارثی است. بیماری در برخی موارد با توارث اتوزومال غالب ناشی از موتاسیون در ژن a- سینولکئین (4q21) است. موتاسیون در ژن پارکین (6q25.2q27) عامل عمده پارکینسون ارثی با شروع زودرس و توارث اتوزومال مغلوب و نیز بیماری پارکینسون تک‌گیر با شروع در جوانی است انواع مختلفی از جابه‌جایی اکزونها و موتاسیون‌های نقطه‌ای در این بیماران یافت شده است (21-23).

1-1-2-2- پاتولوژی

در پارکینسونیسم ایدیوپاتیک بررسی پاتولوژیک نشان دهنده از بین رفتن سلول‌های پیگمانته در ماده سیاه و دیگر مراکز ساقه مغز، از بین رفتن سلول‌های گلوبوس پالیدوس و پوتامن و وجود گرانول‌های انکلوزیونی داخل نورونی اتوزینوفیلی (اجسام‌لوی) حاوی پروتئین a- سینولکئین در

هسته‌های قاعده‌ای، ساقه مغز و نخاع و گانگلیون‌های سمپاتیک است. این اجسام انکلوژیونی در موارد پارکینسونیسم به دنبال انسفالیت مشاهده نمی‌شوند. در مقابل دژنراسیون غیراختصاصی نوروفیبریلر در برخی ساختمان‌های دیانسفال و نیز تغییرات ماده سیاه مشاهده می‌شود (24).

1-1-2-3- پاتورنز

دوپامین و استیل‌کولین در کورپوس استریاتوم موجود بوده و به عنوان واسطه‌های شیمیایی عمل می‌کنند. چنین به نظر می‌رسد که در پارکینسونیسم ایدیوپاتیک به علت کاهش دوپامین در سیستم ترشح کننده دوپامین نیگرواستریاتال تعادل طبیعی بین این دو واسطه شیمیایی که دارای اعمال متضاد هستند مختل می‌شود. واسطه‌های شیمیایی دیگر مانند نوراپی نفرین نیز در مغز مبتلایان به پارکینسونیسم کاهش می‌یابند اما اهمیت بالینی این کاهش مشخص نیست. به هم خوردن تعادل مهارتی و تحریکی در درون هسته‌های قاعده‌ای و ارتباط مستقیم و غیرمستقیم آن عامل بروز اختلالات حرکتی مبتلایان به پارکینسونیسم دانسته شده است.

1-1-2-3-1- لرزه پارکینسونیسم با فرکانس 4 تا 6 هرتز مشخصاً در حالت استراحت بارزتر است. لرزه در نتیجه فشارهای عاطفی تشدید شده و اغلب در حین فعالیت اداری کاهش می‌یابد. لرزه معمولاً از دست یا پا شروع می‌شود و به شکل اکستانسیون-فلکسیون منظم انگشتان یا دست یا پا و با پروناسیون-سوپیناسیون منظم ساعد بروز می‌نماید. لرزه در بسیاری موارد صورت رادر ناحیه دهان گرفتار می‌سازد. لرزه در نهایت هرچهار اندام رادرگیر خواهد ساخت اما محدود ماندن لرزه در یک یا دو اندام یک سمت بدن برای ماه‌ها تا سال‌ها پیش از منتشر شدن شایع است. در برخی بیماران لرزه هیچ‌گاه علامت بارزی نخواهد داشت.

1-1-2-3-2 - رژیذیده یا افزایش تون - یعنی افزایش مقاومت در مقابل حرکات غیرفعال، از مشخصات

بالینی پارکینسونیسم است. اختلال تون عامل وضعیت خمیده بسیاری از مبتلایان به پارکینسونیسم می باشد.

مقاومت مشخصاً در تمام طول حرکت در یک مفصل خاص ثابت باقی می ماند و عضلات آگونیسست و

آنتاگونیسست به یک میزان درگیر می شوند که این امر برخلاف اسپاسیته است که در آن افزایش تون در

شروع حرکات حداکثر بوده (پدیده چاقوی ضامن دار) در برخی عضلات بیش از عضلات دیگر می باشد.

رژیذیده ناشی از پارکینسونیسم در برخی موارد به سبب انقطاع‌هایی چرخ دهنده مانند در حرکات غیرفعال با

عنوان رژیذیده چرخ دهنده‌ای توصیف می شود که علت آن تا حدودی ناشی از وجود لرزه است.

1-1-2-3-3 - هیپوکینزی ناتوان کننده‌ترین تظاهر بیماری هیپوکینزی است (که گاه برادی‌کینزی یا آکینزی

نیز خوانده می شود.) است که در آن حرکات ارادی آهسته شده، حرکات خودکار مانند نوسان دست‌ها هنگام

راه رفتن، کاهش می یابد. صورت بیمار نسبتاً بدون حرکت است (صورت ماسک مانند)، شیارهای پلک

گشاد شده و پلک زدن کاهش می یابد و حالت صورت ثابت باقی می ماند، لبخند به آرامی ایجاد می شود و

به آرامی از بین می رود. بلندی صدا کاهش می یابد (هیپوفونی) و تنظیم آن دچار اختلال می شود. حرکات

ظریف یا حرکات متناوب سریع مختل می شوند اما قدرت در صورتی که بیمار وقت کافی داده شود کاهش

نیافته است، دست خط ریز، لرزان و ناخوانا می شود.

1-1-2-3-4 - راه رفتن و قامت غیرطبیعی بلند شدن از تخت یا مبل مختل می شود و بیمار هنگام

ایستادن، قامتی خمیده دارد. شروع راه رفتن مشکل است به طوری که بیمار در حال درجا راه رفتن و پیش

از امکان حرکت به جلو بیشتر و بیشتر به جلو خم می شود. راه رفتن با قدم‌های کوچک و با کشیدن پاها

صورت می گیرد و نوسان طبیعی دست‌ها به هنگام راه رفتن وجود ندارد. دور زدن نامتعادل است و ایستادن

نیز ممکن است مشکل باشد. در موارد پیشرفته بیمار جهت جلوگیری از افتادن مرتباً به سرعت راه رفتن

خود می افزاید زیرا در نتیجه قامت غیر طبیعی مرکز ثقل تغییر یافته است.

1-1-2-3-5- دیگر تظاهرات بالینی بلغار و کلونوس خفیف (لرزش پلک‌های بسته) شایع است و در مواردی بلغار و اسپاسم (بسته شدن غیرارادی پلک‌ها) مشاهده می‌شود. آب دهان بیمار احتمالاً به علت اختلال بلع ممکن است سرازیر شود. مشخصاً تغییری در رفلکس‌های وتري مشاهده نمی‌شود و پاسخ کف پایي فلکسور است. زدن ضربات متوالی به ریشه بینی (دو ضربه در ثانیه) سبب پلک زدن مداوم بیمار می‌شود (نشانه میرسون). حال آنکه در افراد طبیعی پلک زدن پس از چند ضربه متوقف می‌شود. اختلال شناختی ممکن است رخ دهد اما معمولاً خفیف و دیررس می‌باشد. افسردگی و توهمات بینایی شایع است (19, 21).

1-1-2-4- درمان

پارکینسونیسم در مراحل اولیه به درمان دارویی نیازی ندارد اما ماهیت بیماری و نیز در دسترس بودن درمان طبی در صورت تشدید علائم باید برای بیمار توضیح داده شود و بیمار باید تشویق به ارائه فعالیت شود. درمان در صورت لزوم جهت برقرار ساختن تعادل دوپامین-استیل‌کولین در استریاتوم توسط مهار اثرات استیل‌کولین با داروهای آنتی‌کولینرژیک یا تقویت اثرات دوپامین صورت می‌گیرد.

1-1-2-4-1- داروهای آنتی‌کولینرژیک: داروهای آنتی‌کولینرژیک موسکارینی در درمان لرزه و رژی‌دیتیه موثرتر از هیپوکینزی هستند اما به طور کلی تأثیر کمتر از داروهای تقویت‌کننده دوپامین دارند. از میان شایعترین داروهای مصرفی، تری‌هگزی فنیدیل و بنزوتروپین را می‌توان نام برد.

1-1-2-4-2- آمانتادین: از آمانتادین جهت درمان پارکینسونیسم خفیف به تنهایی یا به همراه یک داروی آنتی‌کولینرژیک می‌توان استفاده کرد. این دارو باعث بهبود تمام تظاهرات پارکینسونیسم می‌شود.

1-1-2-4-3- لودودوپا: لودودوپا در بدن به دوپامین تبدیل می‌شود. تمامی علائم پارکینسون را بهبود می‌بخشد و برخلاف داروهای آنتی‌کولینرژیک به خصوص در درمان هیپوکینزی مؤثر است. مصرف لودودوپا

در مبتلایان به گلوکوم زاویه بسته و یا بیماریهای سایکوتیک ممنوع است. همچنین مصرف آن در مبتلایان به زخم پتیک و یا ملانوم بدخیم، باید با احتیاط صورت گیرد.

1-1-2-4-4 - آگونیست‌های دوپامین: آگونیست‌های قدیمی دوپامین از مشتقات ارگوت هستند. برموکریپتین گیرنده‌های D₂ دوپامین را تحریک می‌سازد اثرات این دارو در بهبود علائم پارکینسون احتمالاً اندکی کمتر از لوودوپا می‌باشد اما به میزان کمتری باعث دیس‌کینزی می‌شود.

1-1-2-4-5 - سلجلین: مهارکننده مونوآمین‌اکسیداز نوع B است، و از جمله داروهای ضد پارکینسونی ضعیف می‌باشد که تا حدی تاثیرات داروهای لوودوپا را شدت می‌بخشد. بهتر است این دارو در اوایل بیماری مصرف شود و در این مرحله مفیدتر است، چرا که به مدت یک یا دو سال اکثر نشانه‌های بیماری را تحت کنترل درمی‌آورد. گزارش‌هایی مبنی بر اینکه این دارو تاثیر حفاظتی دارد و روند پیشرفت بیماری را کند می‌نماید، متأسفانه نادرست از آب درآمد.

1-1-2-4-6 - جراحی: یکی از مهمترین استراتژی‌های درمانی پیوند بافت‌های دپامینرژیک می‌باشد. معکوس‌شدن، نارسایی‌های حرکتی و بیوشیمیایی در مدل‌های حیوانی بیماری پارکینسون بوسیله پیوند نشان داده شده است. عمومی‌ترین روش در پیوند قرار دادن سلول‌های اکتوپیک سوسپان شده از بافت‌های VM جنینی در کورپوس استریاتوم بدون عصب می‌باشد. این می‌تواند بسیاری از اثرات رفتاری آسیب را کاهش داده و یا حتی معکوس نماید. با وجود این هیچکدام از استراتژی‌های پیوند که تا به امروز آزموده شده است منجر به بازسازی کامل مسیر نیگرواستریاتال نشده است.

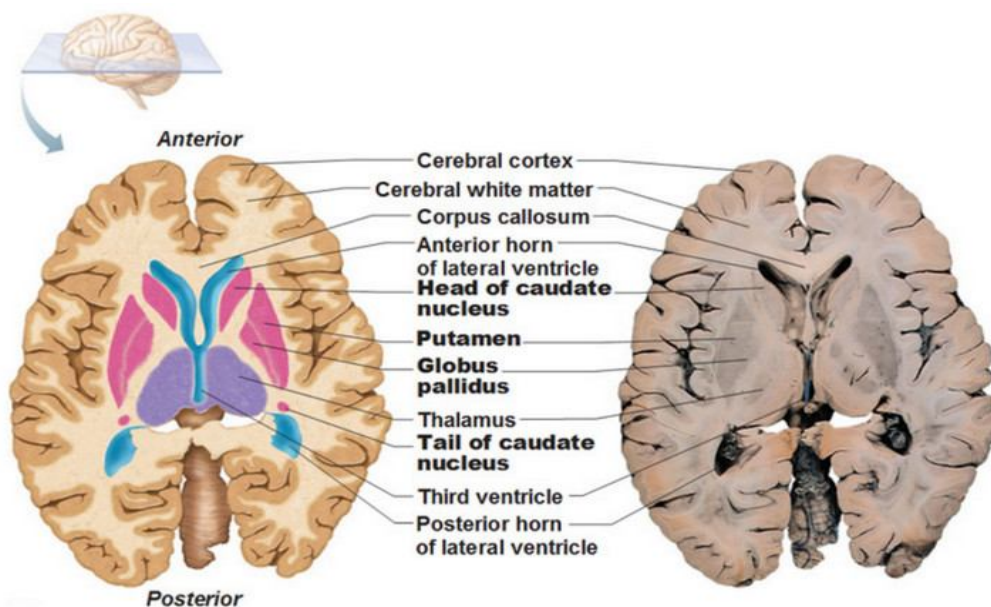
1-1-2-4-7 - تحریک عمقی مغز: تحریک الکتریکی تالاموس با فرکانس بالا در بهبود لرزه پارکینسون مفید است، این روش در درمان تمام عوارض پارکینسونیسم مفید است.

1-1-2-4-8 - ژن درمانی: علاوه بر داروهای جدید، روش‌های درمانی نوینی نیز ابداع شده است. ژن درمانی قابلیت چشمگیری در درمان بیماری‌های سیستم عصبی مرکزی دارد. وارد کردن ژن‌های کارآمد به

مغز بیماران مبتلا به پارکینسون روش مفیدی است تا این ژن‌های سالم جایگزین ژن‌های معیوب شوند. هدف از انجام این کار وارد کردن پروتئینی است که از آسیب سلولی ممانعت کرده و یا عملکرد سلول آسیب دیده را مجدداً برقرار نموده و یا امکان انتقال فیزیولوژیکی را در ناقلین عصبی ناقص فراهم آورد (19, 25).

3-1-1- ساختمان و عملکرد عقده‌های قاعده‌ای

عقده‌های قاعده‌ای یک گروه به هم پیوسته از هسته‌های عمقی مغز می‌باشند. از نظر فیزیولوژیک این هسته‌ها شامل 5 قسمت هسته کودت، پوتامن و گلوبوس پالیدوس در مغز جلوئی، هسته ساب‌تالاموس در دیانسفال، و ماده سیاه (substantia nigra) در مزانسفال می‌شوند. به مجموع هسته کودت و پوتامن، استریاتوم می‌گویند (26-28).



شکل 1-1: اجزای عقده‌های قاعده‌ای در مغز را نشان می‌دهد.

1-3-1-1- استریاتوم

استریاتوم بعنوان بخشی از تلسفال وسیعترین و اصلی ترین جز عقده‌های قاعده‌ای محسوب می‌گردد. این هسته‌ها از لحاظ فیزیولوژی بعنوان یک واحد تک عمل نموده اما از نظر آناتومیکی توسط کپسول داخلی از یکدیگر جدا می‌گردند. و از دو بخش اصلی یعنی استریاتوم پشتی و استریاتوم شکمی تشکیل شده است. این دو بخش از نظر ساختمان سلولی، مشخصات نوروشیمیایی و ارتباط آوران شباهت زیادی با هم داشته ولی از نظر توپوگرافی و ابرانها و نوع اطلاعاتی که پردازش می‌کند متفاوت از هم می‌باشند. استریاتوم پشتی، بخش اصلی نئواستریاتوم به حساب می‌آید به این علت که مرز مشخصی بین دو نئواستریاتوم نمی‌توان در نظر گرفت. لذا استریاتوم شکمی را امتداد شکمی استریاتوم پشتی در نظر می‌گیرند(29).

استریاتوم دریافت‌کننده اصلی آوران‌ها به عقده‌های قاعده‌ای می‌باشد. این ورودی‌ها شامل فیبرهای گلوتاماتینرژیک که از تمامی نواحی قشر مغز منشا می‌گیرند، فیبرهای دوپامینرژیک از بخش متراکم جسم سیاه و فیبرهایی از تالاموس می‌باشند. خروجی‌ها از عقده‌های قاعده‌ای (بخش مشبک جسم سیاه و بخش داخلی گلوبوس پالیدوس) منشا می‌گیرند. این فیبرها بطور تونیک هسته‌های هدفشان را در تالاموس و ساقه مغز مهار می‌نمایند. استریاتوم از طریق مسیرهای مستقیم و غیر مستقیم هسته‌های تالاموسی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. هر دو این مسیرها از پوتامن منشا می‌گیرند. مسیر مستقیم در بخش داخلی گلوبوس پالیدوس و بخش مشبک ماده سیاه ختم می‌شود. این مسیر از همان نورون‌هایی منشا می‌گیرد که ورودی‌های قشری را دریافت می‌دارند. تحریک این مسیر، مهار را از روی هسته‌های تالاموسی که توسط بخش داخلی گلوبوس پالیدوس و ماده سیاه اعمال می‌شود برمی‌دارد.

مسیر غیرمستقیم، بخش خارجی گلوبوس پالیدوس را درگیر می‌نماید. این بخش هسته ساب‌تالاموس را مهار می‌نماید. با مهار بخش خارجی گلوبوس توسط استریاتوم، هسته ساب‌تالاموس فعال شده و فعالیت بخش داخلی گلوبوس پالیدوس را افزایش می‌دهد که سبب مهار بیشتر هسته‌های تالاموسی می‌شود.

بررسی این مسیرها نشان می‌دهد که در جریان یک حرکت، مسیر مستقیم فیدبک مثبت اعمال کرده و با افزایش فعالیت تالاموس و قشر، حرکت را تسهیل می‌نماید. از طرف دیگر مسیر غیرمستقیم فیدبک منفی اعمال کرده و مهار حرکت را سبب می‌شود. نورون‌هایی که منشا مسیر مستقیم می‌باشند دارای گیرنده D_1 برای دوپامین می‌باشند. این گیرنده تحریکی می‌باشد. آن‌هایی که مسیر غیرمستقیم را تشکیل می‌دهند، گیرنده D_2 داشته که مهاری می‌باشد. بر این اساس، فیبرهای دوپامینرژیک از بخش متراکم ماده سیاه که در استریاتوم ختم می‌شوند، انتقال در مسیر مستقیم را تسهیل می‌نمایند و انتقال در مسیر غیرمستقیم را مهار می‌نمایند. بیماری‌هایی که بازالگانگلیا را درگیر می‌نمایند موجب فعال شدن و یا مهار بیش از حد یکی از این مسیرها می‌شوند. چنانچه تعادل به نفع مسیر مستقیم باشد، اختلالات هیپوکینتیک رخ می‌دهد و اگر تعادل به نفع مسیر غیرمستقیم باشد، اختلالات هیپوکینتیک ایجاد می‌شود. بیماری پارکینسون از جمله اختلالات هیپوکینتیک می‌باشد (30, 31).

نئواستریاتوم در موش صحرایی یک توده خاکستری رنگ و بزرگ بوده که عمقی‌ترین بخش نیمکره مغزی را اشغال می‌کند و در بافت تازه تهیه شده و در رنگ‌آمیزی نیسل تقریباً یکنواخت بنظر می‌آید.

1-1-3-2- جسم سیاه

جسم سیاه در بخش شکمی تگمنتوم مغز میانی قرار داشته و طول آن در جهت سری-دمی $2/5$ میلی‌متر و در جهت میانی-جانبی پهنای آن 3 میلی‌متر می‌باشد. حجم بخش متراکم جسم سیاه $0/3\text{mm}^3$ و محتوی $10000-12000$ نورون در هر طرف می‌باشد جسم سیاه در مهره‌داران پست به صورت بدوی و رشد

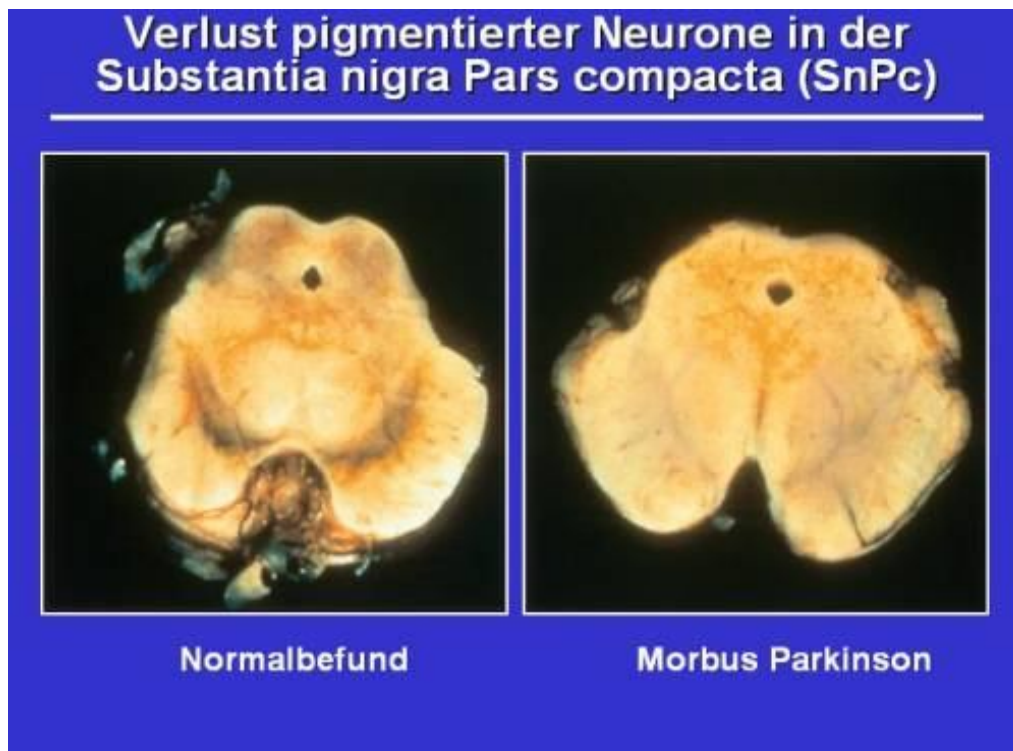
نایافته است ولی بطور مشخص در پستانداران ظاهر می‌شود و در مغز انسان به بزرگترین اندازه خود می‌رسد (32).

جسم سیاه اگرچه یک هسته از مزانسفال بوده ولی بدلیل ارتباطات غنی که با استریاتوم دارا می‌باشد بعنوان جزئی از عقده‌های قاعده‌ای محسوب می‌گردد. رنگ سیاه این قسمت بعلت رنگ‌دانه ملانین که از متابولیسم دوپامین تولید می‌شود و در نورون‌های بخش متراکم است می‌باشد و بخوبی با چشم غیر مسلح دیده می‌شود.

این هسته، ناحیه‌ای از مغز است که تحقیقات زیادی در رابطه با آن به انجام رسیده است و در بیماری عصبی پارکینسون نورون‌های دوپامینرژیک آن تحلیل می‌رود (26).

جسم سیاه یک گروه یکنواخت از عناصر مرتبط از نظر نوروشیمیایی و عملکردی به حساب می‌آید. این هسته دارای یک بخش متراکم مجاور تگمنتوم با سلول‌های حاوی رنگدانه نوروملانین، یک بخش مشبک که مجاور پایک‌های مغزی است می‌باشد. امتداد جانبی بخش متراکم قسمت کوچکی بنام بخش جانبی می‌باشد. بخش متراکم جسم سیاه مرکب از یک صفحه از نورون‌های دوپامینرژیک می‌باشد که بصورت کلاهکی بر روی بخش مشبک قرار می‌گیرد بخش متراکم جسم سیاه محتوی نورون‌های دوپامینرژیک با اندازه متوسط و تراکم زیاد می‌باشد. اندازه جسم سلولی هر نورون حدودا 20-11 میکرومتر بوده و دارای یک هسته خارج از مرکز می‌باشند. بخش جانبی کوچکترین قسمت جسم سیاه است و نورون‌های آن عمدتا به اندازه متوسط و به اشکال گرد، دوکی و ستاره‌ای می‌باشند. بخش جانبی برخی از این نورون‌هایش دوپامینرژیک بوده و به آمیگدال و استریاتوم، فیبر ارسال می‌کنند، در حالیکه برخی دیگر غیر دوپامینرژیک بوده و به کولیکولوس تحتانی، فیبر می‌فرستند. نورون‌های بخش مشبک چند قطبی و گابائرژیک بوده و به

اشکال بیضوی، گرد و یا مثلثی یافت می‌شوند و شباهت بسیاری را با نورون‌های گلوبوس پالیدوس نشان می‌دهند (33, 34).



شکل 1-2: مقایسه جسم سیاه در یک فرد سالم با یک فرد مبتلا به پارکینسون

1-1-3-3-1- گلوبوس پالیدوس

گلوبوس پالیدوس از دیانسفال مشتق شده، بین پوتامن و کپسول داخلی قرار دارد و از دو هسته مجزا خارجی و داخلی که به وسیله لایه نازکی از آکسون‌ها از یکدیگر جدا شده‌اند تشکیل شده است.

هر دو هسته حاوی تعداد کمی نورون‌های بزرگ با دندریت‌های طولانی می‌باشند. دوپامین آزاد شده از مسیر نیگرواستریاتال اثرات عملی مخالفی بر روی دو نوع جمعیت سلولی استریاتوپالیدال دارد به گونه‌ای که نورون‌های پروجکت شده به بخش خارجی و داخلی GP را به ترتیب مهار و تحریک می‌کنند. هر دو قسمت گلوبوس پالیدوس ارتباط آوران و وایران مجزایی دارند. بخش داخلی گلوبوس پالیدوس (همراه با

قسمت مشبک جسم سیاه (CNR) به دلیل اینکه منشا اکثر فیبرهایی بوده که به قسمتهای دیگر محور مغزی- نخاعی می‌روند بعنوان خروجی اصلی عقده‌های قاعده‌ای شناخته شده است. منشا اصلی اوران قسمت داخلی گلوبوس پالیدوس استریاتوم می‌باشد، و بدلیل اینکه بطور مستقیم فعالیت سلول‌های خروجی پالیدال داخلی را کنترل می‌کند مسیر مستقیم نام گرفته است. و ابران قسمت داخلی پالیدوس گابارژیک هستند. قسمت داخلی گلوبوس پالیدوس نیز پروجکشن گابارژیک از استریاتوم دریافت داشته و بعلت اینکه به طور غیرمستقیم بر روی فعالیت سلولهای گلوبوس داخلی از طریق یک ارتباط با هسته ساب‌تالاموس اثر می‌گذارد، منشا مسیر غیرمستقیم می‌باشد الیاف اوران آن شامل الیاف Striatopallidal می‌باشند این الیاف از هسته‌های دم‌دار و پوتامن به سمت گلوبوس پالیدوس می‌روند این الیاف ماده GABA را به عنوان نوروترانسمیتر آزاد می‌نماید و ابران‌ها شامل 4 گروهند: الیافی که به هسته‌های تالاموس می‌رود، الیافی که به ساب تالاموس می‌رسد، الیافی که در بخش تحتانی تگم‌توم ساقه مغز خاتمه می‌یابند و الیاف pallidosubthalamic که به هسته‌های ساب‌تالامیک می‌روند (27, 35).

4-1-1- نوروترانسمیترها

نوروترانسمیترها موادی هستند که در ترمینال‌های پیش‌سیناپسی سنتز و نگهداری می‌شوند و در برابر تحریک مناسب آزاد شده و از شکاف سیناپسی عبور کرده و با نقاط گیرنده اختصاصی در سلول بعد از سیناپس باند می‌شوند. مهمترین نوروترانسمیترها از نظر عمل عقده‌های قاعده‌ای عبارتند از گلوتامات که سبب فعال شدن پروژکسیون‌های تحریکی کورتیکواستریاتال می‌شود، استیل‌کولین، دوپامین، گاما آمینوبوتیریک اسید و سووتونین، نوراپی نفرین نیز به مقدار کم موجود است ولی عمل آن به درستی روشن نیست. عقده‌های قاعده‌ای دارای مواد فعال بیولوژیک دیگر مانند ماده P، انکفالین، کوله‌سیستوکینین و سوماتوستاتین نیز می‌باشد که ممکن است اثرات نوروترانسمیترها را تشدید و یا تخفیف دهند.

استیل کولین یک نوروترانسمیتر می باشد که در گانگولین های اتونومیک و عقده های قاعده ای نیز یافت می شود. بیشترین غلظت Ach و کولین استیلاز و استیل کولین استراز (که به ترتیب این دو آنزیم در سنتز و تخریب Ach شرکت می کنند) در استریاتوم یافت می شود. استیل کولین توسط نورون های نئواستریاتال کوچک (گلژی تیپ II) سنتز و آزاد می شود که روی آنها اثر تحریکی دارد. به نظر می رسد که احتمالاً علت اثر آلکالوئیدهای بلادونا که سالها برای درمان پارکینسون به کار می رفت و می رود معمولاً توان آنها در آنتاگونیست کردن Ach بصورت مرکزی باشد (19).

از کاتکولامین ها دوپامین، نوراپی نفرین و اپی نفرین قابل ذکرند، که دوپامین از اهمیت بیشتری برخوردار می باشد. در مغز دوپامین توسط آنزیم های مونوآمین اکسیداز و کاتکول-اُمتیل ترانسفراز متابولیزه می شود.

مواد نهایی عبارتست از همووانیلیک اسید و دی هیدروکسی فنیل اسید می باشد

دوپامین علاوه بر اینکه precursor نوراپی نفرین می باشد اثرات دیگری نیز در مغز دارد. نواحی غنی از دوپامین عبارتند از:

1- جسم سیاه که در آنجا دوپامین توسط اجسام سلول های عصبی pars compact سنتز می شود.

2- استریاتوم که در آنجا در پایانه های سیناپسی الیاف نیگرال قرار دارد.

تحریک جسم سیاه سبب آزاد شدن دوپامین در استریاتوم می شود که آن هم اثر وقفه ای روی نورون های نئواستریاتال دارد. الیاف استریاتونیگرال در pars reticulate دارای گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز می باشند. که این آنزیم در سنتز GABA مصرف می شود. GABA به مقدار زیاد در جسم سیاه، استریاتوم و گلوبوس پالیدوس یافت می شود که نقش وقفه ای را به عهده دارد. راه های عصبی اختصاصی فعالیت این ترانسمیتر، هنوز مشخص نیست (19).

5-1-1- مدل تجربی بیماری پارکینسون

بیماری پارکینسون (PD) یکی از بیماری‌های انسانی بحساب می‌آید که فرم خودبخودی آن در حیوانات ظاهر نمی‌گردد با این وجود برخی علائم مشخصه بیماری را می‌توان با تجویز عوامل فارماکولوژی (مهارکننده آنزیم تیزوزین هیدروکسیداز) نظیر رزپین (Reserpine)، آلفامتیل - پ - تیروزین (α-methyl- p- tyrosin) و همچنین عوامل نوروٹوکسین نظیر مت‌آمفتامین (Methamphetamine) 6-هیدوکسی دوپامین (6-OHDA) (6-Hydroxydopamine) و 1-متیل-4-فنیل-1,2,3,6-تتراهیدروپیریدین (MPTP) (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro pyridine) بوجود آورد (36, 37).

6-1-1- مدل‌های حیوانی آزمایشگاهی بیماری پارکینسون :

- 1-6-1-1 اختلالات عملکردی القا شده توسط عوامل فارماکولوژی در نوروترانسmitter دوپامین
- 2-6-1-1 مدل رزپین: Carlsson و همکارانش (1957) این موضوع را مطرح ساختند که کاهش دوپامین در استریاتوم مسئول علائم حرکتی بیماری پارکینسون است. آنها نشان دادند که حالتی از آکینزیا میتواند توسط جذب سیستمیک رزپین در رت‌ها ایجاد شود و نیز این میزان از بیماری می‌تواند توسط L-DOPA درمان شود. در رت‌ها رزپین باعث اختلالات حرکتی همچون آکینزیا هیپوکینزیا و یا کاتالپسی همراه با ترمور شود. مکانیسم دقیق اثرات فارماکولوژیک رزپین هنوز به طور کامل درک نشده است. اما ثابت شده است که در دوزهای بالا ذخایر ویزیکولی داخل نورونی توسط مگنزیوم و مکانیسم‌های وابسته به ATP تحت تاثیر قرار می‌گیرند و نیز ذخایر دوپامین و سایر نوروترانسmitterهایی چون آدرنالین نورآدرنالین هیستامین و سروتونین کاهش می‌یابد. به علاوه بازجذب پس‌سیناپسی هم ممکن است به

حداقل زمان ممکن برسد. در گذشته از محدودیت‌های حرکتی ایجاد شده توسط رزرپین بر روی جوندگان به طور گسترده‌ای در بررسی درمان‌های ضد پارکینسونی استفاده می‌شد. و طی این بررسی‌ها L-DOPA آ‌مفت‌آمین و مشتقات آن آ‌گونیست‌های گیرنده دوپامین و آنتاگونیست‌های NMA موثر واقع شدند. اما امروزه به دلیل اینکه رزرپین باعث آزادسازی انواع گوناگون نوروترنسمیترها می‌شود این روش به ندرت مورد استفاده قرار می‌گیرد. روش دیگری که توسط گروه Carlsson مورد استفاده قرار گرفت مدل ایجاد آکینزیا برای بررسی روش‌های درمانی بود، حیوانات آزمایشگاهی که در این روش مورد استفاده قرار گرفتند موش‌هایی بودند که از 18 ساعت قبل 10mg/kg رزرپین به صورت داخل صفاقی به آنها تزریق شد تا فعالیت‌های حرکتی آنها بررسی شود و نیز برای مشاهده اثرات بالقوه 2 ساعت قبل به این حیوانات p متیل تیروزین (500mg/kg) تزریق شد. در واقع این ماده از سنتز دوپامین جلوگیری می‌کند فعالیت حرکتی این حیوانات توسط یک دستگاه اندازه‌گیری الکترونیک که میانگین فعالیت‌های حیوانات را در دوره‌ی زمانی مشخص ثبت می‌نمود اندازه‌گیری می‌شد (38).

1-1-6-3 مدل کاتالپسی القا شده توسط داروهای آرام‌بخش

آرام بخش‌هایی نظیر هالوپریدول به عنوان آنتاگونیست گیرنده‌ی D2 دوپامین اثراتی را ایجاد می‌کنند که مشابه علائم ایجاد شده متعاقب تزریق رزرپین است. در رت‌ها کاتالپسی به این معناست که حیوان نمی‌تواند اندام‌هایش را به طور صحیح و دقیق و سریع در یک موقعیت غیر معمول قرار دهد این فرایند به راحتی طی یک سری تست‌هایی در رت‌ها بررسی می‌شود بررسی‌های فارماکولوژیک اخیر نشان داده‌اند که کاتالپسی ایجاد شده توسط هالوپریدول 0/5mg/kg می‌تواند با آنتاگونیست‌های گیرنده‌ی NMDA مقابله کند به عنوان مثال آمانتادین و MK801 باعث مهار وابسته به دوز کاتالپسی

ایجاد شده توسط هالوپریدول می‌شود. در حالیکه ممانتین با دوز 10mg/kg به میزان کمتری موثر است. طی مطالعات عمقی و بررسی‌های درجات کاتالپسی القا شده توسط هالوپریدول و مورفین نتیجه می‌شود که کاتالپسی حالت پیچیده‌ای از نقایص حرکتی می‌باشد که توسط تست‌های رفتاری کلاسیک قابل بررسی است. اخیراً کاتالپسی توسط کاهش دوپامین به صورت آزمایشگاهی قابل طراحی می‌باشد و شامل آکینزی یا سفتی عضلانی (ریگور) و لرزش اندام‌ها می‌باشد. با ایجاد این حالت نوروهایبی از مغز مسئول شروع حرکات ارادی هستند غیر فعال بوده ولی بخش‌هایی از مغز که در کنترل رفلکس‌های وضعیتی و حفظ تعادل بدن نقش دارند به صورت طبیعی عمل می‌کنند. در این حیوانات کاتالپتیک، اگرچه شروع حرکت مختل شده است اما با اعمال تحریکات خارجی قوی‌تری نظیر فشار دادن دم حیوان آب سرد یا صداهای بلند می‌توان حیوان را به سمت فعالیت سوق داد(39).

1-1-6-4- برادی‌کینزیا و آکینزیای القا شده توسط هالوپریدول

تزریق دوزهای پایین 0/3 یا 15mg/kg هالوپریدول به رت‌ها می‌تواند منجر به حالات رفتاری مشابه علائم آکینزی و برادی‌کینزیا بیماری پارکینسون شود.

Hauber(1990) جهت اندازه‌گیری اثر دوپامین در کنترل و شروع فعالیت حرکتی رت‌ها تکنیکی را ابداع کرد که در آن آغاز سریع فعالیت حرکتی در پاسخ به تحریک منجر به پاداش غذایی می‌شد. وسائل آزمایش شامل جعبه شروع یک مسیر و یک جعبه هدف بود، یک رت آموزش دیده در جعبه شروع قرار می‌گرفت و یک تحریک خروجی دروازه را مشخص می‌کند رت به این تحریک پاسخ داده شروع به حرکت و طی مسیر نموده تا به جعبه هدف رسیده و به جایزه یا غذا دست یابد. مدت زمان مابین شروع سیگنال و شروع فعالیت حرکتی توسط یک سوئیچ فتوالکتریک اندازه‌گیری می‌شود

جذب سیستمیک هالوپریدول در دوزهای اشاره شده باعث وخیم تر شدن رفتارهای حرکتی نظیر تاخیر شروع حرکت، یا آکینزیا و شروع آهسته حرکت یا برادی کینزیا می شود (39, 40).

1-1-6-5 مدل متامفتامین

متامفتامین ها داروهای محرک روانی اعتیاد آوری هستند که فعالیت آنها به صورت اولیه توسط مکانیسم آزادسازی دوپامین می باشد. در دوزهای بالا این داروی محرک روانی باعث فعالیت سمی در جوندگان میشود اما در انسان فاقد چنین خاصیتی است (30).

1-1-6-6 مدل MPTP

دیگر مدل آزمایشگاهی بیماری پارکینسون مدل MPTP نامیده می شود. MPTP امروزه بسیار مورد استفاده و ارزیابی قرار گرفته است. طی سالهای 1979 الی 1982 مطالعاتی بر روی جوانان معتاد کالیفرنایی انجام شد. این افراد نوعی هروئین ترکیبی را به صورت تزریقی دریافت کردند و مشاهده شد که در آنها شیوع یک سندروم پارکینسونی جدی ایجاد شد. این بیماران تمام علائم پارکینسون را نشان داده و نسبت به درمان با L-DOPA به خوبی پاسخ دادند. آنالیز هروئین ترکیبی نشان داد که این ماده حاوی 2/9٪ MPTP است. قدرت این ماده در ایجاد سندروم پارکینسون قبلا بر روی انواع مختلف حیوانات بررسی شده امروزه بررسی های بیوشیمیایی و هیستوشیمیایی نشان می دهند که این ماده باعث ایجاد سندروم پارکینسون در انسان می شود. در موش ها و پرایمت های غیر انسانی این دارو قادر به ایجاد تغییرات پاتوبیوشیمیایی و هیستوپاتولوژی مشخصه بیماری پارکینسون است اما ترمور به عنوان یکی از علائم اصلی اغلب مشاهده نمی شود. اما یک مدل پیشرفته از پارکینسون را میتوان در میمون ها توسط MPTP ایجاد کرد. بدین ترتیب می توان کاهش نورون های دوپامینرژیک را در VTA و کاهش نورون های نورآدرنرژیک را در لوکوس سرلئوس مشاهده کرد. این آسیب ها منجر به تغییرات

نوروترانسمیترهای دوپامین و نورآدرنالین در مغز حیوانات شده اما نوروپپتیدها بدون تغییر باقی می‌مانند. توانایی MPTP برای ایجاد اثرات سمی در حیوانات به تولید تتراهیدروایزوکوئینولین‌ها (N متیل سالسولینول) و B کربولین‌ها مربوط می‌شود. اگرچه تتراهیدروایزوکوئینولین و 1-متیل مشتق از آن در هسته دم دار و لوب فرونتال مغز انسان بسیار کم می‌باشد، اما این میزان در فرد سالم و پارکینسونی تفاوتی ندارد. ذخایر کمتر ولی آشکاری از N متیل سالسولینول در CSF بیماران پارکینسونی که توسط L-DOPA درمان نشده‌اند در مقایسه با بیماران گروه کنترل مشاهده شده است (30, 41, 42).

فاکتورهایی که عمل سمیت‌زایی MPTP را تحت تاثیر قرار می‌دهند:

- نوع و خانواده حیوانات آزمایشگاهی مورد استفاده

- تفاوت‌های فردی

- سن حیوانات

- تاثیر طراحی مدل آزمایشگاهی

2-7-1-7-2 مدل 6 هیدروکسی دوپامین

فعالیت نوروتوکسیک 6 هیدروکسی دوپامین (6-OHDA) ابتدا هنگام بررسی‌های دستگاه عصبی مرکزی مشخص شد. در این دستگاه 6-OHDA طی چندین ماه باعث کاهش نورآدرنالین و نیز باعث تخریب انتخابی پایانه‌های عصبی نورآدرنژیک می‌گردد. جذب سیستمیک 6-OHDA قادر به عبور از سد خونی مغزی نمی‌باشد. هرچند تزریق مستقیم دوزهای پایین این سم به بطن طرفی (150mg) یا به دیگر ساختارهای مغزی (8mg) منجر به تخریب انتخابی نورون‌های کاته‌کول‌آمین می‌شود. این

ماده باعث کاهش دوپامین نورآدرنالین و آدرنالین در نواحی آسیب دیده مغزی می‌شود. در حالیکه ذخایر سایر نوروترانسمیترها (استیل‌کولین، سروتونین و گابا) بدون تغییر باقی می‌ماند. کاربرد مهارکننده‌های سیستم انتقال نورآدرنالین با کیفیت بالا می‌تواند وسعت ناحیه آسیب دیده از نورون‌های دوپامینرژیک را محدود نماید. تزریق این سم به داخل دستجات فیبری دوپامینرژیک و یا به داخل جسم‌سیاه دژنراسیون و تخریب کامل نواحی A9 و A10 را سبب می‌شود که هیچگونه شباهتی با مراحل اولیه PD در انسان نشان نمی‌دهد. نوروتوکسین 6-OHDA بعلت شباهت زیادی که با سایر کاته‌کول‌آمین‌ها دارد بطور انتخابی توسط سیستم انتقال کاتکول‌آمین وارد سلول می‌شود (32).

(42).

بدنبال تزریق 6-OHDA بداخل استریاتوم کاهش دراز مدت، پایدار و بارز تعداد نورون‌ها در جسم‌سیاه همان طرف رخ می‌دهد. (اثر رتروگراد) 6-OHDA توسط نورون‌های جسم‌سیاه همانند دوپامین شناخته شده و در سلول‌ها به صورت گرانولار ذخیره و سپس به سلول باند شده و با تحریک عصبی آزاد شده به عنوان یک نوروترانسمیتر کاذب عمل می‌کند. میزان بالای تجمع سیتوپلاسمی آن باعث تولید میزان بالایی از محصولات 6-OHDA مثل پراکسیدها، سوپراکسیدها و کوینون‌ها شده که این فراورده‌ها باعث تخریب نورونی می‌شوند. RER و غشای سلولی، هسته، میتوکندری اولین محل‌هایی هستند که توسط 6-OHDA آسیب می‌بینند. این سم در میتوکندری موجب عدم ایجاد فسفریلاسیون اکسیداتیو می‌شود. پس در CNS حیوانات پس از تزریق این سم تغییراتی را در هر دو نورون‌های دوپامینرژیک و مونوآمینرژیک رخ می‌دهد. این سم با ورودش به داخل سیتوپلاسم سمیت خود را آشکار کرده و سلول‌های مونوآمینرژیک را به صورت انتخابی تخریب می‌کند. مطالعات قبلی نشان می‌دهند که رت‌هایی که تزریق یکطرفه 6-OHDA به جسم‌سیاه داشته‌اند، یک سندروم حرکتی را نشان داده که در آن چرخش به سمت همان سمت

آسیب دیده، دیده می‌شود. همچنین تحقیقات قبلی نشان می‌دهند که تزریق دوز متوسط 6-OHDA می‌تواند در عدم حضور آسیب‌های ساختاری تغییراتی را در مغز اعمال کند. ذخایر دوپامین به صورت اولیه پس از تزریق افزایش می‌یابد ولی سپس میزان آن پس از آسیب‌های متوالی به نوروهای دوپامینرژیک کاهش یافته و تمام می‌شود نوروٹوکسین 6-OHDA از طریق القا تولید آب اکسیژنه و رادیکال‌های آزاد و بسیار فعال هیدروکسیل مشتق از آن و احتمالاً در حضور آهن موجب آسیب مسیر دوپامینرژیک نیگرواستریاتال می‌گردد (43).

دو تئوری در مورد مکانیسم اثر رتروگراد 6-OHDA پس از تزریق بداخل استریاتوم مطرح می‌باشد:

1- پایانه‌های دوپامینرژیکی در استریاتوم بطور انتخابی بر اثر نوروٹوکسین تخریب شده و این بطور ثانویه منجر به دژنراسیون رتروگراد اجسام سلولی دوپامینرژیک در جسم سیاه می‌گردد.

بدنبال حذف بخش زیادی از استریاتوم و پس از گذشت 3-4 هفته، شدت فلورسانس کاتکول‌آمینی در سلولهای نیگرال کاهش می‌یابد. در مورد از بین رفتن پیشرونده و تدریجی نوروهای ناحیه لوکوس سرولئوس پس از تزریق داخل بطنی 6-OHDA این مکانیسم پیشنهاد شده است (43, 44).

2- نوروٹوکسین 6-OHDA و یا متابولیت‌های تولید شده از آن بفرم رتروگراد انتقال یافته و موجب آسیب اجسام سلولی در SNC می‌گردد.

نوروٹوکسین 6-OHDA موجب کاهش سطح گلوٹاتیون احیا شده و کاهش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیس‌موتاز (SOD) در ناحیه نئواستریاتوم می‌گردد. بعلاوه میزان مالون‌دی‌آلدهید در استریاتوم افزایش می‌یابد. نوروٹوکسین 6-OHDA همانند MPTP موجب اختلال و مهار عملکرد کمپلکس 1 میتوکندریایی می‌گردد که نتیجه نهایی آن تولید رادیکال‌های سوپراکسید و هیدروکسل و ماده آب‌اکسیژنه می‌باشد.

1-1-6-6-1- تغییرات رفتاری پس از تخریب یکطرفه با 6-OHDA

نئواستریاتوم نقش مهمی در تنظیم اعمال حرکتی بدن به عهده دارد و یکی از آورانه‌های اصلی آن سیستم دوپامینرژیک نیگرواستریاتال می‌باشد که 10-15٪ پایانه‌های موجود در نئواستریاتوم را تشکیل داده و آسیب آن اثر بارزی را بر اعمال حرکتی بدن به جا می‌گذارد.

نتایج تحقیقات متعدد نشان می‌دهد که بروز عدم تعادل در فعالیت نورونی دوپامینرژیک بین دو طرف سبب بروز یک عدم تقارن در رفتار حرکتی حیوان مبتلا می‌شود. در موش صحرایی این عدم تقارن خود را به فرم چرخش حیوان به سمت با فعالیت دوپامینرژیکی کمتر نشان می‌دهد.

با تزریق یک طرفه 6-OHDA به داخل استریاتوم موش صحرایی، بخش اعظم نورون‌های دوپامینرژیک از بین رفته و در نتیجه کاهش سطح دوپامین در استریاتوم همان طرف ضایعه ایجاد می‌گردد. حیوانات با تخریب یک طرفه برای مدت زمان کوتاهی پس از جراحی یک عدم تقارن حرکتی خودبخودی (رفتار چرخشی به همان طرف) را نشان داده ولی به زودی این عدم تقارن محو شده و رفتار حیوان طبیعی به نظر می‌آید، مگر آنکه یک محرک فیزیکی به حیوان وارد گردد. به دنبال تجویز سیستمیک آگونیست‌های دوپامینرژیک و با توجه به ماهیت دارو، یک رفتار حرکتی چرخشی بارز در حیوان پدیدار می‌گردد که آن را می‌توان به طور کمی اندازه‌گیری نمود (44).

با تخریب طرف چپ سیستم دوپامینرژیک نیگرواستریاتال، تراکم گیرنده‌های دوپامینرژیک واقع بر روی نورون‌های هدف استریاتال بر اثر بروز حالت تنظیم افزایشی بیشتر می‌شود. به دنبال آسیب ناشی از 6-OHDA تراکم گیرنده‌های نوع D2 افزایش یافته در حالی که تغییرات گیرنده نوع D1 به خوبی معلوم نیست. به همین دلیل با تجویز داروهای با اثر مستقیم و غیرانتخابی که مستقیماً بر روی

گیرنده‌ها اعمال اثر می‌کنند، فعالیت حرکتی در سمت چپ نسبت به سمت راست بیشتر شده و در نتیجه حیوان به سمت مقابل در جهت عقربه‌های ساعت خواهد چرخید(45).

2-7-1-7-2 تغییرات رفتاری پس از تخریب دوطرفه: تزریقات استریوتاکسیک دو طرفه -6 OHDA به استریاتوم رت منجر به مرگ قسمت اعظم سلول‌های عصبی دوپامینرژیک در جسم سیاه و نیز کاهش دوپامین در استریاتوم می‌شود حیوانات دچار آکینزی‌آفازی و نانوشی (آدیپسی) و نهایتاً مرگ می‌شوند شدت کمتری از علائم ذکر شده را می‌توان در رت‌هایی مشاهده کرد که این سم توسط دستگاه استریوتاکسی به ناحیه MFB (بخش قدامی طرفی هیپوتالاموس) آنها تزریق شده است. تزریق به این ناحیه باعث کاهش نورآدرنالین از هیپوتالاموس و دوپامین از استریاتوم می‌گردد این هیپوکینزی ممکن است با L-DOPA یا سایر آگونیست‌های گیرنده دوپامین بهبود یابد اما توسط مواد آنتی‌کولینرژیک بهبود نمی‌یابد. اخیراً از تزریق‌های دوطرفه به ندرت استفاده می‌شود(44).

7-1-1- آپوپتوز

آپوپتوز اولین بار در سال 1972 میلادی توسط محققى به نام Kerr شناخته شد. این واژه ریشه یونانی دارد و به معنای افتادن برگ از درخت است. در مواردی که زنده ماندن یک سلول، موجودیت موجود زنده را به خطر بیندازد، سلول با مرگ برنامه‌ریزی شده، خودکشی می‌کند. زمانی که سلول تحت تأثیر عوامل مختلف محیطی و یا حتی درونی، همانند اشعه‌های یونیزه کننده، داروهای سیتوتوکسیک (در درمان سرطان‌ها) هایپرترمیا، هورمون‌های گلوکوکوررتیکوئیدی و .. قرار می‌گیرد درونمایه آن از جمله DNA، دستخوش تغییراتی می‌شوند که در صورت ادامه حیات آن منجر به ناهنجاری‌هایی شدیدتری از جمله سرطانی شدن سلول می‌شوند. عوامل دیگری نظیر برخی باکتری‌های بیماری‌زای داخل سلولی مانند سالمونلا، شیگلا،

لیستریا، لژیونلا و ... نیز در هنگام عفونت‌زایی خود با تغییر، در برخی مسیرهای متابولیسمی و بیوشیمیایی داخل سلولی می‌توانند، در هدایت سلول به سمت این نوع خاص از مرگ موثر باشند(46).

مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، از طریق مسیرهای مختلفی، برانگیخته می‌شود، برخی از این مسیرها در اثر اتصال لیگاندهایی به گیرنده‌های سطح سلول، و برخی دیگر از این مسیرها در اثر فقدان برخی فاکتورهای رشد، راه‌اندازی می‌شوند. آسیب‌های شدید به ماده ژنتیکی سلول نیز، می‌تواند مسیرهای مختلفی، که منجر به آپوپتوز می‌شوند را راه‌اندازی کند.

1-7-1-1- دگرگونی‌های سلولی در هنگام آپوپتوز

در هنگام آپوپتوز حجم سلول کاهش یافته و در سلول ویزیکول‌های متعددی ایجاد می‌شوند. سپس کروموزوم‌ها متراکم شده و قطعه قطعه، می‌شوند. در مراحل بعد، غشا هسته از بین می‌رود و در آخر، سلول بصورت ویزیکول‌های کوچکی، به چندین قسمت تقسیم می‌شود. در طول آپوپتوز، اندامک‌های داخلی سلول، مانند، میتوکندری‌ها و لیزوزوم‌ها سالم می‌مانند. ویزیکول‌هایی که از قطعه قطعه شدن سلول پدید می‌آیند، بوسیله فاگوسیت‌ها، بلعیده می‌شوند و هضم می‌شوند(46)

1-7-1-2- مولکول‌های تنظیم‌کننده آپوپتوز:

1-2-7-1-1- پروتئین‌های خانواده B-cell lymphoma 2: مولکول BCL-2 ابتدا به عنوان پروانکوژن در لنفومال فولیکولار سلول‌های B شناسایی شد. سپس این مولکول به عنوان هومولوگ پستانداری یکی از اعضای اصلی آپوپتوز در C.elegance معرفی شد. BCL-2 یک پروتئین غشایی است که اساساً در غشای خارجی میتوکندری قرار دارد. نوزده عضو از خانواده BCL-2 در پستانداران شناسایی شده است. این خانواده چهار موتیف حفاظت شده BH1-BH2-BH3-BH4 دارد که باتوجه به فعالیت و ساختار به سه

دسته تقسیم شده‌اند: الف-اعضای ضد آپوپتوز که شامل حداقل دو موتیف حفاظت شده هستند: BCL-2 و BCL-XL و غیره. ب-اعضای پرو آپوپتوز که شامل چهار دسته حفاظت شده هستند (BCL-2-associated X protein) Bak, Bax و غیره. ج-شامل Bik, Bin, Bad و غیره هستند. این گروه تنها دارای موتیف حفاظت شده BH3 بوده و این ناحیه برای القای خاصیت شکنندگی کافی و ضروری است. اعضای ضد آپوپتوز و پرو آپوپتوز به صورت هترو دایمر در می‌آیند و به نظر می‌رسد که اعمال یکدیگر را معین می‌کنند.

1-1-7-2-2-کاسپازها: کاسپازها اجزای ترین عضو مجموعه هستند. نام کاسپازها (-cystenspartate proteinase) از عملکرد آنها گرفته شده است. این خانواده در پستانداران چهارده عضو دارد، که یازده عضو آنها آنزیم‌های انسانی هستند. این آنزیم‌ها مسیر مرگ را هماهنگ می‌کنند و با تجزیه سوبستراهای مخصوص خود نقش مهمی در پیشبرد مرگ سلولی دارند. بیان این پروتئازها به صورت پرو آنزیم (زیموژن) است و به وسیله شکسته شدن توسط سالین، کاسپازها یا گرانزیم B فعال می‌شوند. این آنزیم‌ها در حالت زیموژن سه ناحیه اصلی دارند: پیش‌دومین N-ترمینال، زیرواحد بزرگ شامل جایگاه فعال و زیرواحد کوچک شامل C-ترمینال. این سه ناحیه توسط آسپاراتات از هم جدا می‌شوند. کاسپازها پروتئازهای اختصاصی هستند و سوبسترای خود را از محل آسپاراتات خاصی که با توانایی کاسپاز سازگار است تجزیه میکنند و باعث تخریب پروتئین‌ها یا فعال شدن کاسپازهای دیگر می‌شوند. تمام کاسپازها به وسیله رویداد تجزیه‌ای پروتئازی فعال می‌شوند. کاسپاز فعال، تترامری شامل دو زیرواحد کوچک و دو زیرواحد بزرگ می‌باشد. اکتین، وایمنتین، کراتین و کاده‌رین سوبستراهای مناسبی برای کاسپازها محسوب می‌شوند. کاسپازها را از نظر تقدم و تاخر شرکت در فرآیند مرگ سلولی به دو دسته، آغازگر و اجرایی تقسیم میکنند. کاسپازهای آغازگر مانند کاسپاز 8 در ابتدای فرایند فعال می‌شوند و کاسپازهای اجرایی مانند کاسپاز 3 در مراحل بعدی و توسط کاسپازهای آغازگر فعال شده و آبشار کاسپازی را به راه می‌اندازند.

1-1-7-2-3- ممانعت کننده‌های کاسپازی: سلول‌های طبیعی ممانعت کننده‌های خاصی را علیه کاسپازها به کار می‌گیرند. این پروتئین‌های مهارکننده IAP (Inhibitor of apoptosis protein) نام دارند و اولین بار در باکولوویروس‌ها شناسایی شدند ولی به تدریج همولوگ‌های انسانی آنها نیز شناسایی شد. اتصال ممانعت کننده‌ها به کاسپازها و مهارکنندگی آنها به وسیله نواحی BIR Bacculoviral inhibition apoptosis (protein repeat) موجود در IAP رخ می‌دهد. ناحیه BIR حفاظت شده است و 70 اسیدآمینه دارد که به صورت پشت سرهم در باکولوویروس تکرار می‌شوند. میتوان گفت IAPها از طریق رقابت با سوبسترا برای اتصال به کاسپازها موجب ممانعت از فعالیت و در نهایت تخریب کاسپازهای شرکت کننده در فرآیند آپوپتوز می‌شوند.

1-1-7-2-4- مولکول P53: مولکول P53 یکی از مهمترین مهار کننده‌های چرخه تکثیر سلولی است که آن را محافظ ژنوم می‌نامند. این مولکول با ایجاد وقفه در مرحله G2 باعث مهار چرخه سلولی میشود و با القای آپوپتوز از ایجاد تومور جلوگیری میکند. تخریب DNA عامل اصلی فعالیت این مولکول است.

1-1-7-2-5- یون کلسیم: هرگاه میزان یون کلسیم درون سلولی به واسطه فعالیت گسترده پمپ Ca-ATPase افزایش یابد یا میزان کلسیم ورودی به اندامک‌هایی نظیر رتیкулوم اندوپلاسمی، هسته و مینوکندری زیاد باشد آنزیم‌های پروتئازی و اندونوکلازای وابسته به یون کلسیم فعال شده و مقدمات آپوپتوز فراهم می‌شود.

1-1-7-3- مسیرهای مرگ سلولی: بسته به اینکه پیام مرگ از چه طریقی به سلول ابلاغ شود مسیر فعال‌سازی مرگ سلولی متفاوت است. اگر پیام‌ها داخلی باشند اولین اندامک فعال شده میتوکندری خواهد بود. و اگر پیام از طریق رسپتورهای سطحی سلول بیان شود انتقال پیام از

طریق مولکول‌های سازگارکننده (اداپتور) به آبشار کاسپازی خواهد رسید. میزان مرگ سلولی

القا شده توسط رسپتورها شدیدتر از مسیر میتوکندریایی است.

1-1-3-7-1-1 مسیر رسپتوری: رسپتورهای مرگ رسپتورهای سطحی سلول هستند که پیام را از طریق

لیگاندهای مخصوص انتقال می‌دهند و آبشار کاسپازی را فعال می‌کنند. مهمترین رسپتورهای مرگ،

خانواده‌ی رسپتوری TNF شامل، CD95(fas)، TRAMP, TRAIL-1, TRAIL-2 TNFR-T, هستند. در

انتهای کربوکسیل این رسپتورها ناحیه درون‌سلولی به نام DD(death domain) وجود دارد. وقتی این

رسپتورها به لیگاند خود متصل می‌شوند مرگ سلولی اتفاق می‌افتد. اتصال TNF- α به رسپتور موجب

می‌شود مولکول TRADD (TNF-R associated death domain) از طریق واکنش DD به رسپتور

TNF متصل شود و خود TRADD هم با DD دوم به خود DD مولکول Fas- (FADDdeathdomain)

associated) اتصال یابد و FADD هم از طریق واکنش DED-DED(effecter death domain) به

پروکاسپاز 8 متصل شود. تجزیه و تبدیل پروکاسپاز 8 به کاسپاز 8 یا فرم فعال آن باعث راه‌اندازی آبشار

کاسپازی می‌شود. در مرحله بعد، کاسپاز اجرایی 3 فعال و به نوبه خود باعث فعال‌سازی سایر کاسپازهای

اجرایی و پیشرفت چرخه آپوپتوز می‌شود.

1-1-3-7-2-1 مسیر میتوکندریایی: میتوکندری اصلی‌ترین اندامک فعال در مسیر مرگ سلولی می‌باشد.

این اندامک با رهایی مولکول‌های فعال‌کننده مکانیسم خودکشی سلولی، به صورت مستقیم یا غیرمستقیم در

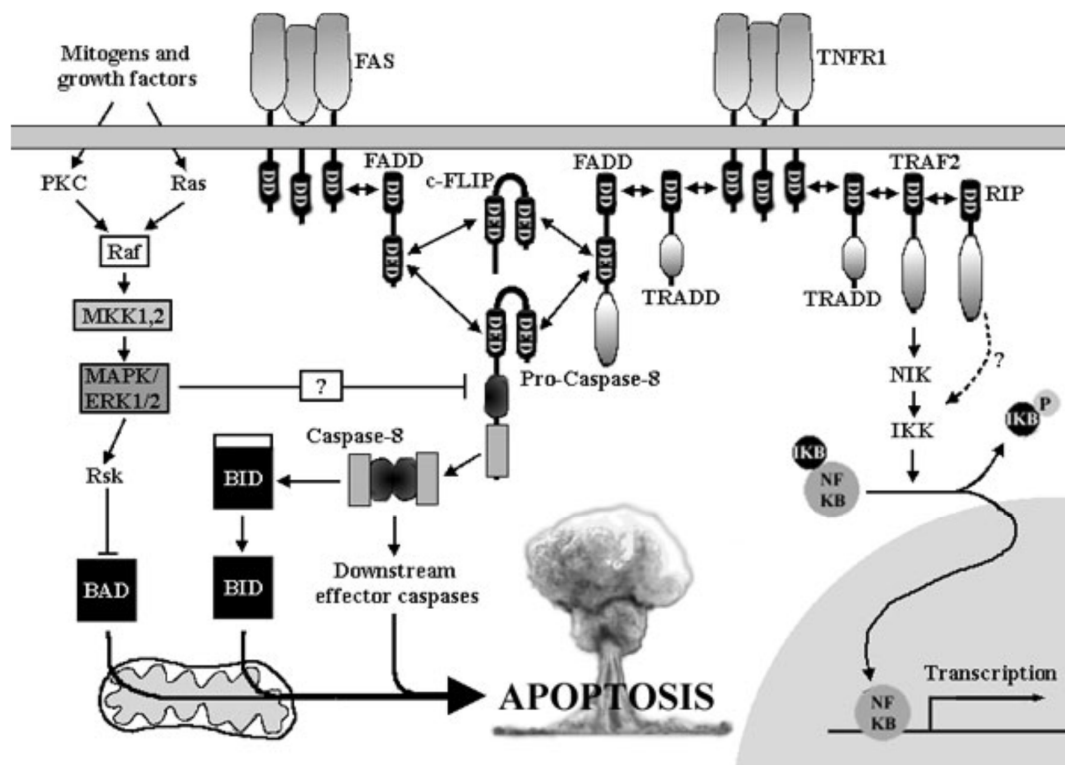
این فرایند شرکت می‌کند. برخی آنکوپروتئین‌ها مثل محصولات ژن‌های مهارکننده تومور، عوامل عفونت‌زای

ویروسی و عوامل دارویی می‌توانند از طریق تاثیر مستقیم بر روی میتوکندری، آپوپتوز را فعال کنند. این

پدیده به بیماری‌های مختلفی نظیر سرطان، تخریب عصبی و ایدز منجر می‌شود. آبشار کاسپازی با رهایی

سیتوکروم C از میتوکندری کامل می‌شود. مولکول‌های خانواده BCL-2 این مرحله را کنترل می‌کنند. سایر

اعضای خانواده، فعالیت Bak و Bax را القا می‌کنند و سبب افزایش نفوذپذیری غشای میتوکندری و خروج سیتوکروم C از میتوکندری می‌شوند. سیتوکروم C مسیر میتوکندری را تحریک می‌کند و به یک مولکول پروتئینی به نام Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) متصل می‌شود. این اتصال و ترکیب شدن به Apaf-1 اجازه می‌دهد که ساختار آن تغییر شکل یابد و چندین مولکول Apaf-1 به هم متصل شوند. در این صورت حالت چرخمانندی بوجود می‌آید که شامل هفت مولکول Apaf-1 است. این حالت چرخمانند آپوپتوزوم نام دارد و میتواند هفت مولکول کاسپاز 9 را به خدمت گیرد.



شکل 1-3: فرآیند آپوپتوز. تصویر بالا نشان دهندهی مسیر داخلی و خارجی آپوپتوز در سلول می‌باشد

1-1-8- کانال‌های پتاسیمی انواع و نقش آنها در تنظیم فعالیت سلول‌ها و نورون‌ها

کانال‌های پتاسیمی گسترده‌ترین کانال‌های یونی در تمامی موجودات زنده می‌باشند. آنها در نورون‌ها و در تنظیم سطح پتانسیل استراحت غشا، شکل، مدت زمان و فرکانس شلیک پتانسیل عمل نقش دارند. این

کانال‌ها همچنین نقش مهمی در تنظیم سطح تحریک‌پذیری سلول‌ها داشته و از این طریق فعالیت الکتریکی سلول‌ها را کنترل می‌کنند (14, 47).

این کانال‌ها پروتئین‌های ترانس‌ممبرانی هستند که نقش مهمی در عملکردهای طبیعی و پاتولوژیک تمامی سلول‌ها ایفا می‌کنند. کانال‌های پتاسیمی گوناگونی با اهداف درمانی در بیماری‌های پارکینسون آلزایمر و ایسکمی‌های مغزی و نخاعی شناسایی شده‌اند. برخی از کانال‌های پتاسیمی موجود در غشاهای پلاسمایی سلول‌های مختلف همچنین در غشای درونی میتوکندری آنها نیز به چشم می‌خورد. اینگونه تصور می‌شود که کانال‌های پتاسیمی در تنظیم پتانسیل غشای میتوکندری، تنفس سلولی، حجم ماتریکس، همئوستاز یون کلسیم، اسیدپتوز نقش دارند. 5 نوع کانال پتاسیمی که در ادامه ذکر می‌شوند در غشای پلاسمایی بافت‌های مختلف در غشای درونی میتوکندری نیز به چشم می‌خورند:

1-1 - کانال پتاسیمی وابسته به ATP regulated(-ATP)mitoK ATP

2- کانال پتاسیمی وابسته به کلسیم با هدایت بالا (large conductance ca^{2+} -mitoBK ca) (regulated)

1- کانال پتاسیمی وابسته به کلسیم با هدایت متوسط (medium conductance -mitoBK ca) (ca^{2+} -regulated)

2- کانال پتاسیمی وابسته به ولتاژ (Voltage-Gated -mitoKv 1/3 type)

3- کانال پتاسیمی (twin pore domain – mito TASK-3)

امروزه ثابت شده که افزایش جریان پتاسیم به درون میتوکندری سلول‌های مغزی توسط کانال ATP mitoK و کانال ca^{2+} mitoBK در شرایط پاتولوژیک اثرات سودمندی در بقای نورونی دارد. اخیراً توزیع افتراقی کانال‌های ca^{2+} mitoBK در میتوکندری‌های نورونی مشاهده شده است. این یافته‌ها نقش

neuroprotective کانال‌های Ca^{2+} BK_m را در ساختارهای مغزی خاصی مشخص می‌کند. پیشرفت‌های صورت گرفته در زمینه بیولوژی کانال‌های یونی طی 60 سال اخیر چشمگیرتر شده و امروزه تحقیقات کانال‌های یونی ادغامی از روش‌های الکتروفیزیولوژی فارماکولوژی زیست سلولی و ژنتیک می‌باشد. مطالعات ژنتیکی نشان داده‌اند که بیش از 80 ژن در پستانداران زیرواحدهای کانال‌های پتاسیمی غشای سلولی را کدگذاری می‌کنند. امروزه به خوبی آشکار شده است که کانال‌های پتاسیمی خاص موجود در غشای پلاسمایی بیشتر سلول‌ها انواع گوناگون فعالیت‌های سلولی را کنترل می‌کنند. شواهدی نیز بیان می‌کنند که نقایص کانال‌ها نقش اساسی در ایجاد بیماری‌های نورودژنراتیو ایفا می‌کنند. و نیز بیان شده که کانال‌های پتاسیمی میتوکندریایی راه اندازه‌ها و عمل‌کننده‌های نهایی طی فرآیند محافظت نوروئی می‌باشند اما مکانیسم این فرآیند هنوز بطور دقیق شناسایی نشده است (48).

1-8-1-1 کانال‌های پتاسیمی وابسته به ATP regulated ATP () میتوکندریایی: مطالعات بیوشیمیایی

و الکتروفیزیولوژیک شواهدی را مبنی بر حضور کانال‌های پتاسیمی ATP regulated در غشای درونی میتوکندری سلول‌های مختلف بیان می‌کنند. چنین کانال‌هایی در کبد، قلب، مغز، کلیه، عضله اسکلتی و نیز لنفوسیت‌های T انسانی شناسایی شده‌اند. علی‌رغم تلاش‌های صورت گرفته توسط گروه‌های مختلف اما هنوز ویژگی‌های مولکولی این کانال ناشناخته مانده است. مطالعات زیادی نشان داده‌اند که این کانال متعلق به خانواده کانال K^{+} inward rectifier می‌باشد. اخیراً پیشنهاد شده که مجموعه‌ای از 5 پروتئین در غشای درونی میتوکندری قادر به انتقال یون پتاسیم می‌باشند. این مجموعه شامل SDH ، $mABC1$ ، ANT ، PIC ، $ATPase$ می‌باشد. امروزه توسط تکنیک‌های Patch-Clamp نشان داده‌اند که کانال $mitoK^{+}$ ATP توسط کلسیم و نیتریک‌اکسید، کنترل و میانجیگری می‌شود. به علاوه مشاهده

شده که داروی بیهوشی Isoflurane مستقیماً باعث مهار فعالیت این کانال می‌گردد. داده‌هایی وجود دارد مبنی بر این که باز شدن این کانال‌های پتاسیمی طی فرآیند ایسکمی، دارای اثر محافظتی بر عملکرد نورون‌ها می‌باشد (49).

1-1-8-2- کانال پتاسیمی وابسته به کلسیم با هدایت بالا (large conductance Ca^{2+} -mitoBK ca regulated)

(regulated) میتوکندریایی: اولین گزارشات در مورد کانال مذکور در اثر مطالعات میکروالکترودی نورون‌های molluscan ایجاد گشت. از زمانی که تکنیک‌های Patch-clamp بکارگرفته شدند ثبت جریانات کانال که وابسته به سطح یون کلسیم می‌باشد به راحتی امکان‌پذیر شد و محققان 3 نوع کانال وابسته به کلسیم شناسایی کردند. بدین شرح:

-کانال پتاسیمی وابسته به کلسیم با هدایت بالا

-کانال پتاسیمی وابسته به کلسیم با هدایت متوسط

-کانال پتاسیمی وابسته به کلسیم با هدایت پایین

هریک از این کانال‌ها با توجه به ویژگی وابستگی به ولتاژ حساسیت به یون کلسیم و نیز فارماکولوژی‌شان آنالیز گشته‌اند. کانال پتاسیمی وابسته به کلسیم با هدایت بالا به صورت گسترده در غشای پلاسمایی سلول‌های تحریک‌پذیر و تحریک‌ناپذیر توزیع شده‌اند. کانال‌های مذکور در عضله صاف مغز و سلول‌های کرومافین و نیز در میتوکندری‌های سلول‌های مغزی و رده سلولی گلیومای انسانی یافت می‌شوند. این کانال تترامری از 4 زیر واحد α است. این کانال توسط یون کلسیم تحریک شده و توسط charybdotoxin مهار می‌شود. همچنین اخیراً مشاهده شده که کانال‌های یونی میتوکندریایی به کاهش سطح اکسیژن حساس می‌باشند. استفاده از تکنیک‌های Patch-clamp مشخص ساخته که هیپوکسی باعث مهار نفوذپذیری منافذ

کانال گشته اما در عوض باعث افزایش فعالیت کانال mitoBK ca در میتوکندری‌های کبد و آستروسیت‌های رت می‌گردد. پاسخ میتوکندریایی به تغییرات غلظت کلسیم سیتوزولی اثر شدیدی بر روی متابولیسم نوروها و بقای آنها دارد. مشاهده شده که اضافه کردن یون کلسیم به مغز رت‌ها باعث از بین رفتن پتانسیل غشای میتوکندری و در نتیجه افزایش تنفس میتوکندریایی می‌شود.

1-1-8-3- کانال پتاسیمی وابسته به کلسیم با هدایت متوسط (medium conductance -mitoIK ca)

ca^{2+} regulated میتوکندریایی: ویژگی‌های بیوفیزیکی این کانال مشابه کانالهای پتاسیمی وابسته به کلسیم موجود در غشای پلاسمایی می‌باشد. این کانال دارای ویژگی نفوذپذیری انتخابی به پتاسیم با محدوده هدایت (ps) 10 تا 90 میباشد. ویژگی‌های فارماکولوژیک کانال mitoIK ca مشابه کانال‌های یونی غشای پلاسمایی است. فعالیت این کانال در سطوح پایین کلسیم متوقف شده و مهار کننده‌های کانال Kca3/1 نظیر کلوتریمازول و TRAM-34 در غلظت‌های نانومولار از فعالیت این کانال جلوگیری می‌کنند. اما تاکنون کانالی مشابه کانال mitoIK ca در بافت مغزی مشاهده نشده است (50).

1-1-8-4- کانال پتاسیمی وابسته به ولتاژ (Voltage Gated) میتوکندریایی: این کانال‌ها خانواده‌ای از

کانال‌های یونی هستند که توسط تغییرات پتانسیل غشایی تنظیم می‌شوند. کانال‌های مذکور در حین بازگشت سلول دپلاریزه به حالت استراحت ایفای نقش می‌کنند. کانال پتاسیمی نوع Kv1.3 به صورت اولیه در لنفوسیت‌های T بیان شده، اما در کلیه اپیتلیوم‌ها و دستگاه عصبی مرکزی نیز حضور دارد. همچنین نشان داده شده که کانال‌های پتاسیمی نوع Kv1.3 در تکثیر و نیز تنظیم حجم سلول نقش داشته و بدین ترتیب عدم عملکرد کانال‌های وابسته به ولتاژ باعث ایجاد بیماری‌های قلبی عصبی و اختلالات ایمنی می‌گردد. مطالعات صورت گرفته در سال

2005 نوعی کانال Kv1.3 حساس به margatoxin در میتوکندری‌های لنفوسیت T شناسایی شد. همچنین داده‌های بیوفیزیکی بیوشیمیایی فارماکولوژیک و نیز ژنتیکی بیان این نوع کانال را در میتوکندری لنفوسیت‌ها تایید کردند. ابتدا مطالعات میکروسکوپ الکترونی بر روی لنفوسیت‌های خون محیطی نشان داد که این نوع کانال در غشای درونی میتوکندری حضور دارد. بعدها مطالعات Patch-clamp حضور این نوع کانال را در غشای درونی میتوکندری با ویژگی‌هایی مشابه آنچه در غشای پلاسمایی وجود دارد. پس نشان داده شده که این کانال هم در میتوکندری و هم در غشای پلاسمایی وجود داشته اگرچه توالی پایانه انتهایی N میتوکندریایی وجود ندارد. امروزه بر این عقیده‌اند که کانال Kv1.3 میتوکندریایی ممکن است فاکتور مهمی در انتقال پیام‌های آپوپتوزی باشد (51).

5-8-1-1- کانال پتاسیمی Twin-Pore Domain میتوکندریایی: کانال TASK-3 که عضوی از خانواده کانال پتاسیمی Twin-Pore Domain می‌باشد دارای 4 جز ترانس‌ممبران می‌باشد. این کانال‌های حساس به اسید نوعی کانال معکوس‌کننده رو به داخل (Inward Rectifier) ضعیفی می‌باشند. توزیع بافتی این کانال گسترده بوده و در هر دو سلول‌های تحریک‌پذیر و تحریک‌ناپذیر یافت می‌شوند. کانال‌های مذکور در برخی اعمال فیزیولوژیک نظیر تنظیم تحریک نوروئی و نیز تنظیم مدت زمان وقایع پس سیناپسی دخالت دارند. اخیراً کانال TASK-3 در میتوکندری‌ها نیز مشاهده شده است. تحقیقات ایمونوشیمی و زیست مولکولی ثابت کرده‌اند که کانال TASK-3 در میتوکندری‌های ملانوما و سلول‌های کراتینوسیت نیز وجود دارند. اگرچه ویژگی‌های عملکردی کانال‌های TASK-3 در غشای درونی میتوکندری هنوز

ناشناخته است. اما بیان ژن مربوط به کانال پتاسیمی Twin-Pore Domain در میتوکندری‌های

مغزی ثابت شده است (9, 51).

9-1-1- مهار کننده‌های کانال‌های پتاسیمی: همانطور که ذکر شد، کاهش اندازه سلول و فعال

شدن کاسپازها از ویژگی خاص آپوپتوز می‌باشد. کارهای در دست انجام پیشنهاد

کرده‌اند که تغییراتی در جریانات یونی، خصوصاً یون پتاسیم نقش محوری در پدیده

آپوپتوز دارد. در سلول‌های عصبی و ایمنی در طی پدیده آپوپتوز یون پتاسیم داخل

سلولی به شدت کاهش می‌یابد و خود این امر منجر به فعال شدن کاسپاز 3 و ایجاد

آپوپتوز می‌شود. افزایش جریان یون پتاسیم می‌تواند توسط فعالیت شدید کانال‌های

پتاسیمی وابسته به ولتاژ انجام شود. طی یک سری تحقیقات نشان داده شده که

تترااتیل‌آمونیم (TEA)، 4آمینوپیریدین (4AP) و سایر مهارکننده‌های کانال‌های پتاسیمی

باعث محدود شدن مرگ آپوپتوزی سلول‌ها در نورون‌های قشری کشت داده شده،

سلول‌های کبدی و قشر مخ رت‌ها می‌گردد. 4AP دارویی است که در غلظت‌های

میلی‌مولار کانال‌های پتاسیمی و آپوپتوز را مهار می‌کند (8, 52)

دندروتوکسین (Dendrotoxin)، یک نوع مهار کننده کانال‌های پتاسیمی وابسته به ولتاژ نوع A باعث

آسیب‌های حرکتی و نیز آسیب به نئوکورتکس و ساب‌کورتکس می‌گردد. در مقابل، 4آمینوپیریدین، یک

مهارکننده وسیع‌الطیف کانال‌های پتاسیمی، باعث ایجاد آسیب حرکتی شده و از مرگ نورونی جلوگیری

می‌کند (6).

1-1-10- تترائیل آمونیوم:

تترائیل آمونیوم (TEA) یا (Et_4N^+) یک کاتیون 4 آمونیومی است که توسط چهار گروه اتیل به یک اتم نیتروژن مرکزی متصل شده و دارای بار مثبت می باشد. این ماده در نمک های ساده نظیر تترائیل آمونیوم کلرید، تترائیل آمونیوم برمید، تترائیل آمونیوم یدید و تترائیل آمونیوم هیدروکسید یافت میشود. نمک های تترائیل آمونیوم در فرآیندهای شیمیایی مورد استفاده قرار گرفته ولی امروزه استفاده های مختصری نیز در موارد بالینی داشته و به صورت گسترده در تحقیقات فارماکولوژیک استفاده میشوند.

1-1-10-1- آماده سازی: یکی از روش های مستقیم آماده سازی نمک ساده حاوی یون تترائیل

آمونیوم از واکنش بین تری اتیل آمین و اتیل هالید ایجاد میشود. این روش برای ایجاد تترائیل آمونیوم یدید بسیار مناسب است. کاتیون تترائیل آمونیوم ممکن است در ارتباط با انواع مختلف آنیون ها باشد که ممکن است برخی از آنها کاملاً پیچیده باشند و آماده سازی آنها مستلزم فرآیندهای پیچیده ای باشد (53, 54).

1-1-10-2- کاربرد: ویژگی شیمیایی اصلی نمک های تترائیل آمونیوم توانایی این یون برای

شرکت در فرآیندهای انتقال فاز می باشد. به طور معمول 4 گروه اتیل که نیتروژن را احاطه کرده اند، برای انتقال یون بین فازهای آلی و آبی بسیار کوچک می باشند (55, 56).

1-1-10-3- فارماکولوژی: ویژگی های فارماکولوژیک این دارو گسترده اند و تحقیقات در این

رابطه همچنان ادامه دارد. واضح است TEA که گانگلیون های خود کار را مهار میکند و اولین داروی مهارکننده گانگیونیک است که به دنیای پزشکی معرفی شده است. این دارو اثراتی هم در اتصال عصبی عضلانی و در پایانه های سمپاتیک دارد. این دارو مدت

هاست که به عنوان مهارکننده کانال های پتاسیمی وابسته به ولتاژ در عصب شناخته شده و از این طریق در پایانه های عصبی سمپاتیک ایفای نقش میکند. همچنین نشان داده شده که این دارو مهارکننده رسپتورهای نیکوتینی استیل کولین نیز می باشد. اگرچه جزئیات و مکانیسم اثر این فرایند پیچیده می باشد. این دارو کانال های پتاسیمی وابسته به کلسیم نظیر کانال هایی که در عضله اسکلتی و سلول های هیپوفیزی یافت می شوند را مهار می کنند. اگرچه TEA کاربردهای کلینیکی گوناگونی شامل درمان هایپر تانسیون دارد ، اما کاربرد گسترده این دارو استفاده از آن به عنوان یک ردیاب برای بررسی ظرفیت اتساع عروق در موارد بیماری های عروقی می باشد. اما امروزه به دلیل ریسک بالای استفاده از آن و اثرات کشنده آن، داروهای دیگری جایگزین آن شده اند (57, 58).

TEA مصرف خوراکی نداشته و معمولا دوز (400-500mg) آن به صورت داخل وریدی استفاده میشود. علائمی که پس از مصرف این دارو در فرد ایجاد میشود شامل خشکی دهان ، کاهش ترشحات معدی ، کاهش چشمگیر انقباضات معده ، فلج مثانه و از بین رفتن حس برخی از دردها می باشد. در تمامی بررسی ها و مطالعات انجام شده با TEA به نظر میرسد که نمک کلرید یا برمید اثر یکسانی دارند. اما قابل ذکر است که Birchall و همکارانش در آزمایشات خود استفاده از تترا اتیل آمونیوم کلرید را به منظور اجتناب از اثرات آرام بخشی یون برمید ترجیح داده اند (59-61).

1-10-4- سمیت زایی: در سال 1948 مطالعات گسترده ای برای ارزیابی سمیت زایی تترا اتیل آمونیوم کلرید بر روی موش ، رت و سگ صورت گرفت. محققان دریافتند که متعاقب دریافت دوزهای سمی تزریقی ، علائمی شامل ترمور، ناهماهنگی حرکتی ، شلی عضلات

و مرگ در اثر نارسایی تنفسی و قلبی ظرف 10 الی 30 دقیقه ایجاد میگردد. سگ ها نیز همین علائم را به علاوه آریتمی، ایست تنفسی و قلبی ، پتوزیس و مرگ در اثر فلج و کلاپس عضلات تنفسی نشان میدهند. اما متعاقب دریافت دوزهای غیرکشنده این علائم ظرف 15 الی 60 دقیقه از بین می روند.(62-65).

1-2-2- اهداف و فرضیات

1-3-1- هدف اصلی طرح

بررسی اثر پیش تیمار با TEA بر ایجاد بیماری پارکینسون در مدل حیوانی 6- هیدروکسی دوپامین

1-3-2- اهداف فرعی

1-2-3-1- بررسی اثر دوز 5mg/kg TEA بر ایجاد بیماری پارکینسون در مدل حیوانی 6-

هیدروکسی دوپامین

1-2-3-2- بررسی اثر دوز 2mg/kg TEA بر ایجاد بیماری پارکینسون در مدل حیوانی 6- هیدروکسی

دوپامین

1-3-4- اهداف کاربردی

در صورت مثبت بودن نتایج تکرار آزمایش در دیگر مدل های حیوانی پارکینسون توصیه می گردد.

1-3-5- فرضیه ها یا سؤال های پژوهش:

1-3-5-1- آیا پیش تیمار با دوزهای پایین TEA در موش های دریافت کننده سم

6- هیدروکسی دوپامین از تعداد چرخش های القاء شده با اپومرفین نسبت به گروه

پیش تیمار نشده می کاهد؟

1-3-5-2- آیا پیش تیمار با دوزهای بالای TEA در موش های دریافت کننده سم

6- هیدروکسی دوپامین از تعداد چرخش های القاء شده با اپومرفین نسبت به گروه

پیش تیمار نشده می کاهد؟

فصل دوم

مروری بر متون

بیماری پارکینسون یک بیماری نورودژنراتیو است که به واسطه از دست رفتن نورون‌های دوپامینرژیک مغز میانی و کاهش متعاقب دوپامین در استریاتوم ایجاد می‌گردد. استریاتوم قسمتی از عقده‌های قاعده‌ای مغز می‌باشد. کانال‌های پتاسیمی به طور گسترده در عقده‌های قاعده‌ای مغز بیان شده‌اند به نظر می‌رسد اختلال در این کانال‌های پتاسیمی در پاتوژنز بیماری پارکینسون نقش داشته باشد (12).

کانال‌های پتاسیمی نقش زیادی در تنظیم شلیک نورون‌ها ایفا می‌نمایند. جریان‌ات یونی از این کانال‌ها مدت زمان و ریپولاریزاسیون پتانسیل عمل، هیپرپلاریزاسیون متعاقب اسپایک اول و تاخیری و فاصله بین اسپایک‌های سدیمی را تنظیم می‌نمایند. مهار این کانال‌ها سبب دپولاریزاسیون نورون‌ها، افزایش فرکانس شلیک و تغییر الگوی شلیک از حالت تونیک به حالت انفجاری می‌شود. مطالعات الکتروفیزیولوژیکی نشان داده‌اند که کانال‌های پتاسیمی متفاوتی در نورون‌های پستانداران وجود دارند (9, 66).

شواهد روزافزون نشان می‌دهند که فعالیت الکتریکی نیز ممکن است در مرگ و بقای نورونی نقش داشته باشند. در مغز بزرگسالان تغییراتی در جریان‌ات یونی می‌تواند به طور فعال در مرگ سلول‌های عصبی در بیماری پارکینسون نقش داشته باشد. فعالیت نورون DA نه تنها برای کنترل ترشح دوپامین بلکه برای بقای نورون‌ها در طی تکامل مغز ضروری می‌باشد. فاکتور نوروتروفیک مشتق از سلول‌های گلیال (GDNF) عامل محافظت نورونی برای فعالیت کانال‌های پتاسیمی نوع A محسوب می‌شود. این نشان می‌دهد که ممکن است GDNF با مهار کانال‌های پتاسیمی نوع A در بقای سلول نقش داشته باشد (6, 67).

Wood fork KA و همکارانش دریافتند که مهار کانال‌های پتاسیمی حساس به ATP باعث توقف چرخه سلولی برگشت پذیر سلول‌های سرطان پستان در فاز (G0/G1) در محیط کشت می‌شود. آنها میزان

تکثیر و گسترش چرخه سلولی سلول‌های سرطان پستان را به هر یک از آنتاگونیست‌های کانال‌های پتاسیمی بررسی کردند. از بین داروهایی که استفاده کردند تنها کنیدین و گلیبن‌کلامیدولینوگلیریدبر روی MCF چرخه سلولی، زنده ماندن و توزیع چرخه سلولی اثر گذاشتند (7).

Skryma RN و همکاران در سال 1997 بر روی قابلیت هدایت پتاسیم و نقشش روی تکثیر سلول‌های LNCaP و سلول‌های سرطان پروستات حساس به آندروژن کار کردند، و دریافتند سلول‌های سرطانی پروستات LNCaP دارای نوع جدیدی از کانال‌های پتاسیمی هستند که نقش مهمی در فیزیولوژی و عملکرد پاتولوژیکی این سلول‌ها و به طور خاص در تکثیر سلولی ایفا می‌کنند که این کانال‌های پتاسیمی با افزایش کلسیم داخل سلولی و TEA به میزان 2 میلی‌مول و 2 نانومول دتروتوکسین (DTX) مهار می‌شوند (6).

از طرف دیگر نشان داده شده است که فعالیت آنزیم‌ها، نوکلئازها و کاسپازها که سیگنال‌های مرگ را هدایت و تقویت می‌نمایند و از این طریق سبب آپوپتوزیس می‌شوند، وابسته به یون پتاسیم می‌باشند.

Grishin A و همکارانش در سال 2005 دریافتند مهار کانال‌های پتاسیمی در آنتروسیت‌های روده‌ای سبب تضعیف آپوپتوز می‌شود. جریان پتاسیم در روند آپوپتوز سلول‌های آنتروسیت ضروری است و به زودی اتفاق می‌افتد آنها دریافتند استفاده از مهارکننده‌های کانال‌های پتاسیمی مانند TEA، 4AP، استروماتوکسین از شکسته شدن DNA، فعالیت کاسپازها و رها شدن سیتوکروم C از میتوکندری و کاهش پتانسیل غشای میتوکندری و در نتیجه آپوپتوز جلوگیری می‌کند (52).

Hernandez-Enriquez و همکارانش در سال 2010 نقش جریان‌های یون پتاسیم را روی مرگ سلولی و کاهش حجم آپوپتوتیک در نوروئوم‌های گرانولار مخچه‌ای کشت داده شده، بررسی کردند آنها دریافتند نوروئوم‌های گرانولار مخچه‌ای (CGN) در 3 حالت دچار آپوپتوز و کاهش حجم آپوپتوتیک می‌شوند: تحت تاثیر استارواسپورین‌ها، تحت تاثیر کامپتوتیسین (CPT) یا وقتی که سلول‌ها از پتاسیم خارج سلولی بالا (25mM) به

پتاسیم خارج سلولی کم (5mM) منتقل می‌شوند. سپس آنها دریافتند دو نوع مختلف مهارکننده‌های کانال‌های پتاسیمی یعنی سزیم و TEA از کاهش حجم آپوپتوتیک و آپوپتوز نورون‌های (CGN) جلوگیری می‌کند (68).

JIA chun-hong و همکارانش در سال 2009 بر روی پیناسیدیل که یک بازکننده کانال‌های پتاسیمی وابسته به ATP است کار کردند و دریافتند پیناسیدیل، می‌تواند بیان BCL2، mRNA و پروتوئین را افزایش دهد. همینطور آپوپتوز نورونی را کاهش دهد و در نهایت آسیب سلولی PC12 را که به وسیله ایسکمی و هایپوکسی ایجاد شده بود را تضعیف کند (69).

YU Sp و همکارانش در سال 1999 بر روی نقش جریان‌های پتاسیمی یکسوکننده تاخیری در فعالیت کاسپاز و آپوپتوز القاشده با سرامید در نورون‌های قشری کشت داده شده، کار کردند و دریافتند افزایش پتاسیم خارج سلولی به 25 میلی‌مول مرگ سلولی القاشده با 2 سرامید را مهار می‌کند و اثر حفاظت نورونی بوسیله 25 میلی‌مول یون پتاسیم یا TEA به وسیله مهار کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ از بین نرفته بود. یک مهارکننده تیروزین کیناز، Herbimycin A و lavendustin A، افزایش یون پتاسیم و یا آپوپتوز القاشده با 2 سرامید را سرکوب می‌کند. آنها در نهایت پیشنهاد کردند که افزایش جریان یون پتاسیم القاشده با سرامید به وسیله فسفوریلاسیون تیروزین، نقش حیاتی در آپوپتوز نورونی ایفا می‌کند (70).

Aizenman و همکاران در سال 2000 گزارش دادند، 2'-2'-dithiodipyridine (DTDP) که باعث القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در سلول‌های عصبی گشته می‌تواند توسط مهارکننده کانال‌های پتاسیمی (TEA) و یا سطوح بالای پتاسیم خارج سلولی مهار گردد (71).

Shi L و همکاران در سال 2009 نشان داد که کانال‌های پتاسیمی در مرگ آپوپتوزی القا شده با روی، در سلول‌های MES23.5 درگیر می‌باشند. آنها متوجه شدند که چگالی جریان K^+ متعاقب درمان با 60 میلی‌مول روی در مدت 4-8 ساعت افزایش یافته بود. پس از تزریق 20

میلی مول TEA جریان پتاسیم به طور کامل مسدود شده بود. این داده‌ها نشان می‌دهد که اثر آپویتوزی

مذکور ممکن است به علت افزایش فعالیت TEA-کانال‌های پتاسیمی حساس به TEA باشد (72).

فصل سوم

مواد و روش‌ها

1-3 مواد:

تترا اتیل آمونیوم (TEA)

سم 6 هیدروکسی دوپامین (6-OHDA)

آپومورفین

موش صحرائی نر

کتامین

گزیلازین

ست جراحی

سرنگ انسولین

سرنگ هامیلتون 10 میکرولیتر

غذای حیوانات

اسید اسکوربیک

نرمال سالین

پنبه و الکل

دستکش و ماسک

6 هیدروکسی دوپامین، آپومورفین، تترااتیل آمونیوم از شرکت sigma خریداری شده‌اند و اسید اسکوربیک از MERCK خریداری شده است

سم 6 هیدروکسی دوپامین و آپومورفین بلافاصله قبل از تزریق آماده می‌شدند. تترااتیل آمونیوم نیز به صورت حل شده در نرمال سالین وجود داشت.

2-3 نمونه حیوانی و گروه‌های آزمایشی:

موش‌های صحرانی نر بالغ از نژاد ویستار (n=48) در محدوده وزنی 250-300g که از موسسه رازی (کرج) خریداری شده‌اند. این موش‌ها در حیوان‌خانه دانشگاه در قفس‌های بزرگی با ابعاد ۲۰×۵۹×۳۸ در اتاقی با درجه حرارت کنترل شده و شرایط 12 ساعت روشنایی و 12 ساعت تاریکی، و در حالی که به آب و غذا به صورت نامحدود دسترسی داشتند نگهداری شده‌اند. موش‌ها در شروع آزمایش به 6 گروه تقسیم شدند: 1- گروه سالین حاد که 0/1 میلی لیتر سالین مطابق الگوی دیگر گروه‌های حاد دریافت کردند (n=8). 2- گروه TEA مدل حاد بادوز کم که از نیم ساعت قبل از تزریق سم 6-OHDA تا 7 روز پس از آن روزی 2 بار 2 میلی گرم به ازای هر کیلو وزن بدن TEA به صورت درون صفاقی دریافت کردند (n=8). 3- گروه TEA مدل حاد با دوز زیاد که از نیم ساعت قبل از تزریق سم 6-OHDA تا 7 روز پس از آن روزی 2 بار 5 میلی گرم به ازای هر کیلو وزن بدن TEA به صورت درون صفاقی دریافت کردند (n=8). 4- گروه سالین مزمن که 0/1 میلی لیتر سالین مطابق الگوی دیگر گروه‌های مزمن دریافت کردند (n=8). 5- گروه TEA مدل مزمن با دوز کم که از نیم ساعت قبل از تزریق سم تا 15 روز پس از آن روزی 2 بار 5 میلی گرم به ازای هر کیلو وزن بدن TEA به صورت درون صفاقی دریافت کردند (n=8). 6- گروه TEA مدل مزمن با دوز زیاد که از نیم ساعت قبل از تزریق سم تا 15 روز پس از آن روزی 2 بار 5 میلی گرم به ازای هر کیلو وزن

بدن TEA به صورت درون صفاقی دریافت کردند (n=8). بر روی تمامی موش‌ها جراحی استرئوتاکسیک و تزریق سم 6-OHDA انجام شد. نتایج یک گروه دیگر به نام گروه موش‌های سالم (n=10) در تحلیل نتایج آزمون روتارد استفاده شد. موش‌های سالم جراحی نشدند و سم 6-OHDA و یا داروی دیگری دریافت نکردند.

3-3- طراحی تحقیق

روش انجام این تحقیق شامل 3 مرحله می‌شد:

- 1- پیش تیمار با مهارکننده‌های کانال‌های پتاسیمی
- 2- جراحی استرئوتاکسیک و تزریق سم 6-هیدروکسی دوپامین
- 3- انجام آزمون‌های رفتاری

3-4- روش انجام این تحقیق برای گروه‌های حاد شامل:

1- پیش تیمار با مهارکننده‌های کانال‌های پتاسیمی: همه گروه‌ها به غیر از گروه موش‌های سالم، از نیم ساعت قبل از جراحی تترااتیل آمونیوم را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. و تزریقات هر 12 ساعت (روزی 2 بار) انجام شد و تا 1 هفته پس از جراحی تزریقات ادامه داشت.

2- جراحی استرئوتاکسیک و تزریق سم 6-هیدروکسی دوپامین: حیوانات را در ابتدا با استفاده از تزریق کتامین / زایلازین (6/60 mg/kg) به صورت داخل صفاقی بیهوش کرده و سپس در دستگاه استرئوتاکس قرار داده شدند (شکل 3-1). در پوست سر یک برش طولی به اندازه 2 سانتیمتر ایجاد شده و سطح استخوان آشکار می‌شود. سپس نقطه برگما مشخص شده و با استفاده از دستگاه استرئوتاکس و به کمک اطلس پاکسینوز و واتسون (73) محل مورد نظر تزریق با مختصات زیر نشانه‌گذاری می‌گردد (شکل 3-2).

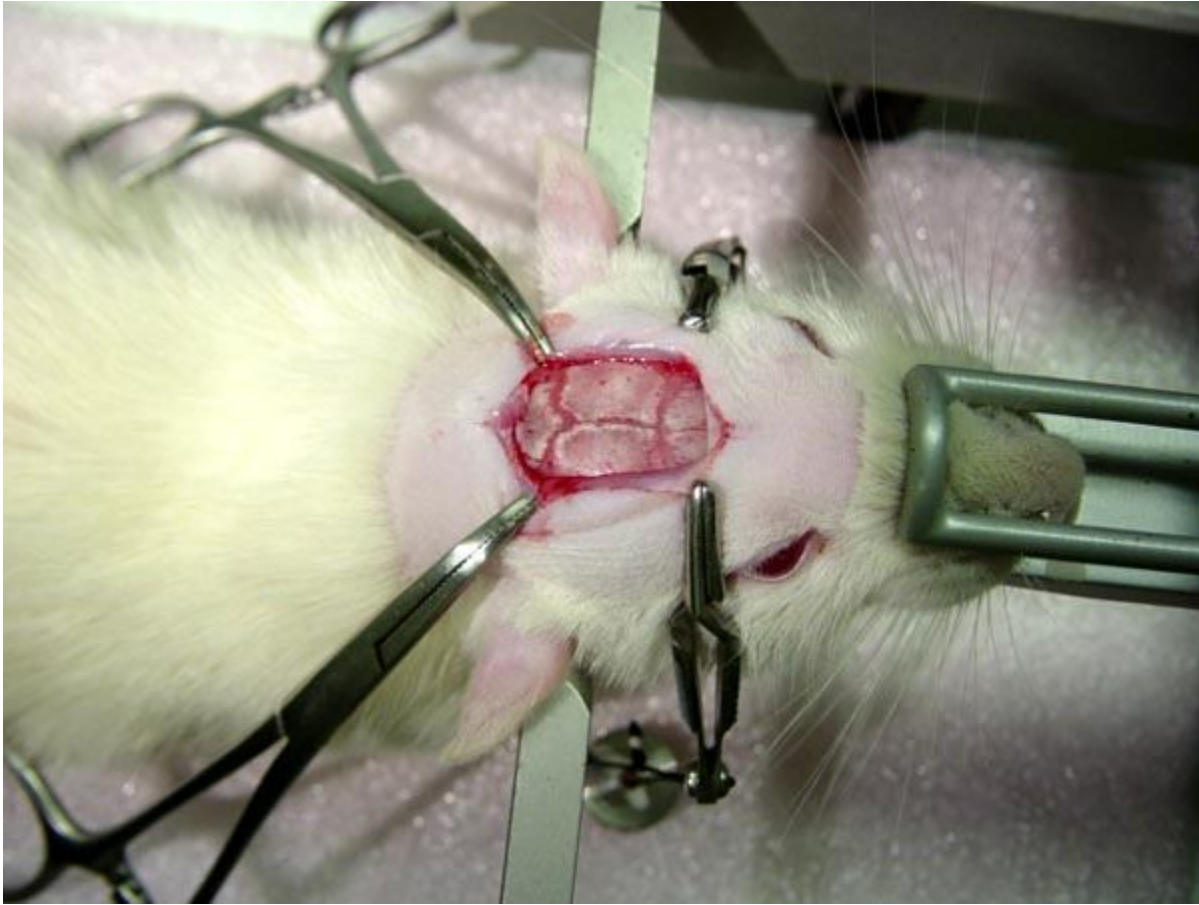
AP	-4	-4.4
L	-0.8	-1.2
V	-8	-7.8

سپس سطح جمجمه با مته دندانپزشکی سوراخ گردیده. و با استفاده از سرنگ هاملتون 6 میکرولیتر از محلول حاوی سم نورو توکسیک 6-OHDA هیدروبروماید (با غلظت 15-10 میکروگرم حل شده در سالین حاوی 0/2 درصد اسید اسکوربیک) به 2 ناحیه در دسته میانی مغز جلوئی (MFB) راست نزدیک جسم سیاه تزریق گردید. سم 6-OHDA به آهستگی و در عرض 5 دقیقه تزریق شد، در پایان سرنگ برای 5 دقیقه در محل خود نگه داشته و به آهستگی با سرعت 1mm/min از مغز بیرون آورده شد (شکل 3-3).

3- انجام آزمون‌های رفتاری: در هفته‌های سوم، پنجم و هشتم پس از جراحی استرئوتاکسی و تزریق سم 6-OHDA آزمون چرخش القاء شده با آپومرفین و پیچش بدن بالارفته انجام گرفت و در هفته هفتم آزمون روتارد انجام گرفت.



شکل 3-1: موش‌ها را پس از بیهوش کردن در دستگاه استرنوتاکس قرار می‌دهیم



شکل 3-2: نقطه برگما یعنی همان محل مورد نظر تزریق نشانه گذاری می شود.



شکل 3-3: سپس سطح جمجمه با مته دندانپزشکی سوراخ گردیده. و با استفاده از سرنگ هامیلتون محلول حاوی سم نورو توکسیک 6-OHDA به ناحیه MFB یا استریاتوم تزریق می شود. سم 6-OHDA به آهستگی و در عرض 5 دقیقه تزریق می شود، در پایان سرنگ برای 5 دقیقه در محل خود نگه داشته و به آهستگی با سرعت 1mm/min از مغز بیرون آورده می شود.

3-5- روش انجام این تحقیق برای گروه‌های مزمن شامل:

1- پیش‌تیمار با مهارکننده‌های کانال‌های پتاسیمی: همه گروه‌ها به غیر از گروه موش‌های سالم از نیم

ساعت قبل از جراحی تترااتیل آمونیوم را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. و تزریقات هر

12 ساعت (روزی 2 بار) انجام شد و تا 2 هفته پس از جراحی تزریقات ادامه داشت.

2- جراحی استرئوتاکسیک و تزریق سم 6-هیدروکسی‌دوپامین: حیوانات را در ابتدا با استفاده از تزریق

کتامین/زایلازین (6/60 mg/kg) به صورت داخل صفاقی، بیهوش کرده و سپس در دستگاه استرئوتاکس قرار

داده شدند (شکل 3-1). در پوست سر یک برش طولی به اندازه 2 سانتیمتر ایجاد شده و سطح استخوان

اشکار می‌شود. سپس نقطه برگما مشخص شده و با استفاده از دستگاه استرئوتاکس و به کمک اطلس

پاکسینوز و واتسون (73) محل مورد نظر تزریق با مختصات زیر نشانه‌گذاری می‌گردد (شکل 3-2).

AP	1.50	0.8	0.1	-0.5
L	-2.5	-3	-3.2	-3.6
V	6	6	6	6

سپس سطح جمجمه با مته دندانپزشکی سوراخ گردیده. و با استفاده از سرنگ هامیلتون 10 میکرولیتر از

محلول حاوی سم نوروتوکسیک 6-OHDA هیدروکلراید (با غلظت 15-10 میکروگرم حل شده در سالیین

حاوی 0/2 درصد اسید اسکوربیک) به 4 ناحیه در استریاتوم راست تزریق گردید. سم 6-OHDA به آهستگی

و در عرض 5 دقیقه تزریق شد در پایان سرنگ برای 5 دقیقه در محل خود نگه داشته و به آهستگی با

سرعت 1 mm/min از مغز بیرون آورده شد (شکل 3-3).

انجام آزمون‌های رفتاری: در هفته‌های چهارم، ششم و هشتم پس از جراحی استریوتاکسی و تزریق سم 6-

OHDA آزمون چرخش القاء شده با آپومرفین و پیچش بدن بالارفته انجام گرفت و در هفته هشتم آزمون

روتارد انجام گرفت .

3-6- آزمونهاى رفتارى

آزمون‌هاى رفتارى شامل موارد زير است:

(الف) آزمون چرخش القا شده با آپومورفين (آزمون چرخشى)

(ب) آزمون پيچش بدن بالارفته (elevated body swing test, EBST) (آزمون سوئينگ)

(ج) آزمون روتارد

در زير روش انجام هر يك از اين آزمونها شرح داده شده است:

3-6-1- آزمون چرخش القا شده با آپومورفين:

اين آزمون بر اساس روش بكار برده شده توسط فوجى و همكاران در سال 1996 صورت گرفت (74). به طور خلاصه چنانچه تزريق سم 6-OHDA سبب تخريب گسترده نورونى در هسته جسم سياه گردد 2 تا 4 هفته پس از جراحى موش‌ها در قبال تزريق آپومورفين چرخش‌هاى پي‌درپي را به سمت مقابل محل تزريق نشان مى‌دهند كه تعداد اين چرخش‌ها در واحد زمان معيارى از شدت تخريب نورونى در جسم سياه و تاثير مداخله مى‌باشد. براى اجراى اين آزمون ابتدا موش‌ها در داخل يك استوانه پلكسى‌گلاس شفاف با ابعاد 28 سانتى‌متر قطر و 38 سانتى‌متر ارتفاع قرار داده و به آنها 5 دقيقه جهت سازش با محيط زمان داده مى‌شود. سپس آپومورفين هيدروكلرايد 5/0 mg/kg حل شده در سالين به موش‌ها تزريق شده و 1 دقيقه پس از آن تعداد چرخش‌ها به طرف محل تزريق سم (عدد منفى) و يا خلاف آن (عدد مثبت) به مدت يك ساعت ثبت گرديده است. در پايان تعداد چرخش خالص موش‌ها به يك طرف با جمع جبرى اعداد بدست آمده محاسبه شده است.

3-6-2-آزمون پیچش بدن بالارفته (elevated body swing test, EBST):

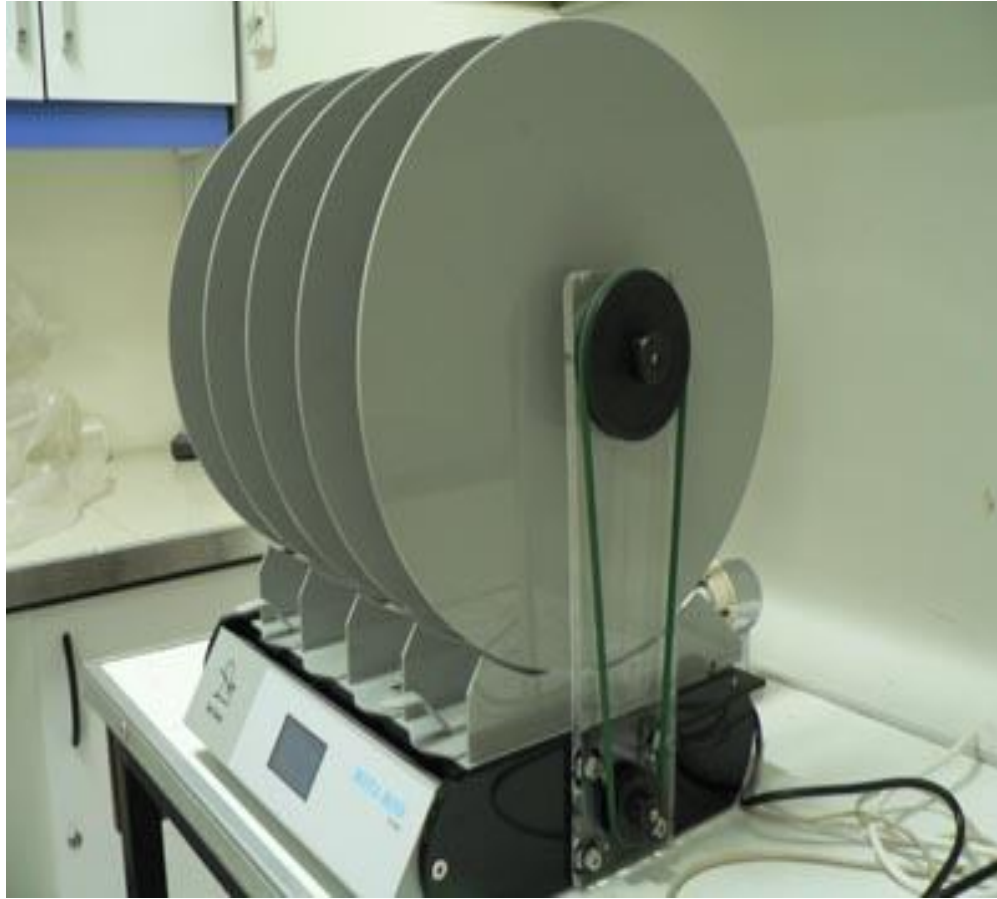
. این آزمون بر طبق روش شرح داده شده توسط Borlongan و همکاران در سال 1995 صورت گرفت (75). به طور خلاصه دم موش از محدوده 2 سانتی متری محل اتصال با بدن گرفته شده و به بالا آورده می شود به طوری که بینی حیوان 2 سانتیمتر بالای سطح اتکا قرار گیرد. در این حالت حیوان بدن خود را به سمت راست یا چپ می پیچاند که تعداد این پیچش ها به هر طرف نشان دهنده شدت بیماری می باشد. تعداد پیچش ها به راست یا چپ در مدت زمان 1 دقیقه شمارش و انحراف در پیچش بدن به این صورت محاسبه میشود: $(\%) R/(R + L)$ یا $(\%) L/(L + R)$ (تعداد پیچش به چپ = L و تعداد پیچش به راست = R) در حیواناتی که بوسیله سم 6-هیدروکسی دوپامین پارکینسونی شده اند این پیچش ها عمدتاً به سمت مقابل محل تزریق سم می باشد.

3-6-3- آزمون روتارود: آزمون روتارود توانایی اجرای فعالیت‌های حرکتی (motorperformance) را مورد ارزیابی قرار می‌دهد. با کمک این آزمون هماهنگی حرکات، حفظ تعادل و مهمتر از همه توانایی یادگیری حرکتی در حیوانات مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. از این رو این آزمون روتارود، آزمون معتبر و قابل اعتمادی در بررسی اختلالات بخش‌هایی از سیستم عصبی که درگیر کنترل حرکات می‌باشند (مانند منچچه و بازال گانگلیا) می‌باشد. روش اجرای آن اصولاً برگرفته از روش معرفی شده توسط لاندبلد و همکاران می‌باشد (76). به طور خلاصه، دستگاه روتارود شامل یک چارچوب پلاستیکی می‌باشد که در آن میله‌های استوانه‌ای با قابلیت چرخش در سرعت‌های مختلف تعبیه شده‌اند که حیوان می‌تواند بر روی آن قدم بزند. در این آزمایش سرعت چرخش میله‌های استوانه‌ای به گونه‌ای تنظیم می‌شود که در یک فاصله زمانی 120 ثانیه‌ای از 5 دور بر ثانیه به 40 دور بر ثانیه برسد (شکل 3-4). مدت زمانی که حیوان می‌تواند بر روی میله‌ها قدم بزند معیاری از توانایی اجرای حرکتی حیوان می‌باشد. این آزمون در 3 روز پشت سرهم هر روز 2 بار، با فاصله زمانی حداقل 1 ساعت (مجموعاً 6 جلسه) انجام می‌شود. داده‌ها یا آزمون روتارود بر اساس معیار ناحیه زیر منحنی (area under the curve (AUC) و بر اساس فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$AUC = \text{time on the rod (s)} \times [\text{time on the rod (s)} \times 0.44 / 2]$$

$$0.44 = \text{میزان شتاب سرعت چرخش میله گرداننده دستگاه در ثانیه}$$

حیوانات سالم پس از چند جلسه به خوبی یاد می‌گیرند که بر روی میله‌ها در تمام مدت آزمون قدم زده، تعادل خود را حفظ کرده و از افتادن خود از دستگاه جلوگیری نمایند. از طرف دیگر حیوانات با اختلالات حرکتی مثلاً حیوانات پارکینسونی و یا حیوانات مبتلا به آتاکسیا در انجام این آزمون ضعیف عمل کرده و اجرای آن را یاد نمی‌گیرند و یا دیر یاد می‌گیرند. اثرات درمان و یا پیش‌درمان‌های مختلف بر روی این بیماری‌ها در این آزمون آشکار خواهد شد.



شکل 3-4: تصویری از دستگاه روتارود 4 کاناله

3-7- روش جمع‌آوری و تجزیه و تحلیل داده‌ها:

تجزیه و تحلیل داده‌ها بر اساس نرم‌افزار اکسل بیان شده است. همچنین در تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها چنانچه داده‌ها از توزیع نرمال تبعیت نمایند از آزمون آنالیز واریانس به همراه آزمون تعقیبی توکی استفاده خواهد شد. چنانچه داده‌ها از توزیع نرمال تبعیت نمایند از آزمون کروسکال‌والیس استفاده خواهد شد و سطح معنی‌دار کمتر از 0.5 محاسبه شد.

فصل چهارم

نتایج و یافته‌ها

هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر مهارکننده TEA در پیشگیری از ایجاد بیماری پارکینسون بود.

از آنجایی که مهار کانال‌های پتاسیمی سبب افزایش تحریک‌پذیری و فعالیت الکتریکی نورون‌ها می‌شود که می‌تواند منجر به بروز تشنج شود (37)، قبل از شروع مطالعه آزمایشاتی برای یافتن دوز تحت تشنجی داروی TEA صورت گرفت. تجویز درون‌صفافی داروی TEA در دوزهای بالاتر از 10 میلی‌گرم به ازای هر کیلو وزن بدن سبب بروز تشنج و مرگ در موش‌های صحرایی گردید. ولی دوزهای 2 و 5 میلی‌گرم به ازای هر کیلو وزن بدن هیچگونه عوارض قابل مشاهده‌ای بر روی موش‌ها نداشت. از این رو در این تحقیق بالاترین دوز بکار رفته دوز 2 و 5 میلی‌گرم به ازای هر کیلو وزن بدن بود.

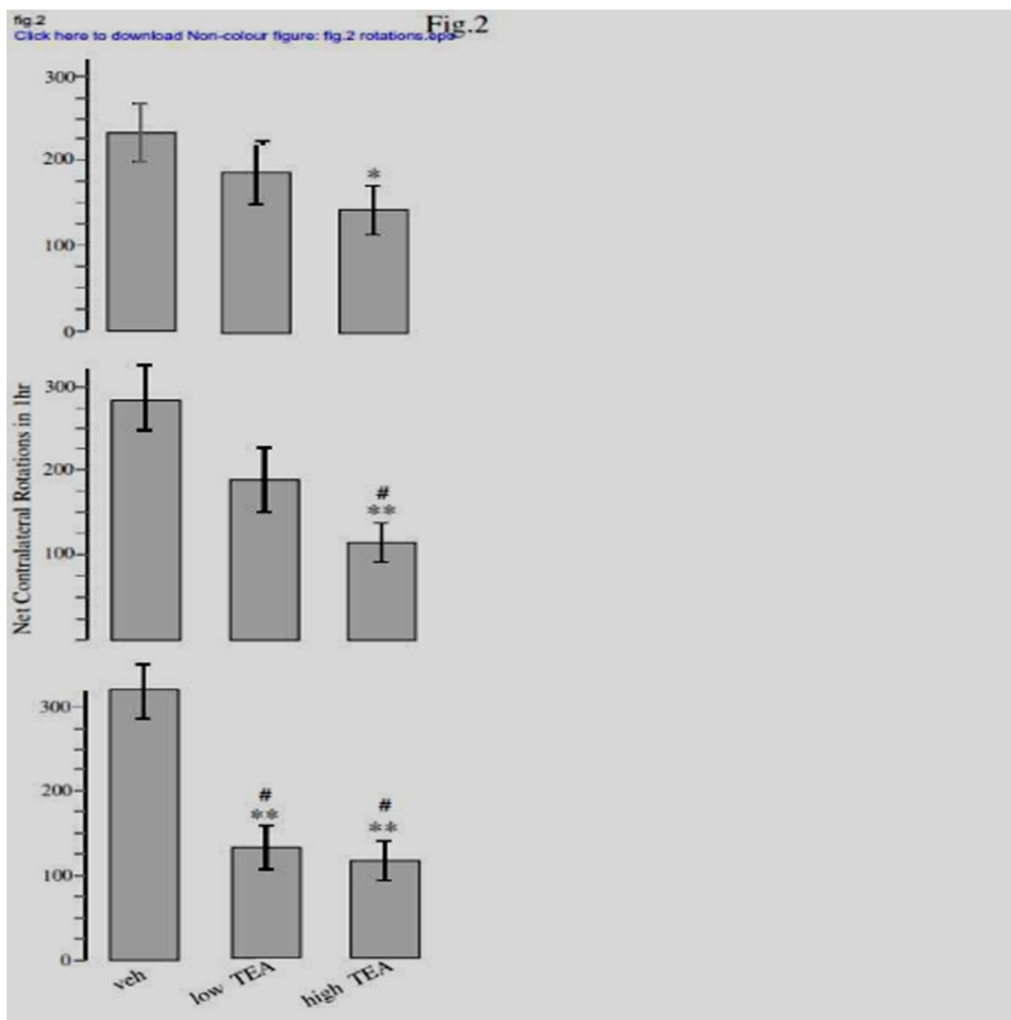
4-1 نتایج آزمون چرخش القاشده با آپومورفین:

موش‌های تمامی گروه‌ها درجه‌های مختلفی از چرخش القاشده با آپومورفین را نشان دادند که این موضوع نشان می‌دهد، پیش‌درمان با TEA نتوانست از ایجاد پارکینسونیسم القاءشده توسط سم 6OHDA جلوگیری کند. لکتفاوت‌هایی بینگروه‌ها در شدت چرخش‌ها مشاهده شد که نشان می‌دهد TEA توانسته است به میزان قابل توجهی بر شدت پارکینسونیسم ایجاد شده اثر گذارد.

4-1-1 نتیجه آزمون چرخش القاشده با آپومورفین برای گروه‌های حاد:

در گروه سالین (veh) تعداد چرخش‌ها در آزمون‌های اول تا سوم پس از جراحی به ترتیب در اولین آزمون $223/38 \pm 8/13$ در دومین آزمون تعداد چرخش‌ها $220/25 \pm 9/95$ و در سومین آزمون تعداد چرخش‌ها $217/13 \pm 5/32$ بود به گونه‌ای که تعداد چرخش‌ها در این سه آزمون تغییر قابل ملاحظه‌ای نکرد.

TEA زیاد در اولین، دومین و سومین آزمون به ترتیب موجب کاهش 40، 60 و 65 درصدی شدت چرخش ها شد. اما اثر دوز کم TEA تنها در آزمون سوم قابل ملاحظه بود و موجب کاهش 50 درصدی تعداد چرخش ها شد. در واقع در آزمون سوم هم TEA کم و هم TEA زیاد به صورت چشم گیر و معنی داری اثر خود را آشکار ساختند..(شکل 1-4)



شکل 1-4: نمودار نتایج آزمون چرخش القاء شده با آپومرفین در گروه های مدل حاد نشان داده شده است. شکل های بالا تا

پایین به ترتیب نتایج آزمون را در اولین، دومین و سومین آزمون پس از جراحی نشان می دهند.

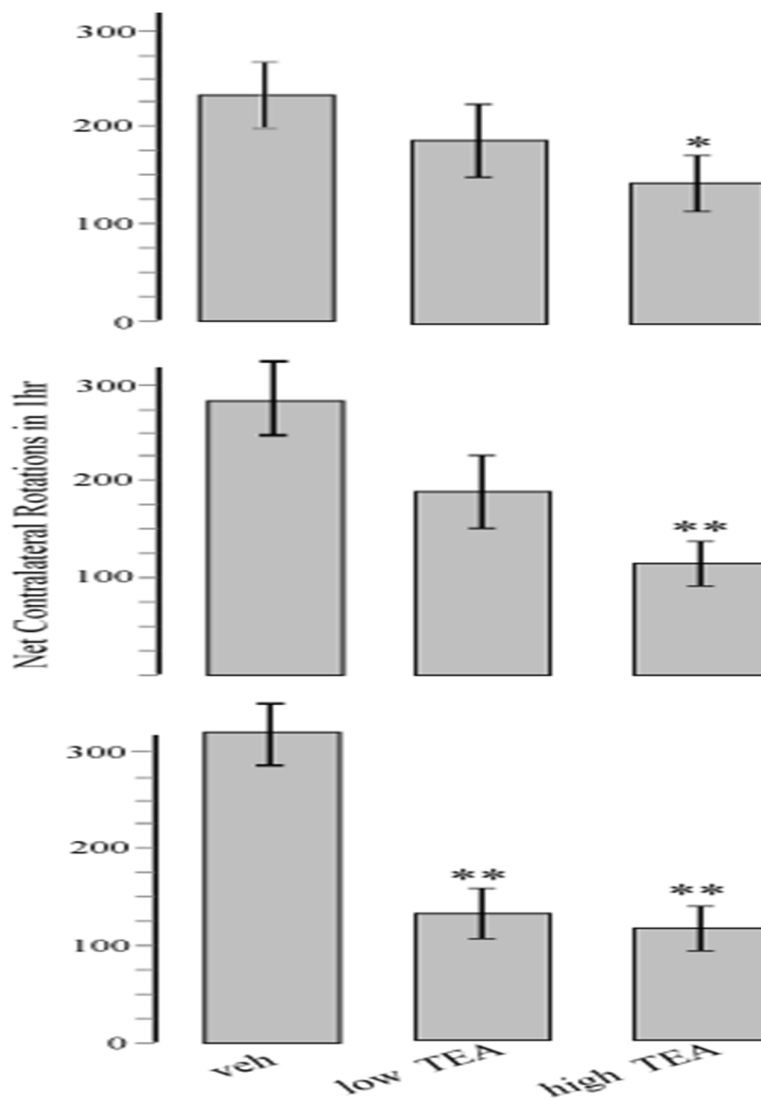
veh: گروه سالیین Low TEA: دوز کم TEA (2mg/kg). high TEA: دوز زیاد TEA (5mg/kg).

*: $P < 0.05$ و **: $P < 0.01$

4-1-2 نتیجه آزمون چرخش القا شده با آپومورفین برای گروه‌های مزمن:

در گروه سالین‌مزمّن، تعداد چرخش‌ها در آزمون‌های پس از جراحی به تدریج افزایش یافت. به این صورت که تعداد چرخش‌ها در اولین آزمون $228/25 \pm 6/76$ در دومین آزمون، تعداد چرخش‌ها $6/56 \pm 246/5$ و در سومین آزمون تعداد چرخش‌ها $300/15 \pm 7/28$ بود.

در اولین آزمون اگر چه TEA در هر دو دوز سبب کاهش شمار چرخش‌ها گردید ولی این اثر در مورد دوز زیاد معنی دار بود ($P < 0.05$). در دومین آزمون دوز زیاد TEA سبب کاهش شدید و معنی دار شدت چرخش‌ها (نزدیک به 50٪، $P < 0.01$) نسبت به گروه سالین گردید. اثر دوز کم TEA در کاهش شدت چرخش‌ها معنی دار نبود. در سومین آزمون هم دوز کم TEA و هم دوز زیاد TEA سبب کاهش شدید و معنی دار شدت چرخش‌ها (نزدیک به 60٪، $P < 0.01$) نسبت به گروه سالین شدند. همچنین قابل ذکر است که شدت چرخش‌ها در گروه سالین طی آزمون‌های متوالی به تدریج افزایش یافته است در حالیکه در گروه‌های TEA چنین اثری مشاهده نشد. (شکل شماره 4-2)



شکل 4-2: نمودار نتایج آزمون چرخش القاء شده با اپومورفین در گروه‌های مدل مزمن نشان داده شده است.

شکل‌های بالا تا پایین به ترتیب نتایج آزمون را در اولین، دومین، و سومین آزمون پس از جراحی نشان می‌دهند.

*: $P < 0.05$ و **: $P < 0.01$

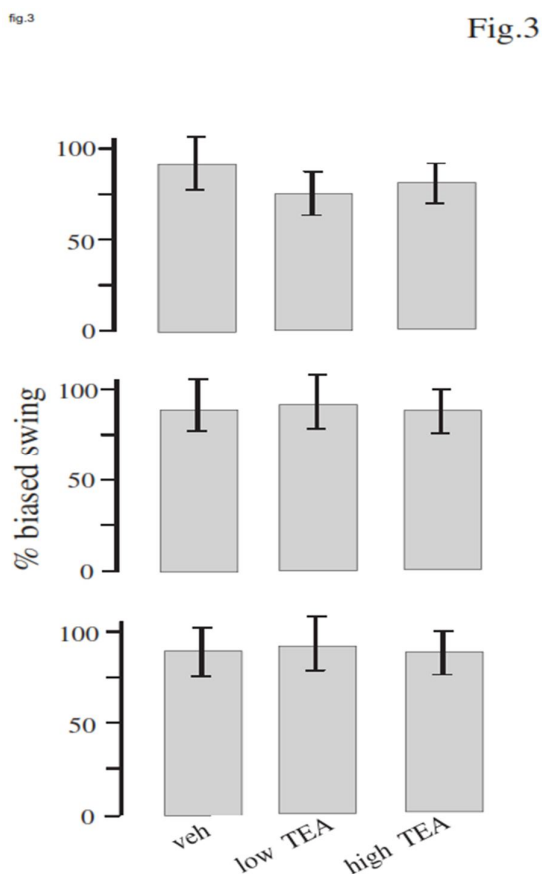
4-2 نتیجه آزمون پیچش بدن بالا رفته (EBST)

تعداد پیچش‌ها از 1 تا 8 پیچش متفاوت بود. ولی تقریباً پیچش همه موش‌ها به سمت مقابل محل تزریق سم

بود. در زیر نتایج به صورت درصد بیان شده‌اند. نتایج این آزمون در شکل 3 نشان داده شده است.

4-2-1 نتیجه آزمون EBST برای گروه‌های حاد:

در این آزمون اثر دوز کم و زیاد TEA چشمگیر و قابل ملاحظه نبود. تنها TEA کم در اولین آزمون موجب کاهش جزئی شدت و درجه انحراف پیچش ها گشت که در مورد TEA زیاد هیچگونه اثر مثبتی دیده نشد. (شکل 3-4)

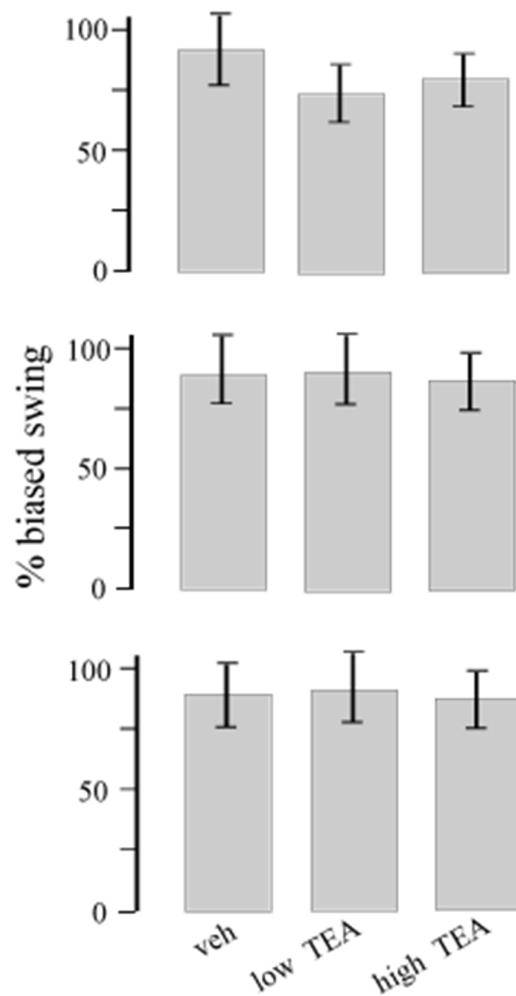


شکل 3-4: نمودار نتایج آزمون پیچش بدن بالارفته (EBST) در گروه های مدل حاد نشان داده شده است. شکل های بالا تا پایین به ترتیب نتایج آزمون را در اولین، دومین، و سومین آزمون پس از جراحی نشان می دهند. در مجموع اثر TEA (دوز کم و دوز زیاد) قابل ملاحظه و معنی دار نبود.

4-2-2 نتیجه آزمون EBST برای گروه های مزمن:

همانطور که ملاحظه میشود پیش درمان با TEA نتوانسته است شدت و درجه انحراف پیچش ها در این آزمون را تغییر دهد. تنها TEA

کم در اولین آزمون گروه حاد باعث کاهش حدوداً 20 درصدی تعداد پیچش‌ها نسبت به گروه سالین گردید ولی در دومین و سومین آزمون اثر آن معنی‌دار نبود.



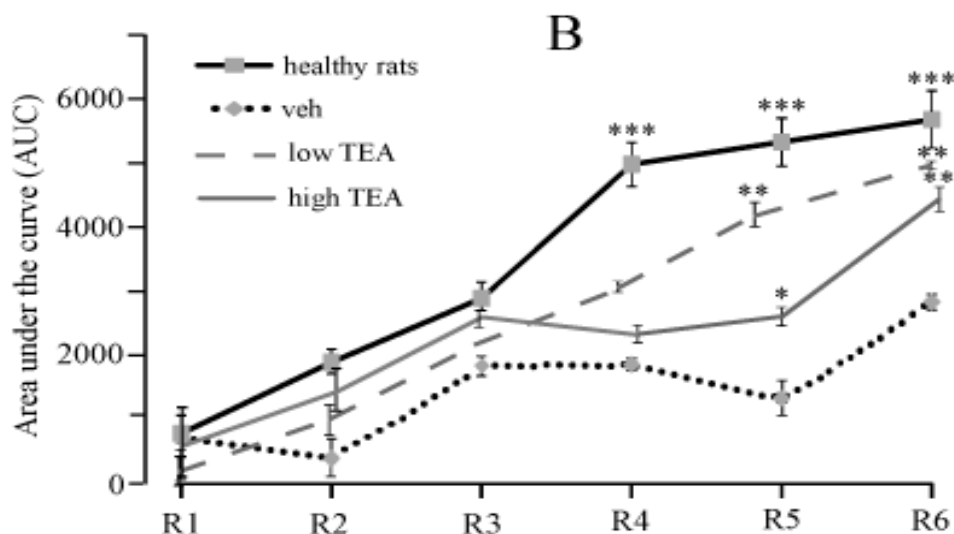
شکل 4-4: نمودار نتایج آزمون پیچش بدن بالارفته (EBST) در گروه‌های مدل مزمن نشان داده شده است. شکل‌های بالا تا پایین به ترتیب نتایج آزمون را در اولین، دومین و سومین آزمون پس از جراحی نشان می‌دهند.

3-4 نتیجه آزمون روتارد:

در آزمون روتارد توانایی یادگیری حرکتی موش‌های صحرائی بررسی می‌شود. از انجایی که عقده‌های قاعده‌ای نقش مهمی در یادگیری حرکتی ایفا می‌نمایند. اختلال در عمل آن‌ها (مثلاً در بیماری پارکینسون) سبب اختلال در یادگیری حرکتی می‌شود که با آزمون روتارد قابل تشخیص می‌باشد. در این آزمون دو پارامتر حائز اهمیت می‌باشد 1: زمان ماندن بر میله چرخان، که هر چه بالاتر باشد نشان دهنده یادگیری بهتر در موش می‌باشد. در این مطالعه AUC زمان ماندن بر میله چرخان را نشان می‌دهد. 2: الگوی یادگیری به این معنی که در صورت یادگیری زمان ماندن بر میله چرخان (AUC) در جلسات متوالی به تدریج افزایش می‌یابد. در آزمون روتارد موش‌های سالم به سرعت نحوه قدم زدن در دستگاه روتارد را آموختند، به طوری که در جلسه چهارم آزمون، به حداکثر زمان ماندن بر میله چرخان نزدیک شدند و در جلسه ششم به حداکثر زمان رسیدند. در موش‌های پارکینسونی (موش‌های گروه سالیین veh) اگرچه در جاتی از یادگیری مشاهده شد، ولی این یادگیری بسیار ضعیف بود و زمان ماندن تغییراتی را در جلسه‌های مختلف آزمون نشان داد. مثلاً در گروه سالیین (شکل 5) AUC در جلسه 5 (R5) کمتر از آن در جلسه 3 و 4 بود.

4-3-1 نتیجه آزمون روتارد برای گروه‌های حاد:

در گروه‌های مدل حاد AUC (متغیر وابسته به زمان ماندن در میله چرخان روتارد) در موش‌های گروه سالیین حاد (veh) و در جلسه‌های 5، 4 و 6 بسیار کمتر از زمان ماندن در موش‌های سالم، و تفاوت بین این دو گروه معنی‌دار بود ($P < 0/001$). با تزریق دوز کم TEA حرکت موش‌ها اندکی بهبود یافت؛ به طوری که زمان ماندن در جلسه‌های 5 و 6 به میزان معنی‌دار بیشتر از گروه سالیین، و گروه TEA زیاد بود ($P < 0/05$) (شکل 5). همین‌طور تزریق میزان زیاد TEA اثر مشخصی نداشت و الگوی یادگیری و زمان ماندن بر میله چرخان در این گروه بسیار نزدیک به گروه سالیین بود. (شکل 4-5)



شکل 4-5: نمودار نتایج آزمون روتارد در گروه‌های مدل حاد نشان داده شده است. AUC متغیری وابسته به زمان ماندن

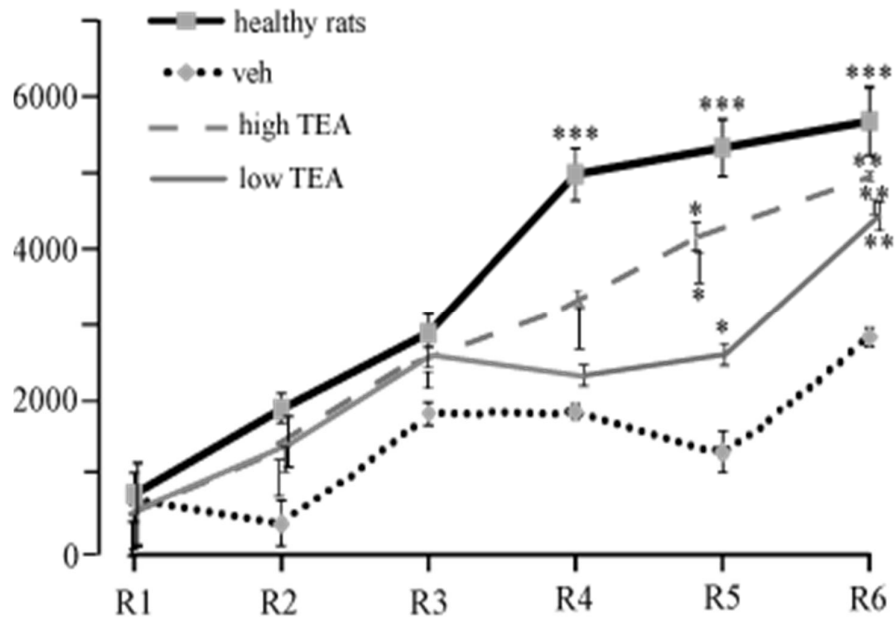
در میله چرخان دستگاه روتارد می‌باشد.

P<0.01 **: P<0.05 *

P<0.001 ***

3-2 نتیجه آزمون روتارد برای گروه های مزمن:

در این گروه پیش درمان با TEA منجر به بهبود قابل ملاحظه اجرای حرکتی موش‌ها شد به گونه ای که در هر دو دوز TEA توانست بطور معنی داری زمان ماندن موشها بر میله چرخان دستگاه روتارد را در درجسات 5 (R5) و 6 (R6) نسبت به گروه سالین افزایش دهد (P<0.01). همچنین الگوی یادگیری در گروه TEA زیاد به الگوی موش های سالم نزدیک بود ولی در گروه TEA کم الگوی یادگیری به الگوی موش های پارکینسونی نزدیک تر بود



شکل 4-6: نمودار نتایج آزمون روتارد در گروه‌های مدل مزمن نشان داده شده است. AUC متغیری وابسته به زمان ماندن

در میله چرخان دستگاه روتارد می‌باشد.

P<0.01 :** ، P<0.05 :*

P<0.001 :***

فصل پنجم

بحث و نتیجه گیری

بحث:

نتایج ما نشان می دهند که پیش درمان با می تواند تا اندازه ای شدت علائم رفتاری بیماری پارکینسون را در هر دو مدل حاد و مزمن پارکینسونیسم القاء شده با سم 6-OHDA کاهش دهد. این اثرات در هر دو دوز 2 و 5 میلی گرم به ازای هر کیلو وزن بدن مشاهده شد ولی دوز بیشتر اثرات قویتری در کاهش شدت علائم داشت. و می توان گفت TEA دارای اثرات وابسته دوز می باشد. بنابراین بر اساس داده های این مقاله در صورت استفاده از TEA برای درمان بیماری پارکینسون در انسان دوزهای بالای آن توصیه میشود. پارکینسونیسم القاء شده با سم 6- هیدروکسی دپامین به دو صورت حاد و مزمن ایجاد می شود. نوع حاد بر اثر تجویز سم به ناحیه MFB و یا هسته جسم سیاه ایجاد می شود. در این حالت سم در عرض 2 یا 3 روز سبب مرگ گسترده نورون های دپامینرژیک بخش متراکم هسته جسم سیاه میشود. نوع مزمن بر اثر تجویز سم به ناحیه استریاتوم مغز جلویی ایجاد می شود. در این حالت سم در عرض 5 تا 10 روز سبب مرگ نورون های دپامینرژیک هسته جسم سیاه می شود. مدل حاد بیانگر مراحل انتهایی و حاد بیماری پارکینسون و مدل مزمن نشانگر مراحل اولیه پارکینسون می باشد. از انجایی که ایجاد پارکینسون در انسان به آهستگی و تدریجی صورت می گیرد، مدل مزمن بیشتر شبیه ایجاد بیماری پارکینسون در انسان میباشد. (81)

همچنین بیماری پارکینسون یک بیماری پیش رونده است به این معنی که پس از تشخیص علائم آن بتدریج شدیدتر می شوند. از این رو نتایج این تحقیق نشان می دهند که TEA می تواند از گسترش و تشدید بیماری پارکینسون جلوگیری کند.

گزارش هانشان داده اند که کار تباطو مثبت بین مرگ سلول های دپامینرژیک هسته جسم سیاه در بیمار پارکینسونیست که تحت درمان ف
تاریخ در مدل حیوانی 6-OHDA وجود دارد. Yuan H. و همکاران در سال 2005 تاثیر تزریق سم 6-
OHDA را به اساس تریاتوم مو به MFB موش های صحرایی مقایسه کردند، و دریافتند ضایعات

MFB مر حلهنائیبیماریپار کینسونهستند، در حالیکهضایعاتاستریاتومحدویشروندهنیستند.

آنهاهمچنینبیانکردندآزمونچرخشی، معتبرترینآزموندر

ارزیابیشد تاينمدلازبیماریپار کینسونمی باشد کهمی تواندآسیب هاینسبیویاتقریباکاملدرهستهجسمسیاهرآتشیصده

د. دراینآزموندامنچرخشهابهدرجهضایعهوتخریبوابستهاست(4). همینطور Lancu R و همکاراندرسال

2005 دریافتند کهضایعات-6

OHDA یکطرفهقابلتوجهو پایداریرادرموش هامیتوانبوجودآوردواينضایعاترا بااستفادهازآزمون هایمختلفارزیابییکر

دکھشایدبهوسیلهاآنها درآیندهبهعلتیبیماریپار کینسونپی بریم، همینطور نشان دادندآزمونروتارود میتواندبهترینپیش بینیر

ازمرگسلول هاییدوپامینرژیکدر مقایسهباتست چرخشی EBST ارائهدهند،

وزمانماندنبرگردونه دستگاهر وتاردنسبتعکسبا آسیسلولیدراينهستهدارد(83). همچنین Borlongan CV و

همکارش در سال 1995 نشان دادند که آزمون EBST آزمون معتبری در اندازه گیری اعمال حرکتی

میانجیشدهوسیلهدوپامینمی باشد. برایناساسمامی توانیمادعاکنیمکهپیش در مانبا 4-AP

سببکاهشمرگنورونینورون هاییدوپامینرژیکدرهستهجسمسیاهتوسط 6-OHDA شدهاست(5)

بر این اساس داده های این مطالعه نتایج محققین مختلف مبنی بر اثر بخش بودن TEA در درمان بیماری

های نورودژنراتیو مختلف را تایید میکند. اخیرا در یک تحقیق، از آنالوگ های TEA به نام های تترا پتیل

آمونیم (TPA) و تترا هگزیل آمونیم (THA)، برای بررسی آپوپتوز نورونی و اثر فارماکولوژیک این

داروها بر روی جریانات غشایی در نورونهای قشری کشت داده شده استفاده کرده اند و به این نتیجه رسیده

اند که اثرات ناشی از فعال شدن کاسپاز 3 را تضعیف میکنند. همچنین نشان داده اند که TEA و آنالوگ

های آن در غلظت میکرومولار تمام ویژگی های آپوپتوزی را در سلول های تیموسیت کاهش میدهند. در

نتیجه ی اثر TEA بر روی سطح سیتوپلاسمی کانالهای وابسته به ولتاژ اثر القایی Staurosporine (که

باعث فعال شدن کاسپاز 3 میشود) در آپوپتوز نورونی کاهش می یابد. اما پیشنهاداتی مبنی بر اینکه اثر حفاظتی ناشی از کانالهای پتاسیمی ناشی از افزایش درمیزان یون کلسیم (در اثر فعال شدن کانالهای کلسیمی وابسته به ولتاژ) ایجاد میگردد ، وجود دارد. همچنین نشان داده شده است که پروتئین AB، یکپروتئینغشایی که به میزان زیادی درسیستم عصبی بیان شده و در یادگیری و بقاء سلولی دارای نقش می باشد، می تواند از طریق فعال کردن جریان پتاسیمی وابسته به کلسیم با کنداکتانس بالا و حساس به TEA سبب نوروتوکسیسیته گردد.

Skryma RN و همکاران در سال 1997 بر روی قابلیت هدایت پتاسیم و نقشش روی تکثیر سلولهای LNCaP و سلولهای سرطان پروستات حساس به آندروژن کار کردند، و دریافتند سلولهای سرطانی پروستات LNCaP دارای نوع جدیدی از کانالهای پتاسیمی هستند که نقش مهمی در فیزیولوژی و عملکرد پاتولوژیکی این سلولها و به طور خاص در تکثیر سلولی ایفا می کنند که این کانالهای پتاسیمی با افزایش کلسیم داخل سلولی و TEA به میزان 2 میلی مول و 2 نانومول دتروتوکسین (DTX) مهار می شوند (6).

از طرف دیگر نشان داده شده است که فعالیت آنزیمها، نوکلئازها و کاسپازها که سیگنالهای مرگ را هدایت و تقویت می نمایند و از این طریق سبب آپوپتوز می شوند، وابسته به یون پتاسیم می باشند.

Grishin A و همکارانش در سال 2005 دریافتند مهار کانالهای پتاسیمی در آنتروسیت های روده ای سبب تضعیف آپوپتوز می شود. جریان پتاسیم در روند آپوپتوز سلولهای آنتروسیت ضروری است و به زودی اتفاق می افتد آنها دریافتند استفاده از مهارکننده های کانالهای پتاسیمی مانند 4AP، TEA استروماتوکسین از شکسته شدن DNA، فعالیت کاسپازها و رها شدن سیتوکروم C از میتوکندری و کاهش پتانسیل غشای میتوکندری و در نتیجه آپوپتوز جلوگیری می کند (7)

Hernandez-Enriquez و همکارانش در سال 2010 نقش جریانات یون پتاسیم را روی مرگ سلولی و کاهش حجم آپوتوتیک در نورون‌های گرانولار مخچه‌ای کشت داده شده، بررسی کردند آنها دریافتند نورون‌های گرانولار مخچه‌ای (CGN) در 3 حالت دچار آپپتوز و کاهش حجم آپوتوتیک می‌شوند: تحت تاثیر استارواسپورین‌ها، تحت تاثیر کامپتوتیسین (CPT) یا وقتی که سلول‌ها از پتاسیم خارج سلولی بالا (25mM) به پتاسیم خارج سلولی کم (5mM) منتقل می‌شوند. سپس آنها دریافتند دو نوع مختلف مهارکننده‌های کانال‌های پتاسیمی یعنی سزیم و TEA از کاهش حجم آپوتوتیک و آپپتوز نورون‌های (CGN) جلوگیری می‌کند (8).

JIA chun-hong و همکارانش در سال 2009 بر روی پیناسیدیل که یک بازکننده کانال‌های پتاسیمی وابسته به ATP است کار کردند و دریافتند پیناسیدیل، می‌تواند بیان BCL2، mRNA و پروتئین را افزایش دهد. همینطور آپپتوز نورونی را کاهش دهد و در نهایت آسیب سلولی PC12 را که به وسیله ایسکمی و هایپوکسی ایجاد شده بود را تضعیف کند (9).

YU Sp و همکارانش در سال 1999 بر روی نقش جریانات پتاسیمی یکسوکننده تاخیری در فعالیت کاسپاز و آپپتوز القاشده با سرامید در نورون‌های قشری کشت داده شده، کار کردند و دریافتند افزایش پتاسیم خارج سلولی به 25 میلی‌مول مرگ سلولی القاشده با C2 سرامید را مهار می‌کند و اثر حفاظت نورونی بوسیله 25 میلی‌مول یون پتاسیم یا TEA به وسیله مهار کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ از بین نرفته بود. یک مهارکننده تیروزین کیناز، Herbimycin A و lavendustin A، افزایش یون پتاسیم یا آپپتوز القاشده با C2 سرامید را سرکوب می‌کند. آنها در نهایت پیشنهاد کردند که افزایش جریان یون پتاسیم القاشده با سرامید به وسیله فسفوریلاسیون تیروزین، نقش حیاتی در آپپتوز یون پتاسیمی ایفا می‌کند (10).

Aizenman و همکاران در سال 2000 گزارش دادند، 2'-dithiodipyridine (DTDP) که باعث القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در سلول‌های عصبی گشته می‌تواند توسط مهارکننده کانال‌های پتاسیمی (TEA) و یا سطوح بالای پتاسیم خارج سلولی مهار کرد (11).

Shi L و همکاران در سال 2009 نشان داد که کانال‌های پتاسیمی در مرگ آپوپتوزی القا شده با روی، در سلول‌های MES23.5 درگیر می‌باشند. آنها متوجه شدند که چگالی جریان K^+ متعاقب درمان با 60 میلی‌مول روی در مدت 4-8 ساعت افزایش یافته بود. پس از تزریق 20 میلی‌مول TEA جریان پتاسیم به طور کامل مسدود شده بود. این داده‌ها نشان می‌دهد که اثر آپوپتوزی مذکور ممکن است به علت افزایش فعالیت TEA-کانال‌های پتاسیمی حساس به TEA باشد (12).

از آنجایی که اخیراً اختلال در عملکرد کانال‌های پتاسیمی در سلول‌های فیرو بلاست بیماران مبتلا به آلزایمر به عنوان مارکر تشخیصی بیماری آلزایمر در نظر گرفته می‌شود، 1 Matsuyama SS و همکاران در سال 1995 تحقیقی برای اندازه‌گیری کلسیم داخل سلولی متعاقب استفاده از مهارکننده کانال پتاسیمی TEA انجام دادند و به این نتیجه رسیدند که افزایش کلسیم ناشی استفاده از TEA مارکر مناسبی برای تست غربالگری آلزایمر نمی‌باشد (13).

همچنین Lin Huang و همکارانش در سال 2014 توانستند اثبات کنند که TEA میتواند باعث آپوپتوز سلول‌های هلالی سرطانی گردد و کشف این دارو را گام بزرگی در از بین بردن سلول‌های سرطانی دانستند (14).

. نشان داده شد که کانال‌های Kv در مرگ برنامه‌ریزی شده (آپوپتوز) نورو ن هایدرو پامینرژیک سهیم هستند (15).
(16).

به طوریکه در فرآیند آپوپتوز خروج سربو ناگهان نیون‌ها پتاسیم از داخل سلول با افتد میزان K^+ داخل سلولی به میزان ناگهانی کاهش می‌یابد که باعث گسیختگی DNA، فعال شدن کاسپازها، آزاد شدن سیتوکروم C از میتوکندری و کاهش

پتانسیل غشای میتوکندری ها و در نهایت آپوپتوز اتفاق می افتد. ردمنو همکاران در سال 2006 نشان دادند که هم-6 OHDA جریان تیونینو ابسته به کانال های پتاسیم را در سلول های مزانتریکتاد و برابر افزایش می دهد که این افزایش جریانی پتاسیوم مقربا با مرگ 50 درصد از نورو ن های دیو پامینرژیک همراه بوده است. آنها همچنین نشان دادند که هم-6 OHDA سبب مرگ سلولیو ابسته به کانال های Kv القای متوسط استرس اکسیداتیو در نورو ن های قشری می شود. همچنین آنها نشان دادند که هم-6 OHDA با استفاده از آنتاگونیست های کانال های پتاسیم می توان خنثی کرد (17).

نتیجه گیری:

بطور کلی این تحقیق نشان داد، که مهار کننده کانال های پتاسیم، تترائیل آمونیوم می تواند اثرات حفاظتی و نیبراینورون های دیو پامینرژیک هسته جسم سیاه را در برابر هم-6 OHDA داشته باشد. این اثر وابسته به دوز بود و در موارد مزمن و آهسته بیماری دوزهای نسبتا بالا و در شرایط حاد، دوزهای پائین تر موثر بود. با توجه به اینکه هم-6 OHDA در انسان یک بیماری را ایجاد نمی کند، کاربرد در بیمارانی که دچار پارکینسون نیستند، نیاز به تحقیقات بیشتری دارد. علاوه بر این، هم-6 OHDA می تواند سبب کاهش یا آهسته نمودن نورو ن های دیو پامینرژیک شود و در کاهش پیشرفت علائم بیماری موثر باشد.

- .1 Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*. 2003;39(6):889-909.
- .2 Przedborski S. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*. 2005;11:S3-S7.
- .3 Tsang AH, Chung KK. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2009;1792(7):643-50.
- .4 Mathie A, Woollorton JR, Watkins CS. Voltage-activated potassium channels in mammalian neurons and their block by novel pharmacological agents. *General Pharmacology: The Vascular System*. 1998;30(1):13-24.
- .5 Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, et al. Molecular diversity of K⁺ channels. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1999;868(1):233-55.
- .6 Skryma RN, Prevarskaya NB, Dufy-Barbe L, Audin J, Dufy B. Potassium conductance in the androgen-sensitive prostate cancer cell line, LNCaP: Involvement in cell proliferation. *The Prostate*. 1997;33(2):112-22.
- .7 Woodfork KA, Wonderlin WF, Peterson VA, Strobl JS. Inhibition of ATP-sensitive potassium channels causes reversible cell-cycle arrest of human breast cancer cells in tissue culture. *Journal of cellular physiology*. 1995;162(2):163-71.
- .8 Yu SP, Yeh CH, Gottron F, Wang X, Grabb MC, Choi DW. Role of the Outward Delayed Rectifier K⁺ Current in Ceramide-Induced Caspase Activation and Apoptosis in Cultured Cortical Neurons. *Journal of neurochemistry*. 1999;73(3):933-41.
- .9 Lesage F, Lazdunski M. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2000;279(5):F793-F801.
- .10 Wang X, Xiao AY, Ichinose T, Yu SP. Effects of tetraethylammonium analogs on apoptosis and membrane currents in cultured cortical neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2000;295(2):524-30.
- .11 Furukawa K, Barger SW, Blalock EM, Mattson MP. Activation of K⁺ channels and suppression of neuronal activity by secreted β -amyloid-precursor protein. 1996.
- .12 Wang G, Zeng J, Ren R, Chen S. Potassium channels in the basal ganglia: promising new targets for the treatment of Parkinson's disease. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 2007;13:3825-38.
- .13 Mathie A, Clarke CE, Ranatunga KM, Veale EL. What are the roles of the many different types of potassium channel expressed in cerebellar granule cells? *The Cerebellum*. 2003;2(1):11-25.

- .14 Haghdoost-Yazdi H, Janahmadi M, Behzadi G. Iberitoxin-sensitive large conductance Ca²⁺-dependent K⁺(BK) channels regulate the spike configuration in the burst firing of cerebellar Purkinje neurons. *Brain research*. 2008;1212:1-8.
- .15 Strupp M, Kalla R, Dichgans M, Freilinger T, Glasauer S, Brandt T. Treatment of episodic ataxia type 2 with the potassium channel blocker 4-aminopyridine. *Neurology*. 2004;62(9):1623-5.
- .16 Glasauer S, Kalla R, Büttner U, Strupp M, Brandt T. 4-aminopyridine restores visual ocular motor function in upbeat nystagmus. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2005;76(3):451-3.
- .17 Wang Y, Yang P-l, Tang J-f, LinJ-f, Cai X-h, Wang X-t, et al. Potassium channels: possible new therapeutic targets in Parkinson's disease. *Medical hypotheses*. 2008;71(4):546-50.
- .18 Ebadi M, Srinivasan SK, Baxi MD. Oxidative stress and antioxidant therapy in Parkinson's disease. *Progress in neurobiology*. 1996;48(1):1-19.
- .19 John E. Guyton and Hall textbook of medical physiology. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011.
- .20 Mullin S, Schapira AH. Pathogenic mechanisms of neurodegeneration in Parkinson disease. *Neurologic clinics*. 2015;33:17-1:(1)3
- .21 Schapira AH, Jenner P. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Movement disorders*. 2011;26(6):1049-55.
- .22 Armstrong M, Daly A, Cholerton S, Idle J, Bateman D. Mutant debrisoquine hydroxylation genes in Parkinson's disease. *The Lancet*. 1992;339(8800):1017-8.
- .23 Schapira AH. Etiology of Parkinson's disease. *Neurology*. 2006;66(10 suppl 4):S10-S23.
- .24 Halliday GM, McCann H. The progression of pathology in Parkinson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010;1184(1.95-188:(
- .25 Davis KL. *Neuropsychopharmacology: the fifth generation of progress: an official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.
- .26 Yelnik J. Functional anatomy of the basal ganglia. *Movement disorders*. 2002;17(S3):S15-S21.
- .27 Yasmin QS, Banu LA, Rahamn MF, Hossain S, Akhter Z. Impact of use of illustration in the presentation of Neuroanatomy through the analyses of the illustration in the Neuroanatomy text books commonly used by the medical postgraduates of Bangladesh. *Bangladesh Journal of Anatomy*. 2013;10(1):27-31.
- .28 Clarke PG, Blaser P, Catsicas S. Neurotrophic theory. *Trends in Neurosciences*. 1989;12(12):494-5.
- .29 Emmi A, Rajabi H, Stewart J. Behavioral and neurochemical recovery from partial 6-hydroxydopamine lesions of the substantia nigra is blocked by daily treatment with D1/D5, but not D2, dopamine receptor antagonists. *The Journal of neuroscience*. 1997;17(10):3840-6.
- .30 Gerlach M, Riederer P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *Journal of neural transmission*. 1996;103(8-9):987-1041.
- .31 Gassen M, Youdim M. *Free radical scavengers: chemical concepts and clinical relevance*: Springer; 1999.
- .32 Kane JR, Ciucci MR, Jacobs AN, Tews N, Russell JA, Ahrens AM, et al. Assessing the role of dopamine in limb and cranial-oculomotor control in a rat model of Parkinson's disease. *Journal of communication disorders*. 2011;44(5):529-37.
- .33 Groc L, Bezin L, Foster JA, Jiang H, Jackson TS, Weissmann D, et al. Lipid peroxidation-mediated oxidative stress and dopamine neuronal apoptosis in the substantia nigra during development. *Neurochemistry international*. 2001;39(2):127-33.
- .34 Garrett BE, Griffiths RR. The role of dopamine in the behavioral effects of caffeine in animals and humans. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1997;57(3):533-41.
- .35 GEBICKE-HAERTER P, GERLACH, M; RIEDERER, P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *J Neural Transm*. 1996;103:987-1041.

- .36 Logroscino G, Marder K, Cote L, Tang MX, Shea S, Mayeux R. Dietary lipids and antioxidants in Parkinson's disease: a population-based, case-control study. *Annals of neurology*. 1996;39(1):89-94.
- .37 Dexter D, Carter C, Wells F, Javoy-Agid F, Agid Y, Lees A, et al. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*. 1989;52(2):381-9.
- .38 Carlsson A, Rosengren E, Bertler Å, Nilsson J. Effect of reserpine on the metabolism of catecholamines. *Psychotropic drugs*. 1957;6:363-72.
- .39 Barnum CJ, Tansey MG. Modeling neuroinflammatory pathogenesis of Parkinson's disease. *Progress in brain research*. 2010;184:113-32.
- .40 Hauber W, Schmidt WJ. The NMDA antagonist dizocilpine (MK-801) reverses haloperidol-induced movement initiation deficits. *Behavioural brain research*. 1990;41(2):161-6.
- .41 Pereira E, Aziz T. Parkinson's disease and primate research: past, present, and future. *Postgraduate medical journal*. 2006;82(967):293-9.
- .42 Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT. Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays*. 2002;24(4):308-18.
- .43 Lotharius J, Dugan LL, O'malley KL. Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons. *The Journal of neuroscience*. 1999;19(4):1284-93.
- .44 Glinka Y, Gassen M, Youdim M. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *Advances in Research on Neurodegeneration: Springer*; 1997. p. 55-66.
- .45 Hudson JL, van Horne CG, Strömberg L, Brock S, Clayton J, Masserano J, et al. Correlation of apomorphine-and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain research*. 1993;626(1):167-74.
- .46 Honardoost M, Soleimanjahi H, Rajaei F. Apoptosis: programmed cell death. 2013.
- .47 Sofiabadi M, Haghdoost-Yazdi H, Mahmudi M, Piri H, Dargahi T, Yaghubidust M. Effect of potassium channel blocker 4-aminopyridine pretreatment on the 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats. *J Qazvin Univ Med Sci*. 2015; 19 (2): 11-20. Corresponding Address: Hashem Haghdoost-Yazdi, Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Shahid Bahonar Blvd, Qazvin, Iran Email: hhaghdoost@gmail.com Tel.98-912.
- .48 Tian C, Zhu R, Zhu L, Qiu T, Cao Z, Kang T. Potassium channels: structures, diseases, and modulators. *Chemical biology & drug design*. 2014;83(1):1-26.
- .49 Rodrigo G, Standen N. ATP-sensitive potassium channels. *Current pharmaceutical design*. 2005;11(15):1915-40.
- .50 Miller C. An overview of the potassium channel family. *Genome Biol*. 2000;1(4):1-5.
- .51 Waszkielewicz A, Gunia A, Szkaradek N, ŚL K. Ion channels as drug targets in central nervous system disorders. *Current medicinal chemistry*. 2013;20(10):1241.
- .52 Grishin A, Ford H, Wang J, Li H, Salvador-Recatala V, Levitan ES, et al. Attenuation of apoptosis in enterocytes by blockade of potassium channels. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2005;289(5):G815-G21.
- .53 Vernon AA, Sheard JL. The Solubility of Tetraethylammonium Iodide in Benzene-Ethylene Dichloride Mixtures. *Journal of the American Chemical Society*. 1948;70(6):2035-6.
- .54 Kolthoff I, Coetzee J. Polarography in Acetonitrile. 1 I. Metal Ions which Have Comparable Polarographic Properties in Acetonitrile and in Water. *Journal of the American Chemical Society*. 1957;79(4):870-4.
- .55 Starks CM, Liotta CL, Halpern ME. Phase-Transfer Catalysis: Fundamentals I: Springer; 1994.
- .56 Huang J, Sumpter BG, Meunier V. A universal model for nanoporous carbon supercapacitors applicable to diverse pore regimes, carbon materials, and electrolytes. *Chemistry-A European Journal*. 2008;14(22):6614-26.
- .57 Hille B. The selective inhibition of delayed potassium currents in nerve by tetraethylammonium ion. *The Journal of general physiology*. 1967;50(5):1287-302.
- .58 Akk G, Steinbach JH. Activation and block of mouse muscle-type nicotinic receptors by tetraethylammonium. *The Journal of physiology*. 2003;551(1):155-68.

- .59 Drill VA, DiPalma JR. *Drill's pharmacology in medicine*: McGraw-Hill; 1971.
- .60 Bell CJ, Elliott R. The influence of barbiturate drugs on tetraethylammonium induced contractures of the chick biventer cervicis muscle in vitro. *General Pharmacology: The Vascular System*. 1984;15(5):411-4.
- .61 Cena V, Garcia A, Gonzalez-Garcia C, Kirpekar S. Ion dependence of the release of noradrenaline by tetraethylammonium and 4-aminopyridine from cat splenic slices. *British journal of pharmacology*. 1985;84(2):299-308.
- .62 Fueta Y, Avoli M. Tetraethylammonium-induced epileptiform activity in young and adult rat hippocampus. *Developmental brain research*. 1993;72(1):51-8.
- .63 Choi KL, Aldrich RW, Yellen G. Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K⁺ channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991;88(12):5092-5.
- .64 Goldberg JA, Wilson CJ. Control of spontaneous firing patterns by the selective coupling of calcium currents to calcium-activated potassium currents in striatal cholinergic interneurons. *The Journal of neuroscience*. 2005;25(44):10230-8.
- .65 Sophiabadi M, Fraidouni N, Faraji A, Dargahi T. 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. *Physiology and Pharmacology*. 2013.
- .66 Shieh C-C, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacological Reviews*. 2000;52(4):557-94.
- .67 Dowd E, Monville C, Torres EM, Wong LF, Azzouz M, Mazarakis ND, et al. Lentivector-mediated delivery of GDNF protects complex motor functions relevant to human Parkinsonism in a rat lesion model. *European Journal of Neuroscience*. 2005;22(10):2587-95.
- .68 Hernandez-Enriquez B, Arellano R, Moran J. Role for ionic fluxes on cell death and apoptotic volume decrease in cultured cerebellar granule neurons. *Neuroscience*. 2010;167(2):298-311.
- .69 JIA C-h, ZHANG H, LI J, LU Y, YANG X. Pinacidil, an ATP-sensitive potassium channel opener, inhibits ischemic apoptosis via up-regulating Bcl-2 expression in PC12 cells [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*. 2009;7:025.
- .70 Franciosi S, Ryu JK, Choi HB, Radov L, Kim SU, McLarnon JG. Broad-spectrum effects of 4-aminopyridine to modulate amyloid β 1-42-induced cell signaling and functional responses in human microglia. *The Journal of neuroscience*. 2006;26(45):11652-64.
- .71 Aizenman E, Stout AK, Hartnett KA, Dineley KE, McLaughlin B, Reynolds IJ. Induction of neuronal apoptosis by thiol oxidation. *Journal of neurochemistry*. 2000;75(5):1878-88.
- .72 Shi L, Song N, Jiang H, Wang J, Ma Z, Xie J. Potassium channels are involved in zinc-induced apoptosis in MES23.5 cells. *Journal of neuroscience research*. 2009;87(2):514-21.
- .73 Paxinos G. C. Watson C: "The rat brain in stereotaxic coordinates, Ed 6". Academic Press; 2007.
- .74 Fujita M, Nishino H, Kumazaki M, Shimada S, Tohyama M, Nishimura T. Expression of dopamine transporter mRNA and its binding site in fetal nigral cells transplanted into the striatum of 6-OHDA lesioned rat. *Molecular brain research*. 1996;39(1):127-36.
- .75 Borlongan CV, Randall TS, Cahill DW, Sanberg PR. Asymmetrical motor behavior in rats with unilateral striatal excitotoxic lesions as revealed by the elevated bodyswing test. *Brain research*. 1995;676(1):231-4.
- .76 Lundblad M, Vaudano E, Cenci M. Cellular and behavioural effects of the adenosine A_{2a} receptor antagonist KW-6002 in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia. *Journal of neurochemistry*. 2003;84(6):1398-4.10
- .77 Medina-Ceja L, Cordero-Romero A, Morales-Villagrán A. Antiepileptic effect of carbenoxolone on seizures induced by 4-aminopyridine: a study in the rat hippocampus and entorhinal cortex. *Brain research*. 2008;1187:74-81.
- .78 Shimohama S, Sawada H, Kitamura Y, Taniguchi T. Disease model: Parkinson's disease. *Trends in molecular medicine*. 2003;9(8):360-5.

- .79 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):70-4.
- .80 Goudarzi I, Kaffashian M, Shabani M, Haghdoost-Yazdi H, Behzadi G, Janahmadi M. In vivo 4-aminopyridine treatment alters the neurotoxin 3-acetylpyridine-induced plastic changes in intrinsic electrophysiological properties of rat cerebellar Purkinje neurones. *European journal of pharmacology*. 2010;642(1):56-65.
- .81 Strupp M, Zwergal A, Brandt T. Episodic ataxia type 2. *Neurotherapeutics*. 2007;4(2):73-267:(
- .82 Kalla R, Spiegel R, Claassen J, Bardins S, Hahn A, Schneider E, et al. Comparison of 10-mg doses of 4-aminopyridine and 3, 4-diaminopyridine for the treatment of downbeat nystagmus. *Journal of Neuro-Ophthalmology*. 2011;31(4):320-5.
- .83 Leung G, Sun W, Brookes S, Smith D, Shi R. Potassium channel blocker, 4-aminopyridine-3-methanol, restores axonal conduction in spinal cord of an animal model of multiple sclerosis. *Experimental neurology*. 2011;227(1):232-5.
- .84 Wu Z-Z, Li D-P, Chen S-R, Pan H-L. Aminopyridines potentiate synaptic and neuromuscular transmission by targeting the voltage-activated calcium channel β subunit. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(52):36453-61.
- .85 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.
- .86 González C, Baez-Nieto D, Valencia I, Oyarzún I, Rojas P, Naranjo D, et al. K^+ Channels: Function-Structural Overview. *Comprehensive Physiology*. 2012.
- .87 Baranauskas G, Tkatch T, Surmeier DJ. Delayed rectifier currents in rat globus pallidus neurons are attributable to Kv2. 1 and Kv3. 1/3.2 K^+ channels. *The Journal of neuroscience*. 1999;19(15):6394-404.
- .88 Redman PT, Jefferson BS, Ziegler CB, Mortensen OV, Torres GE, Levitan ES, et al. A vital role for voltage-dependent potassium channels in dopamine transporter-mediated 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *Neuroscience*. 2006;143.6-1:(1)
- .89 Jin S, Fredholm B. Role of NMDA, AMPA and kainate receptors in mediating glutamate- and 4-AP-induced dopamine and acetylcholine release from rat striatal slices. *Neuropharmacology*. 1994;33(9):1039-48.

1. Haghdoust-Yazdi H, Janahmadi M, Behzadi G. Iberitoxin-sensitive large conductance Ca²⁺-dependent K⁺(BK) channels regulate the spike configuration in the burst firing of cerebellar Purkinje neurons. *Brain research*. 2008;1212:1-8.
2. Strupp M, Kalla R, Dichgans M, Freilinger T, Glasauer S, Brandt T. Treatment of episodic ataxia type 2 with the potassium channel blocker 4-aminopyridine. *Neurology*. 2004;62(9):1623-5.
3. Glasauer S, Kalla R, Büttner U, Strupp M, Brandt T. 4-aminopyridine restores visual ocular motor function in upbeat nystagmus. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2005;76(3):451-3.
4. 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.
5. Borlongan CV, Randall TS, Cahill DW, Sanberg PR. Asymmetrical motor behavior in rats with unilateral striatal excitotoxic lesions as revealed by the elevated body swing test. *Brain research*. 1995;676(1):231-4.
6. Skryma RN, Prevarskaya NB, Dufy-Barbe L, Audin J, Dufy B. Potassium conductance in the androgen-sensitive prostate cancer cell line, LNCaP: Involvement in cell proliferation. *The Prostate*. 1997;33(2):112-22.
7. Grishin A, Ford H, Wang J, Li H, Salvador-Recatala V, Levitan ES, et al. Attenuation of apoptosis in enterocytes by blockade of potassium channels. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2005;289(5):G815-G21.
8. Hernandez-Enriquez B, Arellano R, Moran J. Role for ionic fluxes on cell death and apoptotic volume decrease in cultured cerebellar granule neurons. *Neuroscience*. 2010;167(2):298-311.
9. JIA C-h, ZHANG H, LI J, LU Y, YANG X. Pinacidil, an ATP-sensitive potassium channel opener, inhibits ischemic apoptosis via up-regulating Bcl-2 expression in PC12 cells [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*. 2009;7:025.
10. Franciosi S, Ryu JK, Choi HB, Radov L, Kim SU, McLarnon JG. Broad-spectrum effects of 4-aminopyridine to modulate amyloid β 1–42-induced cell signaling and functional responses in human microglia. *The Journal of neuroscience*. 2006;26(45):11652-64.

11. Aizenman E, Stout AK, Hartnett KA, Dineley KE, McLaughlin B, Reynolds IJ. Induction of neuronal apoptosis by thiol oxidation. *Journal of neurochemistry*. 2000;75(5):1878-88.
12. Shi L, Song N, Jiang H, Wang J, Ma Z, Xie J. Potassium channels are involved in zinc-induced apoptosis in MES23.5 cells. *Journal of neuroscience research*. 2009;87(2):514-21.
13. Matsuyama S, Yamaguchi D, Vergara J, Jarvik L. Tetraethylammonium-induced calcium concentration changes in skin fibroblasts from patients with Alzheimer disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*. 1995;6(5):241-4.
14. Huang L, Huang Q-Y, Huang H-Q. The evidence of HeLa cell apoptosis induced with tetraethylammonium using proteomics and various analytical methods. *Journal of Biological Chemistry*. 2014;289(4):2217-29.
15. Wang Y, Yang P-l, Tang J-f, Lin J-f, Cai X-h, Wang X-t, et al. Potassium channels: possible new therapeutic targets in Parkinson's disease. *Medical hypotheses*. 2008;71(4):546-50.
16. Baranauskas G, Tkatch T, Surmeier DJ. Delayed rectifier currents in rat globus pallidus neurons are attributable to Kv2.1 and Kv3.1/3.2 K⁺ channels. *The Journal of neuroscience*. 1999;19(15):6394-404.
17. Redman PT, Jefferson BS, Ziegler CB, Mortensen OV, Torres GE, Levitan ES, et al. A vital role for voltage-dependent potassium channels in dopamine transporter-mediated 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *Neuroscience*. 2006;143(1):1-6.