Physiology and Pharmacology, 17 (3), 266-276
Autumn 2013 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Effect of tetraethylammonium and B vitamins group on the efficacy of cell replacement therapy in the treatment of Parkinson's disease in the 6-hydroxydopamine animal model

Mohammad Sophiabadi, Negin Fraidouni, Ayda Faraji, Tahereh Dargahi, Hassan Yaghubi-Dust, Hashem Haghdoost-Yazdi *

Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

Received: 12 June 2013 **Accepted: 27 Aug 2013**

Abstract

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

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

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

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

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

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

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۷ (۳)، ۲۶۶ - ۲۷۶
پاییز ۱۳۹۲

فیزیولوژی و فارماکولوژی

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

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

دریافت: ۲۲ خرداد ۹۲ پذیرش: ۵ شهریور ۹۲

چکیده

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

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

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

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

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

مقدمه

بیماری پارکینسون دومین بیماری شایع تخریب نورونی (neurodegenerative) می‌باشد که ۲۰۰ نفر را در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر مبتلا می‌سازد. سبب اصلی ایجاد این بیماری تخریب پیش رونده نورون های دوپامینرژیک در مغز میانی می باشد. درمان‌های متداول عبارتند از درمان دارویی با لوودپا، جراحی و تحریک نواحی عمقی مغز و برداشت هسته پالیدوم می باشد که هیچ کدام نمی‌توانند جلو پیشرفت بیماری را بگیرند لذا پس از مدتی برخی از علائم عود می‌نمایند که سبب پایین آمدن کیفیت زندگی می‌گردد [۶، ۲۸، ۳۴]. از این رو در حال حاضر تحقیقات به سمت شناخت روش‌های نوین برای درمان و یا پیشگیری از ایجاد این بیماری می باشد.

در طی سه دهه اخیر تحقیقات وسیعی به منظور استفاده از پیوند سلول‌های بنیادی و جانشین سازی سلولی (cell replacement therapy) جهت درمان بیماری پارکینسون صورت گرفته و پیشرفت‌های قابل ملاحظه ای در

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: hhaghdoost@yahoo.com
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

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

نشان داده شده است که مرگ بیشتر نورون های دوپامینرژیک پیوندی از طریق مرگ برنامه ریزی شده و یا همان آپوپتوزیس صورت می‌گیرد [۳۲، ۳۸]. از این رو بسیاری از مطالعات به سمت استفاده از مهار کننده های آپوپتوز جهت افزایش بقاء نورون های پیوندی هدایت شده‌اند. تترااتیل آمونیوم (TEA) یک مهار کننده وسیع الطیف کانال‌های پتاسیمی می باشد که به ویژه کانال‌های پتاسیمی delayed rectifier و کانال‌های پتاسیمی وابسته به کلسیم با هدایت بالا را مهار می‌نماید [۳۱]. نشان داده شده است که فعالیت آنزیم‌ها، نوکلئازها و کاسپازها که سیگنال‌های مرگ را هدایت و تقویت می‌نمایند و از این طریق سبب آپوپتوز می‌شوند، وابسته به یون پتاسیم می باشد. در نورون های قشری موش، جریان پتاسیمی حساس به TEA شناسایی شده است که مسئول آپوپتوز نورونی می باشد [۳۷]. از طرف دیگر گزارش شده است که پروتئین آمیلوئید بتا (Aß)، یک پروتئین غشایی که به میزان زیادی در سیستم عصبی بیان شده و در یادگیری و بقاء سلولی دارای نقش می باشد، می‌تواند از طریق فعال کردن جریان پتاسیمی وابسته به کلسیم با هدایت بالا و حساس به TEA سبب سمیت نورونی گردد. از این رو تصور می‌شود که اختلال در این پروتئین ممکن است در فرایند تخریب نورونی بیماری آلزایمر نقش داشته باشد [۱۱].

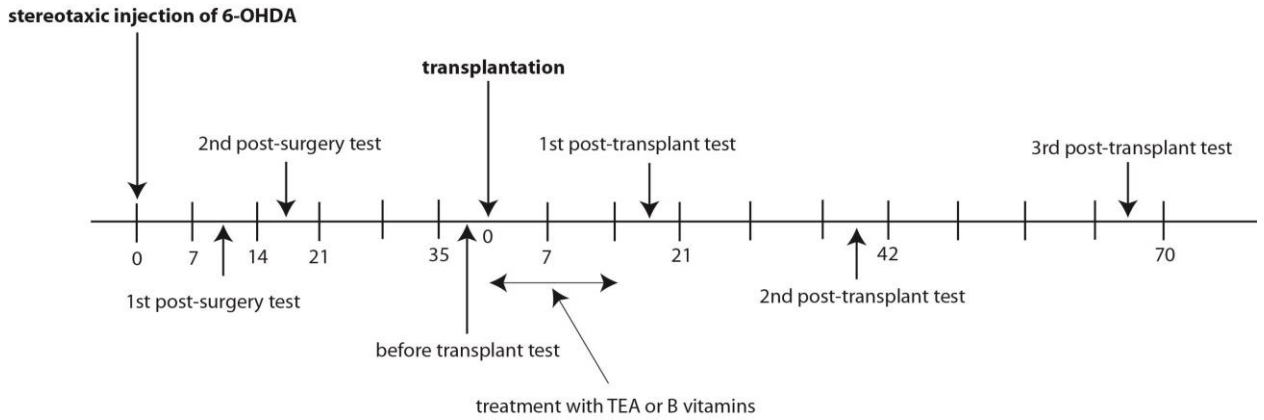
از طرف دیگر نشان داده شده است که ویتامین‌های گروه ب برای انجام بسیاری از واکنش‌های بیوشیمیایی و همچنین عملکرد طبیعی میتوکندری ها ضروری می‌باشند. این ویتامین‌ها بویژه درگیر در متابولیسم هموسیستئین (Hcy) می‌باشند به گونه ای که کمبود این ویتامین‌ها سبب انباشت Hcy در بدن می‌گردد. گزارشات زیادی نشان داده‌اند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

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

مواد و روش ها

نمونه حیوانی. جامعه مورد مطالعه موشهای صحرایی ماده بالغ در محدوده وزنی ۳۰۰-۲۰۰ گرم بودند. موش‌ها در حیوان خانه دانشگاه در قفس‌های بزرگ با ابعاد ۲۰×۵۹×۳۸ در اتاقی با درجه حرارت کنترل شده و شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی درحالی‌که به آب و غذا به صورت نامحدود دسترسی داشتند نگه داری می‌شدند.

این تحقیق در ۶ مرحله اجرا گردید: ۱- ایجاد مدل حیوانی



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

پارکینسون ۲- تهیه سوسپانسیون سلولی از مزانسفال شکمی جنین موشهای صحرایی ۳- تخمین درصد سلول‌های زنده در سوسپانسیون ۴- پیوند سوسپانسیون سلولی به موش‌های پارکینسونی ۵- تیمار موش‌ها با TEA یا ویتامین‌های ب و یا هر دو ۶ - آزمون‌های رفتاری

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

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

ب- آزمون رفتاری: تزریق سم سبب تخریب نورون های دوپامینرژیک جسم سیاه در همان طرف می گردد. علائم پارکینسون در این حیوانات به صورت رفتار چرخشی به طرف مقابل محل تزریق (در خلاف جهت عقربه‌های ساعت) بلافاصله پس از تزریق آپومرفین (0.5 mg/kg, i.p) بروز می‌نماید. آزمون رفتاری چرخش القاء شده با آپومرفین در ۷ زمان متفاوت انجام گرفت (شکل ۱): ۱ : قبل از جراحی استرئوتاکسیک و تزریق سم 6-OHDA. این آزمون در ابتدای تحقیق انجام گرفت و موش‌هایی جهت کار انتخاب شدند که در مدت یک ساعت کمتر از ۱۰ چرخش خالص در جهت یا خلاف جهت عقربه های ساعت نشان می‌دادند. ۲ و ۳: در هفته های دوم و سوم پس از تزریق سم. موش‌هایی که در این دو آزمون بیش از ۲۰۰ چرخش خالص در جهت مخالف تزریق سم نشان می‌دادند انتخاب شده و به گروه های مختلف آزمایشی تقسیم می‌شدند. ۴: قبل از انجام پیوند سوسپانسیون سلولی. نتایج این آزمون برای مقایسه با نتایج آزمون‌های رفتاری پس از پیوند استفاده شدند. ۵، ۶ و ۷: در هفته های سوم، ششم و دهم پس از پیوند. چرخش‌ها توسط دستگاه روتومتر ثبت و ذخیره گردید.

۲- تهیه سوسپانسیون سلولی از مزانسفال شکمی جنینی. این قسمت به میزان زیادی با استفاده از پروتوکل ارائه شده توسط [Dunnett & Bjorklund 1997 ۸] انجام گرفت. بطور خلاصه مراحل زیر جهت انجام این قسمت اجرا گردید:

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

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

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

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

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

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

1: L: -2.6, AP: -1.3 و V: -5

2: L: -3.2, AP: +1.3 و V: -5

3: L: -4.3, AP: -0.4 و V: -5

4: L: -4.5, AP: +0.4 و V: -5

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

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

۶- آزمون‌های رفتاری. جهت آزمون اثر TEA و ویتامین‌های گروه ب، موش‌ها تحت آزمون چرخشی با آپومرفین در هفته های سوم، ششم و دهم پس از پیوند با همان روش ارائه شده در مرحله ۱ قرار گرفتند. تعداد چرخشهای خالص در واحد زمان معیاری از اثر تیمار می باشد.

گروه های آزمایشی. پس از انجام دومین آزمون رفتاری پس از تزریق سم 6-OHDA موش‌هایی که بیش از ۲۰۰ چرخش در ساعت را نشان دادند در ۵ گروه قرار گرفتند: ۱- کنترل (con, n=6) که سوسپانسیون سلولی بدون تیمار با TEA و ویتامین‌های ب را دریافت نمودند ۲-گروه شاهد (sham, n=6) که تنها ترکیب محیط کشت بدون سوسپانسیون سلولی را دریافت نمودند. ۳ و ۴ و ۵- گروه‌هایی که سوسپانسیونهای سلولی تیمار شده با گروه ویتامین‌های ب (Vit B, n=6) یاTEA (TEA, n=7) و یا هردو (Vit B+TEA, n=6) را دریافت نمودند. تمامی موش‌ها هفته‌ها قبل از پیوند، سم 6-OHDA را دریافت نموده و پارکینسونی شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌ها بر حسب میانگین بعلاوه منهای خطای معیار بیان شده‌اند. برای تجزیه و تحلیل آماری نتایج آزمون‌های رفتاری از آزمون تی زوجی (paired t-test) برای مقایسه نتایج قبل با پس از پیوند و از آزمون آنوا با آزمون تعقیبی دانت برای مقایسه نتایج گروه‌ها با گروه کنترل در هر آزمون استفاده گردید. P<۰/۰۵ به عنوان سطح معنی دار بودن اختلاف‌ها در نظر گرفته می‌شد.

یافته ها

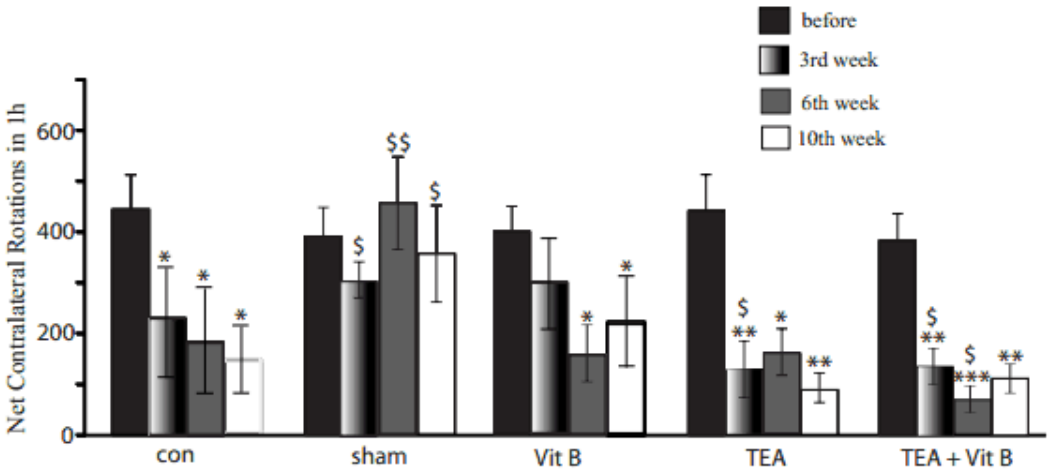
درصد سلول‌های زنده و تراکم سلولی در سوسپانسیون سلولی. قبل از انجام عمل پیوند درصد سلول‌های زنده و تراکم سلولی در سوسپانسیون های سلولی بررسی گردید. همانطور

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

جدول ۱- درصد سلول‌های زنده و تراکم سلولی در سوسپانسیون های سلولی پیوند زده شده به گروه‌های مختلف موش‌های صحرایی پارکینسونی شده. بـه گـروه شـاهد محلـول محیط کشت حاوی تترااتیل آمونیوم (TEA) و ویتامین‌های گروه ب بدون سوسپانسیون سلولی تزریق گردید. درصد سلول‌های زنده و تراکم سلولی در سوسپانسیون های پیونـدی به گروه‌های آزمایشی تفاوت قابل ملاحظه ای با یکدیگر نداشت. Con: گروه کنترل، Vit B: گروه دریافت کننده سوسپانسـیون سـلولی حـاوی ویتـامین‌هـای ب، TEA: گـروه دریافت کننده سوسپانسیون سلولی حاوی TEA و Vit B + TEA: گروه دریافت کننده سوسپانسیون سلولی حاوی TEA و ویتامین‌های گروه ب.

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

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



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

که در جدول ۱ مشاهده می‌شود درصـد سـلول‌هـای زنـده در گروه های مختلف بسیار نزدیک به یکدیگر بـوده و در تمـامی آن‌ها بیش از ۸۰٪ بود. این نتیجه در رابطه با تراکم سلولی نیز بدست آمد و در تمامی گروه‌ها تراکم سـلولی بـیش از ۴۰۰۰۰ سلول (زنده و مرده) در هر میکرولیتر بود.

آزمون چرخش القاء شده با آپومرفین. آزمون چرخش القـاء شده با آپومرفین در دو بخش انجام شد: ۱- پس از تزریق سم و قبل از پیوند و ۲- پس از انجام عمل پیوند.

۱- در این بخش آزمون در سه مرحله انجام شـد. مراحـل اول و دوم در هفته های دوم و سوم پس از تزریـق سـم بـود.

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

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

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

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

بحث

نتایج ما نشان می‌دهند که:

۱- پیوند سلول‌های ناحیه VM جنین‌های ۱۴ روزه به ناحیه استریاتوم موش‌های صحرایی پارکینسونی به میزان قابل ملاحظه‌ای سبب کاهش علائم رفتاری پارکینسون گردید که در هفته دهم پس از پیوند بیشترین میزان بهبود مشاهده شد.

۲- تیمار با ویتامین‌های ب اثری بر درصد سلول‌های زنده در سوسپانسیون سلولی و کاهش بیشتر علائم رفتاری پارکینسون نداشت.

۳- تیمار با TEA اثری بر درصد سلول‌های زنده در سوسپانسیون سلولی نداشت ولی میزان بهبود را بویژه در هفته سوم پس از پیوند به میزان معنی داری افزایش داد.

۴- تیمار با ترکیب هر دو TEA و ویتامین‌های گروه ب اثری بر درصد سلول‌های زنده در سوسپانسیون سلولی نداشت ولی میزان بهبود را بویژه در هفته های سوم و ششم پس از پیوند به میزان معنی داری افزایش داد.

در مجموع نتایج ما نشان می‌دهند که TEA بویژه هنگامی که با ویتامین‌های گروه ب همراه شود می‌تواند سبب افزایش اثربخشی پیوند سلولی در درمان بیماری پارکینسون در موش‌های صحرایی شود.

محتمل‌ترین علت افزایش اثربخشی پیوند سلولی توسط TEA و تلفیق آن با ویتامین‌های گروه ب می‌تواند ناشی از اثر این ماده در افزایش میزان بقاء نورون های پیوند زده شده در مغز موش‌های پارکینسونی باشد. مرگ نورون های پیوندی عمدتاً از طریق آپوپتوز صورت می‌گیرد [۳۳، ۳۹] و شواهد قابل توجهی وجود دارد که نشان می‌دهد TEA از طریق مهار

کانال‌های پتاسیمی سبب مهار و یا تضعیف فرایند آپوپتوزیس می‌شود [۱۳، ۱۷، ۱۸، ۳۵، ۷۳]. ونگ و همکاران (2008) نشان دادند که کاربرد TEA سبب کاهش آپوپتوزیس القاء شده با استاروسپورین (ST) در سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌شود [۳۵]. ST خروج پتاسیم از طریق کانال‌های وابسته به ولتاژ را افزایش می‌دهد. این مطالعه مشخص نمود که TEA از افزایش بیان پروتئین پیش آپوپتوزیس Bax و همچنین کاهش پروتئین ضد آپوپتوز Bcl-2 که توسط ST القاء می‌شوند جلوگیری می‌نماید. مطالعه ای دیگر نشان داد که فعال شدن جریان پتاسیمی delayed rectifier حساس به TEA در سلول‌های بنیادی در حال تمایز مرتبط با آپوپتوزیس می باشد [۱۸]. همچنین خروج پتاسیم از طریق کانال‌های پتاسیمی برای پیشرفت آپوپتوزیس در انتروسیت ها ضروری بوده و کاربرد TEA با جلوگیری از گسیختگی DNA، فعال شدن کاسپازها، آزادشدن سیتوکروم c از میتوکندری ها و کاهش پتانسیل غشاء میتوکندری ها از آپوپتوزیس در این سلول‌ها جلوگیری می‌نماید [۱۳]. در مطالعه صورت گرفته توسط یو و همکاران (2006) مشخص گردید که TEA مرگ نورونی القاء شده توسط AB_{1-40} را در نورون های قشری کشت داده شده از طریق اثر بر اندیکاتورهای آپوپتوز مهار می‌نماید [۳۷]. بررسی‌های صورت گرفته نشان می‌دهند که TEA می‌تواند آپوپتوز القاء شده بوسیله روی را در نورون های دوپامینرژیک مهار نماید [۲۷]. TEA همچنین آپوپتوز القاء شده توسط camptothecin را در نورون های گرانولی مخچه کشت داده شده مهار می‌نماید [۱۷].

مکانیسم‌های دیگری نیز محتمل می باشد. به عنوان مثال نشان داده شده است که TEA می‌تواند پلاستیسیته یا انعطاف پذیری در سیناپس بین فیبرهای گلوتاماتینرژیکی قشری با نورون های استریاتوم را بهبود بخشیده و تولید LTP در این سیناپس ها را تقویت نماید [۲۲]. البته این مکانیسم نمی‌تواند در مدل 6-OHDA قابل قبول باشد زیرا اساس چرخش‌های القاء شده با آپومرفین غالب بودن فعالیت مدارها در عقده های قاعده ای در یک طرف مغز می باشد. چنانچه TEA با تقویت LTP فعالیت این مدارها را بهبود بخشد این بهبود دو طرفه بوده و تغییری در میزان چرخش‌ها بوجود نمی‌آورد. همچنین در این تحقیق برای برطرف نمودن این مشکل TEA و ویتامین‌های گروه ب به گروه شاهد نیز تجویز گردید لکن بهبودی در این گروه ملاحظه نگردید که خود دلیل قاطعی برای رد این مکانیسم در بهبود علائم رفتاری در نتایج ما می باشد. از سوی دیگر مطالعات نشان داده‌اند که تجویز TEA می‌تواند در درمان علائم پارکینسونیسم در مدل 6-OHDA موثر باشد [۱۴]. TEA سبب فعال شدن نورون های خاموش، افزایش فرکانس شلیک در نورون ها و تبدیل الگوی شلیک تونیک به الگوی شلیک انفجاری می گردد [۴، ۱۲، ۲۴]. نشان داده شده است که چرخش‌های ایجاد شده در قبال تزریق آپومرفین در موش‌های صحرایی دریافت کننده سم 6-OHDA هنگامی آشکار می‌شوند که ۹۰-۵۰٪ از نورون ها در هسته جسم سیاه طرف تزریق سم تخریب گردند [۳۸]. از این رو TEA می‌تواند با افزایش فعالیت نورون های باقی مانده و یا فعال کردن نورون های خاموش و یا آسیب دیده در جسم سیاه طرف آسیب سبب کاهش علائم رفتاری این بیماری گردد. در صورت وجود این اثرات حاد می‌باشند و بررسی‌ها نشان داده است که از ۱۵ دقیقه پس از تزریق شروع شده و حداکثر چند ساعت پس از آن از بین می‌روند [۳]. بنابراین تنها در صورت تزریق TEA در زمان انجام آزمون چرخشی احتمال ایجاد این اثرات ممکن بود حال آن که در مطالعه حاضر تجویز TEA روزها و هفته‌ها قبل از انجام آزمون‌های رفتاری متوقف گردید.

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

اختلال در عملکرد میتوکندری ها از مهمترین مکانیسم‌های درگیر در مرگ نورون های دوپامینرژیک و پاتوفیزیولوژی بیماری پارکینسون عنوان شده‌اند. سمومی که در حیوانات ایجاد پارکینسون می‌نمایند مانند MPTP، 6-OHDA و روتنون از طریق مهار کمپلکس I میتوکندریایی و آسیب اکسیداتیو عمل می‌نمایند [۶، ۲۸، ۳۴]. عملکرد ناقص میتوکندری ها ناشی از اکسیداسیون DNA و RNA، پروتئین و لیپیدهای غشایی می باشد. اکسیداسیون ساختار بسیاری از آنزیم‌ها را تغییر داده و از این طریق سبب تمایل آنها را به سوبستراها یا کوانزیم هاشان و همچنین فعالیت آنها را کاهش می‌دهد. از این رو تغذیه میزان بالایی از کوفاکتورهای میتوکندریایی و سوبستراهای آنزیم‌های میتوکندریایی می‌تواند برخی اثرات ناشی از کهولت سن را معکوس نماید زیرا سطوح بالای سوبستراها و کوفاکتورها می‌تواند به آنزیم‌ها متصل شده و محل فعال آنها را از آسیب اکسیداتیو محافظت نموده و فعالیت آنزیم‌هایی که به دلیل استرس اکسیداتیو تا حدودی آسیب دیده‌اند را افزایش دهد. پیشنهاد شده است که درمان با دوزهای بالای ویتامین B می‌تواند آنزیم‌های مختلف را که بر اثر عوامل مختلف مانند پیری و یا بیماری‌های ژنتیکی تمایل اتصال با کوانزیم کاهش یافته دارند را تحریک نماید. ویتامین‌های ب پیش ساز کوفاکتورهای آنزیم‌های میتوکندریایی می‌باشند.

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

سپاسگزاری

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

References

[1] Andereggen L, Meyer M, Guzman R, Ducray AD, Widmer HR, Effects of GDNF pretreatment on function and survival of transplanted fetal ventral mesencephalic cells in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. ***Brain Res*** 1276 (2009) 39-49.

[2] Bjorklund LM, Sánchez-Pernaute R, Chung S, Andersson T, Chen IY, McNaught KS, Brownell AL, Jenkins BG, Wahlestedt C, Kim KS, Isacson O., Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. ***PNAS*** 19 (2002) 2344-2349.

[3] Capacio BR, Chang FC, Spriggs D, Byers CE, Matthews RL, Benton BJ, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 4-aminopyridine in awake guinea pigs. ***Drug Chem Toxicol*** 20 (1997) 151-172.

[4] Cavelier P, Pouille F, Desplantez T, Beekenkamp H, Bossu JL, Control of the propagation of dendritic low-threshold Ca^{2+} spikes in Purkinje cells from rat cerebellar slice cultures. ***J Physiol*** 540 (2002) 57-72.

[5] Chen H, Zhang SM, Schwarzschild MA, Hernán MA, Logroscino G, Willett WC, Folate intake and risk of Parkinson's disease. ***Am J Epidemiol*** 160 (2004) 368-375.

[6] Dauer W, Przedborski S, Parkinson's disease: Mechanisms and Models. ***Neuron*** 39 (2003) 889-909.

[7] Duan W, Ladenheim B, Cutler RG, Kruman II, Cadet JL, Mattson MP, Dietary folatedeficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. ***J Neurochem*** 80 (2002) 101-110.

[8] Dunnett SB, Björklund A, Basic neural transplantation techniques. I. Dissociated cell suspension grafts of embryonic ventral mesencephalon in the adult rat brain.

Brain Res Brain Res Protoc 1 (1997) 91-99.

[9] Esmaeili MH, Fraidouni N, Sophiabadi M, Sarookhani M, haghdoost-Yazdi H, High intake of B complex attenuates 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rat. ***Daneshvar*** 102 (2013), in press.

[10] Fraidouni N, Sarookhani M, Sophiabadi M, Haghdoost-Yazdi H, High intake of folic acid attenuates 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonismin rats independent of serum level of homocysteine. ***Physiol Pharmacol*** 16 (2012) 231-244.

[11] Furukawa K, Barger SW, Blalock EM, Mattson MP, Activation of K1channels and suppression of neuronal activity by secreted beta-amyloid-precursor protein. ***Nature*** 379 (1996) 74-78.

[12] Gavelier P, Desplantez T, Beekenkamp H, Bossu JL, K^+ channel activation and low-threshold Ca^{2+} spike of rat cerebellar Purkinje cells in vitro. ***Neuroreport*** 14 (2003) 167-171.

[13] Grishin A, Ford H, Wang J, Li H, Salvador-Recatala V, Levitan ES, Attenuation of apoptosis in enterocytes by blockade of potassium channels. ***Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol***. 289 (2005) 815-821.

[14] Haghdoost-Yazdi H, Faraji A, Fraidouni N, Movahedi M, Hadibeygi E, Vaezi F, Significant effects of 4-aminopyridine and tetraethylammonium in the treatment of 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease. ***Behav Brain Res*** 223 (2011) 70-74.

[15] Haghdoost-Yazdi H, Fraidouni N, Faraji A, Jahanihashemi H, Sarookhani M, High intake of folic acid or complex of B vitamins provides anti-Parkinsonism effect: No role for serum level of homocysteine. ***Behav Brain Res*** 233 (2012) 375- 381.

[16] Hellenbrand W, Boeing H, Robra BP, Seidler A, Vieregge P, Nischan P, Diet and Parkinson's disease. II: a possible role for the past intake of specific nutrients. Results from a selfadministered food frequency questionnaire in a case-control study. ***Neurology*** 47 (1996) 644-650.

[17] Hernández-Enríquez B, Arellano RO, Morán J, Role for ionic fluxes on cell death and apoptotic volume decrease in cultured cerebellar granule neurons. ***Neuroscience*** 167 (2010) 298-311.

[18] Hribar M, Bloc A, Medilanski J, Nüsch L, Eder-Colli L, Voltage-gated K^+ current: a marker for apoptosis in differentiating neuronal progenitor cells? ***Eur J Neurosci*** 20 (2004) 635-648.

[19] Jensen P, Bauer M, Jensen CH, Widmer HR, Gramsbergen JB, Blaabjerg M, Expansion and Characterization of Ventral Mesencephalic Precursor Cells: Effect of Mitogens and Investigation of FA1 as a Potential Dopaminergic Marker. ***J Neurosci Res*** 85 (2007) 1884-1893.

[20] Jensen P, Pedersen EG, Zimmer J, Widmer HR, Meyer M, Functional effect of FGF2- and FGF8-expanded ventral mesencephalic precursor cells in a rat model of Parkinson's disease. ***Brain Res*** 1218 (2008) 13-20.

[21] Jia H, Liu Z, Li X, Feng Z, Hao J, Li X, Synergistic anti-Parkinsonism activity of high doses of B vitamins in a chronic cellular model. ***Neurobiol Aging*** 31 (2010) 636-646.

[22] Kaminski Schierle Gs, Hansson O, Brundin P, Flunarizine improves the survival of grafted dopaminergic neurons. ***Neuroscience*** 94 (1999) 17-20.

[23] Lau LM, Koudstaal PJ, Van MeursJBJ, Uitterlinder AG, Hofman A, Breteler MMB, Methylenetetrahydrofolatereductase C677T genotype and PD. ***Ann Neurol*** 57 (2005) 927-930.

[24] Matsumoto S, Yoshida S, Takahashi M, Saiki C, Takeda M,The roles of I(D), I(A) and I(K) in the electrophysiological functions of small diameter rat trigeminal ganglion neurons. ***Curr Mol Pharmacol*** 3 (2010) 30-36.

[25] Nikkhah G, Rosenthal C, Falkenstein G, Roedter A, Papazoglou A, Brandis A, Microtransplantation of dopaminergic cell suspensions: further characterization and optimization of grafting parameters. ***Cell Transplant*** 18 (2009) 119-133.

[26] Norman ED, Egli RE, Colbran RJ, Winder DG, A potassium channel blocker induces a long-lasting enhancement of corticostriatal responses. ***Neuropharmacology*** 48 (2005) 311-321.

[27] Olaf S, Fowler B, Piertzik K, Huemer M, Haschke-Becher E, Semmler A, et al, M. Homocysteine, folate & vitamin B12 in neuropsychiatric diseases: review & treatment recommendations. ***Expert Rev Neurother*** 9 (2009) 1393-1412.

[28] Przedborski S, Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. ***Parkinsonism Relat Disord*** 11 (2005) 3-7.

[29] Sachdev PS, Valenzuela M, Wang XL, Looi JC, Brodaty

H, Relationship between plasmahomocysteine levels and brain atrophy in healthy elderly individuals. ***Neurology*** 58 (2002) 1539-1541.

[30] Sharma RK, Netland PA, Kedrov MA, Johnson DA, Preconditioning protects the retinalpigment epithelium cells from oxidative stress-induced cell death. ***Acta Ophthalmol*** 87 (2009) 82-88.

[31] Shi L, Song N, Jiang H, Wang J, Ma Z, Xie J, Potassium channels are involved in zinc-induced apoptosis in MES23.5 cells. ***J Neurosci Res*** 87 (2009) 514-521.

[32] Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M, Potassium channels: moleculardefects, diseases, and therapeutic opportunities. ***Pharmacol Rev*** 52 (2000) 557-594.

[33] Sortwell CE, Camargo MD, Pitzer MR, Gyawali S, Collier TJ, Diminished survival ofmesencephalic dopamine neurons grafted into aged hosts occurs during the immediate postgrafting interval. ***Exp Neurol*** 169 (2001) 23-29.

[34] Tsang AHK, and Chung KKK, Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. ***Biochim Biophys Acta*** 1792 (2009) 643-650.

[35] Wang S, Wang JA, Li J, Zhou J, Wang H, Voltage-dependent potassium channels areinvolved in staurosporine-induced apoptosis of rat mesenchymal stem cells. ***Cell Biol Int*** 32 (2008) 312-319.

[36] Yu HB, Li ZB, Zhang HX, Wang XL, Role of potassium channels in Abeta(1-40)-activated apoptotic pathway in cultured cortical neurons. ***J Neurosci Res*** 84 (2006) 1475-1484.

[37] Yu SP, Yeh CH, Gottron F, Wang X, Grabb MC, Choi DW, Role of the outward delayedrectifier K1 current in ceramide-induced caspase activation and apoptosis in cultured cortical neurons. ***J Neurochem*** 73 (1999) 933-941.

[38] Yuan H, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y, Histological, behavioural and neurochemical evaluation of medial forebrain bundle and striatal 6-OHDA lesions as rat models of Parkinson's disease. ***J Neurosci Methods*** 144 (2005) 35-45.

[39] Zawada WM, Zastrow DJ, Clarkson ED, Adams FS, Bell KP, Freed CR, Growth factors improve immediate survival of embryonic dopamine neurons after transplantation into rats. ***Brain Res*** 786 (1998) 96-103.