

اثر تجویز حاد مهار کننده های کانال های پتاسیمی بر علایم رفتاری پارکینسونیسم القا شده با ۶-هیدروکسی دپامین در موش صحرایی

محمد صوفی آبادی^۱، طاهره درگاهی^۲، حسن اژدری زرمهری^۳، هاشم حقدوست یزدی^۴

^۱ دانشیار گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی - دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

^۲ دانشجوی علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

^۳ استادیار فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه، تربت حیدریه، ایران

^۴ استادیار گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

نشانی نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات سلولی ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، دکتر هاشم حقدوست یزدی

E-mail: hhaghdooost@gmail.com

وصول: ۹۲/۱۱/۱۶، اصلاح: ۹۳/۱/۲۵، پذیرش: ۹۳/۳/۴

چکیده

زمینه و هدف: ۴-آمینوپیریدین (4-AP) و تترااتیل آمونیوم (TEA) دو مهار کننده کانال های پتاسیمی می باشند؛ که اثرات سودمندی در درمان برخی بیماری های نورولوژیک همچون مولتیپل اسکلروزیس، اتاکسیا و الزایمر نشان داده اند. در این مطالعه اثر تجویز حاد 4-AP و TEA در درمان علایم رفتاری پارکینسونیسم القا شده با سم ۶-هیدروکسی دپامین (6-OHDA) در موش های صحرایی نر مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: سم ۶-هیدروکسی دپامین به وسیله جراحی استرنوتاکسیک و از طریق سرنگ هامیلتون به درون ناحیه دسته مغز جلویی میانی نیمکره چپ موش ها تزریق شد. سپس در هفته سوم پس از جراحی موش ها در دو مرحله قبل و پس از کاربرد داروها تحت آزمون رفتاری چرخش القا شده با اپومرفین قرار گرفتند. در هفته چهارم آزمون روتارد در حضور مهار کننده ها در شش روز متوالی انجام گرفت.

یافته ها: 4-AP در دوزهای ۲۰۰ و ۵۰۰ $\mu\text{g}/\text{kg}$ اثر قابل ملاحظه ای نداشت؛ اما، در دوز $۱۰۰۰ \mu\text{g}/\text{kg}$ سبب بهبود معنی دار علایم رفتاری پارکینسونیسم در آزمون چرخشی گردید. از طرف دیگر این دارو سبب تضعیف اجرای حرکتی موش ها در آزمون روتارد شد. TEA در دوز $۱ \text{mg}/\text{kg}$ بی اثر بود. در دوز $۲ \text{mg}/\text{kg}$ سبب کاهش معنی دار و در دوز $۵ \text{mg}/\text{kg}$ سبب افزایش معنی دار تعداد چرخش ها شد. TEA اثری بر یادگیری حرکتی در آزمون روتارد نداشت.

نتیجه گیری: نتایج تحقیق حاضر نشان می دهد که 4-AP و TEA به صورت وابسته به دوز برخی علایم رفتاری پارکینسونیسم را تضعیف می کنند. اما، ممکن است برخی علایم دیگر را تشدید نمایند.

واژگان کلیدی: ۴-آمینوپیریدین، تترااتیل آمونیوم، ۶-هیدروکسی دپامین، اپومرفین، آزمون چرخشی، روتارد.

مقدمه

بیماری پارکینسون (PD) یک اختلال نورودژنراتیو مزمن می باشد که به واسطه مرگ تدریجی نورون های دپامینرژیک هسته‌ی جسم سیاه (SN) ایجاد می شود. شیوع این بیماری در کشورهای صنعتی در حدود ۳٪ درصد می باشد، ولی این میزان برای افراد بالای ۶۰ سال به ۱ درصد نیز می رسد (۱). علائم PD می تواند به وسیله‌ی چندین دارو که یا میزان دپامین مغز را افزایش می دهند و یا اثرات آن را تقلید می کنند، بر طرف شده یا کاهش یابد. با وجود این، کارایی این درمان ها با مرور زمان کاهش می یابد و اغلب اختلال در اعمال حرکتی و واکنش های سایکوتیک و دیس کینزیا ظاهر می شوند که خود، سبب پایین آمدن کیفیت زندگی می گردند (۴-۲). از این رو، تحقیقات به سمت شناسایی استراتژی ها و درمان های دارویی نوین و مؤثرتر جهت داده شده است.

کانال های پتاسیمی، گسترده ترین کانال یونی در تمامی موجودات زنده می باشند. آن ها، در نورون ها و در تنظیم سطح پتانسیل استراحت غشاء، شکل، مدت زمان و فرکانس شلیک پتانسیل عمل نقش دارند. این کانال ها، همچنین نقش مهمی در تنظیم سطح تحریک پذیری سلول ها داشته، از این طریق فعالیت الکتریکی سلول ها را تنظیم می نمایند (۶-۵). گزارش هایی وجود دارد که نشان می دهد کانال های پتاسیمی در مرگ برنامه ریزی شده ی سلول ها نقش داشته و استفاده از مهارکننده های این کانال ها، این مرگ را مهار می کند (۶).

۴- امینوپیریدین (4-AP) و تترااتیل امونیوم (TEA)، دو مهارکننده ی وسیع الطیف کانال های پتاسیمی می باشند. 4-AP عمدتاً کانال های پتاسیمی به سرعت غیرفعال شونده را که جریان پتاسیمی نوع A را میانجی می نمایند، مهار می کند. کاربرد این دارو، سبب افزایش شلیک پتانسیل عمل در نورون ها گردیده و در برخی از آنها، شلیک تونیک را به شلیک انفجاری تبدیل می نماید (۸-۷). گزارش های متعدد نشان می دهد که این دارو، اثرات

مفیدی را در درمان برخی اختلالات نورولوژیک دارا می باشد. 4-AP، هدایت ایمپالس در اکسون های آسیب دیده را بهبود می بخشد و به عنوان یک داروی تأیید شده توسط سازمان غذا و داروی ایالات متحده امریکا (FDA) در درمان بیماری مولتیپل اسکلروزیس مورد استفاده قرار می گیرد (۹). همچنین نشان داده شده که 4-AP در درمان اختلالات ناشی از عملکرد ناقص سلول های پورکنز مخچه همچون نیستاگموس و اتاکسیا اثرات مفیدی دارد (۱۱-۱۰). همچنین گزارش شده که تزریق سیستمیک 4-AP، می تواند با فعال کردن گیرنده های NMDA گلوتاماتی از مرگ نورونی القاء شده با کاینات در هیپوکامپ ممانعت کند (۱۲).

تترااتیل امونیوم (TEA)، یک مهارکننده ی قوی کانال های پتاسیمی نوع delayed rectifier و وابسته به کلسیم با کنداکتانس بالا می باشد (۶). کاربرد این مهارکننده در نورون ها، هم باعث افزایش تحریک پذیری آن ها و تقویت هدایت دندروسوماتیک شده و هم باعث القای شلیک انفجاری می شود (۸، ۱۴-۱۳). گزارش هایی در ارتباط با نقش کانال های پتاسیمی حساس به TEA در پاتوفیزیولوژی بیماری الزایمر ارائه شده است (۱۶-۱۵).

کانال های پتاسیمی، به طور گسترده ای در عقده های قاعده ای توزیع شده اند. این کانال ها، نقش مهمی در تنظیم سطح تحریک پذیری مدارهای نورونی عقده های قاعده ای داشته و در مرگ برنامه ریزی شده نورون های دپامینرژیک سهم می باشند (۱۷). نشان داده شده که جریان پتاسیمی نوع A، در نورون های هسته ی جسم سیاه فعال بوده و مهار آن، سبب افزایش شلیک انفجاری در این نورون ها می گردد (۱۸). از طرف دیگر، مطالعات انجام شده بر روی برش های مغزی از استریاتوم، نشان می دهد که کاربرد TEA، تولید تقویت طولانی مدت (LTP) در مدارهای نورونی این ناحیه را تسهیل می نماید که خود می تواند به عنوان یک اثر مفید در درمان بیماری پارکینسون لحاظ شود (۱۹).

TEA2، 1000 و TEA5 تقسیم و بر روی آنها، آزمون روتارد انجام گرفته شده است. n در هر گروه، برابر 6 بوده است. به غیر از گروه‌های ذکر شده، نتایج یک گروه دیگر به نام گروه موش‌های سالم (n=8) در آنالیز نتایج آزمون روتارد مورد استفاده قرار گرفته است. موش‌های سالم، سم 6-OHDA را دریافت نکرده‌اند.

طراحی آزمایش: شکل ۱، مراحل مختلف این تحقیق به همراه زمان‌بندی آنها را نشان می‌دهد. تمامی موش‌ها (به غیر از گروه موش‌های سالم)، تحت جراحی استرئوتاکسیک قرار گرفته و تزریق سم 6-OHDA در مغز آنها صورت گرفته است. در گروه اول، آزمون چرخش القاء شده با اپومرفین، طی دوبار و در هفته‌ی دوم و سوم پس از عمل جراحی انجام گرفته و سپس ۴۸ ساعت بعد از آزمون هفته‌ی سوم، به موش‌هایی که بیش از ۱۰۰ چرخش در ساعت را در هر دو آزمون نشان داده‌اند ابتدا دوز لازم از دارو یا سالیین تزریق گردیده، سپس آزمون چرخشی انجام شده است. برای گروه دوم، آزمون چرخشی بدون کاربرد داروها، در هفته‌ی دوم و سوم پس از جراحی صورت گرفته است. سپس موش‌ها به گونه‌ای به گروه‌های مورد نظر تقسیم شده که میانگین تعداد چرخش‌ها در گروه‌ها به یکدیگر نزدیک بوده‌اند. سپس در هفته‌ی چهارم، موش‌ها ابتدا دوز لازم از دارو یا سالیین را دریافت و سپس آزمون روتارد بر روی آنها صورت گرفته است. داروها، نیم ساعت قبل از انجام آزمون‌ها در موش‌ها، به صورت درون صفاقی تزریق شده است.

جراحی استرئوتاکسی: سم نورو توکسیک 6-OHDA (با غلظت ۴ میکروگرم در هر میکرولیتر حل شده در سالیین حاوی ۲٪ درصد اسیداسکوربیک) به وسیله‌ی جراحی استرئوتاکسیک به ۲ ناحیه در دسته‌ی میانی مغز جلویی (medial forebrain bundle, MFB) راست با مختصات برحسب برگما -4.4 AP، -1.2 L و -7.8 DV و - AP: 4، -0.8 L و -8 DV بر اساس اطلس پاکسینوز و واتسون (۲۰) به مغز موش‌ها تزریق گردیده است. حیوانات

علی‌رغم شواهد موجود که نشان می‌دهند مهار کانال‌های پتاسیمی ممکن است در درمان بیماری پارکینسون مؤثر باشد، تاکنون هیچ تحقیقی اثر مداخله فارماکولوژیک در عملکرد این کانال‌ها را در درمان این بیماری بررسی نکرده است. از این‌رو، در تحقیق حاضر، اثر 4-AP و TEA بر روی علائم رفتاری پارکینسونیسم القاء شده توسط سم 6-OHDA در موش‌های صحرایی مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

حیوانات و گروه‌های آزمایشی: نمونه‌ی حیوانی در این تحقیق، موش‌های صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار و در محدوده‌ی وزنی ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم بوده که از موسسه‌ی رازی (کرج) خریداری شده‌اند. موش‌ها در حیوان‌خانه‌ی دانشگاه در اتاقی با درجه‌ی حرارت کنترل شده و شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و درحالی که به آب و غذا به صورت نامحدود دسترسی داشته، نگاه‌داری شده‌اند.

موش‌ها در ۲ گروه بزرگ قرار گرفته‌اند: ۱- گروه موش‌هایی که سم 6-OHDA را دریافت کرده و شدت پارکینسونیسم در آنها توسط آزمون چرخش القاء شده با اپومرفین بررسی شده است. این گروه، خود به هفت زیرگروه سالیین (n=10)، (n=11)، 4-AP200، 4-AP500 (n=16)، (n=10) 4-AP1000 که به ترتیب تک دوز 4-AP به میزان ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم به‌ازای هر کیلو وزن بدن و سه گروه TEA1 (n=9)، TEA2 (n=8) و TEA5 (n=8) که به ترتیب تک دوز TEA به میزان ۱، ۲ و ۵ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلو وزن بدن می‌باشند، دریافت داشته‌اند. ۲- گروه موش‌هایی که سم 6-OHDA را دریافت کرده و شدت پارکینسونیسم در آنها توسط آزمون چرخش القاء شده با اپومرفین بررسی شده است. سپس موش‌هایی که شدت پارکینسونیسم بالایی را نشان داده‌اند، به ۵ زیر گروه سالیین، 4-AP، 4-AP500

ابتدا با استفاده از کتامین / زایلازین (6/60 mg/kg) بیهوش و سپس در دستگاه استرئوتاکس (Stoelting, USA) قرار داده شده اند. با استفاده از سرنگ هامیلتون ۴ میکرولیتر (در هر ناحیه ۲ میکرولیتر) از محلول حاوی سم 6-OHDA به-آهستگی و در عرض ۵ دقیقه تزریق شده است. در پایان، سرنگ برای ۵ دقیقه در محل خود نگه داشته و به آهستگی با سرعت ۱ mm/min از مغز بیرون آورده شده است.

آزمون های رفتاری:

الف- آزمون چرخش القاء شده با اپومرفین: این آزمون، بر اساس روش به کار برده شده توسط فوجی و همکاران در سال ۱۹۹۶ (۲۱) صورت گرفته است. به طور خلاصه، چنانچه تزریق سم 6-OHDA سبب تخریب گسترده ی نورونی در هسته ی جسم سیاه گردد، ۲ تا ۴ هفته پس از جراحی، موش ها در قبال تزریق اپومرفین (اگونست گیرنده های دوپامینرژیک) چرخش های پی در پی را به سمت مقابل محل تزریق نشان می دهند. تعداد این چرخش ها در واحد زمان معیاری از شدت تخریب نورونی در جسم سیاه و تأثیر مداخله می باشد. برای اجرای این آزمون، ابتدا موش ها در داخل یک استوانه ی پلکسی گلاس شفاف با ابعاد ۲۸ سانتی متر قطر و ۳۸ سانتی متر ارتفاع قرار داده و به آن ها ۵ دقیقه جهت سازش با محیط زمان داده شده است. سپس، اپومرفین هیدروکلراید (0.5 mg/kg, i.p) به موش ها تزریق شده و ۱ دقیقه پس از آن، تعداد چرخش ها به طرف محل تزریق سم (عدد منفی) و یا خلاف آن (عدد مثبت) به مدت ۱ ساعت ثبت گردیده است. در پایان، تعداد چرخش خالص موش ها به یک طرف با جمع جبری اعداد به دست آمده محاسبه شده است.

ب- آزمون روتارود: در این آزمون، توانایی حرکتی، حفظ تعادل و همچنین یادگیری حرکتی حیوانات مورد ارزیابی قرار گرفته است. در این تحقیق، آزمون روتارود بر اساس روش شرح داده شده توسط لاندبلد و همکاران (۲۲) انجام گرفته است. دستگاه روتارود (M.T6800, Borj Sanat, Iran) شامل یک میله ی چرخان می باشد که سرعت چرخش

آن در طول زمان افزایش می یابد. مدت زمانی که حیوان بر روی میله باقی می ماند، به عنوان عملکرد در دستگاه روتارود محاسبه می شود. در این تحقیق، مدت زمان آزمایش ۲۰۰ ثانیه بوده که در آن سرعت چرخش میله ی چرخان، از ۵ دور در دقیقه شروع شده و در عرض ۱۲۰ ثانیه، به حداکثر سرعت ۴۰ دور در دقیقه رسیده و در باقی زمان آزمایش در حداکثر سرعت مانده است. آزمون، در ۶ روز متوالی و هر روز ۱ جلسه انجام گرفت است. داده های آزمون روتارود، بر اساس معیار ناحیه ی زیر منحنی (area under the curve (AUC) که بر اساس فرمول ذیل محاسبه شده، ارائه گردیده اند:

$$AUC = \text{time on the rod} \times [0.44/2] \times \text{time on the rod} \times (s)$$
 عبارت است از میزان شتاب سرعت چرخش میله ی گردان دستگاه در ثانیه

تجزیه و تحلیل داده ها: داده ها بر حسب میانگین به-علاوه ی منهای خطای معیار بیان شده اند. تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از نرم افزار اکسل و آزمون تی استیودنت (student t-test) صورت گرفته است. $P < 0.05$ به عنوان سطح معنادار بودن اختلافها در نظر گرفته شده است.

برای هر دو ترکیب 4-AP و TEA، اثرات تشنج زا گزارش شده است (۲۴-۲۳). در بررسی هایی که در آزمایش های اولیه صورت گرفت، مشخص گردید که 4-AP دردوهای بالاتر از ۱ میلی گرم به ازای هر کیلو وزن بدن، سبب تشنج در موش های صحرائی می شود، اما TEA حتی در دوز ۵ میلی گرم به ازای هر کیلو وزن بدن، سبب ایجاد تشنج نگردیده است. در طول آزمایش ها و دردوهای مورد استفاده از این داروها نیز هیچ گونه تشنجی و یا رفتارهای غیر عادی دیگر مشاهده نشده است.

اثر 4-AP و TEA بر آزمون چرخش القاء شده با اپومرفین

شکل ۲، اثر 4-AP و TEA را بر تعداد چرخش های القاء شده با اپومرفین را نشان می دهد. 4-AP دردوهای

و اگرچه موش‌های دریافت‌کننده سالین، یادگیری نسبی را در اجرای حرکتی در جلسات متوالی نشان داده‌اند، اما موش‌های گروه‌های 4-AP هیچ گونه یادگیری را نشان نداده و AUC در آن‌ها در جلسات ۳، ۴ و ۶ به میزان معناداری، پایین‌تر از آن در گروه سالین بوده‌است. شکل ۳، پانل پایین اثر TEA را در دوزهای ۲ و ۵ میلی‌گرم به-ازاء هر کیلو، وزن بدن را بر اجرای حیوانات در دستگاه روتارد نشان می‌دهد. TEA نیز همانند 4-AP، اثرات دوگانه‌ای بر این آزمون داشته‌است. TEA در دوز ۵، زمان ماندن بر میله‌ی چرخان دستگاه را در جلسات اول و دوم نسبت به گروه سالین به میزان معناداری افزایش داده‌است. درحالی‌که دوزهای ۲ این دارو چنین اثراتی نداشته‌است. از طرف دیگر، گروه دریافت‌کننده‌ی TEA در دوز ۲، زمان ماندن پایین‌تری را نسبت به گروه سالین در جلسات ۳ و ۴ آزمون نشان داده‌اند. با وجود این، TEA بر خلاف 4-AP اثرات منفی بر یادگیری حرکتی نداشته و گروه‌های دریافت‌کننده این دارو همانند گروه سالین، یادگیری نسبی را نشان داده و الگوی یادگیری حرکتی در آنها همانند گروه سالین بوده‌است.

بحث

مطالعات مختلف که بر روی مدل‌های حیوانی انجام شده، نشان می‌دهند که تجویز مهارکننده‌های کانال‌های پتاسیمی همچون 4-AP و TEA، اثرات سودمندی در درمان چندین بیماری نورولوژیکی همچون مولتیپل اسکلروزیس (۲۵)، الزایمر (۲۶)، اتاکسیا و نیستاگموس (۱۰، ۲۷) و میاستنی گراویس (۲۵) دارند. کانال‌های پتاسیمی، توزیع گسترده‌ای در عقده‌های قاعده‌ای مغز داشته و در تحریک‌پذیری مدارهای نورونی در آن‌ها و همچنین حساسیت مکانیسم‌های تنفس سلولی میتوکندریایی نوروون‌ها به عوامل ایجادکننده‌ی بیماری پارکینسون نقش دارند (۱۷). براین اساس، در این مطالعه، اثر تجویز حاد 4-AP و TEA در کاهش علائم رفتاری

۲۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم، اثر قابل ملاحظه‌ای بر تعداد چرخش‌ها نداشته، اما در دوز ۱۰۰۰ میکروگرم، تعداد چرخش‌ها را به صورت معناداری کاهش داده‌است. پس از تجویز 4-AP در دوز ۱۰۰۰، تعداد چرخش‌ها ۶۹٪ کمتر از تعداد چرخش‌ها در دومین آزمون پس از جراحی بوده-است. اثر TEA، بر تعداد چرخش‌ها تا حدی پیچیده بوده-است. به این صورت که در دوز ۱ میلی‌گرم اثری نداشته، اما در دوز ۲ میلی‌گرم تا ۷۳٪ از تعداد چرخش‌ها کاسته‌است. از طرف دیگر، در دوز ۵ میلی‌گرم، اثر معکوس داشته و سبب افزایش تعداد چرخش‌ها به میزان ۵۰٪ گردیده‌است.

اثر 4-AP و TEA بر آزمون روتارد: آزمون روتارد در هفته‌ی چهارم پس از جراحی در شش روز متوالی از این گروه‌ها انجام یافته‌است. همانند آزمون چرخشی، حیوانات نیم‌ساعت قبل از شروع آزمون، دوز لازم از دارو یا سالین را دریافت کرده و سپس در دستگاه روتارد قرار گرفته‌اند. آزمون روتارد، توانایی اجرای حرکتی حیوانات را در حفظ تعادل و از آن مهم‌تر، یادگیری حرکتی را در جلسات متوالی آزمون نشان می‌دهد. شکل ۳، نتایج به دست آمده از این آزمون را به تصویر می‌کشد. همانطور که مشاهده می‌گردد، موش‌های سالم، به سرعت، نحوه‌ی قدم‌زدن بر میله‌ی چرخان را آموخته‌اند. به گونه‌ای که از جلسه‌ی چهارم به بعد، به حداکثر زمان ماندن بر میله‌ی چرخان رسیده‌اند. از طرف دیگر، موش‌های پارکینسونی شده، یادگیری ضعیفی را نشان داده و هیچگاه به زمان حداکثر در روتارد نرسیده‌اند. مقایسه‌ی نتایج به-دست آمده از اجرای حرکتی موش‌های دریافت سالین و گروه‌های دریافت‌کننده 4-AP، نشان می‌دهد که تزریق 4-AP اثرات دوگانه‌ای داشته‌است. تزریق این دارو در اولین جلسه‌ی آزمون، زمان ماندن بر میله‌ی چرخان دستگاه روتارد را به میزان معناداری نسبت به گروه دریافت‌کننده‌ی سالین افزایش داده که نشان می‌دهد این دارو توانایی حفظ تعادل را در موش‌های پارکینسونی بهبود بخشیده‌است. از طرف دیگر، 4-AP اثرات منفی بر یادگیری حرکتی داشته

بیماری پارکینسون القاء شده توسط سمّ 6-OHDA در موش های صحرایی مورد بررسی قرار گرفته است. بدین منظور، سمّ مورد نظر به ناحیهی MFB تزریق گردیده است. تزریق سمّ به این ناحیه، سبب ایجاد پارکینسونیسم شدید در موش های صحرایی مشابه مراحل نهایی بیماری پارکینسون در انسان می شود (۳۰). شدت پارکینسونیسم توسط آزمون چرخش القاء شده با اپومرفین ارزیابی شده، اما از آنجا که این آزمون، می تواند به سبب حساسیت زدایی (desensitization) به اپومرفین (۲۸)، نتایج منحرف کننده ای در برداشته باشد، از آزمون روتارد که یک آزمون بدون کاربرد دارو می باشد، نیز استفاده گردیده است. 4-AP و TEA در دوزهای غیر تشنج زا و نیم ساعت قبل از شروع آزمون های رفتاری تجویز شده اند. زیرا مطالعات نشان داده که شروع عمل و مدت زمان عمل این مهارکننده ها، به ترتیب حدود ۱۵ دقیقه و در چندین ساعت می باشد (۲۹-۳۰).

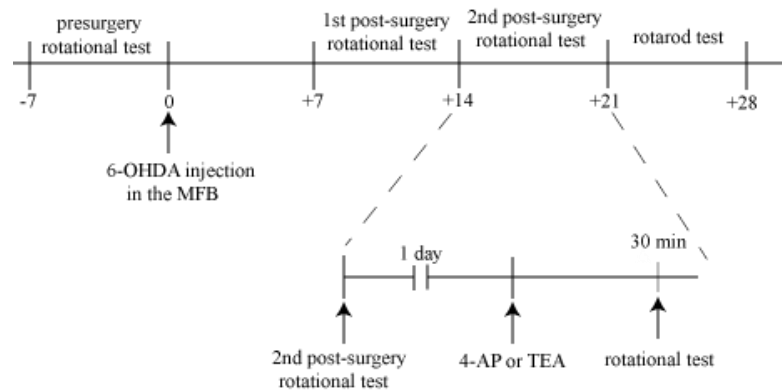
نتایج آزمون چرخشی نشان می دهد که دوز بالای 4-AP (۱۰۰۰)، سبب کاهش علائم پارکینسونیسم می شود، ولی دوزهای پایین و متوسط آن اثری ندارند. از طرف دیگر، TEA در دوز پایین بدون اثر، در دوز متوسط، اثر کاهنده و دردوز بالا، اثر تشدیدکننده بر این علائم داشته است. از طرف دیگر، نتایج آزمون روتارد نشان می دهد که تجویز 4-AP؛ نه تنها اثر سودمندی در کاهش علائم ندارد، بل که می تواند شدت این علائم را نیز افزایش دهد. TEA همچنین، اثر سودمندی در کاهش علائم در این آزمون نداشته، ولی سبب افزایش آنها نیز نگردیده است. براساس این نتایج، نمی توان به طور قطع اثرات سودمند این دو دارو را بر بیماری پارکینسون تأیید نمود. از آنجایی که این دو دارو، طیف وسیعی از کانال های پتاسیمی را مهار می کنند، نتایج ما نمی تواند گزارش های دیگر محققان که کانال های پتاسیمی را به عنوان هدفی تازه در درمان بیماری پارکینسون معرفی می نمایند، تأیید کنند (۱۷ و ۳۱). البته به دلایل ذیل نیز نمی توان اثرات مفید این دو دارو را

در درمان بیماری پارکینسون رد نمود:

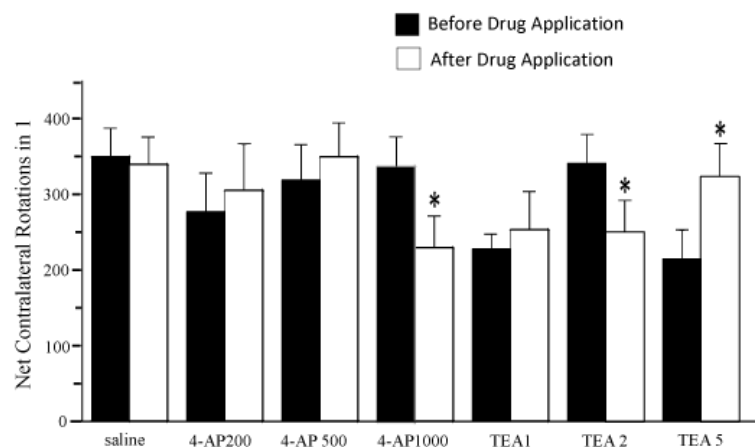
۱- اگر چه آزمون چرخشی، وابسته به دارو بوده و از این نظر نتایج آن می تواند مخدوش باشد، اما هنوز معتبرترین آزمون در ارزیابی رفتاری در مدل 6-OHDA پارکینسون می باشد. البته برای بروز چرخش در قبال تزریق آگونیست های دپامین، لازم است که تخریب نورونی گسترده در هسته ی جسم سیاه یک نیمکره رخ دهد (۲۸). از طرف دیگر، آزمون روتارد می تواند در ارزیابی پارکینسونیسم هنگام تخریب های متوسط تا شدید نورونی در SN نیز مفید باشد، ولی هنگامی بیشترین کاربرد را دارد که تخریب نورونی در هر دو نیمکره رخ دهد. از این رو، هرکدام از این آزمون ها می توانند تنها برخی از علائم تخریب نورونی در هسته ی جسم سیاه و پارکینسونیسم ایجاد شده متعاقب آن را ارزیابی نمایند. از طرف دیگر، بیماری پارکینسون در انسان، علائم مختلفی همچون: لرزش غیرارادی، سختی در اندام ها، کندی حرکات، بی ثباتی در وضعیت عمودی و راه رفتن و همین طور صورت ماسکی شکل دارد. ممکن است 4-AP یا TEA در کاهش برخی از این علائم اثرات سودمندی داشته باشند و یا برخی را تشدید کنند.

۲- در مورد 4-AP، ممکن است که دوزهای بالاتر این دارو، حداقل اثرات سودمند قوی تری داشته باشند، اما 4-AP در این دوزها می تواند تشنج زا باشد. از این رو، می توان با استفاده از مشتقات 4-AP مانند 4-AP-3-methanol که نشان داده شده در دوزهای پایین اثرات مؤثرتری در درمان بیماری مولتیپل اسکلروزیس دارند (۹) استفاده کرد. همچنان که برای درمان بیماری الزایمر پیشنهاد شده است (۳۲).

۳- برای مهارکننده های کانال های پتاسیمی، نقش حفاظت نورونی (neuroprotective) و آنتی آپوپتوتیک پیشنهاد شده است (۶، ۱۲، ۱۷). از این رو، کاربرد این دارو در بیماران پارکینسونی به ویژه در مراحل اول بیماری، می تواند سبب کاهش و یا آهسته نمودن مرگ نورون های



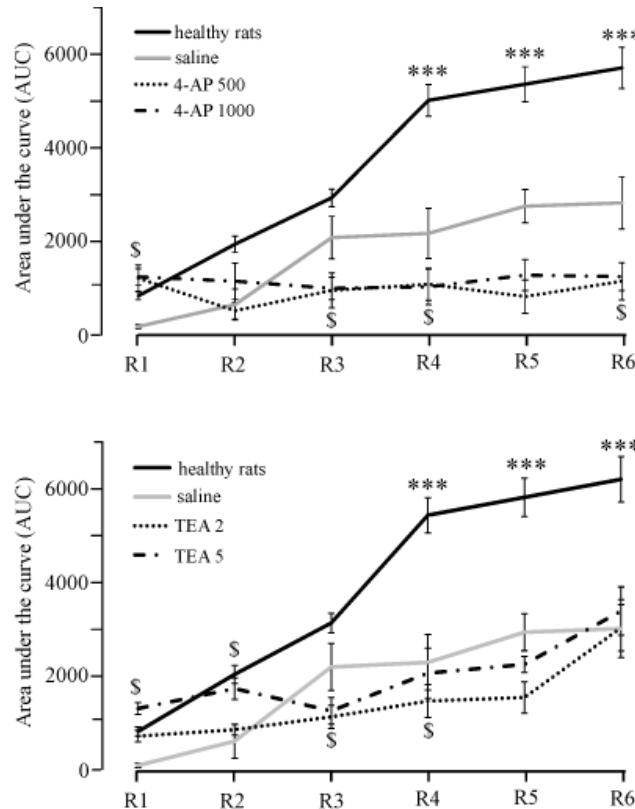
شکل ۱: دیاگرام برنامه‌ی زمانی آزمایش‌های انجام‌شده در این تحقیق را نشان می‌دهد. قبل از جراحی، موش‌ها تحت آزمون چرخش القاء‌شده با اپومرفین قرارگرفته و موش‌هایی که کمتر از ۱۰ چرخش در ساعت را نشان می‌دادند، جهت جراحی انتخاب شده‌اند. اثر 4-AP و TEA بر آزمون چرخشی ۴۸ ساعت پس از دومین آزمون چرخشی پس از جراحی مورد بررسی قرارگرفته‌است.



شکل ۲: هیستوگرام نتایج آزمون چرخش القاء‌شده با اپومرفین را قبل و بعد از تجویز 4-AP، TEA و سالین نشان می‌دهد. در هفته‌ی دوم پس از جراحی، آزمون چرخشی از موش‌ها درشرایطی که هیچ ماده‌ای وجود نداشته بود، به‌عمل آمده‌است. دو روز پس از آن، ابتداء موش‌ها، دوز لازم از دارو را دریافت‌کرده و سپس مورد آزمون قرارگرفته‌اند. مقادیر میانگین \pm خطای معیار می‌باشد. n برای گروه 4-AP 500= 16، 4-AP 200= 11، 4-AP 1000= 10، TEA1= 9، TEA2= 8، TEA5= 8 و سالین برابر ۱۰ بوده‌است. student's t-test * : P<0.05 در مقایسه‌ی تعداد چرخش‌ها پس از دریافت داروها با آن در آزمون هفته‌ی دوم پس از جراحی.

چه مکانیسم یا مکانیسم‌هایی اثرات سودمند 4-AP و TEA را در کاهش تعداد چرخش‌های القاء‌شده با اپومرفین و احتمالاً تضعیف برخی علائم بیماری پارکینسون میانجی می‌نمایند؟ 4-AP یک مهارکننده‌ی کانال‌های پتاسیمی غیرفعال شونده‌ی نوع A می‌باشد که از این طریق، سبب فعال شدن نورون‌های خاموش، افزایش فرکانس شلیک و القاء شلیک انفجاری در نورون‌ها می‌گردد (۶، ۱۴). در نورون‌های SN، کانال‌های نوع A وجود داشته و نشان داده‌شده که مهار آنها، فعالیت

دپامینرژیک شده و درکاهش پیشرفت علائم بیماری مؤثرباشد. در مطالعه‌ای که توسط Redman et al 2006 (۳۳) انجام شده، مشخص‌گردیده که اثر سمی 6-OHDA بر نورون‌های دپامینرژیک از طریق کانال‌های پتاسیمی وابسته به ولتاژ، میانجی‌شده و کاربرد انتاگونست این کانال‌ها، جلو مرگ سلولی توسط 6-OHDA را می‌گیرد. از این رو، مطالعات بیشتر جهت بررسی بیشتر نقش مهارکننده‌های کانال‌های پتاسیمی در پیشگیری و یا درمان بیماری پارکینسون توصیه می‌شود.



شکل ۳: اثر 4-AP در دوزهای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم و TEA در دوزهای ۲ و ۵ میلی‌گرم به‌ازاء هرکیلو وزن بدن بر اجرای حرکتی در آزمون روتارد. موش‌های سالم به‌سرعت و در عرض ۴ جلسه نحوه‌ی قدم زدن بر میله‌ی چرخان دستگاه روتارد را آموخته‌اند، درحالی‌که موش‌های پارکینسونی هیچگاه یادگیری کامل را نشان‌نداده‌اند. اگرچه تزریق 4-AP و TEA سبب بهبود اجرای حرکتی حیوانات در جلسات ۱ و ۲ شده، اما نتوانسته فرایند یادگیری را بهبودبخشد. حتی تزریق 4-AP سبب تضعیف معنادار یادگیری حرکتی در دستگاه روتارد شده‌است. n در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی دارو و سالین، برابر ۶ و در گروه موش‌های سالم برابر ۸ بوده‌است.

t-test ***: $P < 0.001$ درمقایسه‌ی گروه موش‌های سالم با گروه‌های سالین، 4-AP و TEA

t-test \$: $P < 0.05$ درمقایسه‌ی گروه موش‌های دریافت‌کننده 4-AP یا TEA با گروه سالین

ندارد که نشان‌دهنده TEA، آزادسازی دپامین در استریاتوم را افزایش می‌دهد. باوجوداین، آزمایش‌های ما نشان می‌دهد که TEA می‌تواند همانند 4-AP در برطرف‌نمودن علائم پارکینسون مؤثر باشد. پیشنهاد شده‌است که اختلال در انعطاف‌پذیری سیناپسی در بخش پشتی استریاتوم، در پاتوفیزیولوژی بیماری پارکینسون نقش دارد. در همین ارتباط، آزمایش‌هایی که بر روی برش‌های مغزی انجام شده، نشان می‌دهد که TEA می‌تواند سبب القاء انعطاف-پذیری سیناپسی شده و از این طریق، انتقال قشری-استریاتومی را تقویت می‌نماید (۱۹). TEA، همچنین مهارکننده‌ی کانال‌های پتاسیمی وابسته به کلسیم با کنداکتانس بالا (BK) می‌باشد. این کانال‌ها، شلیک

انفجاری در نورون‌ها را تقویت می‌کند (۳۴). علائم بیماری پارکینسون هنگامی آشکار می‌شود که ۸۰-۶۰٪ از نورون‌های SN تخریب شوند (۲۸). ممکن است 4-AP با افزایش فعالیت و القاء شلیک انفجاری در نورون‌های باقی‌مانده، در کاهش شدت علائم تأثیرگذار باشد. 4-AP همچنین، سبب فعال شدن گیرنده‌های گلوتاماتی NMDA و غیر NMDA شده و از این طریق، موجب افزایش آزادسازی دپامین در استریاتوم می‌شود (۳۵).

TEA، نیز نورون‌های خاموش را فعال کرده و فرکانس شلیک را افزایش داده و باعث القای شلیک انفجاری شده-است (۱۳ و ۲۳). با وجوداین، در ایجاد این اثرات TEA به قدرت 4-AP نمی‌باشد و همچنین هیچ گزارشی وجود

نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که مهارکننده‌های کانال‌های پتاسیمی، نمی‌توانند به‌عنوان درمان قطعی و برطرف‌کننده‌ی تمامی علائم بیماری پارکینسون ثمربخش باشند. البته ممکن است سبب تضعیف برخی علائم شوند، اما ممکن است برخی علائم را نیز تشدید نمایند. این اثرات، وابسته به دوز بوده و استفاده از دوز مناسب می‌تواند از عوارض آنها جلوگیری کند. همچنین پیشنهاد می‌شود با توجه به گزارش اثرات حفاظت نورونی برای مهارکننده‌های کانال‌های پتاسیمی، نقش 4-AP و TEA در پیشگیری از ایجاد پارکینسونیسم القاء شده با 6-OHDA نیز بررسی و تحقیق شود.

تقدیر و تشکر

هزینه‌ی این تحقیق توسط کمیته تحقیقات دانشجویی دانشکده‌ی پزشکی و دانشکده‌ی بهداشت دانشگاه علوم پزشکی قزوین تامین شده‌است. نویسندگان از خانم‌ها: نگین فریدونی و آیدا فرجی جهت انجام برخی مطالعات رفتاری این پروژه سپاسگزاری می‌نمایند.

خودبه‌خودی را در نوروهای بینابینی کولینرژیک در استریاتوم تنظیم می‌کنند (۳۶).

از طرف دیگر، نتایج ما نشان می‌دهد که دوز بالای TEA، سبب تقویت مکانیسم‌های ایجادکننده‌ی رفتار چرخشی در موش‌های مبتلا به پارکینسونیسم می‌شود که می‌توان استنباط نمود دوز بالای TEA، می‌تواند تشدیدکننده‌ی علائم بیماری پارکینسون باشد. چندین مکانیسم می‌تواند این عمل را توجیه کند. نشان‌داده شده که در مدل حیوانی MPTP پارکینسون، نوروها در بخش خارجی گلوبوس پالیدوس، دارای فعالیت انفجاری بیشتری بوده که منجر به بروز برخی علائم رفتاری مشاهده شده در این مدل می‌شود. این افزایش، در فعالیت انفجاری به عدم تعادل در فعالیت جریان‌ات پتاسیمی delayed rectifier که به TEA حساس می‌باشند، نسبت داده شده‌است (۱۸). همچنین دوز بالای TEA، می‌تواند فعالیت مدارهای پاتولوژیک central pattern generator در بازال گانگلیا را افزایش دهد. مدل سیلاتوری بیماری پارکینسون، شرح می‌دهد که افزایش فعالیت این مدارها، سبب بروز علائم رفتاری بیماری پارکینسون می‌گردد (۳۷).

References

1. Nussbaum RL, Ellis CE. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 2003; 348(25):2588.
2. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron.* 2003; 39 (6): 889–909.
3. Przedborski S. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2005; Suppl 1:S3-7.
4. Tsang AHK, Chung KKK. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta- Molecular Basis of Disease.* 2009; 1792(7): 643–50.
5. Mathie, A, Wooltorton JR, Watkins CS. Voltage-activated potassium channels in mammalian neurons and their block by novel pharmacological agents. *Gen Pharmacol.* 1998; 30(1):13-24.
6. Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev.* 2000; 52(4):557-94.
7. Edgerton JR, Reinhart PH. Distinct contributions of small and large conductance Ca^{2+} - activated K^{+} channels to rat Purkinje neuron function. *J Physiol.* 2003; 548(Pt 1):53-69.
8. Cavalier 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.* 2002; 540(Pt 1):57-72.
9. 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. *Exp Neurol.* 2011; 227(1):232-5.
10. Glasauer S, Strupp M, Kalla R, Büttner U, Brandt T. Effect of 4-aminopyridine on upbeat and downbeat nystagmus elucidates the mechanism of downbeat nystagmus. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1039:528-31.
11. Strupp M, Kalla R, Glasauer S, Wagner J, Hüfner K, Jahn K, et al. Aminopyridines for the treatment of

- cerebellar and ocular motor disorders. *Prog Brain Res.* 2008; 171:535-41.
12. Ogita K, Okuda H, Watanabe M, Nagashima R, Sugiyama C, Yoneda Y. In vivo treatment with the K⁺ channel blocker 4-aminopyridine protects against kainate-induced neuronal cell death through activation of NMDA receptors in murine hippocampus. *Neuropharmacology.* 2005; 48(6):810-21.
 13. Cavelier P, Desplantez T, Beekenkamp H, Bossu JL. K⁺ channel activation and low-threshold Ca²⁺ spike of rat cerebellar Purkinje cells in vitro. *Neuroreport.* 2003; 14(2):167-71.
 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 Res.* 2008; 1212:1-8.
 15. Furukawa K, Barger SW, Blalock EM, Mattson MP. Activation of K⁺ channels and suppression of neuronal activity by secreted beta-amyloid-precursor protein. *Nature.* 1996; 379(6560):74-8.
 16. 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. *J Neurochem.* 1999; 73(3):933-41.
 17. Wang Y, Yang PL, Tang JF, Lin JF, Cai XH, Wang XT, Zheng GQ. Potassium channels: possible new therapeutic targets in Parkinson's disease. *Med Hypotheses.* 2008; 71(4):546-50.
 18. Baranaukas 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. *J Neurosci.* 1999; 19(15):6394-404.
 19. Norman ED, Egli RE, Colbran RJ, Winder DG. A potassium channel blocker induces a long-lasting enhancement of corticostriatal responses. *Neuropharmacology.* 2005; 48(2):311-21.
 20. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* 6th Edition, Academic Press, San Diego, CA, 2007.
 21. 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. *Brain Res Mol Brain Res.* 1996; 39(1-2):127-36.
 22. Lundblad M, Vaudano E, Cenci MA. Cellular and behavioural effects of the adenosine A2a receptor antagonist KW-6002 in a rat model of l-DOPA-induced dyskinesia. *J Neurochem.* 2003; 84(6):1398-410.
 23. Fueta Y, Avoli M. Tetraethylammonium-induced epileptiform activity in young and adult rat hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res.* 1993; 72(1):51-8.
 24. Wahab A, Albus K, Gabriel S, Heinemann U. In search of models of pharmacoresistant epilepsy. *Epilepsia.* 2010; Suppl 3:154-9.
 25. Wu ZZ, Li DP, Chen SR, Pan HL. Aminopyridines potentiate synaptic and neuromuscular transmission by targeting the voltage-activated calcium channel beta subunit. *J Biol Chem.* 2009; 284(52):36453-61.
 26. Franciosi S, Ryu JK, Choi HB, Radov L, Kim SU, McLarnon JG. Broad-spectrum effects of 4-aminopyridine to modulate amyloid beta1-42-induced cell signaling and functional responses in human microglia. *J Neurosci.* 2006; 26(45):11652-64.
 27. 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. *Eur J Pharmacol.* 2010; 642(1-3):56-65.
 28. 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.* 2005; 144(1):35-45.
 29. 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.* 1997; 20(3):151-72.
 30. Mintun M, Himmelstein KJ, Schroder RL, Gibaldi M, Shen DD. Tissue distribution kinetics of tetraethylammonium ion in the rat. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1980; 8(4):373-409.
 31. Liu XK, Wang G, Chen SD. Modulation of the activity of dopaminergic neurons by SK channels: a potential target for the treatment of Parkinson's disease? *Neurosci Bull.* 2010; 26(3):265-71.
 32. Andreani A, Leoni A, Locatelli A, Morigi R, Rambaldi M, Pietra C, Villetti G. 4-aminopyridine derivatives with anti-amnesic activity. *Eur J Med Chem.* 2000; 35(1):77-82.
 33. Redman PT, Jefferson BS, Ziegler CB, Mortensen OV, Torres GE, Levitan ES, Aizenman E. A vital role for voltage-dependent potassium channels in dopamine transporter-mediated 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *Neuroscience.* 2006; 143(1):1-6.
 34. Noh J, Chang SY, Wang SY, Chung JM. Dual function of Zn (2+) on the intrinsic excitability of dopaminergic neurons in rat substantia nigra. *Neuroscience.* 2011; 175:85-92.
 35. Jin S, Fredholm BB. 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.

36. 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. *J Neurosci.* 2005; 25(44):10230-8.
37. Ibáñez-Sandoval O, Carrillo-Reid L, Galarraga E, Tapia D, Mendoza E, Gomora JC, Aceves J, Vargas J. Bursting in substantia nigra pars reticulata neurons in vitro: possible relevance for Parkinson disease. *J Neurophysiol.* 2007; 98(4):2311-23.

Effect of acute administration of potassium channel blockers on the behavioral symptoms of Parkinsonism induced by 6-hydroxydopamine in rat

Mohamad Sophiabadi

Associate Professor of Medical Physiology, Department of Physiology, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

Tahere Dargahi

Student of Laboratory Sciences, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

Hasan Azhdari-Zarmehri

Assistant Professor of Medical Physiology, Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences, Torbat Heydariyeh, Iran

Hashem Haghdoost- Yazdi

Assistant Professor of Medical Physiology, Department of Physiology, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

Received:05/02/2014, Revised:14/04/2014, Accepted:25/05/2014

Corresponding Author:

Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran
Dr. Hashem Haghdoost-Yazdi
E-mail: hhaghdoost@gmail.com

Abstract

Background: 4-aminopyridine (4-AP) and tetraethylammonium (TEA) are two potassium channel blockers which have shown that have beneficial effects in treating some neurological disorders such as ataxia, Alzheimer and multiple sclerosis. In this study the effect of acute administration of 4-AP and TEA in the treatment of behavioral symptoms of Parkinsonism induced by the toxin 6-hydroxydopamine (6-OHDA) was studied in male rats.

Materials & Methods: 6-OHDA was injected into left medial forebrain bundle (MFB) by stereotaxic surgery using Hamilton syringe. Then, in the third week after surgery, the rats before and after drug application were tested for rotational behavior induced by apomorphine. In the fourth week, Rotarod test was performed in the presence of the blockers for six consecutive days.

Results: 4-AP at doses 200 and 500 µg/kg had no significant effect, but at dose 1000 µg/kg led to a significant improvement of behavioral symptoms of Parkinsonism in the rotation test. On the other hand, the drug decreased motor performance and motor learning in the Rotarod test. TEA at dose 1 mg/kg was ineffective, but at dose 2 mg/kg caused a significant decrease, and at dose 5 mg/kg caused a significant increase in the number of rotations of the Parkinsonian rats. TEA had no effect on the motor learning in the Rotarod test.

Conclusion: The results of this study indicate that 4-AP and TEA, in a dose-dependent manner, weaken some symptoms of Parkinsonism, but worsen some other symptoms.

Keywords: 4-AP, TEA, 6-OHDA, Apomorphine, Rotation test, Rotarod