



## مقایسه ارزیابی موفقیت پیوند سلولی در پارکینسون تجربی با سنجش هموسیستئین با علایم رفتاری

هاشم حقدوست یزدی<sup>۱</sup>، محمد صوفی آبادی<sup>۲\*</sup>، محمد ساروخانی<sup>۳</sup>، زهرا بابا شاهوردی<sup>۴</sup>، نفیسه راستگو<sup>۵</sup>، علی سربازی<sup>۵</sup>

۱- دانشگاه علوم پزشکی قزوین - دانشکده پزشکی - مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی - استادیار.

۲- دانشگاه علوم پزشکی قزوین - دانشکده پزشکی - مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی - دانشیار.

۳- دانشگاه علوم پزشکی قزوین - دانشکده پیراپزشکی - مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی - استاد.

۴- دانشگاه علوم پزشکی قزوین - دانشکده پیراپزشکی - کمیته تحقیقات دانشجویی - دانشجوی علوم آزمایشگاهی.

۵- دانشگاه علوم پزشکی قزوین - دانشکده پزشکی - کمیته تحقیقات دانشجویی - دانشجوی پزشکی.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۵، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۹/۱

### چکیده

**مقدمه:** پارکینسون از بیماری‌های تخریبی مغز به‌شمار می‌رود. شواهد نشان می‌دهد که میزان هموسیستئین سرم در بیماری پارکینسون افزایش می‌یابد. در این مطالعه ارزیابی موفقیت پیوند سلولی با مقایسه سطح سرمی هموسیستئین و علایم رفتاری در پارکینسون تجربی القا شده با ۶-هیدروکسی دپامین مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۳ بر روی موش‌های صحرایی نر ویستار انجام شد. موش‌ها ابتدا تحت جراحی استرئوتاکسیک با تزریق ۶-هیدروکسی دپامین به ناحیه دسته مغز جلویی میانی نیمکره راست پارکینسونی شده که با آزمون چرخش القاء شده با آپومورفین تأیید گردید. پس از آن موش‌ها تحت درمان با پیوند سلول‌های بنیادی قرار گرفته و اثر درمان بر این چرخش‌ها مجدداً بررسی شد. سطح کلی هموسیستئین قبل و شش هفته پس از تزریق ۶-هیدروکسی دپامین و ده هفته پس از پیوند سلولی اندازه‌گیری گردید. داده‌ها با آزمون‌های آماری تی زوجی و واریانس یک طرفه و توکی تحلیل شدند.

**نتایج:** سطح کلی هموسیستئین در موش‌های پارکینسونی با شمار چرخش بالا، تغییر معنی‌داری نداشت. ولی ده هفته بعد از پیوند سلولی، سطح کلی هموسیستئین به میزان قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت.

**نتیجه‌گیری:** از آنجایی که ارتباط مستقیمی بین شدت چرخش‌های القاء شده با آپومورفین با درجه آسیب سلولی در هسته جسم سیاه وجود دارد، نتایج ما نشان می‌دهند که مقادیر بالاتر هموسیستئین می‌تواند نشان‌دهنده آسیب نورونی بیشتر در این هسته باشد.

**واژه‌های کلیدی:** هموسیستئین، پارکینسون، ۶-هیدروکسی دپامین، پیوند سلولی.

\*نویسنده مسئول: دانشگاه علوم پزشکی قزوین، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی، تلفن: ۰۲۸-۳۳۳۳۰۵۳۴، نمابر: ۰۲۸-۳۳۳۴۹۷۱،

Email: mohasofi@yahoo.com

**ارجاع:** حقدوست یزدی هاشم، صوفی آبادی محمد، ساروخانی محمد، راستگو نفیسه، سربازی علی. مقایسه ارزیابی موفقیت پیوند سلولی در پارکینسون تجربی با سنجش هموسیستئین با علایم رفتاری. مجله دانش و تندرستی ۱۱(۴):۴۸-۵۵.

## مقدمه

بیماری پارکینسون (PD) دومین بیماری شایع نورودژنراتیو مغزی بعد از آلزایمر است که بر اثر تخریب نورون‌های دوپامینرژیک بخش متراکم هسته جسم سیاه (Substantia nigra) به وجود می‌آید. علت ایجاد آسیب هسته چند عاملی بوده ولی شواهد جدید استرس اکسیداتیو و اختلال عملکرد میتوکندریایی را از عوامل مهم این تخریب معرفی می‌کند (۱ و ۲).

هموسیستین اسید آمینه‌ای است که در رژیم غذایی موجود نبوده ولی از متیونین و طی فرآیند چند مرحله‌ای سنتز می‌شود مطالعات متعددی نشان داده است که هموسیستین (Hcy) در پاتوژنز آترواسکلروز و بیماری‌های قلبی-عروقی و مغزی-عروقی نقش دارد (۳-۵). همچنین افزایش سطح Hcy خطر ابتلا به اختلالات شناختی، دمانس، آلزایمر و افسردگی را نیز افزایش می‌دهد (۶-۱۰). در سال‌های اخیر افزایش سطح هموسیستین در بیماری‌های نورولوژیکی که منشأ عروقی ندارند مورد توجه قرار گرفته که یکی از این موارد بیماری پارکینسون است. گزارش‌هایی وجود دارد که نشان می‌دهند سطح Hcy نه تنها در خون بلکه در مایع مغزی-نخاعی بیماران پارکینسونی نیز افزایش می‌یابد (۳، ۱۳-۱۱). سطح بالای Hcy می‌تواند مرگ سلول‌های دوپامینرژیک را از طریق القاء استرس اکسیداتیو و مرگ نورونی ناشی از تحریک بیش از حد تسریع کند (۱۶-۱۴). همچنین مطالعات حیوانی نشان داده‌اند که تزریق موضعی Hcy به درون هسته جسم سیاه یا استریاتوم علائم پارکینسونیسم ناشی از تزریق سم ۶-هیدروکسی دپامین (OHDA-۶) را تشدید می‌کند (۱۴ و ۱۷). هنوز کاملاً مشخص نشده که آیا افزایش سطح هموسیستین سرم در بیماران پارکینسونی به صورت اولیه صورت می‌گیرد و یا ثانویه بوده و متعاقب مصرف داروهایی مانند لوودوپا می‌باشد (۳، ۲۰-۱۸). مکانیسم احتمالی در این زمینه تغییر شکل بیوشیمیایی لوودوپا به دوپامین می‌باشد که باعث حذف ماده‌ای به نام اس-آدنوزیل متیونین، که برای تبدیل Hcy به متیونین نیاز است، می‌شود (۲۱ و ۲۲). پارکینسونیسم القاء شده توسط ۶-هیدروکسی دپامین یکی از شایع‌ترین مدل‌های حیوانی بیماری پارکینسون می‌باشد. این سم یک آنالوگ هیدروکسیله از دوپامین طبیعی است که اختصاصاً نورون‌های کاتکول آمینرژیک را تخریب می‌کند و علاوه بر تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن که به پروتئین‌ها، لیپیدها و DNA آسیب می‌رساند، از طریق مهار کمپلکس‌های میتوکندریایی منجر به اختلال عمل میتوکندریایی و نقص در تولید ATP می‌شود (۲۷-۲۳). در پارکینسون تجربی شدت بیماری از طریق آزمون‌های رفتاری مورد ارزیابی و تأیید قرار می‌گیرد. در این مطالعه پس از ایجاد پارکینسون از

طریق ریز تزریق سم ۶-هیدروکسی دپامین، درمان با پیوند سلول‌های بنیادی صورت گرفت و موفقیت درمان از طریق سنجش سطح سرمی Hcy و شدت علائم رفتاری در آزمون چرخش القاء شده با آپومرفین مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۳ در دانشگاه علوم پزشکی قزوین با رعایت تمام نکات اخلاقی انجام شد. موش‌های صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار با محدوده وزنی ۲۵۰ تا ۲۲۰ گرم از مؤسسه رازی کرج تهیه شده و در حیوان خانه دانشگاه در اتاقی با درجه حرارت کنترل شده و شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی درحالی که به آب و غذا به صورت نامحدود دسترسی داشتند نگهداری شدند. این مطالعه بر روی ۳۲ سر موش صحرایی نر انجام شد که همگی تحت جراحی استرئوتاکسی و تزریق سم ۶-OHDA قرار گرفتند.

حیوانات ابتدا با استفاده از کتامین / زایلازین (۶۰/۶ mg/kg) بیهوش شده و در دستگاه استرئوتاکس (Stoelting, USA) قرار داده شدند. سم نوروتوکسیک ۶-OHDA (به میزان ۱۵-۱۰ میکروگرم با غلظت ۴ میکروگرم در هر میکرولیتر حل شده در سالین حاوی ۰/۲ درصد اسید اسکوربیک) به وسیله جراحی استرئوتاکسیک و با استفاده از سرنگ هامیلتون ده میکرولیتری به دو نقطه در ناحیه دسته مغز جلویی میانی (Medial forebrain bundle, MFB) نیمکره راست با مختصات بر حسب برگما  $AP: -4/-4,4$ ،  $L: -1/2,-0.8$ ،  $DV: -7/8,8$  و  $TB: 3.4$  بر اساس اطلس پاکسینوز و واتسون (۲۸) به مغز موش‌ها تزریق شد. تزریق سم به اهستگی و در عرض ۵ دقیقه انجام گرفت و در پایان تزریق سرنگ برای ۵ دقیقه دیگر در محل خود نگه داشته شد و سپس به آهستگی با سرعت 1 mm/min از مغز بیرون آورده شد.

بر اساس روش به کار برده شده توسط فوجی و همکاران (۲۹) در شش مرحله، سه مرحله پس از تزریق سم و سه مرحله پس از پیوند سلولی انجام گرفت. به طور خلاصه چنانچه تزریق سم OHDA-6 سبب تخریب گسترده نورونی در هسته جسم سیاه گردد، موش‌ها در قبال تزریق آپومرفین (اگونیست گیرنده‌های دوپامینرژیک) چرخش‌های پی در پی به سمت مقابل محل تزریق نشان می‌دهند. تعداد این چرخش‌ها در واحد زمان معیاری از شدت تخریب نورونی در هسته جسم سیاه و تأثیر مداخله می‌باشد. برای اجرای این آزمون، موش‌ها ابتدا در داخل یک استوانه پلکسی گلاس شفاف با ابعاد ۲۸ سانتیمتر قطر و ۳۸ سانتیمتر ارتفاع قرار داده شدند و به آنها ۵ دقیقه جهت سازش با محیط زمان داده شد. سپس آپومرفین هیدروکلراید (۵/۰ mg/kg, i.p) به موش‌ها تزریق شد و ۱ دقیقه پس از آن تعداد چرخش‌ها به طرف محل تزریق سم (عدد منفی) و یا خلاف آن (عدد

AP: +0.4, با TB:-3.3 تزریق گردید. حجم سوسپانسیون تزریقی به هر موش ۲ میکرولیتر بود.

نمونه‌گیری خون و اندازه‌گیری هموسیستین در سه مرحله صورت گرفت: ۱- قبل از جراحی استرئوتاکسیک و ۲- هفته ششم پس از تزریق سم و قبل از پیوند سلولی و ۳- هفته دهم بعد از پیوند سلولی. در مرحله اول و دوم نمونه خون از ورید دم حیوانات تهیه گردید. در مرحله سوم نمونه خون از قلب حیوانات پس از بیهوش جمع‌آوری شد. نمونه خون‌های جمع‌آوری شده در 5000 rpm برای ۵ دقیقه سانتریفوژ شده تا سرم از عناصر سلولی جدا گردد. سپس سرم در یک میکروتیوب در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان اندازه‌گیری هموسیستین نگهداری شد.

اندازه‌گیری هموسیستین سرم. برای اندازه‌گیری هموسیستین سرم، از کیت الایزای شرکت Axis-Shield استفاده شد. اصول سنجش هموسیستین با روش به‌کار گرفته الایزای فوق به‌طور خلاصه از این قرار است که ابتدا هموسیستین متصل به پروتئین به نوع آزاد احیا گشته و سپس طی یک واکنش آنزیمی جداگانه به ماده S-adenosyl-L-Homocystein (SAH) تبدیل می‌شود. حال این ماده در یک واکنش الایزای رقابتی مورد سنجش قرار می‌گیرد که در آن با SAH متصل به جداره رقابت می‌کند. در نهایت با استفاده از آنتی‌بادی‌های نشاندار با آنزیم HRP و نیز سوبسترای H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ایجاد رنگ و کالری‌متری شد. در این فرآیند، منحنی استاندارد با به‌کارگیری شش کالیبراتور تهیه شد و از سه سرم کنترل با غلظت‌های کم، طبیعی و بالا استفاده شد که همگی در رنج‌های مطلوب بودند. دقت k، Hcl و یا تکرارپذیری (CV) آن کمتر از ۸٪ و حداقل میزان قابل اندازه‌گیری آن ۱ μmol/L و خطی بودن آن تا ۵۰ μmol/L بود.

داده‌ها بر حسب میانگین به‌علاوه منهای خطای معیار بیان شده‌اند. داده‌های آزمون‌های رفتاری در ابتدا با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov تجزیه و تحلیل شدند تا توزیع نرمال آنها بررسی شود. سپس از آزمون t زوجی دانشجویی (Student's paired t-test) و انووا یک طرفه (One-Way ANOVA) برای تجزیه و تحلیل نتایج آزمون‌های رفتاری و مقادیر هموسیستین استفاده شد ( $P < 0.05$ ) به‌عنوان سطح معنی‌دار بودن اختلاف‌ها در نظر گرفته می‌شد.

### نتایج

مقایسه میزان tHcy قبل و بعد از تزریق OHDA-۶ نشان می‌دهد که پس از تزریق سطح tHcy کاهش قابل ملاحظه‌ای یافته است. قبل از تزریق سم،  $tHcy 13/3 \pm 0/47 \mu mol/L$  و شش هفته بعد از تزریق سم  $10/65 \pm 0/63 \mu mol/L$  بود ( $n=32$ ) (شکل ۱). نکته قابل توجه این بود که شدت علائم رفتاری در آزمون چرخش القاء شده با

مثبت) به مدت ۱ ساعت در فواصل ۱۰ دقیقه‌ای ثبت گردید. در پایان تعداد چرخش خالص موش‌ها به یک طرف با جمع جبری اعداد به‌دست آمده محاسبه شد.

پیوند سلولی در هفته ششم پس از تزریق سم انجام گرفت. این عمل شامل تهیه سوسپانسیون سلولی، تخمین درصد سلول‌های زنده و کاشت یا پیوند این سلول‌ها بود.

تهیه سوسپانسیون سلولی از مزانسفال شکمی جنینی به میزان زیادی با استفاده از پروتکل اریه شده توسط بچورکلوند و همکاران انجام گرفت (۳۰). به‌طور خلاصه مراحل زیر جهت انجام این قسمت اجرا شد:

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 آنها جدا گردید. 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 شدند.

۳- قطعات بافتی ۴ بار با DMEM-DNase شسته شده و فرآیند 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 نگاه‌داری شدند.

۲- تخمین درصد سلول‌های زنده (Cell viability) در سوسپانسیون. این عمل با استفاده از رنگ‌آمیزی با رنگ حیاتی trypan blue صورت گرفت. به این ترتیب که 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. سوسپانسیون اگر دارای بیش از ۸۰٪ سلول زنده بود پیوند زده می‌شد.

۳- کاشت یا پیوند سوسپانسیون سلولی به موش‌های پارکینسونی. سوسپانسیون سلولی تهیه شده به مدت یک شب در محلول هیبرنیشن ۳۰ (حاوی کلریدپتاسیم، گلوکز، کلریدمنیزیم، فسفات سدیم و اسید لاکتیک با pH=۷/۲) در درجه حرارت ۴-۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس در روز بعد با کمک جراحی استرئوتاکسیک و سرنگ هامیلتون سوسپانسیون به ۴ نقطه در استریاتوم طرف راست (همان طرف تزریق سم) موش‌های پارکینسونی با مختصات برحسب برگما و میلی‌متر ۱- AP: -1.3, L: -2.6, V: -5, 2- V: -5, V: -3.2, L: -4.5, AP: -0.4, AP: 1.3, 3- V: -5, L: -4.3, V: -5, 4- V: -5, L: -4.5

بهبودی نشده بود ( $n=14$ ) کاهش قابل ملاحظه‌ای مشاهده نشد (شکل ۳). بررسی‌های آماری همبستگی معنی‌داری بین شمار چرخش‌های القاء شده با آپومرفین و میزان tHcy پس از پیوند نشان دادند (ضریب همبستگی =  $0.371$ ،  $P < 0.05$ )،  $n=9$  برای موش‌های بهبود یافته و ضریب همبستگی =  $0.441$ ،  $P < 0.01$ ،  $n=14$  برای موش‌ها بدون بهبودی).

جدول ۱- ارتباط بین میزان چرخش القاء شده با آپومرفین و سطح کلی هموسیستین (میکرومول/لیتر) در موش‌های صحرایی

شدت پارکینسون	تعداد چرخش / ساعت	هموسیستین قبل از تزریق OHDA-6	هموسیستین بعد از تزریق OHDA-6
شدید	$421 \pm 34$	$13/9 \pm 1/42$	$12/4 \pm 1/15$
متوسط	$282 \pm 19$	$13/4 \pm 1/2$	$11/3 \pm 1/2$
خفیف	$88 \pm 12$	$13 \pm 1/1$	$8/6 \pm 0/9$

جدول ۱- ارتباط بین میزان چرخش القاء شده با آپومرفین و سطح کلی هموسیستین (میکرومول/لیتر) در موش‌های صحرایی با درجات مختلف علائم رفتاری پارکینسونیسم شدید، متوسط و ضعیف القاء شده با OHDA-6 را نشان می‌دهد ( $P < 0.05$  و  $P < 0.01$  \*\*\* آزمون t زوجی).

جدول ۲- تأثیر درمان با پیوند سلولی بر tHcy (میکرومول/لیتر)

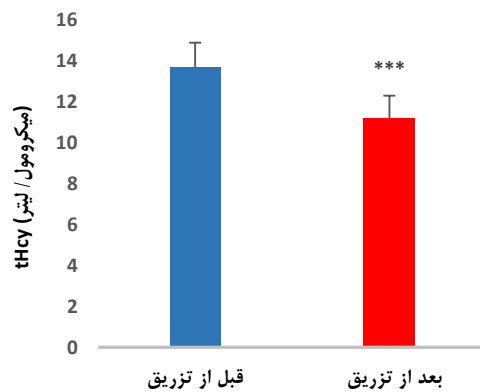
تعداد چرخش / ساعت	هموسیستین قبل از تزریق OHDA-6	هموسیستین بعد از تزریق OHDA-6	هموسیستین بعد از پیوند
$386 \pm 17$	$13/5 \pm 1/35$	$12/29 \pm 1/25$	$12/1 \pm 0/8$
$94 \pm 8/35$	$13/9 \pm 1/1$	$12/2 \pm 1/3$	$8/9 \pm 0/82$

جدول ۲- تأثیر درمان با پیوند سلولی بر tHcy (میکرومول/لیتر): میزان چرخش‌ها در هفته دهم پس از پیوند در موش‌هایی که به پیوند پاسخ داده و بهبود یافتند (بالا) و موش‌هایی که پس از پیوند بهبودی نشان ندادند (پایین) در جدول فوق نشان داده شده است (\*\*\*)  $P < 0.001$  آزمون t زوجی).

## بحث

مهمترین یافته این مطالعه کاهش معنی‌دار tHcy در موش‌های دریافت‌کننده سم OHDA-6 که علائم رفتاری ضعیفی از پارکینسونیسم القاء شده با OHDA-6 داشتند بود. ولی موش‌هایی که علائم شدیدی را نشان می‌دادند تغییری در tHcy نداشتند. همچنین پیوند سلول‌های مزانسفال شکمی جنینی سبب کاهش tHcy تنها در موش‌هایی شد که این پیوند منجر به بهبود قابل ملاحظه در علائم رفتاری آنها می‌شد. در مجموع نتایج ما نشان می‌دهد که یک ارتباط و همبستگی مثبت بین شدت علائم رفتاری پارکینسونی و tHcy پس از تزریق OHDA-6 وجود دارد. از طرف دیگر هیچ‌گونه ارتباط و همبستگی بین tHcy قبل از تزریق OHDA-6 و شدت علائم رفتاری پارکینسونی مشاهده نشد.

آپومرفین در تمامی موش‌های دریافت‌کننده سم یکسان نبود. بر این اساس این موش‌ها به سه گروه تقسیم شدند: ۱- موش‌های صحرایی پارکینسونی شدید با بیش از ۶ چرخش در دقیقه ( $n=12$ )، ۲- موش‌های پارکینسونی متوسط با ۲-۶ چرخش در دقیقه ( $n=12$ ) و ۳- موش‌های پارکینسونی ضعیف با کمتر از ۲ چرخش در دقیقه ( $n=8$ ). در گروه ضعیف، سطح Hcy به‌طور معنی‌داری کاهش یافت اما در گروه پارکینسونی شدید کاهشی مشاهده نشد (شکل ۲). بررسی‌های آماری مشخص کرد که همبستگی معنی‌داری بین شمار چرخش‌ها و tHcy پس از تزریق سم وجود دارد (ضریب همبستگی اسپیرمن =  $0.471$ ،  $P < 0.01$ )،  $n=32$ ، لکن بین tHcy قبل از تزریق سم با شمار چرخش‌ها همبستگی وجود نداشت (ضریب همبستگی =  $-0.04$ ،  $n=32$ ). بررسی گروه‌های مختلف پارکینسونی نشان داد که همبستگی مثبت بین شمار چرخش‌ها و tHcy پس از تزریق سم تنها در گروه پارکینسونی شدید وجود داشت (ضریب همبستگی =  $0.342$ ،  $P < 0.05$ ،  $n=12$ ).



شکل ۱- مقایسه میانگین میزان tHcy قبل و در هفته ششم پس از تزریق OHDA-6

پیوند سلول‌های بنیادی مشتق از ناحیه مزانسفال شکمی جنین‌های موش‌های صحرایی بر روی موش‌های صحرایی پارکینسونی شدید و متوسط انجام گرفت. سوسپانسیون سلولی پس از یک شب انکوباسیون سلول‌ها در یخچال به منطقه استریاتوم موش‌ها تزریق شد. این پیوند در اغلب موارد مؤثر بود و سبب کاهش تعداد چرخش‌ها از  $433 \pm 78$  چرخش در قبل از پیوند به  $245 \pm 124$  چرخش در هفته ششم بعد از پیوند شد ( $n=24$ ). در حالی که تفاوت معنی‌داری در میزان tHcy قبل از پیوند با این میزان قبل از تزریق سم وجود نداشت لکن tHcy پس از پیوند به میزان قابل ملاحظه‌ای کمتر از آن در قبل از تزریق سم بود. البته در اینجا نیز تفاوت‌هایی بین موش‌ها مشاهده شد. به این صورت که در موش‌هایی که پیوند اثر درمانی مناسبی داشت ( $n=9$ ) tHcy کاهش قابل ملاحظه‌ای نشان داد ولی در موش‌هایی که پیوند سبب

مشاهده نشد. از طرف دیگر داده‌های این تحقیق نشان می‌دهند که ارتباط مستقیمی بین tHcy و شدت چرخش‌ها در آزمون چرخش القاء شده با آپومرفین وجود دارد. آزمون چرخشی آزمونی استاندارد برای سنجش شدت آسیب در نورون‌های دپامینرژیک هسته جسم سیاه می‌باشد و نشان داده شده است که شدت چرخش‌ها در این آزمون وابسته به شدت آسیب در این نورون‌ها و همچنین کاهش غلظت دپامین در استریاتوم می‌باشد (۳۶-۳۸) از این رو tHcy بالاتر می‌تواند نشان‌دهنده شدت بیشتر آسیب در نورون‌های هسته جسم سیاه باشد. نشان داده شده است که ۶-OHDA علاوه بر نورون‌های هسته جسم سیاه نورون‌های سروتونینرژیک و نورادرژیک (NA) را نیز تخریب می‌کند (۳۹ و ۴۰) در مغز نورادرنالین به‌عنوان یک پذیرنده گروه متیل عمل می‌کند و تولید هموسیستین نیز نیاز به متیلاسیون دارد (۴۱) همچنین، سیستم NA در بیماری پارکینسون حائز اهمیت می‌باشد و نشان داده شده است که تخریب هریک از سیستم‌های NA و یا DA می‌تواند بر عملکرد سیستم دیگر اثر بگذارد. به‌عنوان مثال پیشنهاد شده است که تخریب نورون‌های NA در هسته لوکس سرلئوس سبب مستعدشدن نورون‌های DA به تخریب می‌شود (۴۰). این حقایق به همراه داده‌های این تحقیق که نشان می‌دهند بین tHcy قبل از تزریق ۶-OHDA با شدت چرخش‌ها پس از تزریق سم ارتباطی وجود ندارد تأکید می‌کنند که افزایش سطح هموسیستین گزارش شده در بیماران پارکینسونی می‌تواند در واقع ناشی از تخریب نورونی باشد. با وجود این، چندین مطالعه نشان داده‌اند که Hcy یک نوروتوکسین بوده و اثر دیگر نوروتوکسین‌ها که سبب مرگ نورون‌های دپامینرژیک هسته جسم سیاه می‌شوند را تقویت می‌کند. Hcy سبب تشدید استرس اکسیداتیو، اختلال در عملکرد میتوکندری‌ها و آپوپتوزیس نورون‌های DA انسانی می‌شود که در معرض سم روتنون و یا یون آهن قرار گرفته‌اند. همچنین تزریق مستقیم Hcy به هسته جسم سیاه و یا استریاتوم آسیب‌های نورونی ناشی از تجویز سم MPTP را تشدید می‌کند (۱۴). محققین دیگر نشان داده‌اند که تزریق Hcy به هسته جسم سیاه موش‌های دریافت‌کننده ۶-OHDA منجر به تشدید علائم رفتاری پارکینسونیسم و کاهش تعداد نورون‌های دپامینرژیک هسته جسم سیاه می‌شود (۱۷) البته در این تحقیق ما اثر تزریق مستقیم Hcy به هسته جسم سیاه را بررسی نکردیم. ممکن است که تزریق حاد Hcy در غلظت‌های زیاد اثرات سمی بر نورون‌های دپامینرژیک داشته باشد. افزایش سطح هموسیستین چه در اثر مرگ نورون‌ها و یا بر اثر تجویز داروهای درمانی باشد حائز اهمیت می‌باشد زیرا نشان داده شده است که افزایش سطح این ماده در خون در ارتباط با افزایش خطر بروز بیماری‌های مغزی-عروقی و علائم عصبی-روانی همچون دمانس، افسردگی می‌باشد (۴۲) و سطح بالای Hcy می‌تواند تظاهرات

دلایل مختلفی می‌تواند کاهش tHcy را پس از تزریق ۶-OHDA توجیه کنند. مارتینز و همکاران در سال ۲۰۰۵ گزارش کردند که در موش‌های صحرایی غلظت هموسیستین از  $47/0 \pm 94/2 \mu\text{mol/L}$  در نوزادان به  $67/0 \pm 29/8 \mu\text{mol/L}$  در سه ماهگی افزایش می‌یابد. در شش ماهگی سطح آن به  $6/24 \pm 1/65$  و در بیست و هشت ماهگی به  $4/87 \pm 0/81$  می‌رسد (۳۱) اگرچه این غلظت‌ها با غلظت‌های ارایه شده در این تحقیق متفاوت می‌باشد ولی نشان می‌دهند که سطح Hcy سرم با افزایش سن کاهش می‌یابد. در این تحقیق موش‌ها قبل از تزریق ۶-OHDA حدود سه ماه سن داشتند. بنابراین می‌توان کاهش مشاهده شده در tHcy پس از تزریق سم را به افزایش سن نسبت داد. با وجود این کاهش tHcy در تمامی موش‌ها مشاهده نشد و غلظت آن در موش‌هایی که علائم رفتاری شدیدی را نشان می‌دادند کاهش نیافت. همچنین در تعداد قابل ملاحظه‌ای از موش‌های دریافت‌کننده پیوند سلولی، تفاوت قابل ملاحظه‌ای در میزان tHcy پس از پیوند با آن در قبل از تزریق ۶-OHDA مشاهده نشد با وجود آن که این دو اندازه‌گیری شانزده هفته با یکدیگر فاصله داشتند. از این رو کاهش در tHcy را نمی‌توان به افزایش سن نسبت داد. مکانیسم دیگر می‌تواند برهم کنش ۶-OHDA با آنزیم کاتکول او متیل ترانسفراز یا COMT باشد. این آنزیم سبب تجزیه کاتکول‌آمین‌ها و از جمله دپامین می‌شود. برخی مطالعات انسانی نشان می‌دهند که سطح Hcy در خون و CSF بیماران پارکینسونی بیشتر از افراد طبیعی می‌باشد (۳۲ و ۱۱ تا ۱۳). مطالعات دیگر نشان داده‌اند که این افزایش در غلظت Hcy ناشی از مصرف لوودوپا (L-DOPA، داروی کلیدی برای درمان بیماری پارکینسون)، می‌باشد (۳ و ۲۰-۱۸). مکانیسم پیشنهادی این است که تبدیل L-DOPA، به دپامین سبب مصرف اس-ادنوزیل متیونین می‌شود. ماده اخیر برای تبدیل Hcy به متیونین ضروری می‌باشد (۳ و ۱۳). از طرف دیگر تبدیل L-DOPA به دپامین نیاز به ا-متیلاسیون دارد که به‌وسیله COMT کاتالیز می‌شود. گزارش شده است که مصرف همزمان L-DOPA با مهارکننده‌های COMT سطح L-DOPA را افزایش داده و همزمان غلظت Hcy را کاهش می‌دهد (۲۱، ۳۳ و ۳۴) نشان داده شده است که ۶-OHDA همچون یک مهارکننده COMT عمل می‌کند (۳۵). از این رو ممکن است که در آزمایشات ما، تزریق ۶-OHDA از این طریق سبب کاهش tHcy شده است. لکن دلایل مختلفی وجود دارند که این احتمال را رد می‌کنند. اولاً، tHcy شش هفته پس از تزریق ۶-OHDA اندازه‌گیری شد که زمان کافی برای برطرف شدن این اثر ۶-OHDA را فراهم می‌کند. ثالثاً، اگر کاهش در tHcy ناشی از این اثر ۶-OHDA باشد، tHcy می‌بایستی در تمامی موش‌ها کاهش می‌یافت در حالی که در گروه موش‌های پارکینسونی تشدید کاهشی در سطح هموسیستین سرم

7. Prins ND, Den Heijer T, Hofman A, Koudstaal PJ, Jolles J, Clarke R, et al. Homocysteine and cognitive function in the elderly: the rotterdam scan study. *Neurology* 2002;59:1375-80.
8. Quadri P, Fragiaco C, Pezzati R, Zanda E, Tettamanti M, Lucca U. Homocysteine and B vitamins in mild cognitive impairment and dementia. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:1096-100.
9. Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2002;346:476-83. doi: 10.1056/NEJMoa011613
10. Edney LC, Burns NR, Danthiir V. Subjective well-being in older adults: folate and vitamin B12 independently predict positive affect. *Br J Nutr* 2015;114:1321-8. doi: 10.1017/S0007114515002949
11. Korutla L, Furlong HA, Mackler SA. NAC1, A POZ/BTB protein interacts with Parkin and may contribute to Parkinson's disease. *Neuroscience* 2014;257:86-95.
12. Yasui K, Kowa H, Nakaso K, Takeshima T, Nakashima K. Plasma homocysteine and MTHFR C677T genotype in levodopa treated patients with PD. *Neurology* 2001;55:437-40. doi: 10.1212/WNL.55.3.437
13. dos Santos EF, Busanello EN, Miglioranza A, Zanatta A, Barchak AG, Vargas CR, et al. Evidence that folic acid deficiency is a major determinant of hyperhomocysteinemia in Parkinson's disease. *Metab Brain Dis* 2009;24:257-69. doi: 10.1007/s11011-009-9139-4
14. Duan W, Ladenheim B, Cutler RG, Kruman II, Cadet JL, Mattson MP. Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J Neurochem* 2002;80:101-10.
15. Sachdev PS, Valenzuela M, Wang XL, Looi JC, Brodaty H. Relationship between plasma homocysteine levels and brain atrophy in healthy elderly individuals. *Neurology* 2002;58:1539-41.
16. Obeid R, Herrmann W. Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. *FEBS Lett* 2006;580:2994-3005. doi: 10.1016/j.febslet.2006.04.088
17. Xing H, Peng H, Xuebing C, Sun S. Effect and mechanism of homocysteine on Parkinson's disease induced by 6-OHDA. *Journal of Nanjing Medical University* 2008;22:12-7.
18. Miller JW, Shukitt-Hale B, Villalobos-Molina R, Nadeau MR, Selhub J, Joseph JA. Effect of L-DOPA and the catechol-O-methyltransferase inhibitor Ro 41-0960 on sulfur amino acid metabolites in rats. *Clin Neuropharmacol* 1997;20:55-66.
19. Rogers JD, Sanchez-Saffon A, Frol AB, Diaz-Arrastia R. Elevated plasma homocysteine levels in patients treated with levodopa: association with vascular disease. *Arch Neurol* 2003;60:59-64.
20. Religa D, Czyzewski K, Styczynska M, Peplonska B, Lolk J, Chodakowska-Zebrowska M, et al. Hyperhomocysteinemia and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2006;404:56-60.
21. Zoccollella S, Lamberti P, Armenise E, de Mari M, Lamberti SV, Mastronardi R, et al. Plasma homocysteine levels in Parkinson's disease: role of antiparkinsonian medications. *Parkinsonism Relat Disord* 2005;11:131-3. doi: 10.1016/j.parkreldis.2004.07.008
22. Siniscalchi A, Gallelli L, Mercuri NB, Ibbadu GF, Sarro G. Role of lifestyle factors on plasma homocysteine levels in Parkinson's disease patients treated with levodopa. *Nutr Neurosci* 2006;9:11-6. doi: 10.1080/10284150600583446
23. Kumar R, Agarwal ML, Seth PK. Free radical-generated neurotoxicity of 6-hydroxydopamine. *J Neurochem* 1995; 64:1703-7.
24. Soto-Otero R, Mendez-Alvarez E, Hermida-Ameijeiras A, Munoz-Patino AM, Labendeira-Garcia JL. Autooxidation and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurochem* 2000;74:1605-12.

کلینیکی بیماری پارکینسون را نیز تشدید کند (۱۲). بنابراین کاهش سطح Hcy در بیماران پارکینسونی حائز اهمیت می‌باشد. گزارش شده که ویتامین‌های گروه B همچون فولات، B۶ و B۱۲ به‌طور مؤثری غلظت پلاسمایی Hcy را کاهش می‌دهند (۸ و ۳۷). با وجود این در مطالعه قبلی ما نشان دادیم که اگرچه غنی کردن آب موش‌های سالم با مجموعه ویتامین‌های B و یا هر یک از ویتامین‌های B۶ و B۱۲ و نه فولات به تنهایی به میزان ۴ برابر نیاز روزانه آنها می‌تواند سبب کاهش سطح Hcy شود ولی در موش‌های دریافت‌کننده سم ۶-OHDA افزودنی ویتامین‌های B اثری در کاهش سطح tHcy ندارد (۴۳ و ۴۴).

به‌طور خلاصه، داده‌های این تحقیق نشان می‌دهند که در پارکینسونیسم القاء شده با ۶-OHDA قبل از تزریق ۶-OHDA ارتباطی با شدت علائم رفتاری پارکینسونیسم در آزمون چرخش القاء شده با آپومرفین ندارد لکن سطح سرمی Hcy پس از تزریق ۶-OHDA متناسب با شدت این علائم رفتاری می‌باشد. از آنجایی که شدت علائم رفتاری در این آزمون منعکس‌کننده شدت آسیب نورونی در هسته جسم سیاه می‌باشد، tHcy بالاتر در بیماران پارکینسونی و یا دیگر بیماری‌های نورولوژیک ممکن است در واقع از عوارض جانبی بیماری بوده و لزوماً به‌عنوان یک عامل افزایش‌دهنده وقوع بیماری مطرح نباشد.

### تشکر و قدردانی

هزینه‌های این طرح تحقیقاتی توسط صندوق حمایت از پژوهشگران کشور معاونت تحقیقات و فناوری ریاست جمهوری بابت طرح شماره ۹۲۰۴۳۸۱۲ تأمین شده است.

### References

1. Fernandez HH. Updates in the medical management of Parkinson disease. *Cleve Clin J Med* 2012;79:28-35. doi: 10.3949/ccjm.78gr.11005
2. Uitti RJ. Treatment of Parkinson's disease: focus on quality of life issues. *Parkinsonism Relat Disord* 2012;18:S34-6. doi: 10.1016/S1353-8020(11)70013-X
3. Hu XW, Qin SM, Li D, Hu LF, Liu CF. Elevated homocysteine levels in levodopa-treated idiopathic Parkinson's disease: a meta-analysis. *Acta Neurol Scand* 2013; 128:73-82. doi: 10.1111/ane.12106
4. Song IU, Kim JS, Park IS, Kim YD, Cho HJ, Chung SW, Lee KS. Clinical significance of homocysteine (hcy) on dementia in Parkinson's disease. *Arch Gerontol Geriatr* 2013;57:288-91. doi: 10.1016/j.archger.2013.04.015
5. O' Suilleabhain PE, Sung V, Hernandez C, Laccritz L, Dewey RB J, Bottiglieri T, et al. Elevated plasma homocysteine level in patients with Parkinson disease: motor, affective, and cognitive associations. *Arch Neurol* 2004;61:865-8. doi: 10.1001/archneur.61.6.865
6. Tan C, Peng W, Deng Y. Risk factors and predictive factors of cognitive deterioration in patients of vascular cognitive impairment no dementia with subcortical ischemic vascular disease. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2014;94:352-5

25. Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R, et al. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2001;65:135-72.
26. Rodriguez M, Barroso-Chinea P, Abdala P, Obeso J, González-Hernández T. Dopamine cell degeneration induced by intraventricular administration of 6-hydroxydopamine in the rat: similarities with cell loss. *Exp Neurol* 2001;169:163-81. doi: 10.1006/exnr.2000.7624
27. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 2003;39:889-909.
28. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. San Diego, CA: Academic Press;2007.
29. Jönsson ME, Ono Y, Björklund A, Thompson LH. Identification of transplantable dopamine neuron precursors at different stages of midbrain neurogenesis. *Exp Neurol* 2009; 219:341-54. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.06.006
30. Rath A, Klein A, Papazoglou A, Pruszek J, Garcia J, Krause M, Maciaczyk J, et al. Survival and functional restoration of human fetal ventral mesencephalon following transplantation in a rat model of Parkinson's disease. *Cell Transplant* 2013;22:1281-93. doi: 10.3727/096368912X654984
31. Martins PJ, Galdieri LC, Souza FG, Andersena ML, Benedito-Silva AA, Tufika S, et al. Physiological variation in plasma total homocysteine concentrations in rats. *Life Sci* 2005;76:2621-9. doi: 10.1016/j.lfs.2004.12.011
32. Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 2000;3:1301-6. doi: 10.1038/81834
33. Lamberti P, Zoccollella S, Iliceto G, Armenise E, Fraddosio A, de Mari M, et al. Effects of levodopa and COMT inhibitors on plasma homocysteine in Parkinson's disease patients. *Mov Disord* 2005;20:69-72. doi: 10.1002/mds.20261
34. Siniscalchi A, Mancuso F, Gallelli L, Ferreri Ibbadu G, Biagio Mercuri N, De Sarro G. Increase in plasma homocysteine levels induced by drug treatments in neurologic patients. *Pharmacol Res* 2005;52:367-75. doi: 10.1016/j.phrs.2005.05.013
35. Segura-Aguilar J, Kostrzewa RM. Neurotoxin mechanisms and processes relevant to Parkinson's disease: an update. *Neurotox Res* 2015;27:328-54. doi: 10.1007/s12640-015-9519-y
36. Ba XH. Therapeutic effects of GM1 on Parkinson's disease in rats and its mechanism. *Int J Neurosci* 2016;126:163-7. doi: 10.3109/00207454.2014.996640
37. Shin E, Rogers JT, Devoto P, Björklund A, Carta M. Noradrenaline neuron degeneration contributes to motor impairments and development of L-DOPA-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2014;257:25-38. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.04.011
38. Penttinen AM, Suleymanova I, Albert K, Anttila J, Voutilainen MH, Airavaara M. Characterization of a new low-dose 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease in rat. *J Neurosci Res* 2016;94:318-28. doi: 10.1002/jnr.23708
39. Sadakierska-Chudy A, Haduch A, Golembiowska K, Daniel WA. Effects of low doses of intracerebroventricular 6-OHDA on the levels of monoaminergic neurotransmitters in rat brain structures. *Pharmacol Rep* 2010;62:1225-30.
40. Szot P, Franklin A, Sikkema C, Wilkinson CW, Raskind MA. Sequential loss of LC noradrenergic and dopaminergic neurons results in a correlation of dopaminergic neuronal number to striatal dopamine concentration. *Front Pharmacol* 2012;3:184. doi: 10.3389/fphar.2012.00184
41. Bonetti F, Brombo G, Zuliani G. The relationship between hyperhomocysteinemia and neurodegeneration. *Neurodegener Dis Manag* 2016;6:133-45. doi: 10.2217/nmt-2015-0008
42. Wei LK, Sutherland H, Au A, Camilleri E, Haupt LM, Gan SH, et al. A potential epigenetic marker mediating serum folate and vitamin B12 levels contributes to the risk of ischemic stroke. *BioMed Res Int* 2015;2015:167976. doi: 10.1155/2015/167976
43. 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* 2012;233:375-81. doi: 10.1016/j.bbr.2012.05.011
44. Haghdoost-Yazdi H, Sarookhani M, Faraji A, Fraidouni N, Dargahi T, Yaghoobidoust MH, et al. Evaluation of the association between blood homocysteine concentration and the degree of behavioral symptoms in the 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rat. *Pharmacol Biochem Behav* 2014;124:297-304. doi: 10.1016/j.pbb.2014.06.020



## Comparison of Assessing the Success of Cell Transplantation in Experimental Parkinson by Measuring Homocysteine with Behavioral Symptoms

Hashem Haghdoost Yazdi (Ph.D.)<sup>1</sup>, Mohammad Sofiabadi (Ph.D.)<sup>1\*</sup>, Mohammad Sarookhani (Ph.D.)<sup>2</sup>, Zahra Babashaverdi (B.Sc. Student)<sup>2</sup>, Nafise Rastgoo (G.P. Student)<sup>3</sup>, Ali Sarbazi (G.P. Student)<sup>3</sup>

1- Dept. of Physiology, Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.

2- Dept. of Laboratory Sciences, School of Paramedicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.

3- Dept. of Physiology, School of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.

Received: 26 July 2016, Accepted: 21 November 2016

### Abstract:

**Introduction:** Parkinson is a brain's degenerative disease. Evidence shows that the levels of homocysteine increases in the Parkinson's disease. In this study, the success of cell transplantation was evaluated by comparison between serum homocysteine levels and behavioral symptoms in experimentally Parkinson's induced by 6-hydroxy dopamine (6- OHDA).

**Methods:** This experimental study was conducted in 2014 on male Wistar rats. The rats initially were Parkinsonism through stereotaxic 6- OHDA microinjection into right middle frontal areas of right hemisphere. Parkinson's was confirmed by apomorphine-induced rotation test. Then the rats treated with stem cell transplantation and the effect of treatment was assessed again. The total level of homocysteine was measured before, six weeks after 6- HDOA injection and ten weeks after cell transplantation. Data were analyzed using paired t-tests, ANOVA and Tukey test.

**Results:** The total level of homocysteine didn't change significantly in rats with higher number of rotations. But ten weeks after cell transplantation, the level of homocysteine decreased significantly.

**Conclusion:** Considering the direct correlation between the severity of rotational behavior and the degree of lesion in the substantia nigra (SN), our data indicate that higher tHcy values can predict higher SN dopaminergic neurodegeneration.

**Keywords:** Homocysteine, Parkinson's disease, 6-hydroxydopamine, Cell replacement therapy.

Conflict of Interest: No

\*Corresponding author: M. Sofiabadi, Email: mohasofi@yahoo.com

**Citation:** Haghdoost Yazdy H, Sofiabadi M, Sarookhani M, Rastgoo N, Sarbazi A. Compare assessing the success of cell transplantation in experimental parkinson by measuring homocysteine with behavioral symptoms. Journal of Knowledge & Health 2017;11(4):48-55.