1-1 اختلالات نورودژنراتیو

مرگ نورونها مهمترین مشخصه بیماریهای نورودژنراتیو به شمار میرود(Wolozin and Behl, 2000). بیماری هایی از قبیل آلزایمر، پارکینسون، هانتینگتون و... دارای جنبه های پاتولوژیک مختلف مشترکی از جمله تجمع پروتئین های غیر طبیعی، فعال شدن میکروگلیا، تغییر در حالت احیاء بافت ونارسایی میتوکندریایی می باشند(Halliwell *et al*., 2006). در حین این فرایندها گونه های فعال اکسیژن (Reactive Oxigen Species=ROS) تولید می شوند که باعث آسیب رساندن به مولکول های ضروری مانند لیپیدها، DNA و پروتئینها و ایجاد استرس اکسیداتیو می شوند (Helga *et al*., 2008). افزایش سطح رادیکالهای آزاد در مغز بیمار یکی از عوامل شکل گیری پدیده مرگ نورونی می باشد(Culmsee *et al*., 2006). عدم تعادل در حالت احیاء سلول را که در نتیجه ی تشکیل مولکول های اکسیدانت یا یک نارسایی در سیستم آنتی اکسیدانتی می باشد، استرس اکسیداتیو گویند(Sies *et al*.,1985).

گونه های واکنشگر اکسیژن (ROS) یک سری رادیکالهای آزاد اکسیژن از جمله سوپر اکسید (O_2^-)، هیدروکسیل (OH) و مولکولهای غیر رادیکالی مثل پروکسید هیدروژن (H_2O_2) را شامل میشوند (Halliwell *et a*l., 2006). اگر چه این ترکیبات نقش فیزیولوژیک مهمی در سیگنال دهی سلولی ایفا می کنند، اما مجاورت طولانی مدت سلول ها با مقادیر بالای ROS موجب اثرات سمی شدیدی مانند مرگ سلولی آپوپتوتیک یا نکروتیک می گردد(Helga *et al*, 2008). علاوه بر ROS، RNS (Reactive Nitrogen Species) مانند نیتریک اکسید(NO) و پراکسی نیتریت (PN) نیز در استرس اکسیداتیو نقش مهمی ایفا می کنند(Shankar *et al*., 2008). ترشح ROS و RNS از میکروگلیاهای فعال شده باعث ایجاد یک منبع اضافی از گونه های واکنشگر در نورودژنراسیون می شوند(Helga *et al*., 2008). عده ای از مولکولهای واکنشگر مثل پروکسی نیترات ($ONOO^-$) و پروکسی نیتریت (O_2NOO^-) هم جزء گروه ROS و هم جزء گروه RNS طبقه بندی میشوند (Halliwell *et al*., 2006).

2-1 منابع ایجاد کننده ROS

برخی از سیستم های آنزیمی مانند اکسیژنازهای وابسته به سیتوکروم P450 (Bernhardt, 1996)، NAD(P)H اکسیداز (Krause, 2004) و گزانتین اکسیداز (Harrison, 2002) در تولید داخل سلولی رادیکال های آزاد دخالت دارند (Helga, 2008) همچنین ROS می تواند به صورت غیر آنزیمی در کمپلکس I و III زنجیره انتقال الکترون میتوکندریایی تولید شود(Helga, 2008). پیش ساز معمول بیشتر انواع ROS، آنیون سوپراکسید می باشد که سریعا به طور خود به خود یا توسط آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به پراکسید هیدروژن و اکسیژن تبدیل می شود (Fridovich, 1995). اگرچه پراکسید هیدروژن یک رادیکال آزاد نیست اما می تواند به طور آزادانه از غشاهای زیستی منتشر شده و سبب آسیب شدید به ماکرومولکول های ضروری شود (Helga, 2008). H_2O_2 می تواند در حضور فلزاتی مانند آهن و مس تولید رادیکال های بسیار فعال هیدروکسیل نماید که از قوی ترین اکسیدانت ها در طبیعت هستند (Helga, 2008).

3-1 بیماری های نورودژنراتیو مرتبط با استرس اکسیداتیو

با وجود اینکه مغز تنها 2% وزن کل بدن را تشکیل می دهد اما حدود 20 % کل اکسیژن بدن در حالت استراحت را مصرف می کند (Helga, 2008). وجود مقادیر بالای اسیدهای چرب غیراشباع، سطوح پائین آنتی اکسیدانت ها، محتوای بالای آهن در مناطق خاصی از مغز مانند گلبوس پالیدوس(Globus Pallidus) و جسم سیاه (Substantia Nigra) آن را مستعد آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو کرده است (Helga, 2008). همچنین تقسیم ناپذیر بودن نورون ها در مغز باعث می شود که با یک بار آسیب دیدن، عملکرد خود را به طور دائمی از دست بدهند (Browne, 2006). از این رو آسیب پذیری مغز نسبت به استرس اکسیداتیو از دیگر اندام های بدن بیشتر است (Shankar, 2008).

تاکنون نقش استرس اکسیداتیو در بیماری زایی چندین بیماری نورودژنراتیو مزمن مانند پارکینسون، آلزایمر، هانتینگتون، ALS و ... نشان داده شده است (Helga, 2008).

1-3-1 آلزایمر

شایعترین بیماری نورودژنراتیو است که باعث از دست رفتن یکپارچگی نورونها، اختلال حافظه، کاهش شناخت و در نهایت از بین رفتن نورون ها و سیناپس ها می شود (Cummings, 2004). حدود 10 درصد از جمعیت تا سن 65 سالگی و حدود 50 درصد از جمعیت تا سن 85 سالگی به این بیماری دچار می شوند.(Morrison *et al.*, 1990) وجود پلاک های آمیلوئیدی و تغییرات نوروفیبریلاری در مناطق نکروتیکی از مهم ترین شاخصه های این بیماری است که به طور قابل توجهی اتفاق می افتند (Helga, 2008). در مغز افراد آلزایمری افزایش حضور عوامل نوروتوکسیک، آهن، مس و... که قادر به تحریک تولید رادیکال های آزاد هستند نشان داده شده است (Shcherbatykh, 2007).

ALS 2-3-1

ALS(Amyotrophic lateral sclerosis) شایعترین بیماری نورودژنراتیو سیستم نورون های حرکتی می باشد که اولین بار در سال 1869 توسط یک نورولوژیست فرانسوی شناسایی شد و تحت عنوان بیماری نورون حرکتی نیز نامیده می شود (King *et al.*, 2009).

علت بیماری ALS ناشناخته است اگرچه برخی از مطالعات نشان داده اند که ممکن است مکانیزم های ایجاد بیماری ALS مشابه بیماری های آلزایمر، پارکینسون و دیگر بیماری های نورودژنراتیو باشد(Hudson, 1996).

ALS در 90 تا 95 درصد موارد به صورت تک گیر رخ می دهد و در 5 تا 10 درصد موارد از وراثت مندلی با فرم توارث آتوزومی غالب پیروی می کند(Armon, 2003).

3-3-1 هانتینگتون

یک بیماری نورودژنراتیو نسبتا نادر با توارث غالب آتوزومی است که 5 تا 10 نفر در هر 100000 نفر را در اروپا و آمریکای شمالی تحت تاثیر قرار داده است (Helga, 2008). ویژگی های کلینیکی آن شامل کاهش شناخت، حرکت های Chorei form و دشواری های رفتاری(Behavioral diffilculties) است (Walker, 2007). علت آن افزایش تکرار های 3 نوکلئوتیدی CAG در ژن کد کننده ی پروتئین هانتینگتین است که باعث تغییر کنفورماسیونی پروتئین می شود و تجمع یافتن این پروتئین در سیتوپلاسم و هسته را موجب می شود (Scherzinger, 1997). اخیرا آسیب های القا شده به واسطه استرس اکسیداتیو دراین بیماری مورد توجه قرار گرفته است (Helga, 2008).

4-3-1 پارکینسون

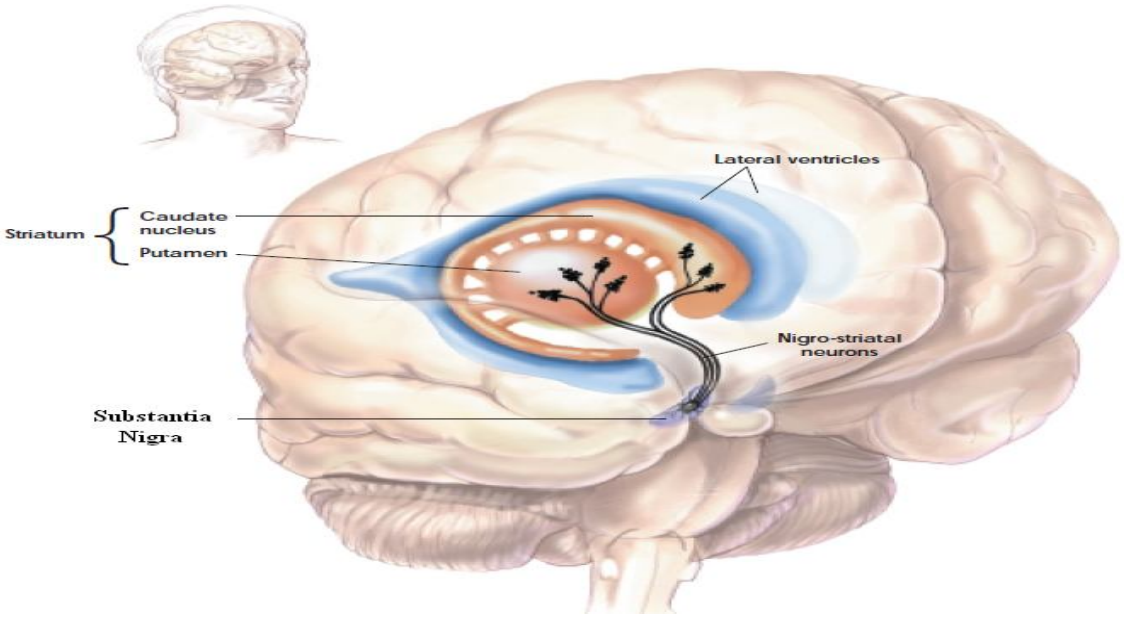
این بیماری بعد از بیماری آلزایمر رایج ترین بیماری نورودژنراتیو است و شیوع آن در افرادی که سن بالای 50 سال دارند 1 تا 2 درصد است. لرزش در حالت استراحت، کندی حرکت (Bradykinesia)، سختی عضلانی (Rigidity) وسختی در شروع حرکت از نشانه های اصلی پارکینسون محسوب می شوند (Jankovic, 2008). جنبه های کلینیکی دیگر آن شامل علائم حرکتی ثانویه، حالت کشاندن پاها روی زمین موقع راه رفتن و لکنت زبان و علائم غیرحرکتی مانند اختلالات حسی و شناختی می باشند (Helga, 2008). فقط 5% موارد پارکینسونی ارثی هستند و قسمت عمده موارد پارکینسونی تحت تاثیر عوامل محیطی اتفاق می افتند (Albeliovich, 2006). بیماری پارکینسون در تمام دنیا و در همه ی نژادها اتفاق می افتد و نسبت بیماری در مردان نسبت به زنان به مقدار اندکی بیشتر است (Zhang *et al.*, 1993).

چندین ژن در وراثت مغلوب یا غالب آتوزومی پارکینسون شرکت می کنند و شامل آلفا سینوکلئین، Parkin ، Dj-1، LRRK2 و PINK1 هستند (Albeliovich, 2006). نقص ژن LRRK2(PARK8) شایعترین علت فرم خانوادگی و همچنین تک گیر از پارکینسون می باشد(Gilks *et al.*, 2005).

نشانه های پارکینسون در سطح سلولی شامل از بین رفتن انتخابی نورون های دوپامینرژیک قسمت متراکم جسم سیاه (Substantia Nigra Pars Compacta) و همچنین وجود اجسام لوی (Lewy Bodies) حاوی آلفا سینوکلئین در سیتوپلاسم نورون ها می باشد (Mosley, 2006). در این بیماران تعداد سلول های ناحیه ی جسم سیاه از 425000 به حدود 200000 کاهش می یابد(Nicholson *et al.*, 2002).

4-1 نورون های دوپامینرژیک جسم سیاه

اطلاعات عصبی در مغز ازکورتکس به واسطه ی عقده های قاعده ای به تالاموس می روند و سپس از طریق نورون های دوپامینرژیک به منطقه ی حرکتی ثانویه ی کورتکس باز می گردند (Goole, 2009). عقده های قاعده ای شامل استریاتوم، گلبوس پالیدوس و جسم سیاه می باشند که در قسمت زیرین مغز میانی قرار گرفته اند(شکل1-1) (Brown, 2005).



شکل 1-1) تصویر شماتیک از موقعیت جسم سیاه و استریاتوم (winslow *et al.*, 2001).

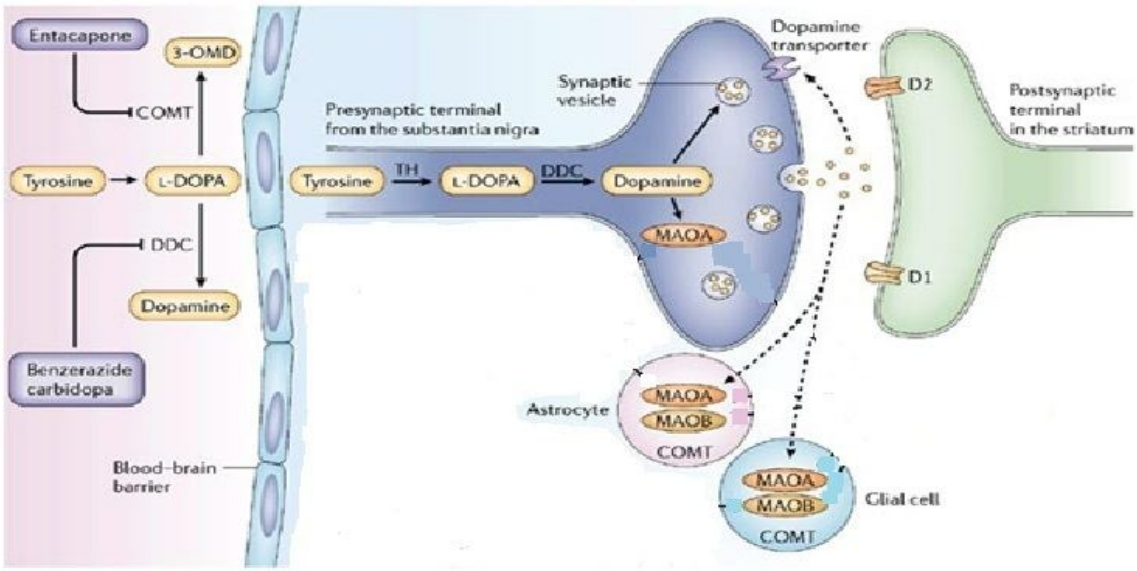
نورون های دوپامینرژیک جسم سیاه با استریاتوم سیناپس دارند و نوروترانسمیتر تولیدی خود یعنی دوپامین را در استریاتوم آزاد می کنند (Zanjani, 2001). دوپامین تولید شده در این نورون ها در عقده های قاعده ای مغز یک نقش کلیدی در هماهنگی حرکات پیچیده دارد (Goole, 2009) .

5-1 مسیر سنتز و تجزیه ی دوپامین

آنزیم تیروزین هیدروکسیلاز در نورون های دوپامینرژیک باعث تبدیل اسید آمینه ی تیروزین به L-DOPA (3-دی هیدروکسی فنیل آلانین) می شود و سپس آنزیم آروماتیک دوپا دکربوکسیلاز L-DOPA را دکربوکسیله کرده و به دوپامین تبدیل می کند (شکل 1-2) (Youdim *et al*., 2006). دوپامین نهایتا در وزیکول های ذخیره ای توسط مونوآمین ترانسپورتر2 ذخیره می شود که با تحریک شدن این نورون ها آزاد می شود (Lowlor, 2004).

دوپامین در فضای سیناپسی توسط آنزیم مونوآمین اکسیدازA (MAOA) نورونی و مونوآمین اکسیداز A وB سلول های گلیال و آستروسیت ها متابولیزه می شود (Youdim *et al*., 2006).

هنگامی که مقدار دوپامین از 60 درصد میزان طبیعی آن پائین تر بیاید، نشانه های کلینیکی پارکینسون بروز می کنند (Bernheimer, 1973).



Youdim *et al. Nature Reviews Neuroscience* **7**, 295–309 (April 2006) | doi:10.1038/nrn1883

شکل1-2) مسیر سنتز و انتقال دوپامین

6-1 مکانیسم ایجاد بیماری پارکینسون

تاکنون به روشنی مشخص نشده است که دلیل مرگ نورون های دوپامینرژیک در بیماری پارکینسون چیست، اما در 2 دهه اخیرعلاوه بر عوامل ژنتیکی زمینه ساز این بیماری، استرس اکسیداتیو و نقص عملکرد میتوکندریایی به عنوان عاملان اصلی در نورودژنراسیون این نورون ها شناخته شده اند (Helga, 2008).

1-6-1 استرس اکسیداتیو در بیماری پارکینسون

در جسم سیاه بیماران پارکینسونی کاهش شدید گلوتاتیون، اکسیداسیون و نیتراسیون پروتئین ها، لیپیدها، DNA، افزایش فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز(SOD) و سطح بالای آهن آزاد نشان داده شده است(Springer, 2006). همان طور که قبلا ذکر شد،

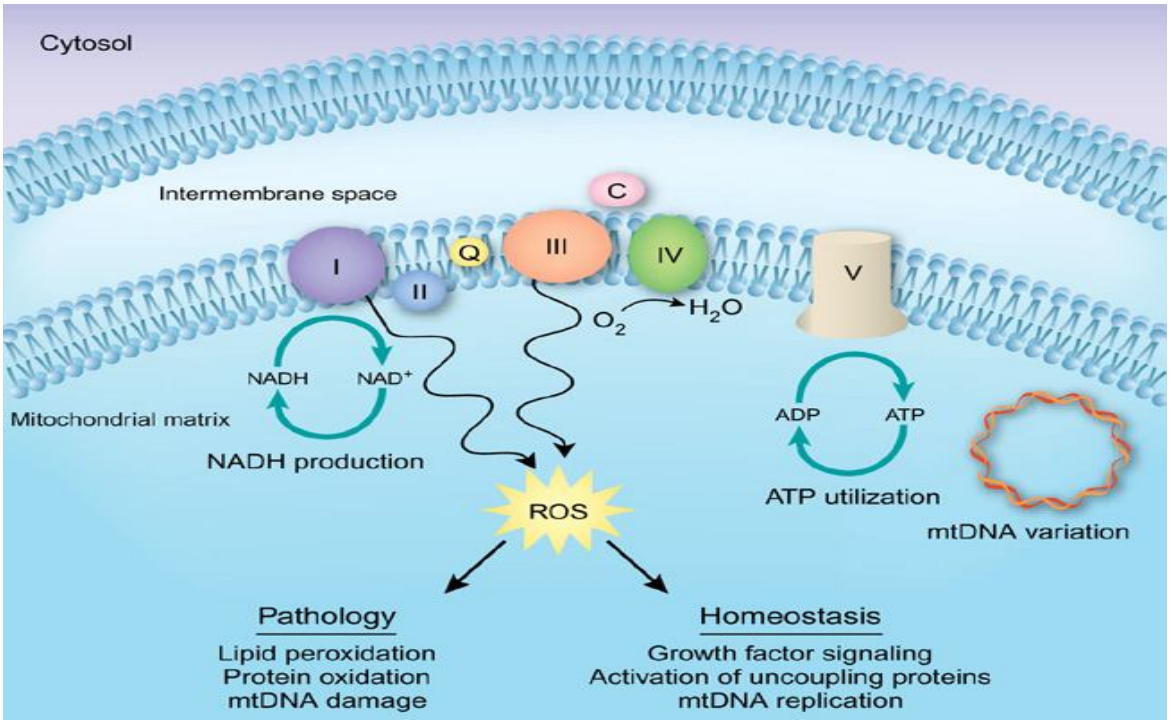
مجاورت سلول ها با رادیکال های آزاد و اکسیدانت های تولید شده در سلول چه به صورت آنزیمی و چه به صورت غیرآنزیمی باعث تغییرات اکسیداتیو در ماکرومولکول های زیستی مانند لیپید، DNA و پروتئین می شود (Shankar, 2008). ROS و RNS باعث اکسیداسیون و نیتراسیون پروتئین ها، قطعه قطعه کردن DNA و پراکسیداسیون لیپیدها می شوند (Carr *et al*., 2000).

به علت تغییرات کنفورماسیونی پروتئین های اکسیده یا نیتراته، تجزیه آنها به آسانی انجام نمی گیرد و از این رو باعث مهار سیستم پروتئازومی و بنابراین تجمع پروتئین های آسیب دیده و القاء بیشتر استرس اکسیداتیو می شود (Butterfield, 2001). قسمت عمده Lewy Bodies در نورون های بیماران پارکینسونی حاوی آلفا سینوکلئین های نیتراته و احتمالا اکسیده است (Albers, 2000). آلفا سینوکلئین یک پروتئین پیش سیناپسی است که در پلاستیسیتی سیناپسی دخالت دارد (Smith, 2006).

2-6-1 نقش میتوکندری در پارکینسون

از آنجایی که میتوکندری ها هم یک هدف و هم یک منبع مهم ROS هستند، اختلال میتوکندری به عنوان یک عامل اصلی در مرگ نورونی در پارکینسون محسوب می شود (Albers, 2000). آسیب کمپلکس I زنجیره انتقال الکترون میتوکندری توسط اکسیدانت هایی مانند نیتریک اکسید نه تنها از طریق کاهش سنتز ATP بلکه با تولید بیشتر ROS، دژنراسیون نورونی را تشدید می کند (Beal, 2005).

DNA میتوکندریایی (mtDNA) به دلیل مجاورت با جایگاه تولید ROS به طور ویژه ای در معرض آسیب های ناشی از ROS قرار گرفته است(شکل 1-3). از طرف دیگر مکانیسم های تعمیر mtDNA محدود هستند و در نتیجه حذف هایی در mtDNA اتفاق می افتد و نهایتا موجب کاهش در عملکرد میتوکندریایی و افزایش تولید ROS می شود (Lansbury, 2006).



شکل1-3) DNA میتوکندریایی (mtDNA) به دلیل مجاورت با جایگاه تولید ROS به طور ویژه ای در معرض آسیب های ناشی از ROS قرار گرفته است (Baughman *et al.*, 2006).

علاوه بر عوامل فوق، دوپامین تولید شده در این سلول ها، آنها را بیشتر مستعد استرس اکسیداتیو می کند (Shankar, 2008). شواهد زیادی نشان می دهد که در حضور همزمان دوپامین، آهن بالا و سطح کاهش یافته گلوتاتیون، میزان بالایی ROS تولید می شود که یک علت اصلی از بین رفتن نورون های دوپامینرژیک است (Youdim, 2004). دوپامین از لحاظ شیمیایی ناپایدار است و دچار اتواکسیداسیون می شود و کینون های اکسید کننده ی دوپامین و رادیکال سوپراکسید تولید می کند (Shankar, 2008). این اکسیدانت ها باعث افزایش شدت استرس اکسیداتیو می گردند. (Shankar, 2008).

آنزیم مونو آمین اکسیداز B (MOAO-B) در سلول های گلیا، یکی دیگر از مواردی است که می تواند درالقاء استرس اکسیداتیو نقش داشته باشد و میزان آن با افزایش سن افزایش می یابد (Kumar, 2004). بیشترین میزان بیان آنزیم MOAO-B در جسم

سیاه می باشد (Shankar, 2008). همچنین در جسم سیاه، تعداد زیادی آستروسیت دارای آنزیم مونو آمین اکسیداز B وجود دارد و به نظر می رسد این آنزیم در استرس اکسیداتیو موضعی شرکت می کند (Westlund, 1988). عملکرد این آنزیم متابولیزه کردن دوپامین و تولید پراکسید هیدروژن می باشد (Shankar, 2008). این پراکسید هیدروژن تولید شده در سلول های گلیال، به میزان بالایی از غشا نفوذ پذیر است و می تواند به سلول های دوپامینرژیک مجاور وارد شده و علاوه بر اکسید کردن دوپامین داخل نورونی، به دیگر اجزای سلولی آسیب وارد نماید (Shankar, 2008).

7-1 انواع روش های درمانی پارکینسون

1-7-1 استفاده از دارو

از این روش به منظور جایگزین کردن دوپامین یا ممانعت از فعالیت مونو آمین اکسیداز ها استفاده می شود.

1-1-7-1 جایگزین کردن دوپامین

نقص اصلی در بیماری پارکینسون مربوط به کاهش پیشرونده دوپامین در عقده های قاعده ای می باشد، بنابراین یکی از راه های درمان بیماری جایگزین کردن دوپامین می باشد (Nicholson *et al.*, 2002). اولین درمان با دوپامین برای جبران دوپامین کاهش یافته در سیناپس های استریاتال انجام شد اما به علت نفوذناپذیر بودن سد خونی مغزی به دوپامین، موفقیت آمیز نبود و موجب عوارض شدیدی شد (Goole, 2009). بازیابی میزان دوپامین استریاتوم از طریق L-DOPA به عنوان یکی از درمان های موفق نشان داده شده است (Kordower, 1999). L-DOPA می تواند از سد خونی مغزی عبور کرده ودر مغز تبدیل به دوپامین شود(Jankovic, 2000). اگرچه این دارو در مراحل ابتدایی بیماری می تواند بسیار کمک کننده باشد اما تاثیر آن به مرور زمان کم

می شود (Poewe, 1998) و بیمار نیاز به داروهای دیگری ازقبیل آگونیست های دوپامین پیدا می کند. اما استفاده طولانی مدت L-DOPA به صورت نامحدود، حوادث بدتری را برای بیماران به بار می آورد (Ahlskog, 2001).

کاهش پاسخ کلینیکی به L-DOPA با گذشت زمان، مربوط به نورودژنراسیون پیشرونده نورون های دوپامینرژیک جسم سیاه است که موجب کاهش دوباره میزان دوپامین و بروز علائمی مانند Dyskinesia، کاهش فشار خون، اختلالات جنسی و اثرات روانی می شود (Ahlskog, 2001; Goole, 2009).

2-1-7-1 استفاده از باز دارنده های مونوآمین اکسیداز

Selegiline یک مهار کننده ی مونوآمین اکسیداز B است که در درمان پارکینسون استفاده می شود و زمان فعالیت دوپامین را در استریاتوم افزایش می دهد و از این طریق باعث بهبود علائم بیماری و کاهش پیشرفت آن می شود. با وجود این درمان با استفاده از Deprenyl و Tocopherol نیز انجام می گیرد.(Lewitt, 1991).

2-7-1 پیوند سلول

استفاده از جایگزین های دوپامین به علت وجود اثرات جانبی زیاد، درمان مناسبی محسوب نمی شدند (Goya, 2008). بنابراین به منظور جایگزینی نورون های دوپامینرژیک از دست رفته تحقیقات برروی پیوند های نورونی تمرکز یافت (Goya, 2008).

با وجود اینکه در ابتدا پیوند رده های مختلف سلولی که حتی با ژن های مختلف دست ورزی شده بودند انجام شد اما به خاطر تشکیل شدن تومور و نیز شناسایی توسط سیستم ایمنی میزبان، در درمان پارکینسون موفق نشان ندادند (Freed, 1990). بنابراین تلاش برای یافتن منابع سلولی مناسب تر ادامه یافت. منابع سلولی که اکنون برای جایگزینی نورون های دوپامینرژیک در پارکینسون مورد توجه هستند شامل سلول های بنیادی (سلول های بنیادی جنینی، پیش سازهای نورونی و..) و سلول های دوپامینرژیک اولیه (سلول های مدولای فوق کلیه، اپیتلیال پیگمانته شبکیه و...) می باشند(Ruwani, 2009).

3-7-1 ژن درمانی

ژن درمانی به معنای انتقال اسیدهای نوکلئیک مورد نظر اعم از DNA یا RNA، به سلول های هدف به منظور درمان می باشد (Lanza, 2007). این اسید های نوکلئیک به صورت وکتور های ویروسی نوترکیب عمدتا از طریق تزریق مستقیم به اندام هدف یا به رگ خونی تغذیه کننده آن (in vivo) یا سلول هایی که برای پیوند زدن به شخص، در آزمایشگاه و در خارج از بدن دست ورزی شده اند (in vitro) استفاده می شوند (Lanza, 2007).

مزیت انتقال ژن به صورت in vivo نسبت به in vitro این است که فرآیندهای پر هزینه ای شامل برداشت سلول از بیمار، دست ورزی آ نها در خارج از بدن و برگرداندن این سلول های تغییر یافته ژنتیکی به بیمار را حذف می کند (Lanza, 2007). از معایب انتقال ژن به روش in vivo القاء سیستم ایمنی توسط وکتور، عدم انتقال دقیق وکتور به سلول های هدف و سمیت القاء شده به وسیله وکتور در سلول ها می باشد (Lanza, 2007).

یکی از مزیت های انتقال ژن از طریق in vitro این است که جمعیت سلولی می تواند تخلیص شود و بنابراین سلول ها و بافت های مجاور را درگیر نمی کند (Lanza, 2007). همچنین در in vitro میزان شناخته شدن وکتور های ژن درمانی توسط سیستم ایمنی ناچیز است، چون سیستم ایمنی با این وکتورها تماس ندارد (Lanza, 2007).

8-1 روش های مورد استفاده در ژن درمانی پارکینسون

این روش ها را می توان بر اساس مکانیسم و هدف عملکردی آنها به ترتیب زیر بررسی کرد: (Tomas, 2009)

- روش های مبتنی بر بازیابی ظرفیت سنتز دوپامین
- روش های مبتنی بر تعدیل فعالیت عقده های قاعده ای
- روش های مبتنی بر حفاظت نورونی (Neuroprotection)

1-8-1 روش های مبتنی بر بازیابی ظرفیت سنتز دوپامین

در بیماران پارکینسونی فعالیت آنزیم تیروزین هیدروکسیلاز که تیروزین را به L-DOPA تبدیل می کند به شدت کاهش یافته است، بنابراین بازسازی آنزیم های لازم برای سنتز دوپامین می تواند یک درمان جایگزین برای دارو درمانی باشد (Tomas, 2009). از این رو با انتقال همزمان ژن های تیروزین هیدروکسیلاز (TH) و آنزیم تبدیل کننده ی L-DOPA به دوپامین یعنی آروماتیک آمینو اسید دکربوکسیلاز (AADC) به استریاتوم می توان میزان تولید دوپامین را افزایش داد (Tomas, 2009). استفاده از این استراتژی باعث شد تا میمون پارکینسونی بهبودی 64 درصدی در علائم بیماری را نشان دهد (Wang, 2002).

برای جلوگیری از تولید نا به جای دوپامین در سلول هایی که هیچ مکانیسم ذخیره و رها سازی این نوروترانسمیتر را ندارند، ژن درمانی با تکیه بر جدا سازی محل سنتز L-DOPA و سنتز دوپامین انجام گرفت (Tomas, 2009). بنابراین انتقال ژن TH و ژن کلیدی سنتز کوفاکتور ضروری این آنزیم یعنی تترا هیدروبیوپترین(BH4) به نورون های استریاتومی به طور پیوسته ای L-DOPA لازم را برای تولید دوپامین توسط AADC درون پایانه های سروتونرژیک و دوپامینرژیک که توانایی ذخیره و رها سازی دوپامین را دارند فراهم می کند (Kish, 2008).

2-8-1 روش های مبتنی برتعدیل فعالیت عقده های قاعده ای

احتمالا تعداد بسیاری از مشکلات حرکتی در بیماری پارکینسون به علت عدم مهار هسته ی Sub Thalamic است که موجب تحریک هسته های هدف آن یعنی گلبوس پالیدوس و جسم سیاه می شود (Hideki, 2008). از این رو خاموش کردن نورون های گلوتاماترژیک تحریکی هسته ی Sub Thalamic با تزاید بیانی آنزیم گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز (GAD)، آنزیمی که در سنتز نوروترانسمیتر GABA (گاما آمینو بوتیریک اسید) دخالت دارد، یکی دیگر از راهکارهای ژن درمانی برای پارکینسون است که در حال بررسی است (Moffat, 1997).

3-8-1 راهکارهای حفاظت عصبی (Neuroprotection)

پارکینسون یک بیماری پیشرونده عصبی است که جمعیت های نورونی را تحت تاثیر قرار می دهد، بنابر این تلاش برای یافتن نوعی استراتژی که فرایند های نورودژنراتیو را کند یا عکس کند انجام شده است (Tomas, 2009). با وجود اینکه بیماران در زمان تشخیص بیماری حدود 50% نورون های دوپامینرژیک جسم سیاه و 80-60% دوپامین استریاتومی را از دست داده اند (Schunpbach, 2005) ولی نورون های باقیمانده می توانند هدفی برای درمان از طریق حفاظت عصبی و ترمیم باشند که به این منظور چند روش مختلف وجود دارد (Tomas, 2009) که در زیر آورده شده است:

1-3-8-1 استفاده از فاکتورهای رشد عصبی (Neurotrophic Factors)

تاکنون فاکتورهای رشدی مانند GDNF (Lin, 1993)، BDNF (Hyman, 1991)، NGF (Rohrer, 1996) و ... به منظور درمان پارکینسون مورد بررسی قرار گرفته اند.

GDNF (Glial Derived Neurotrophic Factor)، مولکولی است که به عنوان فاکتور حفاظت کننده ی عصبی در پارکینسون بیشترین مطالعات روی آن انجام گرفته است (Lin, 1993).

GDNF عضوی از خانواده TGF-β می باشد (Lin, 1993). چون بیان این فاکتور در مغز کمتر از میزانی است که بتوان آن را ردیابی کرد (Tomas, 2009)، از این رو در ابتدا امکان تشخیص نقش دقیق GDNF در حفظ نورون های دوپامینرژیک وجود نداشت (Tomas, 2009).

اخیرا مدل های موش ناک اوت استفاده شده اند و با خاموش شدن بیان GDNF، یک کاهش 60 درصدی در سطح GDNF نیگرال مشاهده شده است (Tomas, 2009) و این باعث از بین رفتن 50% نورون های دوپامینرژیک در طی 7 ماه شد که بیان کننده این است که GDNF در حفظ نورون های دوپامینرژیک در طی بزرگسالی ضروری است (Pascual, 2008). قدرت حفاظتی GDNF در in vivo با تزریق پروتئین آن به فضای پارانشیم مغز مورد مطالعه قرار گرفته است (Tomas, 2009). این

مطالعات اثرات حفاظتی موثری را با تزریق GDNF به مدل های پارکینسونی نشان داده اند و این اثرات حفاظتی دیده شده شدیدا وابسته به جایگاه تزریق، زمان و مدت تیمار بوده است (Peterson, 2002) . GDNF در دوزهای بالا باعث بروز عوارض جانبی مانند سردرد برای بیمار می شود (Nutt, 2003) و این از آنجا ناشی می شود که نفوذ GDNF از مایع مغزی- نخاعی به پارانشیم مغزی محدود است(Kordower, 1999).

2-3-8-1 اثر ژن های بیماری در حفاظت عصبی

یکی دیگر از راههای درمانی بیماری انتقال نسخه های طبیعی ژنهایی است که موتاسیون درآنها باعث بیماری پارکینسون می شود (Hideki, 2008). جهش در برخی ژن ها به خصوص ژن های دخیل در عملکرد میتوکندریایی همچنین پروتئازوم و یا سیستم دفاع آنتی اکسیدانت باعث بروز فنوتیپ ارثی پارکینسون می شوند (Moore, 2005).

در این میان جهش در ژن های آلفا سینوکلئین و LRRK2 باعث حالت وراثتی آتوزومی غالب پارکینسون و جهش در ژن های Parkin، PINK1 و DJ-1 منجر به حالت آتوزومی مغلوب بیماری می شود(Hideki, 2008).

بنابراین هدف ژن درمانی انتقال نسخه های طبیعی ژن های مغلوبی که عملکرد طبیعی خود را از دست داده اند یا کاهش دادن بیان ژن های غالبی که باعث عملکرد سمی شده اند، می باشد (Hideki, 2008).

انتقال ژن کد کننده DJ-1 که در دفاع آنتی اکسیدانت دخیل است در موش هایی که در این ژن موتاسیون داشتند باعث بازیابی بیان DJ-1 و افزایش مقاومت آنها در برابرآسیب های القاء شده توسط اکسیدانت ها شده است (Kim, 2005).

همچنین با انتقال ژن کد کننده Parkin که از اجزای ضروری سیستم پروتئازومی است و در پاک کردن سلول ها از پروتئین های دارای فولدینگ اشتباه یا اکسیده دخالت دارد، به بیماران موتانت در این ژن، فراهم شدن تعدیل بیماری برای این بیماران مورد انتظار است (Hideki, 2008).

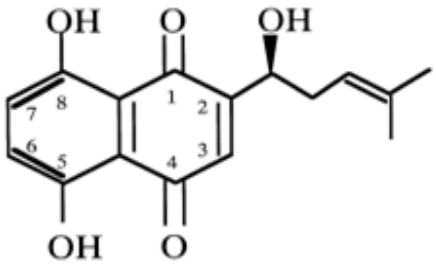
3-3-8-1 حفاظت عصبی با تقویت دفاع آنتی اکسیدانت

استرس اکسیداتیو باعث می شود تا اختلالات نوروبیولوژیکی مشاهده شده در جسم سیاه پارکینسونی ها افزایش یابد. بنابراین تلاش ها برای به حداقل رساندن این استرس می تواند ارزش درمانی زیادی داشته باشد (Hideki, 2008). چندین مکانیسم دفاعی در برابر استرس اکسیداتیو وجود دارد که شامل استفاده از آنتی اکسیدانت های غیر آنزیمی از جمله : آسکوربیک اسید، گلوتاتیون، ویتامین E و غیره می باشند (Kim, 2007).

در سال های اخیر مشخص شده است که بسیاری از مشتقات فنولی و هیدروکینونی، فعالیت آنتی اکسیدانتی دارند (Kondo *et al.*, 1999;Neuzil *et al.*, 1997). برای مثال هیدروکینون ویتامین K از پراکسیداسیون لیپیدهای میکروزومی جلوگیری می کند (Vervoort *et al.*, 1997).

شیکونین یا β-آلکانین یک ماده ارغوانی رنگ است که از ریشه گیاه Lithospermum erithrorhizon استخراج می شود و در گذشته در آسیای شرقی هم به عنوان رنگ و هم در درمان زخم ها کاربرد داشته است(شکل 1-4)(Ozaki *et al.*, 1996).

نشان داده شده است که شیکونین فعالیت قوی آنتی اکسیدانتی بر علیه انواع مختلف ROS دارد (Sekine *et al.*, 1998).



شکل 1-4) ساختار شیمیایی شیکونین (Dayuan *et al.*, 2000).

همچنین از مکانیسم های آنتی اکسیدانت آنزیمی می توان سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و پروکسی ردوکسین را نام برد (Kim, 2007). علاوه بر این، مکانیسم سوم دفاع آنتی اکسیدانتی شامل تعمیر پروتئین های آسیب دیده و یا تجزیه آنها وجود دارد که از تیوردوکسین ها وسیستم پروتئازومی می توان نام برد (Jung, 2009).

معمولا سطح GSH در بیماری پارکینسون پایین می آید که این خود باعث پیشرفت بیماری می شود چون GSH در حفظ تعادل احیای سلولی دخالت دارد (Shankar, 2008). گلوتاتیون تری پپتیدی از گلوتامات، سیستئین و گلیسین است که در حالت احیا به حالت تیولی هستند (Dringen, 2003). بنابراین یک راه مقابله با استرس اکسیداتیو استفاده از آنتی اکسیدانت هایی از جمله گلوتاتیون است که با تزریق خود GSH یا آنالوگ های آن انجام می شود (Schulz, 2000).

به علت نیاز به مقادیر بالای این آنتی اکسیدانت ها برای بروز اثرات حفاظتی در مغز و همچنین نفوذ پذیری کم آنها از سد خونی-مغزی و همچنین سمیت آنها در دوزهای بالای مصرفی، این نوع درمان را با محدودیت هایی مواجه کرده است (Moosmann, 2002). به این دلیل نیاز به استراتژی های جایگزین بر مبنای آنتی اکسیدانت ها برای مقابله با اثرات مضر اکسیدانت ها و حفظ تعادل احیا سلول احساس می شود (Helga, 2008).

در بین آنزیم های آنتی اکسیدانت، سوپراکسید دیسموتاز از اولین خطوط دفاع آنتی اکسیدانت محسوب می شود چون آنیون سوپر اکسید را به پراکسید هیدروژن و اکسیژن مولکولی تبدیل می کند (Johnson, 2005). آنزیم های کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و پروکسی ردوکسین ها، پراکسید هیدروژن ایجاد شده را با تبدیل کردن به آب سم زدایی می کنند (Helga, 2008). کاتالاز، آنزیم آنتی اکسیدانت داخل سلولی است که در سراسر مغز بیان می شود و سم زدایی پراکسید هیدروژن را عمدتا در پراکسیزوم ها انجام می دهد اما میزان آن در مغز در مقایسه با دیگر بافت ها نسبتا کم است (Dringen, 2005).

9-1 گلوتاتیون پراکسیداز (Glutathion Peroxidase)

گلوتاتیون پراکسیداز یک نام کلی برای یک خانواده آنزیمی با چندین ایزوزیم می باشد که احیای پراکسید هیدروژن یا پراکسیدهای آلی به آب یا الکل مربوطه را با استفاده از گلوتاتیون به عنوان دهنده الکترون کاتالیز می کنند (Margis, 2008).

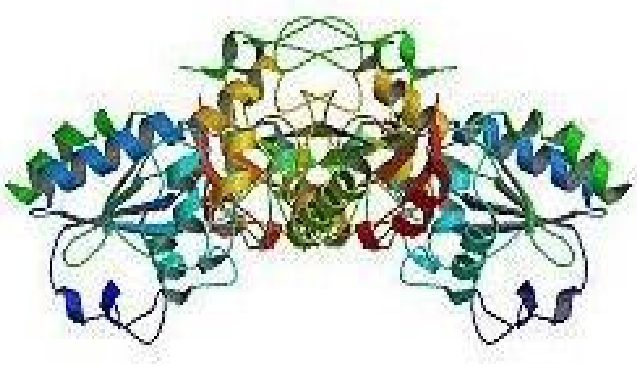
4 نوع ایزوزیم گلوتاتیون پراکسیداز اصلی وابسته به سلنیوم در بافت های پستانداران وجود دارد که گلوتاتیون پر اکسیداز-1 (GPX-1) در بیشتر بافت ها به خصوص در گلبول های قرمز، کبد، ریه و کلیه ها یافت می شود، GPX2 عمدتا به عنوان گلوتاتیون پراکسیداز معده ای- روده ای شناخته می شود (Margis, 2008)، GPX3 که عمدتا در پلاسمای خون و بعضا در کلیه، ریه، جفت، قلب و ماهیچه ها یافت می شود (Margis, 2008) وGPX4 که توزیع گسترده ای در بافت ها دارد و فسفولیپید هیدرو پراکسیدها را احیا می کند (Margis, 2008).

GPX1 ، GPX2 و GPX3 به صورت هومو تترامر فعالیت می کنند در حالی که GPX4 به صورت مونومر عمل می کند(Brown, 2000). گلوتاتیون پراکسیدازها دارای توزیع داخل سلولی ویژه ای نیز هستند به طوریکه GPX1 در سیتوزول، هسته و میتوکندری یافت می شود در حالی که GPX2 در هسته و میتوکندری و GPX3 اگرچه ترشحی است اما در سیتوزول نیز یافت می شود (Margis, 2008). GPX4 نیز در هسته، سیتوپلاسم و میتوکندری به صورت متصل به غشاهای لیپیدی وجود دارد (Herbette, 2007).

10-1 گلوتاتیون پراکسیداز 1 (GPX1)

GPX-1 به عنوان یکی از آنزیم های آنتی اکسیدانت اصلی سلول های پستانداران است که پراکسید هیدروژن را غیرفعال می کند و در برابر استرس اکسیداتیو حفاظت می کند (John, 2009).

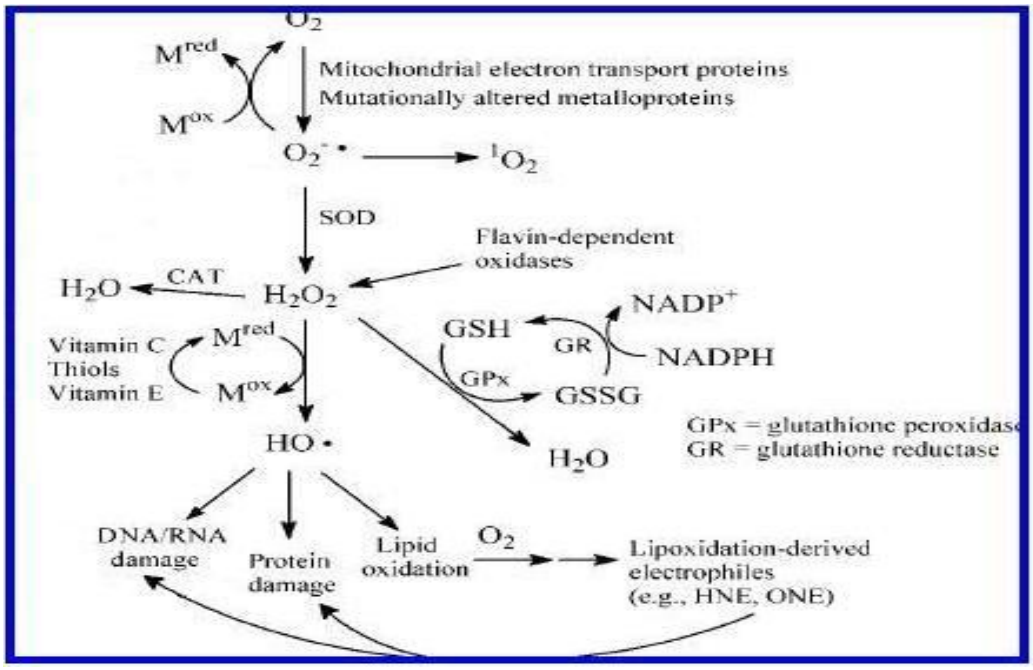
GPX1 پروتئینی 21 کیلو دالتونی است که در میکروگلیا ها در سطح بالا و در نورون ها در سطح پائین تری بیان می شود (Lindenau, 1998).



شکل1-5) ساختار فضایی گلوتاتیون پراکسیداز 1

wikipedia.org

گلوتاتیون پراکسیداز-1 جزئی از سیستم دفاع آنتی اکسیدانت گلوتاتیون است، سیستمی که در آن گلوتاتیون احیا (GSH) توسط گلوتاتیون پراکسیداز-1 اکسیده شده تا سمیت پراکسید هیدروژن خنثی شود (Dringen, 2003). گلوتاتیون اکسیده (GSSG) توسط گلوتاتیون ردوکتاز با مصرف NADPH احیا می شود و این چرخه های اکسید و احیا تکرار می شوند (Dringen, 2003). ارتباط دفاع های آنتی اکسیدانت از جمله سیستم گلوتاتیون و استرس اکسیداتیو در شکل 1-6 آمده است :



شکل 1-6) مسیر تولید اکسیدانت های معمول سلولی و پاک سازی آنها توسط آنتی اکسیدانتها (Lawrence, 2008).

گلوتاتیون پراکسیداز-1 به عنوان یکی از آنتی اکسیدانت های اصلی در سم زدایی پراکسید هیدروژن مورد توجه بوده است چون توزیع بافتی گسترده ای دارد (Brigelius, 1999).

مشخص شده است که GPX1 از لحاظ مکانی یک توزیع متناسب با اجسام Lewy در نورون ها نشان می دهد و احتمالا در مراحل تجزیه این اجسام دخالت دارد (John, 2009)، از این رو گفته می شود نورون ها قادرند آنزیم های آنتی اکسیدانت را به مناطق تولید کننده استرس اکسیداتیو هدایت کنند (John, 2009).

در سلول های اندوتلیال انسانی، افزایش دادن بیان گلوتاتیون پراکسیداز-1 موجب کاهش بیان پروتئین پیش آپوپتوزی Bax شده و از این طریق نسبت پروتئین آنتی آپوپتوتیک Bcl2 به Bax را به نفع Bcl2 تغییر داده است (Xin, 2007). همچنین در بررسی های in vivo در سکته مغزی، افزایش میزان Bcl2 و کاهش سیتوکروم C بعد از افزایش بیان گلوتاتیون پراکسیداز1 از طریق ژن درمانی در استریاتوم را نشان داده اند (Ilona, 2009).

11-1 وکتورهای مورد استفاده در ژن درمانی

رایج ترین وکتورهایی که برای ژن درمانی استفاده می شوند شامل دو گروه وکتورهای ویروسی و غیرویروسی هستند (Lanza, 2007). انواعی از وکتورها در هر دو گروه قرار می گیرند اما رایج ترین وکتورهای غیرویروسی، پلاسمیدها و پلاسمیدهای ترکیب شده با لیپوزوم ها هستند (Lanza, 2007). رایج ترین وکتور های ویروسی شامل آدنوویروسها، ویروس های وابسته به آدنو ویروس ها، رتروویروس ها و لنتی ویروس ها هستند (Verma, 2005).

1-11-1 وکتورهای غیرویروسی

پلاسمید ها ساده ترین وکتورهای انتقال ژن هستند. برای ترانس داکشن in vivo سلول ها، این پلاسمیدها معمولا با لیپوزوم ها ترکیب شده تا اتصال و ورود آنها به سلول های هدف را تسهیل کند(Miller, 1999).

انواعی از روش های فیزیکی برای وارد کردن پلاسمید به سلول های هدف وجود دارد که شامل میکرواینجکشن، الکتروپوریشن، اولتراسوند، تفنگ ژنی و... می باشند(Miller, 1999). بیشتر این روش ها برای انتقال ژن در in vivo قابل استفاده نیستند که به علت عدم دسترسی به سلول های هدف برای دست ورزی مستقیم است (Lanza, 2007). اگرچه پلاسمید ها را به صورت موثری در in vitro استفاده می کنند اما بازدهی in vivo آنها محدود است (Lanza, 2007).