مقاله تحقیقاتی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران

سال هشتم ● شماره ۴ ● صفحات ۲۳۵ تا ۲۴۳ ● زمستان ۱۳۸۹

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان به سلول‌های دوپامینرژیک در مدل تجربی بیماری پارکینسون در موش‌های صحرایی

اکرم نژادی[۱]، فریده قاضی[۲]، مهرداد بختیاری[۳]، زهره عطایی[۴]، *مهدی مهدیزاده[۵]

تاریخ اعلام وصول: ۱۳۸۹/۵/۲۰ تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۱۳۸۹/۸/۲۵

چکیده

سابقه و هدف: بررسی‌ها نشان داده است که تعداد سلول‌های بنیادی زنده در ناحیه پیوند نقش بسیار مهمی در بهبود فعالیت عملکردی عضو دارد و مشخص شده که رادیکال‌های آزاد نقش عمده‌ای در کاهش حیات سلول‌های پیوند یافته دارند. در مطالعه حاضر به بررسی تجویز توأم کوآنزیم Q_{10} به همراه پیوند سلول‌های بنیادی مغز استخوان در موش‌های صحرایی مدل پارکینسون پرداختیم.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار که به شش گروه زیر تقسیم شده بودند استفاده گردید، که عبارتند از: گروه کنترل، شاهد، تخریب، درمان با تجویز خوراکی CoQ_{10}، درمان با پیوند BMSCs و درمان توأم پیوند BMSCs به همراه تجویز خوراکی CoQ_{10}. تجویز خوراکی CoQ_{10} با دوز ۲۰۰ mg/kg روزانه از یک هفته قبل از ایجاد مدل شروع گردید و در طول مدت درمان نیز ادامه داشت. ایجاد مدل آزمایشگاهی بیماری پارکینسون در موش‌های صحرایی گروه‌های درمانی و گروه تخریب با تزریق ۲/۵ میکرولیتر محلول سالین ۰/۹ درصد حاوی ۸ میکروگرم ۶-هیدروکسی دوپامین و ۰/۲ درصد اسید اسکوربیک به بخش متراکم جسم سیاه با روش استریوتاکسی صورت گرفت. در انتهای دوره درمانی دو ماهه مولکولی به عمل آمد.

یافته‌ها: بررسی‌های مولکولی وجود ژن TH را در هر سه گروه درمانی نشان داد با این تفاوت که میزان بیان ژن TH در گروه درمانی توأم نسبت به دو گروه درمانی دیگر بیشتر بود ($P<0/001$).

بحث و نتیجه‌گیری: استفاده توأم دو درمان نوروپروتکتیو و درمان جایگزینی می‌تواند تاثیر بهتری در درمان بیماری پارکینسون نسبت به هر یک از این درمان‌ها به تنهایی داشته باشد و می‌تواند در صورت انجام مطالعات بعدی و بیشتر، جایگزین درمان‌های رایج کنونی نیز گردد.

کلمات کلیدی: کوآنزیم Q_{10}، سلول استرومال مشتق از مغز استخوان، آپوپتوزیس، توأم درمانی

مقدمه

سیستم دوپامینرژیکی نیگرواستریاتال نقش بسیار مهمی در سازماندهی عملکردی عقده‌های قاعده‌ای (basal ganglia) مغز دارد و گواه بارز آن نواقص شدید حرکتی است که در بیماری پارکینسون بر اثر دژنراسیون این سیستم بروز می‌کند (۱، ۲).

بیماری پارکینسون یک بیماری نورودژنراتیو و پیشرونده می‌باشد که با اختلالات حرکتی و ناتوان کنندهٔ متعددی شامل لرزش (Tremor)، سفتی حرکات (Rigidity)، کندی حرکات (Hypokynesia) و عدم تعادل وضعیتی همراه است (۳). مشخصه بارز این بیماری از نظر پاتولوژی، دژنراسیون آهسته و تدریجی نورون‌های دوپامینرژیک

۱ـ پژوهشگر، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی آجا، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی
۲ـ دانشیار، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه ژنتیک و مولکولی
۳ـ استادیار، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی
۴ـ مربی، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه ژنتیک و مولکولی
۵ـ استاد، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی (*نویسنده مسؤول)
تلفن: ۸۸۰۲۸۵۸۹-۰۲۱ آدرس الکترونیک: maranoo@iums.ac.ir

www.SID.ir

بخش متراکم جسم سیاه (Substantia nigra, SNC) می‌باشد که منجر به کاهش سطح دوپامین در نئواستریاتوم می‌گردد (۵، ۴، ۳).

در خصوص مکانیسم‌های پاتولوژیک و علت مرگ سلول‌های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه فرضیات متعددی از قبیل نقص کمپلکس I میتوکندریائی مربوط به زنجیره انتقال الکترون، تجمع آهن، اختلال عملکرد سیتوکروم کبدی P۴۵۰ و افزایش تشکیل رادیکال‌های آزاد مطرح است (۶، ۷).

درمان‌های دارویی رایج این بیماری تا کنون به صورت درمان علامتی (Symptomatic treatment) با تجویز پیش سازهای دوپامین، آگونیست‌ها و سایر آنالوگ‌های دوپامین می‌باشد. رایج‌ترین داروی به‌کار رفته در کاهش علایم این بیماری لودوپا (L-DOPA) است که همچنان موثرترین دارو به‌شمار می‌رود. این دارو توانایی عبور از سد خونی–مغزی را دارد و باعث افزایش سنتز و آزاد شدن دوپامین و تسکین علایم بیماری می‌شود. بیشتر بیماران پاسخ اولیه خوبی به این دارو نشان می‌دهند، اما بعد از استفاده دراز مدت و به ناچار دوزهای بالاتر، در معرض اثرات زیان آور آن از جمله: دیسکنزیا، نوسانات اثر دارو، تغییرات حافظه و فقدان اثر دارو قرار می‌گیرند و در نتیجه کارآیی درمان کاهش می‌یابد. بنابراین اکثر بیماران پارکینسونی در نهایت یک نوع ناتوانی را تجربه خواهند کرد که به وسیله درمان‌های قابل دسترس و رایج کنونی قابل کنترل نخواهد بود. بدین علت تلاش‌های گسترده و هماهنگی برای تکامل یک نوع درمان قطعی برای این بیماری صورت گرفته تا روند تخریب نورونی در این بیماری را متوقف یا کند سازد (۴، ۸).

از آنجایی که سیستم عصبی ـ مرکزی دارای ظرفیت بسیار محدودی برای رژنراسیون نورون‌های صدمه دیدهٔ خود دارد و از آنجایی که سلول‌های بنیادی، سلول‌های اولیه غیر تمایز یافته‌ای هستند که دارای خاصیت خودتکثیری (self-renewal) بوده و قابلیت تمایز و تبدیل شدن به انواع دیگر سلول‌های بدن را دارند، بنابراین پیوند سلول‌های بنیادی به عنوان یکی از استراتژی‌های درمانی جدید برای درمان بیماری‌های نورودژنراتیو از جمله بیماری پارکینسون در حال بررسی می‌باشد (۹).

از میان انواع سلول‌های بنیادی شناخته شده، سلول‌های بنیادی استرومال مشتق از مغز استخوان (BMSCs: Bone marrow stromal stem cells) به عنوان یک منبع اتولوگوس به علت سهولت در دستیابی به آنها و نداشتن مسائل اخلاقی و ایمونولوژیک و نداشتن خطر ایجاد تومور در محل پیوند کاندید خوبی جهت پیوند به شمار می‌روند (۱۰، ۱۱، ۱۲). مطالعات in vitro نشان داده است که BMSCs در صورتی که در محیط کشت حاوی فاکتورهای تمایز عصب کشت داده شوند به سلول‌های دارای مارکرهای عصبی از جمله ژن تیروزین هیدروکسیلاز (TH: Tyrosine hydroxylase)، که به عنوان یکی از مارکرهای شناخته شده سلول‌های دوپامینرژیک می‌باشد، تمایز می‌یابند (۱۳، ۱۴).

از آنجایی که آزمایش‌های قبلی ثابت کرده است که محیط احاطه کننده یک سلول بنیادی می‌تواند تمایز نهایی آن را دیکته کند (۱۵). و همچنین احتمال تغییر قدرت توانایی در بیان ژن و ژنوم سلول در پاساژهای طولانی مدت افزایش می‌یابد و باعث افزایش خطر رشد غیر قابل کنترل سلول می‌شود (۱۶). به همین علت در این مطالعه، ما از پیوند BMSCs تمایز نیافته به بافت استریاتوم موش‌های صحرایی مدل پارکینسون استفاده می‌کنیم.

اگر چه مطالعات آزمایشگاهی پیوند سلولی، نتایج امید بخشی را نشان داده است. اما سلول‌های پیوند شده میزان بقای کمی پس از پیوند دارند و پس از مدتی دچار آپوپتوزیس می‌شوند. یکی از مهمترین علت‌های عمر کم و آپوپتوزیس سلول‌های پیوند یافته عوامل اکسیداتیو دانسته شده است. در این زمینه گفته شده که رادیکال‌های آزاد اکسیژن ناشی از هایپوکسی سلولی و ترومایی که در طی آماده سازی و پیوند زدن سلول‌ها ایجاد می‌شود می‌تواند باعث پراکسیداسیون لیپیدی غشای سلول‌های پیوندی و مرگ آنها در بافت میزبان گردد (۱۷).

به همین دلیل در این مطالعه علاوه بر استفاده از پیوند BMSCs تمایز نیافته به رتهای مدل تجربی پارکینسون تصمیم گرفته شد که از یک عامل آنتی اکسیدانی جهت از بین بردن رادیکال‌های آزاد و جلوگیری از آپوپتوزیس سلول‌های بنیادی پیوند شده و افزایش عمر این سلول‌ها در کمک برای فرصت کافی جهت تمایز یافتن آنها استفاده شود. در این راستا، CoQ_{10} (Coenzyme Q_{10}) به عنوان یک آنتی اکسیدان و عامل آنتی آپوپتوتیک شناخته شده در این مطالعه انتخاب گردید.

CoQ_{10} یک مولکول محلول در چربی است که هم در غشا داخلی میتوکندری و هم در غشاهای لیپیدی بسیاری از انواع سلول‌ها وجود دارد. CoQ_{10} یک کوفاکتور ضروری در زنجیره انتقال الکترون

Archive of SID
www.SID.ir

میتوکندری می‌باشد. این مولکول الکترون‌ها را از کمپلکس ۱ و۲ دریافت و به کمپلکس ۳ تحویل می‌دهد و در واقع شکل احیا شده یوبی‌کینول (Ubiquinol)است که به عنوان آنتی‌اکسیدان چربی دوست عمل می‌کند. بنابراین از سلول در برابر رادیکال‌های آزاد و ROS محافظت می‌کند و سطح آنتی‌اکسیدان‌های دیگر مثل ویتامین E و اسید اسکوربیک را افزایش می‌دهد (۱۸، ۱۹، ۲۰).

بررسی‌های به‌عمل آمده نشان داده است که میزان CoQ_{10} در غشاهای زیستی با پدیده پیری کاهش می‌یابد (۱۹). همچنین مطالعات متعددی نشان داده است که میزان CoQ_{10} در سلولها و سرم خون افراد پارکیسونی کمتر از حد معمول می‌باشد و این سطح کاهش یافته CoQ_{10} پیشنهاد کننده این است که احتمالاً مکمل CoQ_{10} در درمان بیماری پارکینسون مفید باشد (۱۹، ۲۰).

دراینجا این سوال مطرح می‌شود که آیا CoQ_{10} می‌تواند در میزان بیان ژن تیروزین هیدروکسیلاز به عنوان یک مارکر دوپامینرژیک در بافت استریاتوم تاثیری داشته باشد؟ از آنجایی که تاکنون مطالعه اثر این دارو بدین صورت بررسی نشده است بنابراین از مهمترین فرضیه‌های این بررسی به‌شمار می‌رود.

مواد و روش‌ها

حیوانات: در این مطالعهٔ تجربی از ۵۷ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۳۰۰- ۲۵۰ گرم استفاده شد. موش‌ها تحت شرایط استاندارد با دوره روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته و دمای ۳ ± ۲۱ درجه سانتی گراد نگهداری می‌شدند. حیوانات به آب آشامیدنی و غذا کافی دسترسی داشتند و جهت سازگاری با محیط حداقل ۱۰ روز قبل از شروع مطالعه به حیوانخانه منتقل شدند.

حیوانات به طور تصادفی به شش گروه زیر تقسیم گردیدند:

گروه C: گروه کنترل، Control، به تعداد ۷ سر رت.

گروه Sh: گروه شاهد، Sham، به تعداد ۱۰ سر رت.

گروه L: گروه تخریب، Lesion، به تعداد ۱۰ سر رت.

گروه $L+Q_{10}$: گروه تخریب پیش درمان شده با CoQ_{10}، Coenzyme Q_{10}، pretreated Lesion group، به تعداد ۱۰ سر رت.

گروه L+T: گروه تخریب درمان شده با روش جایگزینی توسط پیوند سلول‌های BMSC، BMSCs transplanted Lesion group به تعداد ۱۰ سر رت.

گروه $L+T+Q_{10}$: گروه تخریبی که هر دو روش یعنی پیش درمانی با تجویز CoQ_{10} و درمان با پیوند سلول‌های BMSC در آنها صورت پذیرفت، Coenzyme Q_{10}، pretreated and BMSCs transplanted Lesion group، به تعداد ۱۰ سر رت.

روش ایجاد مدل تجربی بیماری پارکینسون در موش صحرایی

جهت ایجاد مدل تجربی بیماری پارکینسون، ابتدا حیوانات با تزریق داخل صفاقی مخلوطی ازکتامین (۶۰mg/kg) وگزیلازین (۱۰mg/kg) بیهوش شده و سپس تزریق نوروتوکسین ۶- هیدروکسی دوپامین (۶-OHDA: ۶-Hydroxy-Dopamine) (Sigma) در بخش متراکم جسم سیاه (SNC) توسط سرنگ هامیلتون ۵ میکرو لیتری و از طریق دستگاه استریوتاکس (stoelting,USA) انجام شد. مختصات محل تزریق نسبت به خط بین گوشی (interauricular) به صورت ۳/۷میلی متر قدامی- خلفی، ۲/۲میلی متر جانبی، ۷/۷میلی متر شکمی از سطح سخت شامه براساس اطلس پاکسینوس تعیین شد. همچنین میله دندانی استریوتاکس ۳/۳ میلی متر زیر سطح افق تنظیم گردید (۲۱، ۲۲).

در حیوانات گروه L، ۲/۵ میکرولیتر محلول سالین ۰/۹ درصد حاوی ۸ میکروگرم ۶-OHDA و ۰/۲ درصد اسید اسکوربیک به داخل SNC تزریق شد. در حیوانات گروه Sh نیز به همان حجم و غلظت محلول سالین- اسکوربات تزریق گردید. در دو گروه درمانی $L+Q_{10}$ و $L+T+Q_{10}$ علاوه بر تزریق ۶-OHDA به داخل SNC، CoQ_{10} با دوز ۲۰۰mg/kg/daily یک هفته قبل از تزریق نوروتوکسین به صورت گاواژ شروع شد و به مدت دو ماه بعد نیز به صورت روزانه ادامه یافت. در دو گروه درمانی L+T و $L+T+Q_{10}$ دو هفته بعد از تزریق نوروتوکسین در آنها از پیوند BMSC تمایز نیافته به استریاتوم استفاده شد.

روش کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (BMSCs) سلول‌های BMSC از مغز استخوان‌های فمور و تیبیای موش صحرایی بالغ طبق روش استاندارد استخراج شدند (۲۳) و سپس در فلاسک‌های حاوی محیط کشت MEMα (MEM Alpha Medium) کامل شده با سرم FBS (Fetal Bovine Serum) (۱۰٪)، پنی سیلین (۱۰۰ IU/ML) و استرپتومایسین (۱۰۰ mg/ml) کشت داده شدند. فلاسک حاوی سلول داخل انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و

Archive of SID

www.SID.ir

میزان ۵ درصد CO_2 نگهداری شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت، محیط کشت سلولی با محیط تازه تعویض گردید. سلول‌های استرومایی به کف فلاسک چسبیده باقی مانده و سایر سلول‌های خونی خارج شدند. زمانی که سلول‌ها در اثر تکثیر ۷۰ تا ۸۰ درصد کف فلاسک را پر کردند، پاساژ انجام شد به این صورت که با استفاده از محلول تریپسین) ۰/۲۵ درصد) / EDTA (۰/۰۴ درصد) سلول‌ها را از کف فلاسک جدا و داخل دو فلاسک تقسیم گردیدند. این عمل تا چهار پاساژ ادامه یافت.

آماده سازی سلول‌ها برای پیوند

جهت نشاندار کردن سلول‌های BMSC، ۷۲ ساعت قبل از انجام پیوند، پودر Brdu (۵-Bromo-۲′-deoxyuridine) (Sigma) با غلظت ۵ میکرو مول به محیط کشت سلول‌ها اضافه شد. پس از گذشت این زمان سلول‌ها همانند زمان پاساژ توسط Trypsin / EDTA از کف فلاسک جدا شدند و بعد از سانتریفیوژ و دور ریختن محیط بالای رسوب سلولی، این رسوب سلولی را توسط PBS (phosphate buffer saline) به صورت سوسپانسیون در آورده به طوری که در هر ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون حدود ۲×۱۰۵ سلول شناور بود. بعد از این مرحله ۵ میکرولیتر از این سوسپانسیون توسط سرنگ همیلتون ۵ میکرولیتری و به کمک دستگاه استریوتاکس به همان روشی که نوروتوکسین تزریق شده بود به استریاتوم سمت ضایعه دیدهٔ حیوانات گروه‌های پیوندی (L+T و L+T+Q_{10}) با مختصات: ۴/۵ میلی متر شکمی از سطح سخت شامه، ۳/۳ میلی متر جانبی از خط وسط و ۹/۲ میلی متر قدامی- خلفی نسبت به خط بین گوشی بر اساس اطلس پاکسینوس تزریق گردید (۲۱). این پیوند دو هفته بعد از ایجاد مدل پارکینسون و روز بعد از انجام تست رفتاری نوبت دوم صورت گرفت.

بررسی بیان ژن TH به روشی مولکولی RT-PCR

در پایان دوره درمان ۲ ماه به منظور بررسی مولکولی، بافت استریاتوم محل پیوند در گروه‌های مختلف خارج گردید و به صورت تازه تحت بررسی RT-PCR قرار گرفت. بدین منظور در ابتدا با استفاده از محلول RNX^{TM} plus solution (سیناژن، RNV۷۱۳C) بر اساس پروتکل، کل موجودی RNA بافت استخراج شد. قبل از انجام نسخه برداری معکوس، نمونه‌های RNA استخراج شده تحت تیمار با DNase (۱۰۴۱۳۲, Roch) قرار گرفتند تا آلودگی‌های احتمالی مربوط به DNA ژنومیک از نمونه‌های RNA حذف شود. سپس غلظت RNA استخراج شده با روش اسپکتروفوتومتری تعیین شد.

۲میکروگرم از RNA استخراج شده برداشته و با استفاده از کیت RevertAid^{TM}First Strand cDNA Synthesis Kit (K ۱۶۲۱ Fermentas) نسخه برداری معکوس انجام شد. سپس روی cDNA به دست آمده PCR صورت گرفت؛ برای این منظور مواد زیر در یک لوله PCR با یکدیگر مخلوط شدند: ۳ µl cDNA (۵۰ ng/µl)، از هر پرایمر Master Mix ۵x µl ،۱µl (۱۰µM) ۱۲/۵ (سیناژن، PR۸۸۱۶۰۶) و در نهایت با استفاده از آب دوبار تقطیر به حجم ۲۵µL رسانده شد. در این مطالعه علاوه بر ژن هدف، جهت کنترل داخلی و اطمینان از درستی کار PCR توالی ژن بتا اکتین (β-actin) به عنوان یک ژن خانه پا نیز مورد PCR قرار گرفت. پرایمرهای استفاده شده در جدول ۱ آمده است: شرایط PCR برای هر دو ژن یکسان بود و به صورت: ۱) واسرشتگی اولیه: ۲ دقیقه (۹۹ درجه سانتی گراد)، ۲) واسرشتگی هر سیکل: ۶۰ ثانیه، ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳) Annealing ۶۰ ثانیه، ۵۹ درجه سانتی گراد، ۴) Extension سیکل: ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد، ۵) Extension زمانی: ۷ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد. محصولات PCR روی آگارز ۱/۵ درصد جدا شدند و با اتیدیوم بروماید قابل رویت گردیدند.

جدول ۱-

دمای انلینگ	نام جفت پرایمر	ژن هدف	طولی توالی
۶۱	Forward: ۵′- CCC CAC CTG GAG TAT TTT GTG -۳′	Tyrosine hydroxylase	۵۱۸
۶۳	Reverse: ۵′- ATC ACG GGC GGA CAG TAG ACC -۳′	(TH)	
۵۸	Forward: ۵′- GTG GGC CGC CCT AGG CAC CAG -۳′	Actin_ β	۲۶۰
۶۲	Reverse: ۵′- GGC CTT AGG GTT CAG AGG GG -۳′		

Archive of SID
www.SID.ir

بررسی آماری

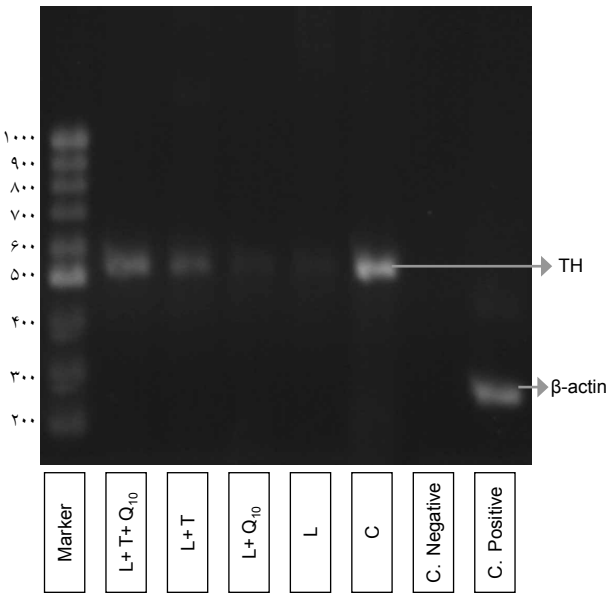
برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار Graph pad prism و تست‌های one way ANOVA و t-test استفاده شد. تمامی داده‌های به دست آمده از ارزیابی رفتاری و شمارش سلولی به صورت Mean ± SEM بیان شدند. در تمامی محاسبات، (p<۰/۰۱) به عنوان اختلاف معنی‌دار منظور گردید.

یافته‌ها

نتایج بررسی مولکولی به دست آمده از واکنش RT-PCR

در ارزیابی مولکولی به روش RT-PCR از بافت استریاتوم بیان ژن TH به عنوان یک مارکر دوپامینرژیکی مورد بررسی قرار دادیم. شکل ۱ نشانگر باندهای TH بدست آمده در هر یک از گروه‌ها می‌باشد.

همانگونه که مشخص است در گروه کنترل بیان ژن TH به صورت باند مشخص و واضح مشهود است در صورتی که وجود این باند در گروه تخریب مشهود نیست از طرف دیگر در هر یک از سه گروه درمانی تشکیل این باند مشاهده می‌شود. در این بررسی جهت اطمینان از عاری بودن واکنش از هر گونه آلودگی از آب DEPC – treated

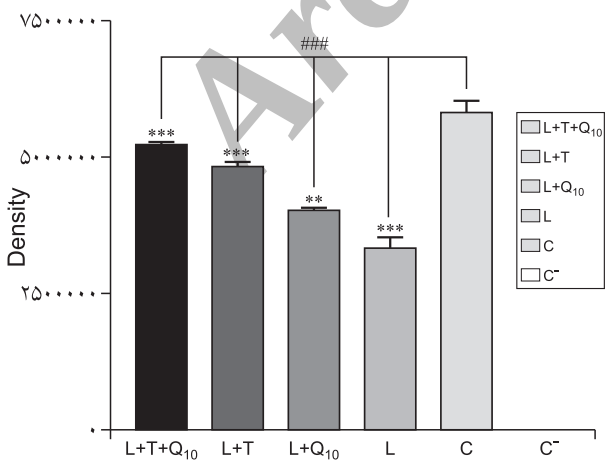


شکل ۱- باندهای به دست آمده در واکنش RT-PCR در هر یک از گروه‌های تحت مطالعه. در گروه کنترل باند واضح TH مشاهده می‌شود ولی این باند در گروه تخریب قابل مشاهده نیست. در سه گروه درمانی باندهای ضعیفی از TH قابل مشاهده است. در این واکنش از آب به عنوان کنترل منفی و از ژن β–actin به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

موجود در کیت PCR به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد و جهت اطمینان از درستی کار PCR از ژن β-actin به عنوان کنترل مثبت استفاده کردیم. نتایج به دست آمده از واکنش RT-PCR به صورت کیفی است و فقط نشان دهندهٔ بیان ژن TH در گروه‌های تحت درمان می‌باشد. جهت بررسی نتایج به صورت کمی و برای پی بردن به میزان بیان در هر یک از گروه‌های درمانی به کمک نرم افزار (www.vilber.com) Image G تعداد پیکسل‌های هر یک از باندهای به وجود آمده را به دست آورده و آنالیز آماری انجام شد.

نمودار ۱ نشان دهنده دانسیته باندهای TH به دست آمده از هر یک از گروه‌ها می‌باشد.

بررسی نتایج نشان دهندهٔ اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها است (P<۰/۰۰۱). نتایج کاهش معنی‌دار در میزان بیان ژن TH در گروه L را نسبت به گروه کنترل نشان داد (P<۰/۰۰۱). هر یک از گروه‌های درمانی افزایش معنی‌داری را در میزان بیان ژن TH نسبت به گروه L نشان دادند. در این بررسی میزان بیان ژن TH در دو گروه درمانی $L+Q_{10}$ و L+T در مقایسه با گروه L افزایش معنی‌دار (به ترتیب (P<۰/۰۰۱)، (P<۰/۰۱)) نشان داد. همچنین میزان بیان این ژن در گروه درمانی توأم ($L+T+Q_{10}$) افزایش معنی‌دار (P<۰/۰۰۱) نسبت به گروه L نشان داد و در مقایسه میزان بیان در این گروه با دو گروه درمانی دیگر افزایش معنی‌دار (P<۰/۰۱) مشاهده شد.



P###<۰/۰۰۱, one way ANOVA P***<۰/۰۰۱, t-test P**<۰/۰۱, t-test N=۵

نمودار ۱- نشاندهندهٔ میزان بیان ژن TH با استفاده از نرم افزار Image G (www.vilber.com) در گروه‌های تحت مطالعه می‌باشد. میزان بیان این ژن در گروه درمانی توأم بیشتر از دو گروه درمانی دیگر است.

Archive of SID
www.SID.ir

بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس مطالعات انجام شده، بیماری پارکینسون یک بیماری multifactorial بوده و با تخریب اکسیداتیو نورونی همراه است. ماده سیاه به دلیل داشتن محتوای قابل اکسید شدن (دوپامین، نوروملانین، اسیدهای چرب غیر اشباع، آهن) و محتوای آنتی اکسیدانی نسبتا پایین به طور اختصاصی مستعد آسیب اکسیداتیو می‌باشد. در این نورون‌ها همچنین سرعت متابولیکی بالایی نیز وجود دارد (۲۴). با توجه به شیوع بیماری پارکینسون، به عنوان یکی از شایع‌ترین بیماری‌های نورودژنراتیو، شیوه‌های درمانی که تا کنون برای این بیماری وجود داشته نارسا بوده و قانع‌کننده نیست. بنابراین یافتن راه درمانی مناسب و قطعی برای این بیماران به جای درمان علامتی همواره مورد توجه محققین بوده است.

در این تحقیق برای اولین بار دو شیوه درمانی یعنی درمان نوروپروتکتیو با استفاده از CoQ_{10} به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی و یک عامل آنتی آپوپتوزیس و درمان جایگزینی با استفاده از پیوند سلول‌های BMSC تمایز نیافته در جسم مخطط موش‌های صحرایی مدل پارکینسون، توأم به کار گرفته شد. در تحقیق حاضر جهت ایجاد مدل پارکینسون در موش‌های صحرایی از تزریق نوروتوکسین ۶–هیدروکسی دوپامین (۶-OHDA) استفاده شد. این نوروتوکسین عموماً در MFB (Medial forebrain bundle)، استریاتوم و یا به طورمستقیم در بخش متراکم جسم سیاه تزریق می‌شود که متعاقب آن سبب جذب انتخابی توسط نورون‌های دوپامینرژیکی می‌گردد (۲۵). نوروتوکسین ۶-OHDA، با اثر سمی خود که مربوط به تولید رادیکال‌های وابسته به اکسیژن است سبب تخریب جسم سلولی نورون‌های دوپامینرژیکی واقع در سمت تزریق شده در مغز میانی و متعاقب آن تهی شدن جسم مخطط همان سمت از دوپامین می‌شود (۳).

در مطالعه حاضر ژن تیروزین هیدروکسیلاز به عنوان یک مارکر دوپامینرژیک در بررسی مولکولی در بافت استریاتوم سمت صدمه دیده مورد هدف قرار داده شد. همان گونه که مشاهده شد نتایج RT-PCR نشان دهندهٔ عدم بیان ژن TH در گروه تخریب و بیان این ژن در هر سه گروه درمانی بود ولی با بررسی کمی باندها مشخص شد که میزان بیان این ژن در گروه درمانی توأم بیشتر از دو گروه درمانی دیگر می‌باشد.

نتایج به دست آمده از بررسی حاضر در گروه درمانی $L+Q_{10}$ موافق با نتایجی است که Cleren در سال ۲۰۰۷ با بررسی اثرات درمانی کوآنزیم Q_{10} در رتهایی که توسط MPTP پارکینسونی شده بودند به دست آورد و به این نتیجه رسید که کوآنزیم Q_{10} دارای اثرات نوروپروتکتیو بارز در این حیوانات می‌باشد و پیشنهاد کرد که تجویز کوآنزیم Q_{10} می‌تواند اثرات درمانی مفیدی در بیماران پارکینسونی داشته باشد (۱۹).

علاوه براین در سال ۲۰۰۳، Papucci و همکارانش نشان دادند: CoQ_{10} باعث مهار آپوپتوزیس در سلول‌های کراتوسیت در اثر عواملی مثل antimycin A و C2-ceramide که باعث آپوپتوز سلول‌ها با مکانیسمی غیر از ایجاد رادیکال آزاد می‌شوند، نیز می‌گردد. آن‌ها نشان دادند که این فعالیت آنتی آپوپتوتیکی، مستقل از فعالیت آنتی اکسیدانی کوآنزیم Q_{10} می‌باشد. آنها این فعالیت آنتی آپوپتوتیکی را به علت مهار دپلاریزاسیون میتوکندری و جلوگیری از باز شدن کانال‌های PTP نسبت دادند. نتایج تحقیقات آنها نشان داد که کوآنزیم Q_{10} باعث مهار دپلاریزاسیون میتوکندری، آزاد شدن سیتوکروم C و فعالیت caspase ۹ که محرک‌های آپوپتوزیس هستند می‌شود، این سه واقعه با باز شدن کانال‌های PTP که باعث دپلاریزاسیون میتوکندری می‌شوند اتفاق می‌افتد بر همین اساس آنها پیشنهاد کردند که کوآنزیم Q_{10} ممکن است آنالوگ عملکردی پروتئین Bcl-۲ باشد (۲۶).

حضور باند TH در گروه درمانی $L+Q_{10}$ نشان دهندهٔ اثر مثبت این ماده در جلوگیری از نابودی کامل سلول‌های دوپامینرژیک می‌باشد. علاوه بر این نتایج به دست آمده از گروه درمانی L+T توسط نتایج به دست آمده از تحقیقی که توسط Li Y در سال ۲۰۰۲ انجام شده تایید می‌گردد، بطوری که چهار هفته پس از پیوند BMSCs به استریاتوم موش صحرایی بالغ مدل پارکینسون، این سلول‌ها خصوصیات سلول‌های عصبی دوپامینرژیک را پیدا کردند و به آنتی بادی تیروزین هیدروکسیلاز (TH) واکنش مثبت نشان دادند و همچنین در این حیوانات بهبود عملکرد نورولوژیکال مشاهده شد (۲۷).

در بررسی‌های دیگر در زمینه سلول‌های بنیادی مشخص شد، محیطی که سلول‌های بنیادی در آن قرار می‌گیرند می‌تواند تمایز رده خاصی از سلول‌ها را به آنها دیکته کند به طوری که سلول‌ها بنیادی مغز استخوان تحت تأثیر عوامل نوروتروفیک اضافه شده به محیط

Archive of SID
www.SID.ir

کشت خصوصیات سلول‌های عصبی را پیدا کرده و پروتئین‌ها و ژن‌های خاص سلول عصبی از جمله: tau, nerurofilament M, Neu N, β-III-tubulin و synaptophysin را بیان می‌کنند (۲۸).

زائو (Zhao) در سال ۲۰۰۲ نشان داد پس از پیوند BMSCsهای انسان به رت‌هایی که دچار صدمات ایسکمیک مغزی شده بودند، سلول‌ها در محل پیوند زنده باقی مانده، مارکر سلول‌های عصبی را بیان کردند و بهبودی حسی- حرکتی نیز در حیوانات مشاهده گردید (۲۹). علاوه بر این تحقیقات دیگر نشان داده که سلول‌های بنیادی مزانشیمال به عنوان یک کارخانه مولکولی کوچک عمل می‌کند که فاکتورهای رشد و تروفیک مختلفی را ترشح می‌کنند. آن‌ها نشان دادند که سلول‌های بنیادی مزانشیمال فاکتورهایی مثل: VEGF، HGF (hepatocyte growth factor)، NGF (nerve growth factor) و BDNF (brain-derived neurotrophic factor) را بیان می‌کنند، این طیف از فاکتورهای رشد نقش مهمی در بهبود ضایعات مغزی دارند (۳۰). بنابراین با مشاهده وجود باند TH در گروه درمانی L+T چنین به نظر می‌رسد که سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان در محل ضایعه تحت تأثیر محیط اطرافشان، فاکتورهای رشد – از جمله BDNF و NGF – و سیتوکین‌ها را ترشح می‌کنند که با مکانیسم‌های اتوکرین و یا پاراکرین بر خود و سلول‌های میزبان اثر گذاشته و نه تنها میزان بقا و تمایز سلولی را افزایش می‌دهند بلکه منجر به عصب دهی مجدد و برقراری ارتباط عصبی نیز می‌شوند. بنابراین احتمالاً فاکتورهای نوروتروفیک ترشح شده از سلول‌های پیوندی باعث می‌شوند که یا خود این سلول‌ها به سلول‌های عصبی دوپامینرژیک تمایز یابند و جایگزین سلول‌های آسیب دیده شوند و یا سلول‌های اطراف تحت تأثیر این فاکتورها به سلول‌های عصبی تمایز یابند (۳۱).

افزایش بیان ژن TH در گروه درمانی توأم با نتایجی که Agrawal و همکارانش در سال ۲۰۰۴ از درمان توأم موش‌هایی صحرای مدل پارکینسون توسط پیوند سلول‌های مزانسفال جنین به همراه دو ترکیب آنتی اکسیدان به دست آوردند تأیید می‌شود. نتایج آنها نیز افزایش حضور سلول‌های TH مثبت را در گروه درمانی توأم نسبت به گروه‌هایی که از هر کدام از روش‌های درمانی به تنهایی استفاده شده بود نشان داد (۳۲).

ترکیب درمانی عنوان روش جدید می‌باشد که برای درمان بسیاری از بیماری‌ها به کار برده می‌شود. مطالعات مختلفی این روش درمانی را بسیار موثرتر از سایر روش‌های درمانی دانسته‌اند.

در همین راستا Jilei و همکارانش در سال ۲۰۰۴ به درمان سکته مغزی در موش صحرایی با روش ترکیب درمانی بااستفاده همزمان از سلول‌های بنیادی مغز استخوان و NOD (nitric oxide donor) پرداختند. و اثبات کردند که این امر باعث افزایش نوروژنزیس و آنژیوژنزیس در مدل‌های موش صحرایی می‌شود به طوری که در گروه‌هایی که از این دو روش به صورت توأم استفاده شده بود در مقایسه با سایر گروه‌ها تکثیر سلول‌های اندوتلیال به صورت چشمگیری نسبت به سایر گروه‌ها افزایش پیدا کرده بود (۳۳).

به نظر می‌رسد که تجویز CoQ_{10} باعث کاهش قابل توجه در میزان عوامل اکسیدان گردیده و تا حدی از نابود شدن سلول‌های مربوط به بخش متراکم جسم سیاه و استریاتوم میزبان جلوگیری به عمل آورده علاوه بر این با خاصیت ضد آپوپتوزیسی که دارد باعث افزایش عمر و بقای سلول‌های BMSC در بافت میزبان شده و بنابراین همین باعث شده که سلول‌ها زمان کافی جهت ترشح فاکتورهای نوروتروفیک را داشته باشند. بنابراین مجموع اثرات درمانی این دو روش باعث پاسخ درمانی بهتر در گروه درمانی توأم نسبت به دو گروه درمانی دیگر شده است. در پایان پیشنهاد می‌گردد که استفاده توأم از روش درمان جایگزینی سلول‌های دوپامینرژیک و روش درمان دارویی با آنتی اکسیدان‌ها می‌تواند درمان موثرتری در بیماری پارکینسون در مقایسه با استفاده از هر یک از این روش‌ها به تنهایی باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از تمامی همکاران محترم مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، آزمایشگاه کشت سلول گروه آناتومی و آزمایشگاه گروه ژنتیک و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی تهران که ما را در این تحقیق یاری نمودند کمال تشکر را داریم.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1- Albin RL, Young AB, Penney JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. Trends Neurosci. 1989;12 (10): 366-75.
2- Allam MF, Del Castillo AS, Navajas RF. Parkinson's disease risk factors: genetic, environmental, or both? Neurol Res. 2005;27 (2): 206-8.
3- Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. Neuron. 2003;39 (6): 889-909.
4- Stoof JC, Vermeulen RJ, van Royen EA, Derukarch B, Voorn P, Wolters EC, and genoerewegen HJ, Dopaminergic systems and parkinson's disease: some latest development in pathogenic, diagnostics and pharmacotherapeutic investigations, Neurosci.res 1996; 18: 133- 141.
5- Joseph J, Eduardo T. Parkinson's disease and movement disorders, fourth edition. Linppicott Williams&Wlikins. 2002;116-663.
6- Gorell JM, Peterson EL, Rybicki BA, Johnson CC. Multiple risk factors for Parkinson›s disease. J Neurol Sci. 2004;217 (2): 169-74.
7- Berger MM. Can oxidative damage be treated nutritionally? Clin Nutr. 2005;24 (2): 172-83.
8- Kordower JH, Goetz CG. The first miracle in neurodegenerative disease: the discovery of oral levodopa. Brain Res Bull. 1999;50 (5-6): 377-8.
9- Ye M, Wang XJ, Zhang YH, Lu GQ, Liang L, Xu JY, Sheng-Di Chen. Therapeutic effects of differentiated bone marrow stromal cell transplantation on rat models of Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord. 2007;13 (1): 44-9. Epub 2006 Sep 26.
10- Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats--similarities to astrocyte grafts. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95 (7): 3908-13.
11- Tseng PY, Chen CJ, Sheu CC, Yu CW, Huang YS. Spontaneous differentiation of adult rat marrow stromal cells in a long-term culture. J Vet Med Sci. 2007;69 (2): 95-102.
12- Suon S, Yang M, Iacovitti L. Adult human bone marrow stromal spheres express neuronal traits in vitro and in a rat model of Parkinson's disease. Brain Res. 2006;1106 (1): 46-51.
13- Rombouts WJ, Ploemacher RE. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. Leukemia. 2003;17 (1): 160-70.
14- Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. Stem Cells. 2003;21 (1): 105-10.
15- Mezey E, Key S, Vogelsang G, Szalayova I, Lange GD, Crain B. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100 (3): 1364-9.
16- Wang Y, Chen S, Yang D, Le WD. Stem cell transplantation: a promising therapy for Parkinson's disease. J Neuroimmune Pharmacol. 2007;2 (3): 243-50.
17- Liu J, Huang HY. How to improve the survival of the fetal ventral mesencephalic cell transplanted in Parkinson›s disease? Neurosci Bull. 2007;23 (6): 377-82.
18- Shults CW. Therapeutic role of coenzyme Q (10) in Parkinson's disease. Pharmacol Ther. 2005;107 (1): 120-30.
19- Cleren C, Yang L, Lorenzo B, Calingasan NY, Schomer A, Sireci A, Wille EJ, Beal MF. Therapeutic effects of coenzyme Q10 (CoQ10) and reduced CoQ10 in the MPTP model of Parkinsonism. J Neurochem. 2008;104 (6): 1613-21.
20- Kaikkonen J, Nyyssönen K, Tomasi A, Iannone A, Tuomainen TP, Porkkala-Sarataho E, Salonen JT. Antioxidative efficacy of parallel and combined supplementation with coenzyme Q10 and d-alpha-tocopherol in mildly hypercholesterolemic subjects: a randomized placebo-controlled clinical study. Free Radic Res. 2000;33 (3): 329-40.
21- Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 2nd Edition Academic Press.San Diego, CA, 1986.
22- Mehdi M, Mohammad T J, Maliheh N, Roya A. The beneficial effect of the flavonoid quercetin on behavioral changes in hemi-parkinsonian rats. Iranian Journal of Neuroscience;2009: 1 (2).
23- Dezawa M, Takahashi I, Esaki M, Takano M, Sawada H. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. Eur J Neurosci. 2001;14 (11): 1771-6.
24- Kidd PM. Parkinson's disease as multifactorial oxidative neurodegeneration: implication for integrative management. Altern Med Rev. 2000;5 (6).
25- Ronald D, Arjan B, and Jos P. Modeling Parkinson's Disease in Rats: An Evaluation of 6-OHDA Lesions of the Nigrostriatal Pathway. Experimental Neurology. 2002; 175: 303–317.
26- Papucci L, Schiavone N, Witort E, Donnini M, Lapucci A, Tempestini A, Formigli L, Zecchi-Orlandini S, Orlandini G, Carella G, Brancato R, Capaccioli S. Coenzyme q10 prevents apoptosis by inhibiting mitochondrial depolarization independently of its free radical scavenging property. J Biol Chem. 2003;278 (30): 28220-8.
27- Li Y, Chen J, Wang L, Zhang L, Intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells in a 1-methul-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine. Neuroscience Letters, 2002;315: 67-70.
28- Hidenori S, Toshihiko T, Hiroshi T, Hideo K, Zhenglin L, Keiichi M, Toshikazn G, Shinya K. Neurospheres induced from bone marrow stromal cells are multipotent for differentiation

Archive of SID

www.SID.ir

into neuron, astrocyte, and oligodendrocyte phenotypes. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004: 322;918-922.

29- Zhao LR, Duan WM, Reyes M. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. Exp Neurol.2002;174: 11-20.

30- Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, Widenfalk J, El Manira A, Prockop, DJ, Olson L. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002 ; 99 : 2199-204.

31- Rocio G, Jore A. Bone marrow stromal cells produce nerve growth factor and glial cell line-derived neurothrophic factors. BBRC, 2004: 316 (3); 753-754.

32- Agrawal AK, Chaturvedi RK, Shukla S, Seth K, Chauhan S, Ahmad A, Seth PK. Restorative potential of dopaminergic grafts in presence of antioxidants in rat model of Parkinson's disease. J Chem Neuroanat. 2004;28 (4): 253-64.

33- Jieli Chena, Yi Lia, Ruilan Zhanga, Mark Katakowskia, Subhash C. Gautamb, Yongxian Xub, Mei Luc, Zhenggang Z, Michael C. Combination therapy of stroke in rats with a nitric oxide donor and human bone marrow stromal cells enhances angiogenesis and neurogenesis. Brain Research.2004;21– 28.

Archive of SID

www.SID.ir

Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells in Dopaminergic Cells in Rat Model of Parkinson's Disease

Nezhadi. A; MSc[1], Ghazi. F; PhD[2], Bakhtiari. M; PhD[3], Ataiy. Z; MSc[4], *Mehdizadeh. M; PhD[5]

Received: 11 Aug 2010 Accepted: 16 Nov 2010

Abstract

Objective: Previous studies have reported that the number of dopaminergic neurons surviving in the grafts is critical for functional recovery in Parkinson disease. Free radical mediated damage has been reported to contribute significantly towards low survival of grafted dopaminergic neurons, post transplantation. In the present study, an attempt has been to explore the neuroprotective potential of the combination of coenzyme Q10 and transplantation of mesenchaimal stem cells in rat model of parkinson's disease (PD).

Materials and Methods: In this experimental study of male Wistar rats that had been divided into six groups were used: Groups; control, sham, lesion, treatment with oral administration of CoQ10, treatment with graft BMSC and combined treatment with graft BMSC and oral administration of CoQ10. Oral administration of CoQ10 was started one week before the model creation procedure and continued during the whole treatment period. The laboratory model of Parkinson disease in rats was performed by injection 6-OHDA in substantia nigra pars compacta. the end of second month of treatment molecular Studies were performed.

Results: Molecular assessment Showed that TH gene expression levels in the combined therapy group was significantly different with other experimental groups ($p<0.001$).

Conclusion: The combined use of two neuroprotective treatment and replacement therapy can have a more effective role in the treatment of Parkinson's disease in comparison to single treatment protocols.

Keywords: Coenzyme Q10, Stromal cells derived from Bone marrow, Apoptosis, Combine therapy

Archive of SID

1- Researcher, Aja University of Medical Sciences, Medical Faculty, Dept. of Anatomy, Tehran, Iran.
2- Associate Professor, Tehran University of Medical Sciences, Medical Faculty, Dept. of Genetic and Biology, Tehran, Iran.
3- Assistant Professor, Tehran University of Medical Sciences, Medical Faculty, Dept. of Anatomy, Tehran, Iran.
4- Instructor, Tehran University of Medical Sciences, Medical Faculty, Dept. of Genetic and Biology, Tehran, Iran.
5- (*Corresponding Author) Professor, Tehran University of Medical Sciences, Medical Faculty, Dept. of Anatomy, Cellular and Molecular Research Center, Tehran, Iran. Tel: 88028589 E-mail: maranaoo@iums.ac.ir

www.SID.ir