

Therapeutic Effect of Bone Marrow Stromal Cells & Coenzyme Q10 on Rat Models of Parkinson's Disease

***Nezhadi A., M.Sc., Ghazi F., Ph.D., Rassoli H., Ph.D., Bakhtiari M., Ph.D.,
Ataei Z., M.Sc., Marzban M., M.Sc., Mehdizadeh M., Ph.D.****

** P.O.Box: 15875-1454, Anatomy Department, Cellular and Molecular Research Center,
Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

Abstract

Purpose: The assessment of the ability of combined treatment of bone marrow stromal cells graft (BMSCs) and oral administration of Coenzyme (CoQ10) in rat model of Parkinson disease as a good substitute for common current Parkinson treatments, and the comparison of this combined treatment method with alone application of these treatments

Materials and Methods: In this experimental study of male Wistar rats were used. They were divided into six groups: control, sham, lesion, treatment groups with oral administration of CoQ10, treatment with graft BMSC and combined treatment with graft BMSC and oral administration of CoQ10. Oral administration of CoQ10 with 200 mg/kg/daily dose started a week before the model creation procedure and continued throughout the whole treatment period. The laboratory model of Parkinson disease in rats was performed by injecting 2.5 microlitre saline solution 0.9 % containing 8 micrograms 6-hydroxy dopamine (6-OHDA) and 0.2 % ascorbic acid in substantia nigra pars compacta. Also in sham group the same volume solution saline-ascorbic was injected. BMS Cells were labeled by 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) before transplantation. Behavioral assessment before creating the model, two weeks after creating the model and eight weeks after cell transplantation was performed. At the end of second month of treatment, Immunohistochemistry and histology Studies were performed.

Results: Behavioral assessment of two groups of alone treatments indicated the equal recovery in comparison with lesion group ($p < 0.01$) while combined treatment of BMSC and Co Q10 showed a considerable recovery compared with lesion group ($p < 0.001$). In addition according to histological studies, no sign of gliosis and graft rejection was seen. Immunohistochemistry studies of BrdU indicate that the cells are alive after two month of application in host tissue. Cell count assessment showed that the number of neural cells in combined treatment of BMSC and Co Q10 was significant difference with others 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 of alone treatment protocols.

Key words: Coenzyme Q10, Stromal cells derived from Bone marrow, Neuroprotective, Parkinson's disease

بررسی اثر درمانی سلول‌های استرومال مغز استخوان و کوآنزیم Q10 در

موش‌های صحرایی مدل تجربی پارکینسون

اکرم نژادی M.Sc.*، فریده قاضی Ph.D.**، هما رسولی Ph.D.***، مهرداد بختیاری Ph.D.***، زهره عطایی M.Sc.**،

محسن مرزبان M.Sc.***، مهدی مهدیزاده Ph.D.***

* گروه آناتومی دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران، ایران

** گروه ژنتیک و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

*** گروه آناتومی دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

**** مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی و گروه آناتومی دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

تاریخ وصول: مردادماه ۸۸، تاریخ پذیرش: آبان ماه ۸۸

چکیده

هدف: ارزیابی توانایی درمان همزمان پیوند سلول‌های استرومال مغز استخوان (Bone marrow stromal cells) و تجویز خوراکی کوآنزیم Q10 (CoQ10) در موش‌های صحرایی مدل پارکینسون به‌عنوان جایگزینی مناسب برای درمان‌های رایج کنونی و مقایسه توانایی این نوع درمان با زمانی که از هر کدام از این درمان‌ها به تنهایی استفاده می‌شوند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار که به شش گروه زیر تقسیم شده بودند، استفاده شد: گروه کنترل، شاهد، تخریب، درمان با تجویز خوراکی CoQ10، درمان با پیوند BMSCs و درمان همزمان پیوند BMSCs به‌همراه تجویز خوراکی CoQ10. تجویز خوراکی CoQ10 با دوز 200 mg/kg روزانه از یک هفته قبل از ایجاد مدل شروع شد و در طول مدت درمان نیز ادامه داشت. ایجاد مدل آزمایشگاهی بیماری پارکینسون در موش‌های صحرایی گروه‌های درمانی و گروه تخریب با تزریق 2/5 میکرولیتر محلول سالین 0/9 درصد حاوی 8 میکروگرم 6-هیدروکسی دوپامین و 0/2 درصد اسید اسکوربیک به بخش متراکم جسم سیاه با روش استریوتاکسی صورت گرفت. سلول‌های استرومال مغز استخوان قبل از پیوند، با برومودیوکسی یوریدین (BrdU) نشاندار شدند. ارزیابی رفتاری قبل و دو هفته بعد از ایجاد مدل، و هشت هفته بعد از پیوند سلولی صورت گرفت. همچنین در انتهای دوره درمانی دو ماهه، مطالعه بافتی و ایمونوهیستوشیمی به عمل آمد.

یافته‌ها: در بخش ارزیابی رفتاری پایان دوره درمان، دو گروه درمانی تجویز با CoQ10 و گروه درمانی پیوند با BMSCs در مقایسه با گروه تخریب از درصد بهبودی برابری برخوردار بودند ($p < 0/01$). همچنین در این ارزیابی گروه درمانی توأم CoQ10 و BMSCs بهبودی بیشتری در علائم رفتاری نسبت به دو گروه درمانی دیگر نشان داد ($p < 0/001$). علاوه بر این در مطالعات بافتی انجام شده در گروه‌های پیوندی نشانه‌ای از رد پیوند و ایجاد بافت گلیوز مشاهده نشد. مطالعات ایمونوهیستوشیمی بر ضد BrdU نشان‌دهنده حیات در سلول‌های پیوندی بعد از گذشت دو ماه از پیوند است. در بخش شمارش سلولی، تعداد سلول‌های عصبی شمارش شده در ناحیه استریاتوم در گروه درمانی توأم CoQ10 و BMSCs به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه‌های آزمایشی دیگر بود ($p < 0/001$).

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 شود.

کلید واژه‌ها: کوآنزیم Q10، سلول استرومال مشتق از مغز استخوان، نوروپروتکتیو، بیماری پارکینسون

آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی و گروه آناتومی، صندوق پستی ۱۴۵۴-۱۵۸۷۵
E-mail: maranaoo@iums.ac.ir

مقدمه

بیماری پارکینسون از جمله بیماری‌های دژنراتیو سیستم اعصاب مرکزی است که بیش از ۲ درصد جمعیت بالای ۶۵ سال را در بر می‌گیرد [۱]. این بیماری از دیدگاه آسیب‌شناسی با از بین رفتن نورون‌های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه (SNC: Substantia nigra pars compacta) و در نهایت فقدان دوپامین در پایانه‌های اصلی این نورون‌ها در جسم مخطط ایجاد می‌شود [۱]. لرزش (Tremor)، سفتی حرکات (Rigidity) و کندی حرکات (Hypokinesia) از بارزترین نشانه‌های این بیماری است، علت این دژنراسیون انتخابی نورون‌های دوپامینرژیک در بیماری پارکینسون به‌طور کامل شناخته شده نیست [۲]. اما از نظر فیزیوپاتولوژی عواملی مانند استرس اکسیداتیو، عملکرد نادرست میتوکندری و سمیت‌های خارج سلولی به‌عنوان علت‌های پیشنهادی ارایه شده‌است [۲و۳]. علاوه بر دژنراسیون نورونی، ویژگی برجسته و ثانویه این بیماری، تشکیل انکلوژیون‌های رشته‌ای داخل سلولی در نورون‌های دوپامینرژیک است که اجسام لوئی (Lowy body) نامیده می‌شود، در واقع این اجسام تجمعات پروتئینی غیرطبیعی از جمله پروتئین آلفا-سینکولین است که در نورون‌های دوپامینرژیک دیده می‌شود [۲].

رادیکال‌های آزاد اکسیژن به‌طور مداوم در تمامی سلول‌های بدن و از جمله نورون‌های دوپامینرژیک مغز میانی بر اثر متابولیسم دوپامین توسط آنزیم منوآمین اکسیداز B یا اتواکسیداسیون دوپامین تولید می‌شود [۳و۴]. چنانچه رادیکال‌های آزاد بیش از حد تولید شود یا آنتی‌اکسیدان‌های اندوژنیک کاهش پیدا کند، آسیب نورونی ایجاد خواهد شد. بنابراین، تعادل مناسب بین رادیکال‌های آزاد و آنتی‌اکسیدان‌ها برای بقای نورون‌ها ضروری است [۴و۵].

درمان متداول دارویی بیماری پارکینسون تا کنون به‌صورت درمان علامتی (Symptomatic treatment) با تجویز پیش‌سازهای دوپامین، آگونیست‌ها و سایر آنالوگ‌های دوپامین انجام می‌شود.

رایج‌ترین روش درمانی این بیماری استفاده از داروهای L-Dopa و Carbidopa است. این دو ماده سبب افزایش سنتز و رهاسازی دوپامین می‌شوند و در رفع کم‌حرکی و سفتی حرکات، به ویژه در مراحل اولیه بیماری مؤثر هستند. اما با پیشرفت بیماری، ادامه این درمان در اکثر بیماران ضمن نیاز به دوز بالاتر درمانی منجر به بروز علائمی نظیر: نوسانات حرکتی (Motor fluctuation)، اختلال حرکتی (Dyskinesia) و پسیکوزیس (Psychosis) می‌شود، در نتیجه کارایی درمان کاهش می‌یابد [۶]. 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 [۶و۷]. به‌همین منظور محققین برای درمان قطعی این بیماری درصدد شناسایی کاندیدهای بالقوه برای جایگزینی نورون‌های از بین رفته در این بیماری برآمدند و هم‌اکنون بسیاری از مطالعات در حال انجام روی بیماری پارکینسون بر این استراتژی درمانی متمرکز شده است. از آنجایی که سیستم عصبی مرکزی دارای ظرفیت بسیار محدودی برای رژنراسیون نورون‌های صدمه دیده دارا است و از آنجایی که سلول‌های بنیادی، سلول‌های اولیه غیر تمایز یافته‌ای است که دارای خاصیت خودتکثیری (self-renewal) بوده و قابلیت تمایز و تبدیل شدن به انواع دیگر سلول‌های بدن را دارد، بنابراین پیوند سلول‌های بنیادی به‌عنوان یکی از استراتژی‌های درمانی جدید برای درمان بیماری‌های نورودژنراتیو از جمله بیماری پارکینسون در حال بررسی است [۲، ۷، ۸].

اولین سلول بنیادی شناخته شده، سلول بنیادی جنینی است که پتانسیل فراوانی برای تمایز به انواع مختلف سلول‌ها را دارا است. ولی از آنجایی که به دست آوردن این نوع سلول‌های بنیادی مشکل بوده و دارای محدودیت‌های اخلاقی نیز می‌باشد و علاوه بر این خطر ایجاد تومور در محل پیوند نیز وجود دارد؛ بنابراین

باعث افزایش خطر رشد غیر قابل کنترل سلول می‌شود [۷]، به همین علت در این تحقیق از پیوند BMSCs تمایز نیافته به بافت استریاتوم رت‌های مدل پارکینسون استفاده شد.

اگر چه مطالعات پره کلینیکال پیوند سلولی، نتایج امید بخشی را نشان داده است، اما سلول‌های پیوند شده میزان بقای کمی پس از پیوند دارد و پس از مدتی دچار آپوپتوزیس می‌شود. از عوامل عمر کم و آپوپتوزیس سلول‌های پیوند شده می‌توان به عوامل اکسیداتیو اشاره نمود [۱۵ و ۱۶]. به همین دلیل در این پروژه علاوه بر استفاده از پیوند BMSCs تمایز نیافته به رت‌های مدل پارکینسون از تجویز خوراکی Coenzyme Q10 (CoQ10) به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی و یک عامل آنتی‌آپوپتوزیس برای از بین بردن رادیکال‌های آزاد و جلوگیری از آپوپتوزیس سلول‌های بنیادی پیوند شده و افزایش عمر این سلول‌ها و کمک به ایجاد فرصت کافی به‌منظور تمایز آنها استفاده می‌شود.

CoQ10 یک مولکول محلول در چربی است که هم در غشای داخلی میتوکندری و هم در غشاهای لیپیدی بسیاری از انواع سلول‌ها وجود دارد. CoQ10 یک کوفاکتور ضروری در زنجیره انتقال الکترون میتوکندری است. این مولکول، الکترون‌ها را از کمپلکس I و II دریافت و به کمپلکس III تحویل می‌دهد و در واقع شکل احیا شده یوبی‌کینون است که به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان چربی دوست عمل می‌کند، بنابراین از سلول در برابر رادیکال‌های آزاد و ROS محافظت کرده و سطح آنتی‌اکسیدان‌هایی مثل ویتامین E و اسید اسکوربیک را افزایش می‌دهد [۱۷-۱۵].

هدف از این تحقیق، بررسی تغییرات رفتاری و ساختار بافتی و بقای سلول‌های پیوند شده در رت‌های مدل تجربی پارکینسون که تحت درمان توأم تجویز خوراکی CoQ10 و پیوند سلول‌های BMSC قرار گرفته‌اند، است.

مواد و روش‌ها

حیوانات

در این مطالعه تجربی از ۵۷ سر موش صحرایی نر نژاد

استفاده از این نوع سلول را با مشکل روبرو کرده است [۷ و ۸]. به علت مشکلات ذکر شده فوق در مورد استفاده از سلول‌های جنینی، منابع سلولی اتولوگوس مورد توجه بیشتری قرار گرفت. که از میان آن‌ها سلول‌های بنیادی استرومال مشتق از مغز استخوان (BMSCs Bone marrow stromal cells) به‌علت سهولت در دستیابی به آن‌ها و نداشتن مسایل اخلاقی و ایمنولوژیک کاندید خوبی برای پیوند به شمار می‌روند [۹-۷]. سلول‌های BMSC یکی از انواع سلول‌های بنیادی غیر خون‌ساز موجود در مغز استخوان است. این سلول‌ها به‌طور طبیعی از مشتقات لایه زایای مزانشیمی است و توانایی تمایز به انواع دیگر سلول‌های این لایه را دارد [۱۰ و ۱۱]. همچنین مطالعات اخیر نشان داده است که این سلول‌ها در حالت تمایز نیافته، ژن‌های هر سه لایه زایای جنینی را بیان می‌کند. به همین علت، این سلول‌ها به‌طور قابل ملاحظه‌ای توانایی ایجاد پلاستیسیته را دارد، یعنی می‌تواند تحت شرایط خاص مرز لایه اصلی خود را شکسته و به سلول‌هایی با منشأ لایه دیگر تبدیل شود؛ این خاصیت را تغییر تمایزی (Trans-differentiation) می‌گویند [۱۳-۱۰].

برای استفاده از سلول‌های بنیادی به‌منظور پیوند در بیماران پارکینسونی، دو راه وجود دارد؛ اولین راه آن است که سلول‌ها ابتدا در محیط *in vitro* به نورون‌های دوپامینرژیک TH مثبت تبدیل شود و سپس به بافت عصبی بیمار پیوند شود. دومین راه برای استفاده از سلول‌های بنیادی یا پیش‌ساز برای پیوند به بیماران پارکینسونی آن است که سلول‌های تمایز نیافته یا پیش‌ساز عصبی متعاقب پیوند به جسم مخطط به نورون‌های دوپامینرژیک تبدیل شود و به عبارت دیگر، پس از پیوند، تمایز در آنها صورت می‌پذیرد. در حال حاضر مدارکی که برتری هر کدام از این روش‌ها را به دیگری ثابت کند، وجود ندارد [۱۴].

از آنجایی که آزمایش‌های قبلی ثابت کرده است که محیط احاطه کننده یک سلول بنیادی می‌تواند تمایز نهایی آن را دیکته کند [۱۲]؛ همچنین احتمال تغییر قدرت توانایی در بیان ژن و ژنوم سلول در پاساژهای طولانی مدت افزایش می‌یابد و

شکمی از سطح سخت‌شامه براساس اطلس پاکسینوس تعیین شد. همچنین میله دندانی استریوتاکس ۳/۳ میلی متر زیر سطح افق تنظیم شد [۱۸].

در حیوانات گروه L، ۲/۵ میکرولیتر محلول سالین ۰/۹ درصد حاوی ۸ میکروگرم 6-OHDA و ۰/۲ درصد اسیداسکوربیک به داخل SNC تزریق شد. به حیوانات گروه Sh نیز به همان حجم و غلظت از محلول سالین - اسکوربات تزریق شد. در گروه درمانی L+Q10، علاوه بر تزریق 6-OHDA به داخل SNC، CoQ10 با دوز ۲۰۰mg/kg/daily یک هفته قبل از تزریق نوروتوکسین به صورت گاوژ شروع شد و این ماده آنتی‌اکسیدان به مدت دو ماه بعد نیز به صورت روزانه ادامه یافت. در گروه درمانی L+T، دو هفته بعد از تزریق نوروتوکسین در آنها از پیوند BMSC تمایز نیافته به استریاتوم استفاده شد و در گروه درمانی L+T+Q10، یک هفته قبل از ایجاد مدل، به آنها CoQ10 خورانده و بعد از آن نیز تجویز روزانه آن ادامه یافت. علاوه بر این در این گروه از پیوند BMSC تمایز نیافته به استریاتوم نیز استفاده شد.

روش کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز

استخوان (BMSCs)

سلول‌های BMSC از مغز استخوان‌های فمور و تیبیای موش صحرایی بالغ استخراج شد. بدین منظور پس از خارج کردن استخوان‌ها از بدن حیوان و جدا کردن عضلات، دو انتهای استخوان قطع شد و توسط سرنگ متصل به سوزن شماره ۲۱ که حاوی محیط کشت (MEM MEM Alpha Medium) کامل شده با سرم (FBS Fetal Bovine Serum) (۱۰٪)، پنی‌سیلین (۱۰۰ IU/ML) و استپتومایسین (۱۰۰ mg/ml) بود، عمل تخلیه (Flash out) مغز استخوان به داخل فلاسک انجام شد. فلاسک حاوی سلول داخل انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و میزان ۵ درصد CO₂ نگهداری شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت، محیط کشت سلولی با محیط تازه تعویض شد. سلول‌های استرومایی به کف فلاسک

ویستار با وزن ۳۰۰-۲۵۰ گرم استفاده شد. موش‌ها تحت شرایط استاندارد با دوره روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته و دمای ۳ ± ۲۱ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. حیوانات به آب آشامیدنی و غذای کافی دسترسی داشتند و برای سازگاری با محیط، حداقل ۱۰ روز قبل از شروع مطالعه به حیوانخانه منتقل شدند.

گروه‌های مورد آزمایش

به منظور اطمینان از سالم بودن رت‌های تحت آزمایش، از تزریق داخل صفاقی آپومرفین حل شده در نرمال سالین ۰/۹ درصد (Sigma) به میزان ۲/۵ میلی‌گرم بر گیلوگرم استفاده شد و موش‌هایی با چرخش کمتر از ۳۰ دور کامل ۳۶۰ درجه در ساعت برای آزمایش انتخاب شدند. سپس حیوانات به طور تصادفی به شش گروه زیر تقسیم شدند:

۱- گروه کنترل (C)، به تعداد ۷ سر رت، ۲-گروه شاهد (Sh)، به تعداد ۱۰ سر رت، ۳-گروه تخریب (L)، به تعداد ۱۰ سر رت، ۴-گروه تخریب پیش درمان شده با CoQ10 (L+Q10)، به تعداد ۱۰ سر رت، ۵-گروه تخریب درمان شده با روش جایگزینی توسط پیوند سلول‌های BMSC (L+T)، به تعداد ۱۰ سر رت، ۶-گروه تخریبی که هر دو روش یعنی پیش درمان با تجویز CoQ10 و درمان با پیوند سلول‌های BMSC در آنها صورت پذیرفت (L+T+Q10)، به تعداد ۱۰ سر رت.

برای ایجاد مدل تجربی بیماری پارکینسون، ابتدا حیوانات با تزریق داخل صفاقی مخلوطی از کتامین (۶۰mg/kg) و گزیزیلازین (۱۰mg/kg) بیهوش شده و سپس تزریق نوروتوکسین ۶-هیدروکسی دوپامین (Hydroxy-Dopamine) (6-OHDA) (Sigma) در بخش متراکم جسم سیاه (SNC) توسط سرنگ هم‌میلتون ۵ میکرولیتری و از طریق دستگاه استریوتاکس (stoelting, USA) انجام شد. مختصات محل تزریق نسبت به خط بین گوشه (interauricular) به صورت ۳/۷ میلی‌متر قدامی - خلفی، ۲/۲ میلی‌متر جانبی، ۷/۷ میلی‌متر

پارافینی و برش‌های ۷ میکرونی از ناحیه پیوند تهیه شد. برش‌ها به صورت یک در میان برای رنگ‌آمیزی بافتی کریزل و یوله و بررسی‌های ایمونوهیستوشیمی استفاده شد. سپس توسط میکروسکوپ OLYMPUS, AX70 از لام‌ها با بزرگنمایی ۲۰ برابر عکس برداری شد و توسط نرم‌افزار OLYSIA bio report شمارش سلولی انجام شد. در شمارش سلولی برش‌های رنگ شده با کریزل و یوله، بخش مرکزی استریاتوم در سطحی معادل ۰/۶ میلی‌متر مربع (به طوری که منطقه پیوند در مرکز این ناحیه قرار می‌گرفت) در برش‌های کرونال انتخاب شد و تعداد نورون‌ها در این منطقه مشخص شده، شمارش شد. مقاطع انتخاب شده در حد واسط ۸/۷۴ و ۹/۴۸ نسبت به برگما با توجه به اطلس پاکسینوس انتخاب شد.

تشخیص ایمونوهیستوشیمی سلول‌های نشاندار شده با Brdu بعد از پیوند به مغز برای انجام بررسی ایمونوهیستوشیمی، برش‌های تهیه شده بعد از پارافین زدایی و انجام روند آبدهی، با PBS شسته شد. سپس برای دناتوره کردن DNA سلول‌ها، برش‌های مغزی در محلول فوراماید ۵۰ درصد تهیه شده در بافر ۲X SSC Standard Sodium Citrate در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت قرار داده شد، بافر SSC از ترکیب سترات سدیم ۰/۳ مولار و کلرید سدیم ۰/۳ مولار تشکیل می‌شود.

بعد از آن برش‌ها را به مدت ۳۰ دقیقه در محلول اسید کلریدریک ۲ نرمال در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد و سپس برای خشی نمودن اسید کلریدریک در بافر بورات ۰/۱ مولار با PH=۸/۵ به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. در مرحله بعد شستشو با PBS انجام شد و برش‌ها در بافر بلاک کننده (سرم بز ۱۰٪ + ۰/۳ درصد تریتون ۱۰۰-X در PBS) به مدت نیم ساعت در دمای اتاق و در محفظه مرطوب انکوبه شد. سپس برش‌ها در معرض آنتی‌بادی اولیه ضد Brdu (۱:۱۰۰) به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از گذشت این مدت، برش‌ها در PBS شسته شد و بعد در معرض آنتی‌بادی ثانویه کوئزوگه به FITC به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق و در محفظه

چسبیده باقی مانده و سایر سلول‌های خونی خارج شد. زمانی که سلول‌ها در اثر تکثیر ۷۰ تا ۸۰ درصد کف فلاسک را پر کرد، پاساژ انجام شد؛ به این صورت که با استفاده از محلول تریپسین (۰/۲۵ درصد) EDTA (۰/۰۴ درصد) سلول‌ها از کف فلاسک جدا و داخل دو فلاسک تقسیم شد. این عمل تا چهار پاساژ ادامه یافت.

آماده سازی سلول‌ها برای پیوند

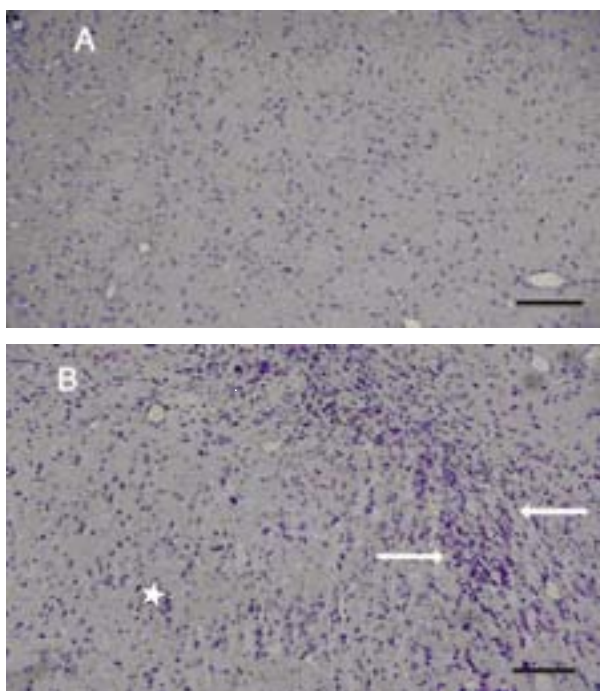
برای نشان‌دار کردن سلول‌های BMSC، ۷۲ ساعت قبل از انجام پیوند، پودر Brdu 5-Bromo-2'-deoxyuridine (Sigma) با غلظت ۵ میکرومول به محیط کشت سلول‌ها اضافه شد. پس از گذشت این زمان، سلول‌ها همانند زمان پاساژ توسط EDTA/Trypsin از کف فلاسک جدا شد و بعد از سانتریفوژ و دور ریختن محیط بالای رسوب سلولی، این رسوب سلولی توسط PBS phosphate buffer saline به صورت سوسپانسیون در آمد، به طوری که در هر ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون حدود 2×10^5 سلول شناور بود. بعد از این مرحله ۵ میکرولیتر از این سوسپانسیون توسط سرنگ همپلتون ۵ میکرولیتری و به کمک دستگاه استریوتاگس همانند روشی که نوروئوکسین تزریق شده بود، به استریاتوم سمت ضایعه دیده حیوانات گروه‌های پیوندی با مختصات: ۴/۵ میلی‌متر شکمی از سطح سخت شامه، ۳/۳ میلی‌متر جانبی از خط وسط و ۹/۲ میلی‌متر قدامی - خلفی نسبت به خط بین گوشه تزریق شد [۱۹]. این پیوند دو هفته بعد از ایجاد مدل پارکینسون و روز بعد از انجام آزمون رفتاری نوبت دوم صورت گرفت.

روش تثبیت و آماده‌سازی ناحیه پیوند برای انجام ارزیابی‌های بافتی و روش شمارش سلولی ۲ ماه بعد از انجام عمل پیوند سلولی، حیوانات تحت بیهوشی عمیق قرار گرفتند و به روش پرفیوژن از طریق قلب توسط محلول پارافرمالدئید ۴ درصد بافر شده تثبیت شدند. سپس مغز رت‌ها به سرعت از حجمه خارج شد و برای ثبوت ثانویه به مدت ۲۴ ساعت در همان محلول تثبیت کننده قرار گرفتند. در نهایت بلوک‌های

یافته‌ها

ارزیابی بافتی و ایمونوهیستوشیمی

در رنگ‌آمیزی کریزل ویوله که مختص به بافت عصبی است، سلول‌های پیوند شده در ناحیه‌ای واقع شده‌است که نسبت به سلول‌های میزبان یا سلول‌های جسم مخطط در اطراف، از تراکم سلولی بالایی برخوردارند. همچنین در ناحیه پیوند نشانه‌ای از تشکیل بافت گلیوزی واضح و مشخص که سلول‌های پیوند شده را از بافت میزبان جدا کند، دیده نشد و به نظر می‌رسد که سلول‌های پیوند شده با بافت میزبان سازگاری یافته‌اند (شکل ۱).



شکل ۱: تصویر A نشان‌دهنده بافت استریاتوم طبیعی که پیوندی در آن صورت نگرفته است، در آن تراکم سلولی در یک منطقه وجود ندارد. تصویر B نشان‌دهنده بافت استریاتومی است که در آن پیوند سلولی صورت گرفته است، در رنگ‌آمیزی کریزل ویوله سلول‌های پیوند شده یک ناحیه با تراکم سلولی بالا را تشکیل می‌دهند. پیکان به مرز بین سلول‌های پیوند شده و بافت میزبان (ستاره) اشاره دارد. در مرز بین سلول‌های پیوند شده و بافت میزبان (ستاره) هیچ‌گونه نشانه‌ای از بافت اسکار دیده نمی‌شود و به نظر می‌رسد که سلول‌های پیوند یافته با بافت میزبان سازگاری پیدا کرده‌اند (مختصات هر دو تصویر بر اساس اطلس پاکسینوس یکی است). رنگ‌آمیزی: کریزل ویوله (بار: ۵۰۰ میکرومتر).

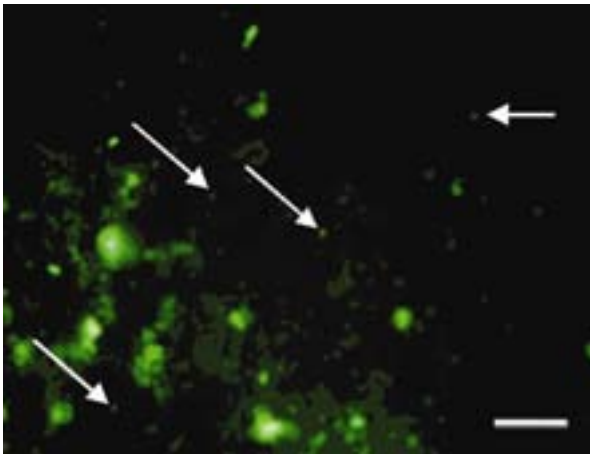
تاریک و مرطوب قرار داده شد. مجدداً برش‌ها توسط PBS شسته شد و در نهایت پس از ماندن با بافر گلیسرول، لام‌ها در تاریکی و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای بررسی برش‌ها از میکروسکوپ فلوروسنت استفاده شد.

روش انجام آزمون رفتاری

بررسی رفتاری موش‌ها با تزریق داخل صفاقی آپومورفین هیدروکلراید (sigma) با غلظت ۲/۵ mg/kg، قبل و دو هفته بعد از تزریق نوروتوکسین (روز قبل از انجام پیوند سلولی) و همچنین ۸ هفته بعد از پیوند سلول‌ها انجام شد. برای اندازه‌گیری تعداد دفعات چرخش از یک روش استاندارد استفاده شد [۲۰]، به این ترتیب که موش‌ها ۱۰ دقیقه قبل از شروع ارزیابی برای سازگاری پیدا کردن با محفظه استوانه‌ای به داخل محفظه منتقل شدند. قطر استوانه ۳۳ سانتی‌متر و ارتفاع آن ۳۵ سانتی‌متر بود. چند دقیقه بعد از تزریق دارو، موش‌ها برخلاف سمت ضایعه دیده شروع به چرخش کرده و تعداد چرخش‌های کامل (۳۶۰ درجه) آن‌ها به مدت یک ساعت توسط شمارش‌گر دستی شمارش شد. در این محاسبه تعداد چرخش کونترول‌ترال (به سمت مخالف محل ضایعه) به‌عنوان عدد مثبت و چرخش اپیسی‌لترال (به سمت محل ضایعه) به‌عنوان عدد منفی در نظر گرفته شد، تعداد خالص چرخش پس از تفاضل چرخش‌ها در دو جهت محاسبه شد [۲۱]. آنالیز رفتاری پس از محاسبه آماری به‌صورت رفتار چرخشی القا شده بر اثر آپومورفین قبل و چند نوبت بعد از ایجاد ضایعه، طی درمان، در نمودارهای مربوط ارائه شده است.

بررسی آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار Graph pad prism و آزمون‌های one way ANOVA و t-test استفاده شد. تمامی داده‌های به‌دست آمده از ارزیابی رفتاری و شمارش سلولی به‌صورت Mean \pm SEM بیان شد. در تمامی محاسبات، ($p < 0/01$) به‌عنوان اختلاف معنی‌دار منظور شد.



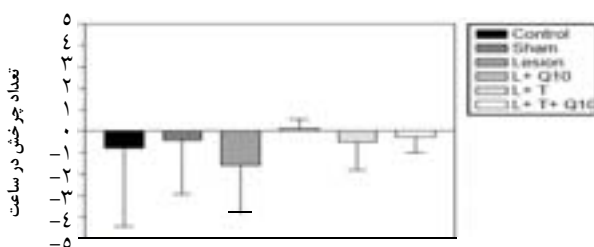
شکل ۳. تصاویر مربوط به ایمونوهیستوشیمی سلول‌های ناحیه پیوند با استفاده از آنتی‌بادی ضد Brdu (هفته هشتم)، (بار ۵۰۰ میکرومتر): نقاط روشن که نشان‌دهنده محل استقرار Brdu در هسته سلول‌های پیوند شده است.

ارزیابی‌های ایمونوهیستوشیمی از ناحیه استریاتوم رت‌های گروه‌های غیر پیوندی نیز صورت گرفت و نتایج آن‌ها منفی بود به این معنی که هیچ رسوب رنگی که نشان‌دهنده مثبت بودن واکنش باشد، مشاهده نشد.

ارزیابی رفتاری

در این پژوهش به منظور ارزیابی رفتار چرخشی رت‌های پارکینسونی در هر گروه، تعداد چرخش‌های القا شده به کمک آپومورفین، طی مدت زمان ۶۰ دقیقه شمارش شد. در ارزیابی رفتاری نوبت اول (قبل از ایجاد ضایعه)، بین گروه‌های مختلف از نظر تعداد چرخش‌های القا شده توسط آپومورفین، هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۴).

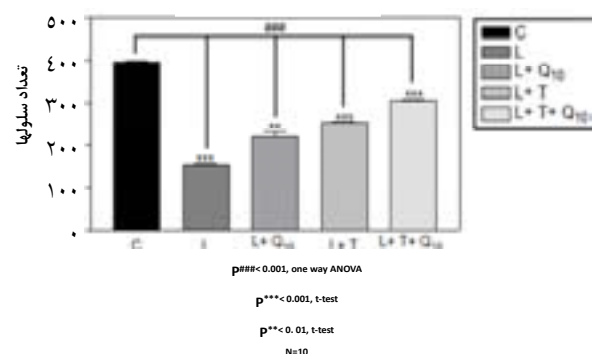
تست رفتاری قبل از ایجاد مدل



شکل ۴. مقایسه میانگین تعداد چرخش‌های القا شده توسط آپومورفین طی مدت یک ساعت در هفته قبل از ایجاد مدل در همه گروه‌ها. اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها وجود ندارد.

نتایج شمارش سلولی از ناحیه استریاتوم نشان داد که در گروه L، تعداد نورون‌های ناحیه استریاتوم به صورت معنی‌دار ($p < 0.001$) نسبت به گروه C، کاهش یافته است. بعد از طی دوره درمان، تعداد نورون‌ها در گروه درمانی L+Q10 و L+T در مقایسه با گروه L، افزایش معنی‌دار (به ترتیب $p < 0.001$ و $p < 0.01$) نشان داد. همچنین تعداد نورون‌ها در گروه درمانی توأم (L+T+Q10) افزایش معنی‌دار نسبت به گروه L نشان داد ($p < 0.001$) (شکل ۲).

شمارش نورون‌های استریاتوم



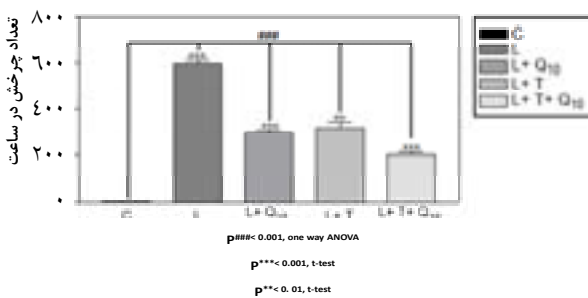
شکل ۲. تعداد سلول‌های عصبی شمارش شده در برش‌های کرونال از بخش مرکزی استریاتوم در سطحی معادل ۰/۶ میلی‌متر مربع در سمت ضایعه دیده در گروه‌های مختلف است.

در این پژوهش، ارزیابی ایمونوهیستوشیمی از محل پیوند برای ارزیابی سلول‌های پیوند شده و زنده ماندن آن‌ها بعد از گذشت دو ماه از پیوند انجام گرفت. همان‌طور که قبلاً اشاره شد سلول‌ها قبل از انجام پیوند توسط نشانگر Brdu نشان‌دار شده بودند، بنابراین در بررسی انجام شده در پایان دوره درمانی با آنتی‌بادی اولیه ضد Brdu و آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با FITC، واکنش هسته سلول‌های پیوندی در بافت استریاتوم میزبان به صورت رنگ سبز مشاهده شد که نشان‌دهنده محل استقرار Brdu در هسته سلول است.

بنابراین وجود سلول‌های Brdu مثبت بعد از گذشت دو ماه از پیوند نشان‌دهنده زنده ماندن سلول‌ها پیوند شده در استریاتوم میزبان است (شکل ۳).

به صورت بارز از گروه کنترل بیشتر بود ($p < 0.001$). در گروه درمانی $L+Q10$ مانند نوبت قبلی، تعداد چرخش‌ها نسبت به گروه L کاهش داشت، علاوه بر این، در گروه درمانی $L+T$ با توجه به این که در ارزیابی قبلی مانند گروه تخریب افزایش بارز چرخش را نشان می‌داد ولی در این ارزیابی، تعداد چرخش‌ها به صورت معنی‌دار نسبت به گروه L کاهش داشت ($p < 0.01$). در این بررسی مشاهده شد که در گروه درمانی توأم کوآنزیم $Q10$ و پیوند سلولی ($L+T+Q10$) تعداد چرخش‌ها در مقایسه با دوره قبل نسبت به گروه تخریب (L) کاهش نشان داد ($p < 0.001$)، همچنین در مقایسه نتایج این گروه با دو گروه درمانی دیگر نیز کاهش چرخش معنی‌دار بود ($p < 0.01$) ولی بین دو گروه درمانی $L+T$ و $L+Q10$ تفاوت معنی‌داری در تعداد چرخش‌ها مشاهده نشد (شکل ۶).

تست رفتاری هشت هفته بعد از پیوند سلولی



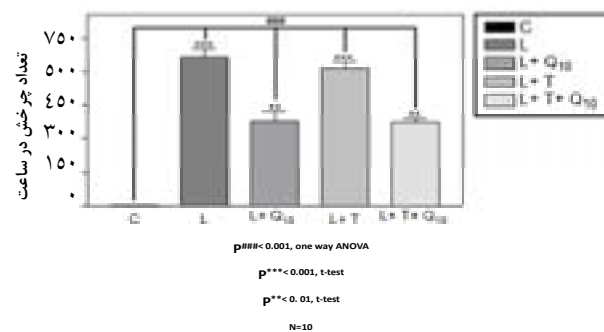
شکل ۶. مقایسه مبانگین تعداد چرخش‌های القا شده توسط آپومورفین در مدت یک ساعت در هفته هشتم بعد از پیوند سلولی

بحث

با توجه به شیوع بیماری پارکینسون، به‌عنوان 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 $CoQ10$ (به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان

در ارزیابی رفتاری نوبت دوم (دو هفته بعد از ایجاد ضایعه و روز قبل از انجام پیوند سلولی) در مقایسه بین دو گروه طبیعی به‌عنوان گروه کنترل با گروه شاهد که تمام روش جراحی روی آن‌ها انجام شد ولی به جای نوروتوکسین OHDA-6، محلول سالین اسکوربات‌دریافت کردند، از نظر رفتار چرخشی، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. بنابراین با یکی کردن نتایج حاصل از این دو گروه و حفظ موارد مشابه، تنها گروه کنترل (C) برای مقایسه با چهار گروه دیگر یعنی گروه تخریب و سه گروه تحت درمان استفاده شد. در این بررسی در مقایسه با گروه کنترل، آپومورفین موجب چرخش بارز کونترول‌ترال در موش‌های گروه تخریب (L) شد ($p < 0.001$). در مقایسه‌ای که بین گروه‌های درمانی با گروه L انجام شد، بین گروه درمانی $L+T$ و گروه L ، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. در صورتی که تعداد چرخش در دو گروه درمانی دیگر ($L+Q10$ و $L+T+Q10$) در مقایسه با گروه L ، به صورت معنی‌دار کاهش نشان داد ($p < 0.01$) (شکل ۵).

تست رفتاری دو هفته بعد از ایجاد مدل



شکل ۵. مقایسه مبانگین تعداد چرخش‌های القا شده توسط آپومورفین در مدت یک ساعت در هفته دوم بعد از ایجاد مدل و روز قبل از انجام پیوند سلولی

در ارزیابی رفتاری نوبت سوم (هفته دهم بعد از ایجاد مدل و هفته هشتم بعد از پیوند سلول) تعداد چرخش در گروه تخریب نسبت به دوره قبل تغییری نداشت و همچنان

زائو (Zhao) نیز در سال ۲۰۰۲ نشان داد پس از پیوند BMSCs های انسان به رت‌هایی که دچار صدمات ایسکمیک مغزی شده بودند، سلول‌ها در محل پیوند زنده باقی مانده، نشانگر سلول‌های عصبی را بیان کرد و بهبودی حسی-حرکتی نیز در حیوانات مشاهده شد [۳۰].

در تحقیقی که توسط لی یو (Li Y) در سال ۲۰۰۲ انجام شد، چهار هفته پس از پیوند BMSCs به استریاتوم موش صحرایی بالغ مدل پارکینسون، این سلول‌ها خصوصیات سلول‌های عصبی دوپامینرژیک را پیدا کردند به طوری که به آنتی بادی تیروزین هیدروکسیلاز (TH) واکنش مثبت نشان دادند و همچنین در این حیوانات بهبود عملکرد نورولوژیکال مشاهده شد [۳۱].

تحقیقات دیگر نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمال به‌عنوان یک کارخانه مولکولی کوچک عمل می‌کند که فاکتورهای رشد و تروفیک مختلفی را ترشح می‌کند. سلول‌های بنیادی مزانشیمال در مغز یا درون عروق، این فاکتورها را به‌صورت مکرر بیان می‌کند. تأثیر این فاکتورها در روی مغز مکانیزی می‌است که باعث بازگشتن شرایط فیزیولوژیکی مغز می‌شود. آن‌ها نشان دادند که سلول‌های بنیادی مزانشیمال فاکتورهای VEGF, HGF hepatocyte growth factor, NGF nerve growth factor و BDNF brain-derived neurotrophic factor را بیان می‌کند، این طیف از فاکتورهای رشد نقش مهمی در بهبود ضایعات مغزی دارد [۳۲].

بنابراین، چنین به نظر می‌آید که فاکتورهای نوروتروفیک ترشح شده از سلول‌های پیوندی باعث شده که یا خود این سلول‌ها به سلول‌های عصبی تمایز یابد و جایگزین سلول‌های آسیب دیده شود که برای اثبات آن، نیاز روش‌هایی تخصصی‌تر است یا سلول‌های اطراف که مربوط به خود میزبان است، تحت تأثیر این فاکتورها به سلول‌های عصبی تمایز یافته‌اند.

همچنین در تحقیق حاضر در مورد گروه درمانی L+Q10 بررسی‌های رفتاری نمایانگر بهبود علائم رفتاری است. به‌نظر می‌رسد که تجویز CoQ10 توانسته تا اندازه‌ای از تخریب کامل نورون‌های دوپامینرژیک جلوگیری نماید.

قوی و یک عامل آنتی‌آپوپتوزیس) و درمان جایگزینی با استفاده از پیوند سلول‌های BMSC در استریاتوم موش‌های صحرایی مدل پارکینسون، به‌صورت همزمان به‌کار گرفته شد.

آخرین نتایج ارزیابی رفتاری در گروه درمانی L+T، کاهش در چرخش‌های القا شده توسط آپومورفین را نسبت به قبل از انجام پیوند نشان داد. همچنین در بررسی‌های بافتی در ناحیه پیوند نشانه‌ای از رد پیوند مشاهده نشد و به نظر می‌رسد که سلول‌های پیوند شده توانسته‌اند با محیط استریاتوم سازگار شوند. علاوه بر این در آزمون‌های ایمونوهیستوشیمی پاسخ مثبت تعدادی از سلول‌ها به آنتی‌بادی ضد Brdu نشان‌دهنده این است که بعد از گذشت دو ماه از انجام پیوند تعدادی از سلول‌ها هنوز در بافت میزبان زنده هستند.

طی مطالعات گذشته بسیاری از محققین ثابت کردند که سلول‌های BMSC، سلول‌های بنیادی چند ظرفیتی هستند که توانایی تمایز یافتن به انواع سلول‌های دیگر لایه مزانشیمی (استوبلاست، کندروسیت، آدیپوسیت، میوبلاست) را دارد [۲۲]. همچنین تحقیقات اخیر نشان داده است که سلول‌های BMSC انسان و موش صحرایی بالغ در محیط آزمایشگاهی تحت شرایط خاص، توانایی تمایز به سلول‌های عصبی را دارد [۲۳-۲۵].

تحقیقات ثابت کرده است، محیطی که سلول‌های بنیادی در آن قرار می‌گیرد، می‌تواند تمایز رده خاصی از سلول‌ها را به آنها دیکته کند، به طوری که این سلول‌ها تحت تأثیر عوامل نوروتروفیک اضافه شده به محیط کشت، خصوصیات سلول‌های عصبی را پیدا کرده و پروتئین‌ها و ژن‌های خاص سلول عصبی از جمله β -III, Neu N, neurofilament M, tau, tubulin و synaptophysin را بیان می‌کند [۲۵-۲۸].

گولرمو (Guillermo) و همکارانش نشان دادند که BMSCs تزریق شده به بطن‌های جانبی جنین موش صحرایی در روز ۱۵/۵ زندگی جنینی، توانایی تمایز به سلول‌های عصبی و سلول‌های گلیال را دارد و همچنین این سلول‌ها توانایی مهاجرت به مناطق دیگر مغز را داشته و در مطالعات ایمونوهیستوشیمی انجام شده دو ماه بعد از تولد نیز این سلول‌ها در بافت میزبان، زنده بود [۲۹].

پس از تخریب بخش متراکم جسم سیاه شده است؛ ولی کاهش کمتر سلول‌های این منطقه در گروه‌های درمانی L+ Q10 نسبت به گروه L نشان‌دهنده اثر حفاظتی CoQ10 بر سلول‌های عصبی است. به طوری که از کاهش شدید سلول‌های این منطقه تا حدی جلوگیری کرده است و نیز به نظر می‌آید که کاهش کمتر سلول‌های استریاتوم در گروه درمانی L+T نسبت به گروه L، به علت ترشح فاکتورهای نوروتروفیک از سلول‌های پیوند شده و اثر حفاظتی این فاکتورها بر نورون‌های استریاتوم باشد. همچنین کاهش کمتر تعداد سلول‌های عصبی در گروه درمانی همزمان BMSC و CoQ10 نسبت به سایر گروه‌های آزمایش احتمالاً به علت استفاده همزمان از دو اثر درمانی مفید است که موجب نتایج بهتر این گروه نسبت به دو گروه دیگر شده است. به نظر می‌رسد که تجویز CoQ10 باعث کاهش قابل توجه در میزان عوامل اکسیدان شده و تا حدی از نابود شدن سلول‌های مربوط به بخش متراکم جسم سیاه و استریاتوم میزان جلوگیری به عمل می‌آورد. 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 سلول، زمان کافی برای ترشح فاکتورهای نوروتروفیک را داشته باشد. بنابراین آثار درمانی استفاده همزمان این دو روش، باعث پاسخ درمانی بهتر در این گروه نسبت به دو گروه درمانی دیگر شده است.

استفاده همزمان BMSC و آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند درمان مؤثرتری در بیماری پارکینسون در مقایسه با استفاده از هر یک از این روش‌ها به تنهایی باشد. شاید این درمان در آینده جایگزین مناسبی برای درمان‌های کنونی این بیماری باشد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند که از همکاری‌های بی‌دریغ مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و ملکولی و آزمایشگاه‌های علوم اعصاب، کشت سلولی و بافت‌شناسی گروه آناتومی و آزمایشگاه گروه ژنتیک دانشگاه علوم پزشکی ایران مراتب تشکر و قدردانی خود را به عمل آورند.

در تحقیقات انجام شده توسط بیل (Beal) در سال ۱۹۹۴ مشخص شد که CoQ10 دارای آثار نوروپروتکتیو در سیستم اعصاب مرکزی است و همچنین در این تحقیق دوز ۲۰۰mg/kg/daily از کوآنزیم Q10 به عنوان دوز نوروپروتکتیو شناسایی شد [۳۳].

تحقیقات نشان داده است که CoQ10 باعث محافظت سلول‌های عصبی از استرس‌های اکسیداتیو می‌شود و از کاهش پتانسیل غشای میتوکندری جلوگیری به عمل می‌آورد [۳۴].

مطالعه‌ای شالتز (Schults) در سال ۱۹۹۷ روی سطح CoQ10 در بیماران پارکینسونی، کاهش سطح این کوفاکتور که مرتبط با کاهش در فعالیت کمپلکس I میتوکندری‌ها است، را نشان داد [۳۵].

با توجه به نتایج بررسی‌های انجام شده می‌توان چنین نتیجه گرفت که کاهش تعداد چرخش در گروه درمان L+ Q10 می‌تواند به علت توان حفاظتی CoQ10 و احتمالاً بروز مکانیسم‌های مربوط به بازگشت عملکردی باشد.

در تحقیقات به عمل آمده ثابت شده که کوآنزیم Q10 به علت دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی قوی در برابر رادیکال‌های آزاد، دارای خاصیت آنتی‌آپوپتوتیک نیز هست [۳۶].

در تحقیق حاضر بهبود علائم رفتاری در گروه L+T+Q10 نسبت به دو گروه درمانی دیگر بیشتر بود. علاوه بر این، مطالعات ایمونوهیستوشیمی انجام شده از ناحیه پیوند بر ضد Brcu، بقای سلول‌های پیوندی را در بافت میزبان بعد از گذشت دو ماه از پیوند نشان می‌دهد.

همچنین از آنجایی که پایانه‌های سلول‌های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه در ناحیه استریاتوم قرار گرفته است و اثر تحریکی روی سلول‌های این ناحیه دارد؛ بنابراین از یافته‌های به دست آمده از شمارش سلول‌های عصبی ناحیه استریاتوم در گروه L، چنین به نظر می‌رسد که از بین رفتن یا کاهش شدید تعداد سلول‌های بخش متراکم جسم سیاه، منطقه استریاتوم را نیز تحت تاثیر قرار داده و باعث کاهش تعداد سلول‌های این منطقه،

References

1. **Dauer W, Przedborski S.** Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron.* 2003; 39: 889–909.
2. **Arenas E.** Stem cell in the treatment of parkinson's disease. *Brain Res Bulltin* 2002; 57(6): 759-808.
3. **Stoof JC, Vermeulen RJ, van Royen EA, Derukarch B, Voorn P, Wolters EC, et al.** Dopaminergic systems and parkinson's disease : some latest development in pathogenic, diagnostics and pharmacotherapeutic investigations, *Neurosci Res* 1996; 18: 133- 41.
4. **Ebadi MSK, Baxi MD.** Oxidative stress and antioxidants therapy in Parkinson's disease *Prong.neurobiol* 1996; 48: 1-19.
5. **Coyle JT, Puttfarcken P.** Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 1993 Oct 29;262(5134):689-95..
6. **Joseph J, Eduardo T.** Parkinson's disease and movement disorders, fourth edition. Linppicott Williams & Wlkins. 2002, pp:116-663.
7. **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.
8. **Bjorklund A, Lindvall O.** Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat Neurosci* 2000; 3: 537-44.
9. **Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM.** From marrow to b rain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000; 290: 1775 –9.
10. **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.
11. **Kramer BC, Woodbury D, Black IB.** Adult rat bone marrow stromal cells express genes associated with dopamine neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 2006: 343(4):1045-52.
12. **Hermann A, Gastl R, Liebau S, Popa MO, Fiedler J, Boehm BO, et al.** Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J Cell Sci* 2004; 117 :4411-22.
13. **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 USA* 2003; 100(3): 1364-9.
14. **Ye M, Wang XJ, Zhang YH, Lu GQ, Liang L, Xu JY, et al.** Therapeutic effects of differentiated bone marrow stromal cell transplantation on rat models of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2007; 13(1): 44-9.
15. **Kaikkonen J, Nyysönen K, Tomasi A, Iannone A, Tuomainen TP, Porkkala-Sarataho E, et al.** 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.
16. **Cleren C, Yang L, Lorenzo B, Calingasan NY, Schomer A, Sireci A, et al.** Therapeutic effects of coenzyme Q10 (CoQ10) and reduced CoQ10 in the MPTP model of Parkinsonism. *J Neurochem* 2008: 104 (6): 1613-21.
17. **Turunen M, Olsson J, Dallner G.** Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1660: 171-99.
18. **Paxinos G, Watson C.** *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd Edition, Academic Press, San Diego, CA, 1986.
19. **Faghihi A, Joghataie MT.** Darabi S, Mehdizadeh M, Roghani M, Bakhtiari M. Evaluation of Behavioral Effects of Trans-Resveratrol in the Hemi- Parkinsonian Rat Model. *J Iranian Anatomical Sciences* 2005; 5: 107-14
20. **Casas M, Ferre S, Coboso A, Cadafalch J, Grau**

- JM, Jan F.** Comparison between apomorphine and amphetamine-induced rotational behavioral in rats with a unilateral nigrostriatal pathway. *Neuropharmacol* 1998; 27: 657-9.
21. **Mehdizadeh M, Joghataei MT, Nobakht M, Aryanpour R.** The beneficial effect of the flavonoid quercetin on behavioral changes in hemi-parkinsonian rats. *Ir J Neurosci* 2009; 11: 5-8
22. **Caterson EJ, Nesti LJ, Danielson, K, Tuan RS.** Human marrow-derived mesenchymal progenitor cells: isolation, culture expansion, and analysis of differentiation. *Mol. Biotechnol* 2002; 20: 245–56.
23. **Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Perez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, et al.** Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 2000;64: 247-56.
24. **Munoz-Elias G, Woodbury D, Black I.** Marrow stromal cells, mitosis, and neuronal differentiation: stem cell and precursor functions. *Stem Cells* 2003; 21: 437– 48.
25. **Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB.** Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000; 61: 364-70.
26. **Kohyama, J, Abe H, Shimazaki T, Koizuma A, Nakashima K, Gojo S, et al.** Brain from bone: efficient meta-differentiation of marrow stromal-derived mature osteoblasts to neurons with noggin or a demethylating agent. *Differentiation* 2002; 68: 235 – 44.
27. **Woodbury D, Reynolds K, Black IB.** Adult bone marrow stromal cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *J Neurosci Res* 2002; 96: 908-17.
28. **Hidenori S, Toshihiko T, Hiroshi T, Hideo K, Zhenglin L, Keiichi M, et al.** Neurospheres induced from bone marrow stromal cells are multipotent for differentiation into neuron, astrocyte, and oligodendrocyte phenotypes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004: 322; 918-22.
29. **Munoz-Elias G, Akiva J, Marcus AJ, Coyne TM, Dale Woodbury D, Black IB.** Adult Bone Marrow Stromal Cells in the Embryonic Brain: Engraftment, Migration, Differentiation, and Long-Term Survival. *J Neurosci* 2004; 24(19): 4585-95.
30. **Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Verfaillie CM, Keene DC, Low WC.** 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.
31. **Li Y, Chen J, Wang L, Zhang L,** Intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neurosci Lett* 2002; 315: 67-70.
32. **Rocio G, Jore A.** Bone marrow stromal cells produce nerve growth factor and glial cell line-derived neurotrophic factors. *BBRC* 2004: 316(3): 753-4.
33. **Beal MF, Henshaw R, Jenkins BG, Rosen BR.** Malonate produces striatal lesions by indirect NMDA receptor activation. *JB. Ann Neurol* 1994; 36, 882-8.
34. **Somayajulu M, McCarthy S, Hung M, Sikorska M, Borowy-Borowski H, Pandey S.** Role of mitochondria in neuronal cell death induced by oxidative stress; neuroprotection by coenzyme Q10. *Neurobiol Dis* 2005; 18: 618-27.
35. **Shults CW, Haas RHY, Passov D, Beal MF.** Coenzyme Q10 levels correlate with the activities of complexes I and II/III in mitochondria from parkinsonian and nonparkinsonian subjects. *Ann Neurol* 1997; 42: 261-4.
36. **Naderi J, Somayajulu-Nitu M, Mukerji A, Sharda P, Sikorska M., Borowy-Borowski H, et al.** Water-soluble formulation of coenzyme Q10 inhibits Bax-induced destabilization of mitochondria in mammalian cells. *Apoptosis* 2006; 11: 1359-69.