# اثرات مفید سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان قرار گرفته در میدان‌های مغناطیسی با فرکانس پایین در درمان پارکینسون در موش سفید بزرگ آزمایشگاهی: ارزیابی میزان BDNF و چرخش‌های القائی

منوچهر صفری[۱](Ph.D)، مجید جدیدی[۲](Ph.D)، حمیدرضا ثامنی[۱](Ph.D)، سام زربخش[۱](Ph.D)، احمدرضا بندگی[۳](Ph.D)، عباسعلی وفایی [۴](Ph.D)، سعید مقدس بیات [*۱](M.Sc)

۱- *مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی سیستم عصبی، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران*

۲- *گروه فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران*

۳- *گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران*

۴- *مرکز تحقیقات فیزیولوژی و گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران*

## چکیده

**سابقه و هدف: استفاده از سلول‌های بنیادی یکی از روش‌های درمانی ممتاز در بیماری پارکینسون می‌باشد. در تحقیقات جدید از میدان‌های مغناطیسی با فرکانس پایین جهت ایجاد تکثیر و تمایز در سلول‌های بنیادی استفاده شده است. بنابراین ما نیز در این تحقیق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان که در دو میدان مغناطیسی قرار گرفته‌اندجهت درمان پارکینسون استفاده کردیم.**

**مواد و روش‌ها: در این تحقیق ۳۶ سر موش صحرایی نر بالغ به‌طور تصادفی به ۶ گروه شامل گروه نرمال، گروه پارکینسونی، گروه درمان با سلول بنیادی، گروه درمان با سلول بنیادی قرار گرفته در میدان مغناطیسی ۴۰ میکروتسلا، گروه درمان با سلول بنیادی قرار گرفته در میدان مغناطیسی ۴۰۰ میکروتسلا، و گروه vehicle تقسیم شدند. مدل پارکینسونی با تزریق ۴ میکروگرم نوروتوکسین ۶-هیدروکسی دوپامین به داخل استریاتوم طرف چپ ایجاد گردید. سلول‌های بنیادی به بطن طرفی چپ تزریق شد.**

**یافته‌ها: نتایج تحقیق ما نشان می‌دهد که تزریق سلول‌های بنیادی مغز استخوان قرار گرفته در میدان ۴۰ و ۴۰۰ میکروتسلا باعث کاهش تعداد چرخش‌ها شده است اما میزان کاهش در گروه ۴۰۰ میکروتسلا نسبت به گروه‌های دیگر بیشتر بود. هم‌چنین میزان BDNF خون در گروه ۴۰۰ میکروتسلا نسبت به دیگر گروه‌های درمانی افزایش بیش‌تری نشان داده است. میزان BDNF در بین گروه سلول بنیادی و گروه ۴۰ میکروتسلا تفاوت قابل توجهی نشان نمی‌دهد.**

**نتیجه‌گیری: سلول‌های بنیادی قرار گرفته در میدان مغناطیسی ۴۰۰ میکروتسلا به‌طور قابل ملاحظه‌ای چرخش‌های القائی را کاهش و سطح BDNF خون را افزایش می‌دهند.**

**واژه‌های کلیدی: بیماری پارکینسون، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، میدان‌های مغناطیسی،سلول های مغز استخوان، BDNF**

## مقدمه

بیماری پارکینسون اولین بار در سال ۱۸۱۷ توسط دانشمند بریتانیایی به نام جیمز پارکینسون بیان شد. این

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۳-۳۳۳۵۴۱۷۰

Email: saeedmbayat@yahoo.com



تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۷/۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۳/۲۵

بیماری ۱-۲ درصد از افراد بالای ۶۵ سال را گرفتار می‌کند [۱]. علائم این بیماری عبارتند از: لرزش(Ttremor) در حال استراحت ، کندی حرکت (Bradykinesia)، سفتی عضلات و بی‌ثباتی‌های وضعیتی، ناهنجاری‌های تکلم، افسردگی، نقص در سیستم اتونومیک، دیستونی، یبوست، توهم و مشکلات بلع. پارکینسون در اثر تخریب شدن نورون‌های دوپامینرژیک مغز میانی ایجاد می‌شود و علت این تخریب شدن هنوز شناخته نشده است اما ممکن است عواملی مانند آلودگی‌های محیطی، سن، سموم خارجی، سموم داخلی ایجاد شده از متابولیسم نورون‌ها، عوامل ژنتیکی و رادیکال‌های آزاد در این تخریب دخالت داشته باشند [۲].

درمان‌های مورد استفاده برای پارکینسون، درمان‌های علامتی بوده و درمان قطعی وجود ندارد. در مراحل اولیه درمان‌های دارویی با لوودوپا (ال دی هیدروکسی فنیل آلانین) و یا آگونیست‌های دوپامین علائم بیماری را کاهش می‌دهند. در حالی‌که استفاده طولانی‌مدت (بیش از ۵ تا ۶ سال) از این داروها باعث بی‌ثباتیهای حرکتی و حتی اسکیزوفرنی می‌شود [۳]. تحریک عمقی هسته‌های ساب تالامیک و گلوبوس پالیدوس [۴] هم‌چنین تزریق فاکتورهای تقسیم‌کننده سلول‌های گلیال (GDNF) در آزمایشات کلینیکی موثر بوده است [۵]. به هرحال این روش‌های درمانی بیش‌تر علامتی بوده و نمی‌توانند باعث ایجاد درمان قطعی شوند. به همین دلیل در تحقیقات از سلول‌های بنیادی جهت بازسازی نورون‌های دوپامینی تخریب شده استفاده می‌شود. این سلول‌ها یک رده از سلول‌های تمایزنیافته هستند که دارای پتانسیل خودنوزایی، تکثیری و تمایزی هستند و تحت تأثیر بعضی شرایط فیزیولوژیکی و یا آزمایشگاهی می‌توانند تمایز یافته و به سلول‌هایی با عمل‌کردهای اختصاصی تبدیل شوند. تاکنون چندین مولکول به‌عنوان فاکتورهایی که مکانسیم‌های خودنوزایی، تکثیر و تمایزسلول‌های بنیادی را رهبری می‌کنند شناسایی شده است به‌عنوان مثال می‌توان از سیتوکین‌ها FGF-FGFR-EGF-EGFR-Notch، میکروRNAها و فاکتورهای نسخه‌برداری نام برد [۸،۷،۶]. از طرف دیگر تحقیقات نشان می‌دهد که میدان مغناطیسی بر جمعیت‌های سلولی متفاوت، بافت‌ها، ارگان‌ها و میکروارگانیسم‌های تاثیرگذار است. نتایج تحقیقات مختلف در مواجهه با میدان‌های مغناطیسی با شدت‌ها و فرکانس‌های گوناگون، بر افزایش فعالیت تکثیری سلول‌های گیرنده نور [۹] افزایش سرعت ترمیم بافت در موش صحرایی [۱۰] افزایش تکثیر سلول‌های آستروسیتی [۱۱] بهبود تکثیر سلول پروتوزوآ [۱۲] افزایش تکثیر باکتری E-Coli [۱۳] افزایش تمایز سلول‌های بنیادی جنینی موش به سلول‌های عضله قلب [۱۴] تمایز بافت جنینی موش به غضروف [۱۵] تمایز مونوسیت‌های میلوئیدی رده سلول‌های U937 [۱۶] و افزایش تعداد سلول‌های طحال موش صحرایی [۱۷] دلالت دارد. از طرف دیگر تحقیقات نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی پیوند یافته، با ترشح سیتوکین‌ها و فاکتورهای نوروتروفیک محافظت‌های محیطی را بر روی سلول‌های مغزی فراهم می‌آورند [۱۸-۲۲]. همان‌طور که می‌دانیم BDNF یکی از اعضا مهم نوروتروفین‌ها می‌باشد. افزایش سطح BDNF می‌تواند بقاء و بازسازی سلول‌های آسیب‌دیده میزبان را تحریک کند [۲۳]. BDNF در انتقال دوپامینرژیک و تحریک رسپتور دوپامین در مسیر فرونتو-استریاتال که در فرآیند شناخت و ادراک نقش دارد، موثر است. از این‌رو می‌توان اختلالات شناختی در بیماری پارکینسون را توجیه کرد [۱۹]. این فاکتور در بیماری‌های نورودژنراتیو مختلفی کاهش می‌یابد، مثلاً در بیماری پارکینسون مقدار آن تا حد قابل ملاحظه‌ای کم می‌شود. تحریک مغزی عمیق جسم سیاه STN با میدان‌های فرکانس بالا بر مواد نوروپروتکتیو مسیر نیگرو استریاتال اثر می‌گذارد. در مطالعه‌ای که به دنبال این مطالعه انجام شد مشخص شد که تحریک مغزی عمیق جسم سیاه با فرکانس بالا بر روی سطح بیان فاکتورهای نوروتروفیک BDNF و GDNF در رت‌های پارکینسونی اثر می‌گذارد و به این نتیجه رسیدند که سنتز پروتئین BDNF در اثر تحریک مغزی عمیق با فرکانس بالا در جسم سیاه افزایش می‌یابد که نتیجه‌ی آن تسهیل انتقال

دوپامین و هم‌چنین حفظ نورون‌های دوپامینرژیک سالم باقی‌مانده در جسم سیاه می‌باشد [۲۴].

نتایج مطالعات مقالات بین سال‌های ۲۰۰۴ تا ۲۰۱۰ نشان داد که شدت میدان‌های بین ۱۰ تا ۶۰۰ میکروتسلا بیش‌ترین اثر تکثیری را دارند. و شدت‌های بین ۹/۴ تا۱۲ تسلا باعث مرگ سلول‌های بنیادی می‌شوند [۲۵]. و به این خاطر دو شدت حداقل ۴۰ میکروتسلا و حداکثر ۴۰۰ میکروتسلا مورد آزمایش قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

**انتخاب حیوان.** تحقیق فوق بر روی ۳۶ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار به وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم انجام می‌شود. موش‌ها به صورت تصادفی به ۶ گروه شش‌تایی تقسیم شدند. این حیوانات از حیوان‌خانه دانشگاه علوم پزشکی ایران خریداری و در حیوان‌خانه گروه آناتومی دانشگاه علوم پزشکی سمنان نگه‌داری شدند. سیکل نوری به صورت ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی بود و دمای محیط نگه‌داری آن‌ها ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد بود. جهت تغذیه حیوانات از غذای فشرده شده و آب شهری استفاده گردید که بدون محدودیت در اختیار آن‌ها قرار گرفت. جهت سازگاری با محیط حیوانات ۱۰ روز قبل از شروع تحقیق به حیوان‌خانه منتقل شدند. حیوانات به ۶ گروه شامل گروه نرمال، گروه پارکینسونی، گروه درمان با سلول‌های بنیادی قرار گرفته در میدان مغناطیسی ۴۰ میکروتسلا، گروه درمان با سلول‌های بنیادی قرار گرفته در میدان مغناطیسی ۴۰۰ میکروتسلا، گروه درمان با سلول‌های بنیادی قرار نگرفته در میدان و گروهvehicle تقسیم شدند. ۲ هفته بعد از پارکینسونی شدن حیوانات، سلول‌های بنیادی به داخل بطن طرفی سمت چپ تزریق گردید. مدت ۲ هفته حیوانات در قفس‌های مجزا نگه‌داری و سپس تست رفتاری نمونه خون آن‌ها تهیه و با جداسازی سرم جهت اندازه‌گیری سطح BDNF به آزمایشگاه بیوشیمی منتقل گردید.

**ایجاد مدل پارکینسونی.** ابتدا موش صحرایی توسط تزریق داخل صفاقی ۱۰۰ mg/kg کتامین و ۲۰ mg/kg گزایلازین (مرک آلمان) بی‌هوش شدند. سپس موش در دستگاه استریوتاکس (stoelting,USA) قرار گرفت و توسط قطعه دهانی و میله‌های داخل گوشی بر روی میز جراحی ثابت شد. توسط پنبه الکی سر حیوان ضد عفونی شد و بعد از کوتاه کردن موهای ناحیه مورد نظر، توسط بیستوری یک برش طولی از میان دو چشم تا میان گوش‌ها ایجاد گشت بعد از پاک کردن بافت‌های پیوندی از روی جمجمه و مشخص شدن ناحیه برگما نشانگر دستگاه بر روی آن تنظیم شد. سپس با توجه به اطلس پاکسینوس و واتسون مختصات نقطه SNC چپ مشخص گردید. (DV=8.2, AP= -4.92, ML=-1.6) و محل تعیین شده توسط مته دستی سوراخ شد و سپس به حیوان ۲ میکرولیتر از محلول سالین ۰/۹ درصد و اسید آسکوربیک ۰/۲ درصد (sigma امریکا) که حاوی ۴ µg نوروتوکسین ۶ هیدروکسی دوپامین هیدروکلراید (sigma امریکا) بود تزریق گردید. جهت تزریق از سرنگ همیلتون ۱۰ میکرولیتری و پمپ دستی استفاده شد و ۵ دقیقه بعد از تزریق سوزن به آهستگی از مغز خارج شد [۲۶]. بعد از اتمام جراحی حیوانات تا زمان به هوش آمدن به اتاقی با دمای مناسب منتقل شدند و پس از به هوش آمدن به طور انفرادی نگه‌داری شدند.

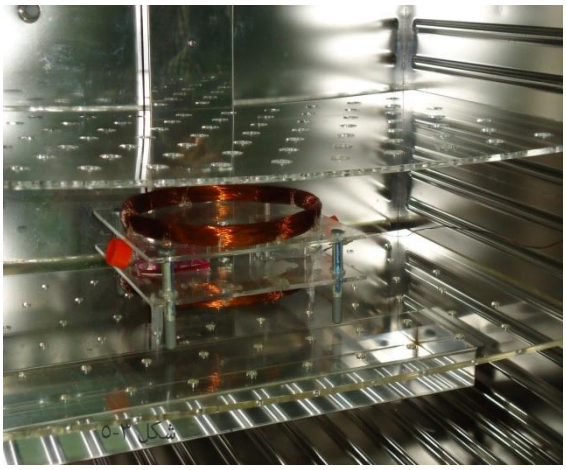
**تهیه و آماده‌سازی سلول‌های بنیادی.** ابتدا موش با استفاده از دی‌اتیل اتر بی‌هوش و استخوان‌های ران و ساق هر دو طرف جدا شد و بلافاصله استخوان‌ها داخل محلول HBSSقرار داده شد و سپس زیر هود لامینار و تحت شرایط استریل دو سر استخوان‌ها قطع و با استفاده از سرنگ و ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM (شرکت gibco) داخل استخوان‌ها شستشو داده شد و محلول تهیه شده ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰rpm سانتریفیوژ گردید. بعد از آن مایع رویی خارج و پلت ته ظرف با حدود ۱ سی‌سی محیط کشت پیپاژ شد و به داخل فلاسک ۲۵ تخلیه و ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی ۱۵٪FBS (شرکت gibco) به آن اضافه شد و فلاسک درون

انکوباتور $CO_2$ قرار گرفت [۲۷]. در تنظیمات انکباتور درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۰ درصد و $CO_2$ پنج درصد تنظیم می‌گردد.

**کشت سلول.** بعد از ۴۸ ساعت محیط کشت فلاسک تعویض و محیط کشت تازه جایگزین گردید. تعویض محیط کشت هر سه روز یک‌بار ادامه یافت تا سلول‌ها کاملاً کف فلاسک‌ها را پر کردند. بعد از این‌که سلول‌ها کف فلاسک را پر کردند فلاسک‌ها پاساژ داده شدند. و پس از سه پاساژ متوالی سلول‌ها در میدان مغناطیسی قرار گرفتند. با انجام ۳ پاساژ متوالی سلول‌های اضافی مانند سلول‌های چربی و فیبروبلاست از محیط کشت خارج می‌شوند و فقط سلول‌های بنیادی که قادر به چسبیدن و تکثیر می‌باشند باقی می‌مانند.

**مراحل پاساژ سلولی.** ابتدا محیط کشت فلاسک را خالی، و دو مرتبه با PBS شستشو داده شد و جهت جدا کردن سلول‌ها از کف فلاسک ۲ میلی‌لیتر تریپسین (شرکت BioIdea) به آن اضافه و ۴ دقیقه درون انکوباتور قرار گرفت. پس از اطمینان از جدا شدن سلول‌ها از کف فلاسک، جهت خنثی کردن اثر تریپسین ۲ میلی‌لیتر FBS به فلاسک اضافه، و محلول حاصل را داخل فالکون ریخته و ۵ دقیقه با دور rpm ۱۲۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس پلیت زیرین با ۲ میلی‌لیتر محیط کشت پیپتاژ و به‌طور مساوی به درون دو فلاسک منتقل گردید و حجم هر فلاسک به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی FBS ۱۵٪ رسید و درون انکباتور $CO_2$ قرار گرفت.

**آماده‌سازی میدان مغناطیسی.** با توجه به ضعیف بودن شدت میدان‌های مغناطیسی مورد نیاز در این پروژه، هر گونه نوسان در برق شهر موجب تغییر در شدت میدان مغناطیسی مورد نیاز می‌گردید، لذا با استفاده از یک دستگاه سیگنال ژنراتور (LINKU) فرکانس ۵۰ هرتز سینوسی مورد نیاز تامین گردید. به منظور تقویت سیگنال ۵۰ هرتز ایجاد شده، خروجی دستگاه به یک آمپلی‌فایر صوتی (NAVASAZ) متصل شد با ارتباط خروجی آمپلی‌فایر و سیم پیچ میدان مغناطیسی، امکان تنظیم ولتاژ ورودی سیم‌پیچ و به‌دست آوردن میدان مغناطیسی متناوب با شدت‌های مورد نظر فراهم گردید. برای ایجاد میدان مغناطیسی یک‌نواخت از دو سیم‌پیچ سری با قطر داخلی ۱۶ سانتی‌متر که از سیم‌های مسی با روکش لاکی به ضخامت ۰/۵ mm و ۳۰۰ دور سیم تشکیل شده، استفاده گردید (شکل۱). برای تنظیم و اندازه‌گیری شدت میدان مغناطیسی (چگالی شار)، از دستگاه تسلامتر Tiwan، مدل EMF-827 استفاده شد. برای اندازه‌گیری شدت میدان، قبل از شروع هر مرحله از آزمایش، سنسور تسلامتر در مرکز میدان مغناطیسی قرار گرفته و شدت میدان مغناطیسی در دو مقدار ۴۰ و یا ۴۰۰ میکروتسلا تنظیم می‌شد. زمان تابش دهی به مدت یک هفته و۱ساعت درروز مورد استفاده قرارگرفت.



شکل۱ . نحوه تابش دهی پلیت ها با میدان مغناطیسی

**آماده‌سازی و تزریق سلول‌ها.** ۲ هفته بعد از پارکینسونی شدن حیوانات جهت تزریق سلول ابتدا محیط کشت فلاسک را خالی کرده و فلاسک دو مرتبه با PBS شستشو داده شد و جهت جدا کردن سلول‌ها از کف فلاسک حدود ۲ میلی‌لیتر تریپسین به آن اضافه نموده و ۴ دقیقه درون انکوباتور قرار گرفت. پس از اطمینان از جدا شدن سلول‌ها از کف فلاسک، جهت خنثی کردن اثر تریپسین ۲ میلی‌لیتر FBS به فلاسک اضافه شد و سپس کل محلول داخل فالکون ریخته شد و ۵ دقیقه با دور rpm ۱۲۰۰ سانتریفیوژ گردید و سپس پلیت زیرین با ۱ میلی‌لیتر محیط کشت پیپتاژ، و شمارش سلولی با استفاده از تکنیک تریپان بلو انجام شد و ۱۵ میکرولیتر محیط کشت که حاوی ۲۰۰,۰۰۰ سلول بنیادی بود با استفاده از

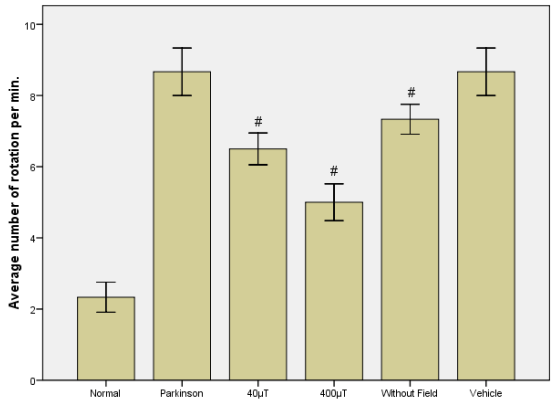
سرنگ همیلتون و پمپ دستی به آرامی درون بطن طرفی چپ تزریق شد. ۵ دقیقه پس از تزریق، سوزن تزریق به آرامی خارج از مغز خارج گردید. حیوانات بعد از تزریق مدت ۲ هفته در قفس‌های مجزا نگه‌داری گردیدند.

**تست چرخش القائی با آپومرفین**. بدین منظور mg/kg ۲/۵ آپومورفین هیدروکلراید (sigma امریکا) به‌صورت داخل صفاقی به موش تزریق شد. و برای اندازه‌گیری تعداد دفعات چرخش‌ها از روش بیان شده توسط Fujita [۲۸] استفاده گردید. به‌طور خلاصه، حیوانات از ۱۰ دقیقه قبل از شروع آزمایش به یک محفظه استوانه‌ای از جنس پلکسی‌گلاس به قطر ۳۳ و ارتفاع ۳۵ سانتی‌متر منتقل شده و یک دقیقه پس از تزریق دارو تعداد چرخش‌ها در فواصل زمانی ۱۰ دقیقه‌ای به مدت ۶۰ دقیقه در شرایط آرام توسط یک شمارشگر دستی اندازه‌گیری شد. تعداد چرخش‌ها به سمت چپ (ایپسی‌لترال) به عنوان عدد منفی و چرخش‌ها به سمت راست (کونترالترال) به عنوان عدد مثبت در نظر گرفته شدند. تعداد خالص چرخش به صورت تفاضل چرخش‌ها محاسبه شد. حیواناتی که حداقل ۶ چرخش کامل در دقیقه (در زمان ۶۰ دقیقه بعد از تزریق آپومورفین) بر خلاف سمت ضایعه داشتند به عنوان مدل‌های پارکینسونی انتخاب شدند [۲۹].

**روش سنجش فاکتور BDNF خون**. بعد از بی‌هوشی عمیق حیوانات و خون‌گیری، نمونه‌های خونی را جهت انعقاد به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار دادیم. سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور rpm ۱۲۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ کرده و سرم رویی آن‌ها را جمع‌آوری کردیم و تا زمان آزمایش در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری نمودیم. و با استفاده از کیت الایزای دو طرفه (EK0380) میزان BDNF را اندازه‌گیری کردیم [۳۰].

## نتایج

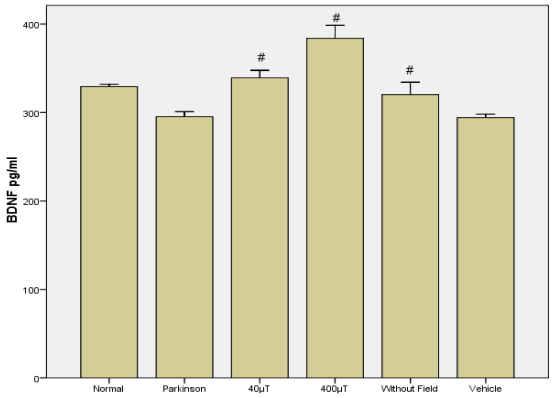
**ارزیابی رفتاری**. نتایج به‌دست آمده در این تحقیق نشان می‌دهد که تعداد چرخش‌های القائی در گروه پارکینسونی نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار پیدا کرده است. اما میزان چرخش القائی در تمام گروه‌های درمانی کاهش را نشان می‌دهد. اما این کاهش چرخش در گروه ۴۰۰ میکروتسلا نسبت به دیگر گروه‌ها قابل توجه و معنی‌دار می‌باشد. کاهش چرخش در دو گروه سلول بنیادی و ۴۰ میکروتسلا نسبت به یک‌دیگر تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد اما نسبت به گروه پارکینسونی تفاوت معنی‌دار است. در گروه vehicle با پارکینسون تفاوتی دیده نشد و نتوانست به مانند گروه‌های درمانی باعث کاهش چرخش‌ها گردد. ( شکل ۲)




شکل ۲. میانگین تعداد چرخشها در خلاف جهت ضایعه متعاقب تزریق آپومورفین ۲ هفته بعد از درمان با سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان که در معرض میدان مغناطیسی با شدت ۴۰ و ۴۰۰ میکرو تسلا بوده اند. #($p<0.05$)

**فاکتور BDNF خون**: نتایج به‌دست آمده در این تحقیق نشان می‌دهد که میزان BDNF متعاقب ضایعه جسم سیاه در مغز میانی در گروه پارکینسونی نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار پیدا کرده است. کاهش سطح BDNF با گروه vehicle یکسان بوده و تفاوتی بین آن‌ها دیده نشد ولی سطح این فاکتور در گروه‌های درمانی متعاقب تزریق سلول‌های بنیادی افزایش یافته است. میزان این افزایش سطح در تمام گروه‌های درمانی یکسان نبوده، در گروه ۴۰۰ میکروتسلا افزایش بیش‌تر از دیگر گروه‌های درمانی بوده و نسبت به گروه کنترل معنی‌دار است. در دو گروه دیگر سلول درمانی افزایش سطح فاکتر BDNF دیده شده است حتی از لحاظ

آماری نسبت به گروه پارکینسون معنی‌دار بوده اما نسبت به یکدیگر تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد همان‌طور که تفاوتی بین چرخش‌های این دو گروه مشاهده نگردید در مجموع بیش‌ترین سطح فاکتور در گروه ۴۰۰ میکروتسلا مشاهده شده است. (شکل ۳)




شکل ۳. سطح فاکتور BDNF موجود در پلاسمای خون ۲ هفته بعد از تزریق سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان که در معرض میدان مغناطیسی ۴۰ و ۴۰۰ میکرو تسلا بوده اند. (#($p<0.05$)

## بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که توکسین 6-OHDA می‌تواند باعث کاهش سطح فاکتور BDNF خون گردد. از لحاظ آماری این کاهش معنی‌دار بوده است بنابراین با توجه به نقش این فاکتور در نگه‌داری و حفظ نورون‌ها کاهش معنی‌دار این فاکتور می‌تواند موجب ضایعات فراوان در نورن‌های مغزی گردد. از طرفی نتایج این تحقیق نشان داد که تزریق سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان اگر در میدان مغناطیسی با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۴۰۰ میکروتسلا قرار گیرد و سپس بداخل بطن‌های طرفی رات مدل پارکینسونی تزریق گردد قابلیت و توان افزایش سطح فاکتور BDNF خون را دارد البته شدت ۴۰ میکروتسلا نیز توان افزایش سطح این فاکتور را در پلاسما دارد با این تفاوت که درصد افزایش کم‌تر از ۴۰۰ میکروتسلا می‌باشد.

نوروتروفین‌ها NT فاکتورهایی هستند که در بقاء، تمایز و حفظ عمل‌کرد نورون‌های مختلف دستگاه عصبی مرکزی و محیطی نقش دارند. در پستانداران نوروتروفین‌ها دارای ۴ عضو می‌باشد. که عبارتند از: BDNF، NGF، NT-3 و NT-4، [۳۳،۳۱،۳۲]. BDNF یکی از اعضاء مهم نوروتروفین‌ها می‌باشد که اولین بار در مغز خوک شناسایی شد و بیش از ۹۰ درصد BDNF محیطی در پلاکت‌ها ذخیره می‌شود [۳۲] و به‌دلیل قابلیت عبور آن از سد خونی مغزی [۳۳] رابطه مثبتی بین سطوح سرمی و مغزی آن وجود دارد [۳۶]. بنابراین به‌علت عبور این فاکتور از سد خونی مغزی افزایش آن به هر علتی می‌تواند باعث محافظت از نورون‌های آسیب‌دیده گردد. بنابراین عاملی است که باعث بهبودی بیمار و متعاقب آن کاهش چرخش در خلاف جهت ضایعه را ایجاد نماید که در گروه‌های درمانی قابل مشاهده بود.

محققین دریافتند که سلول‌های بنیادی پیوند یافته، با ترشح سیتوکین‌ها و فاکتورهای نوروتروفیک محافظت‌های محیطی را بر روی سلول‌های مغزی فراهم می‌آورند [۳۷،۳۶،۲۲،۲۱]. و این می‌تواند یکی از دلایلی باشد که سطح فاکتور BDNF در داخل پلاسما افزایش یافته است اما نکته مهم آن است که سلول‌ها در داخل بطن طرفی تزریق گردیده‌اند اما سطح سرمی BDNF افزایش یافته است می‌تواند به این علت باشد که این فاکتور قابلیت عبور از سد خونی مغزی را داشته و وارد خون می‌گردد.

در حال حاضر به‌طور کلی پذیرفته شده است که EMF (Electro Magnetic Field) در محدوده فرکانس‌های پایین می‌تواند DNA را جهت سنتز برخی پروتئین‌ها تحریک نماید و یکی از توالی‌های DNA که در اثر EMF تحت تاثیر قرار می‌گیرد نیز شناسایی شده است [۳۸].

تحقیقات در مورد تحریک سنتز پروتئین‌های استرس توسط EMF بر روی توالی خاصی از DNA که ژن‌های پروموتر HSP70 را کد می‌کند متمرکز شده است. پروموتر HSP70 شامل نواحی مختلفی از DNA می‌باشد که به‌طور اختصاصی به استرس‌های مختلف پاسخ می‌دهد. شاید بتوان گفت که میدان‌های مغناطیسی توالی‌های خاصی از DNA که باعث بیان BDNF می‌شود را فعال می‌کند و این فعال شدن در

شدت ۴۰۰ میکروتسلا بیش‌تر است و همین عامل باعث افزایش ساخت بیش‌تر این فاکتور گردیده است.

هم‌چنین EMF باعث تولید ROS (reactive oxygen species) می‌شود. این ROSها باعث تحریک متالوپروتئین آزها شده و باعث شکستن و انتشار پیوندهای هپارینی فاکتورهای رشد اپیدرمال می‌شود. ترشح این فاکتورها گیرنده‌های رشد اپیدرمی را فعال می‌کند که به نوبه خود باعث فعال شدن آبشار سیگنال خارج سلولی تنظیم‌کننده کیناز ۱/۲ extracellular signal regulated kinase 1\2 (ERK) می‌شوند [۳۹]. آبشار ERK یکی مسیرهای آبشاری پروتئین کیناز است که فعالیت‌های رونویسی را در پاسخ به تحریک خارج سلولی فعال می‌کند. این مسیرهای آبشاری سیگنالینگ از سه تا شش ردیف پروتئین کیناز تشکیل شده است و سیگنال‌های آن‌ها توسط توالی از فسفریلاسیون و فعال کردن پروتئین کینازها در هر ردیف منتقل می‌شود و نتیجه این واکنش‌های آبشاری، فعال شدن تعداد زیادی از پروتئین‌های تنظیم‌کننده می‌باشد که شامل بعضی از فاکتورهای رونویسی مثل c-Jun, c-Fos, hsp27 و hsp70 می‌باشد. فعال شدن پاسخ‌های استرس که ممکن است با فعال شدن آبشارهای انتقال سیگنال همراه باشد، باعث تنظیم تکثیر سلول، تمایز سلول و تنظیم متابولیسم سلول گردد [۴۱،۴۰،۳۹].

همان‌طور که دیدیم مسیرهای سیگنالینگ که در اثر تحریک EMF ایجاد می‌شود می‌تواند منجر به سنتز پروتئین‌های مختلف شود که این مکانیسم نیز می‌تواند افزایش ترشح BDNF در اثر میدان‌های مغناطیسی را ثابت کند. سلول‌های بنیادی مزانشیمال که در قسمت‌های آسیب‌دیده مغزی تزریق می‌شوند از طریق ترشح فاکتورهای نوروتروفیک مسیرهای اپیتوزی را متوقف کرده و در نتیجه باعث محافظت و ترمیم سلول‌های عصبی می‌شوند [۴۴،۴۳،۴۲]. و اثر میدان‌های مغناطیسی از طریق افزایش ترشح BDNF باعث افزایش این محافظت و ترمیم می‌شود. بنابراین سلول‌های بنیادی پیوندی با ترشح سیتوکین‌ها و فاکتورهای نوروتروفیک باعث حفاظت از سلول‌های مغزی و هم‌چنین تسهیل انتقال نوروترانسمیترها شده و در نهایت باعث کاهش چرخش‌های القائی می‌شود.

تزریق سلول‌های بنیادی در مدل پارکینسونی چرخش‌های القائی را کاهش و میزان سطح BDNF سرم خون را افزایش می‌دهد. هم‌چنین تحریک این سلول‌ها توسط میدان‌های مغناطیسی ۴۰ و ۴۰۰ میکروتسلا باعث می‌شود که چرخش‌های القائی به‌میزان بیش‌تری کاهش و میزان سطح BDNF به میزان بیش‌تری افزایش یابد و احتمالاً افزایش سطح BDNF باعث کاهش چرخش‌های خلاف جهت ضایعه خواهد شد. از طرف دیگر نتایج نشان می‌دهد که تاثیر میدان ۴۰۰ میکروتسلا بر این دو پارامتر بیش‌تر از میدان مغناطیسی ۴۰ میکروتسلا و سلول درمانی بدون میدان می‌باشد.

## تشکر و قدردانی

از سرکار خانم مجیدی کارشناس محترم بخش بافت‌شناسی، آقایان گرائلی و صدیقی کارشناسان بخش آناتومی و هم‌چنین پرسنل محترم بخش مرکز تحقیقات فیزیولوژی که در انجام آزمایشات همکاری نمودند بسیار سپاس‌گزارم.

## منابع

[1] Yao SC, Hart AD, Terzella MJ. An evidence-based osteopathic approach to Parkinson disease. Osteopath Fam Physician 2013; 5: 96-101.

[2] Kidd PM. Parkinson’ s disease as multifactorial oxidative neurodegeneration: implications for integrative management parkinson’ s disease 2001; 5.

[3] Arenas E. Stem cells in the treatment of Parkinson’s disease. Brain Res Bull 2002; 57: 795-808.

[4] Spieles-Engemann AL, Steece-Collier K, Behbehani MM, Collier TJ, Wohlgenant SL, Kemp CJ, et al. Subthalamic nucleus stimulation increases brain derived neurotrophic factor in the nigrostriatal system and primary motor cortex. J Parkinsons Dis 2011; 1: 123-136.

[5] Fumagalli F, Racagni G, Riva M a. Shedding light into the role of BDNF in the pharmacotherapy of Parkinson’s disease. Pharmacogenomics J 2006; 6: 95-104.

[6] Adachi K, Mirzadeh Z, Sakaguchi M, Yamashita T, Nikolcheva T, Gotoh Y, et al. Beta-catenin signaling promotes proliferation of progenitor cells in the adult mouse subventricular zone. Stem Cells 2007; 25: 2827-2836.

[7] Felici MD, Farini D, Dolci S. In or out stemness: comparing growth factor signalling in mouse embryonic stem cells and primordial germ cells. Curr Stem Cell Res 2009; 4: 87-97.

[8] Amann P, B Eichmuller S, Schmidt J, V Bazhin A. Regulation of gene expression by retinoids. Curr Med Chem 2011; 18: 1405-1412.

[9] Khaki AA, Sedghipour MR, Eftekhari M, Roshangar L, Soleimanirad J, Mohammadnejad D. Study on ultrastructural and morphometric effects of electromagnetic fields (EMF) on retina of rat. Med J Tabriz Univ Med Sci 2011; 33: 18-24. (Persian).

[10] Bertolino G, de Freitas Braga A, do Couto K de OL, de Brito Junior LC, de Araujo JE, et al. Macroscopic and histological effects of magnetic field exposition in the process of tissue reparation in Wistar rats. Arch Dermatol Res 2006; 298: 121-126.

[11] Wei M, Guizzetti M, Yost M, Costa LG. Exposure to 60-Hz magnetic fields and proliferation of human astrocytoma cells in vitro. Toxicol Appl Pharmacol 2000; 162: 166-176.

[12] La Fuente AO, Heredia-Rojas JA, Mata-Cárdenas BD, Vargas-Villarreal J, Rodríguez-Flores LE, Balderas-Candanosa I, et al. Influence of 60Hz magnetic fields on growth and differentiation. Exp Parasitol 2008; 119: 202-206.

[13] Potenza L, Ubaldi L, De Sanctis R, De Bellis R, Cucchiarini L, Dachà M. Effects of a static magnetic field on cell growth and gene expression in Escherichia coli. Mutat Res Toxicol Environ mutagen 2004; 561: 53-62.

[14] Bekhite MM, Figulla H-R, Sauer H, Wartenberg M. Static magnetic fields increase cardiomyocyte differentiation of Flk-1 sup cells derived from mouse embryonic stem cells via Ca 2+ influx and ROS production. Int J Cardiol 2013; 167: 798-808.

[15] Goodman R, Blank M. Insights into electromagnetic interaction mechanisms. J Cell Physiol 2002; 192: 16-22.

[16] Tenuzzo B, Dwikat M, Dini L. Static magnetic field selects undifferentiated myelomonocytes from low-glutamine concentration stimulated U937 cells. Tissue Cell 2008; 40: 177-184.

[17] Ding GR, Nakahara T, Tian FR, Guo Y, Miyakoshi J. Transient suppression of X-ray-induced apoptosis by exposure to power frequency magnetic fields in MCF-7 cells. Biochem Biophys Res Commun 2001; 286: 953-957.

[18] Fu YS, Cheng YC, Lin MY, Cheng H, Chu PM, Chou SC, et al. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons in vitro: potential therapeutic application for Parkinsonism. Stem Cells 2006; 24: 115-124.

[19] Crigler L, Robey RC, Asawachaicharn A, Gaupp D, Phinney DG. Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neuritogenesis. Exp Neurol 2006; 198: 54-64.

[20] Shintani A, Nakao N, Kakishita K, Itakura T. Protection of dopamine neurons by bone marrow stromal cells. Brain Res 2007; 1186: 48-55.

[21] Zhao LX, Zhang J, Cao F, Meng L, Wang DM, Li YH, et al. Modification of the brain-derived neurotrophic factor gene: a portal to transform mesenchymal stem cells into advantageous engineering cells for neuroregeneration and neuroprotection. Exp Neurol 2004; 190: 396-406.

[22] Yeon Lim J, Jeun SS, Lee KJ, Oh JH, Kim SM, Park SI, et al. Multiple stem cell traits of expanded rat bone marrow stromal cells. Exp Neurol 2006; 199: 416-426.

[23] Zintzaras E, Hadjigeorgiou GM. The role of G196A polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor gene in the cause of Parkinson's disease: a meta-analysis. J Hum Genet 2005; 50: 560-566.

[24] Spieles-Engemann AL, Collier TJ, Sortwell CE. A functionally relevant and long-term model of deep brain stimulation of the rat subthalamic nucleus: advantages and considerations. Eur J Neurosci 2010; 32: 1092-1099.

[25] Miskon A, Uslama J. A preliminary study on magnetic fields effects on stem cell differentiation. IFMBE Proceedings 2011; 805-810.

[26] Roghani M, Behzadi G, Baluchnejadmojarad T. Efficacy of elevated body swing test in the early model of Parkinson's disease in rat. Physiol Behav 2002; 76: 507-510.

[27] Haastert K, Lipokatic E, Fischer M, Timmer M, Grothe C. Differentially promoted peripheral nerve regeneration by grafted Schwann cells over-expressing different FGF-2 isoforms. Neurobiol Dis 2006; 21: 138-153.

[28] Fujita M, Nishino H, Kumazaki M, Shimada S, Tohyama M, Nishimura T. Expression of dopamine transporter mRNA and its binding site in fetal nigral cells transplanted into the striatum of 6-OHDA lesioned rat. Mol brain Res 1996; 39: 127-136.

[29] Kashani MHG, Tiraihi T, Ghorbanian MT. Transdifferentiation of bone marrow stromal cells into tyrosine hydroxylase immunoreactive cells associated with angiogenesis in parkinsonian rats. Cell 2011; 12: 517-524.

[30] Scalzo P, Kümmer A, Bretas TL, Cardoso F, Teixeira AL. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor correlate with motor impairment in Parkinson's disease. J Neurol 2010; 257: 540-545.

[31] Othumpangat S, Gibson LF, Samsell L, Piedimonte G. NGF is an essential survival factor for bronchial epithelial cells during respiratory syncytial virus infection. PLoS One 2009; 4: e6444.

[32] Hajebrahimi Z, Mowla SJ, Movahedin M, Tavallaei M. Gene expression alterations of neurotrophins, their receptors and prohormone convertases in a rat model of spinal cord contusion. Neurosci Lett 2008; 441: 261-266.

[33] Sieck GC, Mantilla CB. Role of neurotrophins in recovery of phrenic motor function following spinal cord injury. Respir Physiol Neurobiol 2009; 169: 218-225.

[34] Bilderback TR, Gazula V, Lisanti MP, Dobrowsky RT. Caveolin Interacts with Trk A and p75 NTR and regulates neurotrophin signaling pathways caveolin interacts with Trk A and p75 NTR and regulates neurotrophin signaling pathways. J Biol Chem 1999; 274: 257-263.

[35] Fujimura H, Altar CA, Chen R, Nakamura T, Nakahashi T, Kambayashi J, et al. Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. Thromb Haemost 2002; 87: 728-734.

[36] Pan W, Banks W a, Fasold MB, Bluth J, Kastin a J. Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. Neuropharmacology 1998; 37: 1553-1561.

[37] Tatard VM, D'Ippolito G, Diabira S, Valeyev A, Hackman J, McCarthy M, et al. Neurotrophin-directed differentiation of human adult marrow stromal cells to dopaminergic-like neurons. Bone 2007; 40: 360-373.

[38] Yaghoobi MM, Mowla SJ. Differential gene expression pattern of neurotrophins and their receptors during neuronal differentiation of rat bone marrow stromal cells. Neurosci Lett 2006; 397: 149-154.

[39] Bodega G, Forcada I, Suarez I, Fernandez B. Acute and chronic effects of exposure to a 1-mT magnetic field on the cytoskeleton, stress proteins, and proliferation of astroglial cells in culture. Environ Res 2005; 98: 355-362.

[40] Friedman J, Kraus S, Hauptman Y, Schiff Y, Seger R. Mechanism of short-term ERK activation by

electromagnetic fields at mobile phone frequencies. Biochem J 2007; 405: 559-568.

[41] Kültz D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. Annu Rev Physiol 2005; 67: 225-257.

[42] Simkó M. Induction of cell activation processes by low frequency electromagnetic fields. Scientific World J 2004; 4: 4-22.

[43] Jin M, Blank M, Goodman R. ERK1/2 phosphorylation, induced by electromagnetic fields, diminishes during neoplastic transformation. J Cell Biochem 2000; 78: 371-379.

[44] Gnecchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. Circ Res 2008; 103: 1204-1219.

# Beneficial effects of mesenchymal stem cells treated with low frequency magnetic fields in a rat model of Parkinson's disease: Evaluation of rotation test and serum BDNF levels

Manochehr Safari (Ph.D)[1], Majid Jadidi (Ph.D)[2], Hamid Reza Sameni (Ph.D)[1], Sam Zarbakhsh (Ph.D)[1], Ahmad Reza Bandegi (Ph.D)[3], Abbas Ali Vafaei (Ph.D)[4], Saeed Moghadas Biat (M.Sc)[1]

*1- Research Center of Nervous System Stem Cells, Dept of Anatomy, Semnan University of Medical Sciences, Semnan , Iran*

*2- Dept of Medical Physics, Semnan University of Medical Sciences, Semnan , Iran*

*3 - Dept of Biochemistery, Semnan University of Medical Sciences, Semnan , Iran*

*4 - Dept of Physiology, Semnan University of Medical Sciences, Semnan , Iran*

(Received: 24 Sep 2014; Accepted: 15 Jun 2015)

***Introduction:*** The use of stem cells is one of the ideal methods in treatment of Parkinson's disease (PD). Recently, low-frequency magnetic fields have been used for differentiation and reproduction of stem cells. In this study, we used electromagnetic fields (EMF) impact on bone marrow stem cells and evaluated its effect on the serum levels of brain derived neurotrophic factor (BDNF), a neurotrophic factor with decreased expression in PD.

***Materials and Methods:*** Thirty six male wistar rats were randomly divided into 6 groups: control, PD, PD implanted with stem cells exposed to 40 or 400 microtesla EMFs, implanted with stem cells without EMF exposure and vehicle. Parkinson model was induced by injection of 4 µg neurotoxin 6- OHDA into the left striatum. Stem cells were injected in left lateral ventricle.

***Results*:** Injection of mesenchymal stem cells exposed to 40 and 400 microtesla EMFs significantly reduced amphetamine-induced rotation activity and increased serum BDNF levels in rats. The effect of 400 microtesla EMF was considerably higher than that of 40 microtesla EMF. There was not any significant difference between the effects of mesenchymal cells with 40 microtesla exposure and those without any exposure on the rotation test and serum BDNF levels.

***Conclusion:*** Bone marrow stem cells exposed to 400 microtesla EMF considerably reduced amphetamine-induced rotation activity and increased the serum levels of BDNF in rat.

***Keywords:*** Parkinson disease, Mesenchymal stem cells, Magnetic field, Bone marrow cells, Brain-derived neurotrophic factor

* Corresponding author. Tel: +98 23 333354170

saeedmbayat@yahoo.com