

اثر تعاملی ۸ هفته تمرین هوازی پس از تلقیح سلول‌های بنیادی مغز استخوان در جسم مخطط بر شاخص‌های رفتاری در موش‌های مدل پارکینسونی

سید عبدالله هاشم‌ورزی^۱، دکتر علی حیدریان‌پور^۲، دکتر ضیاء فلاح محمدی^۳، دکتر محسن پورقاسم^۴

چکیده

زمینه و هدف: پارکینسون یک انحطاط پیشرونده دستگاه عصبی است که نوروپاتی‌های دوپامینرژیک جسم سیاه تخریب و به دنبال آن مقادیر دوپامین در جسم مخطط کاهش می‌یابد. تلقیح سلول‌های بنیادی و انجام تمرینات ورزشی از جمله راه‌های درمانی غیردارویی است که برای درمان این بیماری مورد توجه قرار گرفته است. هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر تعاملی ۸ هفته تمرین هوازی پس از تلقیح سلول‌های بنیادی مغز استخوان بر شاخص‌های رفتاری موش‌های پارکینسونی است.

مواد و روش‌ها: ۳۵ موش صحرایی نر نژاد ویستار، به طور تصادفی به پنج گروه هفت تایی کنترل سالم، کنترل پارکینسونی، تلقیح سلول، تمرین و تلقیح سلول+تمرین تقسیم شدند. جهت ایجاد مدل پارکینسونی، تخریب جسم مخطط با تزریق ۵ میکروگرم محلول ۶-هیدروکسی دوپامین به صورت استریوتاکسی به داخل جسم مخطط صورت گرفت. برای جداسازی سلول‌های بنیادی، از مغز استخوان فمور و تییبای موش‌های صحرایی نر ۸-۶ هفته استفاده شد که پس از کشت، حدود ۱۰^۵ سلول در ۲ میکرولیتر محیط از طریق کانال به داخل جسم مخطط موش‌های مورد نظر تزریق شد. تمرین هوازی شامل ۸ هفته دویدن روی نوارگردان با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه بود. برای ارزیابی رفتاری از تست چرخشی آپومورفین، تعادل و سیلندر استفاده گردید.

نتایج: در گروه تلقیح سلول+تمرین کاهش معنی‌داری به لحاظ تعداد چرخش در تست چرخشی آپومورفین، مدت اجرای تست تعادل و نیز عدم تقارن حرکتی در تست سیلندر نسبت به گروه کنترل پارکینسونی مشاهده شد ($P \leq 0.05$) که بیانگر اثر مثبت تلقیح سلول همراه با انجام تمرین بر شاخص‌های رفتاری تعادل و عدم تقارن حرکتی است.

نتیجه‌گیری: تلقیح سلول‌های بنیادی مغز استخوان در جسم مخطط و به دنبال آن انجام تمرین ورزشی سبب بهبود رفتاری موش‌های پارکینسونی گردید که می‌تواند به عنوان یک روش درمانی غیردارویی مورد توجه قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: سلول بنیادی مغز استخوان، تمرین هوازی، ارزیابی رفتاری، پارکینسون

۱ دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه بوعلی همدان، ایران

۲ دانشیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه بوعلی همدان، ایران

۳ دانشیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه مازندران، ایران

۴ دانشیار مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، ایران

مقدمه

بیماری پارکینسون^۱ (PD) یک انحطاط نورونی پیشرونده مربوط به مشکلات حرکتی، احساسی و شناختی است که حدود ۱۰ میلیون نفر در سراسر جهان را تحت تاثیر قرار داده است (۱). این بیماری که به وسیله جیمز پارکینسون برای اولین بار در سال ۱۸۱۷ به عنوان یک سندرم توصیف شد، یک نوع تخریب پیشرونده سیستم عصبی مرکزی است که در اثر از بین رفتن نورون‌های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه و به دنبال آن کاهش دوپامین در جسم مخطط ایجاد می‌شود (۲،۳). علائم این بیماری کندی حرکت، سفتی و سختی عضلات، لرزش، اختلال تعادل و کاهش پیشرونده در عملکرد می‌باشد که به طور عمده در افراد بالای ۵۰ سال بروز می‌نماید و یکی از علل شایع ناتوانی در سالمندان است (۴). اگر چه از دست دادن نورون‌ها در این بیماری باعث ایجاد اختلالات حرکتی و شناختی می‌شود اما شروع اختلالات حرکتی بسیار آشکار نیست تا زمانی که حدود ۸۰٪ از پایانه‌های دوپامین جسم مخطط از بین برود (۵). دوپامین پیام عصبی را از مغز میانی به جسم مخطط انتقال می‌دهد. انتقال این پیام‌ها باعث ایجاد تعادل در حرکات بدن می‌شود. هنگامی که سلول‌های ترشح کننده دوپامین در مغز میانی از بین می‌روند، سایر مراکز کنترل کننده حرکات بدن نیز نامنظم می‌گردند و در نتیجه عدم ترشح دوپامین باعث بوجود آمدن علائم پارکینسون می‌شود. اگر چه داروهایی وجود دارد که می‌توانند از پیشرفت علائم این بیماری تا یک دهه جلوگیری کنند اما هیچ درمانی نتوانسته به طور قابل توجهی مانع از پیشرفت این بیماری و یا معکوس کردن آسیب‌های به وجود آمده شود (۱). از جمله راه‌های درمانی غیردارویی که امروزه برای درمان بیماری پارکینسون به خصوص در نمونه های حیوانی مورد پژوهش قرار گرفته است، انجام تمرینات ورزشی و پیوند سلول‌های بنیادی می‌باشد (۱،۳،۶).

شواهد فراوانی وجود دارد که نشان می‌دهد فعالیت بدنی می‌تواند فرایند سالمندی را به تاخیر انداخته، از وقوع بیماری‌های مزمن نظیر آلزایمر و پارکینسون جلوگیری کند و سلامتی را ارتقا دهد. در سال‌های اخیر نشان داده شده است که تمرین بدنی باعث محافظت از جسم سیاه در مقابل آسیب ناشی از التهاب می‌شود (۷،۸،۹). زیگموند^۲ و همکاران گزارش کردند که ورزش می‌تواند سرعت التیام جسم سیاه و مخطط را افزایش داده و انتقال عصبی دوپامینرژیک در سیستم جسم سیاه- مخطط را تغییر دهد (۱). اثر ورزش و سازگاری‌های آن با انجام مطالعات آزمایشگاهی در مدل‌های حیوانی بهتر بررسی می‌شود. در مطالعه‌ای که به منظور اثر ۱۲ هفته تمرین اختیاری روی چرخ دوار انجام گردید، نشان داده شد که پس از این تمرینات تنها سطوح دوپامین جسم مخطط افزایش یافته است اما سطوح تیروزین هیدروکسیلاز افزایش معنی‌داری نداشته است (۹،۱۰). در میان الگوهای ورزشی مختلف، فعالیت داوطلبانه روی چرخ‌دوار، دویدن اجباری روی تردمیل و حرکات عضلانی مقاومتی، رایج ترین مدل‌های ورزشی اتخاذ شده هستند. این ورزش‌ها، جدا از مزایای بدنی خود، عملکرد شناختی را بهبود بخشیده و بازتوانی عصبی را بعد از آسیب مغزی، آسان‌تر می‌کنند (۱۱). بعضی از پژوهش‌ها بر ارزیابی رفتاری موش‌های پارکینسونی پس از انجام تمرین ورزشی متمرکز شده‌اند. در این زمینه تاجیری^۳ و همکاران (۲۰۱۰)

۱. Parkinson's disease

۲. Zigmond

۳. Tajiri

دریافتند که تمرین می‌تواند از طریق تنظیم فاکتورهای رشدی و کاهش عوامل خطرزا سبب بهبود عملکرد مغز و متعاقب آن موجب بهبود عملکرد رفتاری موش‌های پارکینسونی شود (۱۸).

یکی از جدیدترین روش‌های درمانی که امروزه جهت درمان بیماری پارکینسون روی نمونه‌های حیوانی مورد بررسی قرار گرفته، استفاده از سلول‌های بنیادی رویانی می‌باشد. زیرا این سلول‌ها از قدرت خود تکثیری بالایی برخوردارند. همچنین مشاهده شده است که کاربرد آن‌ها در زمینه درمان می‌تواند باعث ایجاد تومور شود. در این روش درمانی، ایجاد پاسخ در فرد گیرنده بالاست و موانع قانونی دارد. بنابراین، استفاده از سلول‌های بنیادی مغز استخوان در درمان این بیماری بیشتر مورد توجه قرار گرفته است، چراکه به راحتی در دسترس بوده و از قدرت خودتکثیری و تمایز به سلول‌های دیگر، از جمله سلول‌های عصبی برخوردارند و به نظر می‌رسد قابلیت تبدیل شدن به سلول‌های دوپامینرژیک را دارند (۱۲، ۳). در سال‌های اخیر، گزارشات متعددی پیشنهاد کردند که استفاده از سلول‌های بنیادی می‌تواند منفعت‌های درمانی در آسیب‌های مغزی و ایسکمی مغزی داشته باشد (۱۳). کاپیتلی^۱ و همکاران (۲۰۱۴) اذعان داشتند که می‌توان از سلول‌های بنیادی به منظور جایگزینی سلول‌های عصبی مرده، بازسازی انتقال دهنده‌های عصبی و جریان‌های عصبی و فراهم کردن آثار نروتروفیک برای سلول‌های دوپامینرژیک باقیمانده در بیماری پارکینسون استفاده کرد (۱۳). محققین در پژوهشی که به منظور بررسی رفتاری موش‌های پارکینسونی پس از تلقیح سلول‌های بنیادی مغز استخوان به جسم مخطط انجام شد، دریافتند که موش‌های پارکینسونی در گروهی که سلول‌های استرومایی مغز استخوان دریافت کرده بودند نسبت به گروهی که فقط محیط کشت به جسم مخطط شان تزریق شده بود، کاهش معنی‌داری را در تست چرخشی نشان می‌دهند (۳). بنابراین از آنجایی که سیستم عصبی مرکزی دارای ظرفیت بسیار محدودی برای بازسازی مجدد نورون‌های صدمه دیده خود دارد و از آنجایی که سلول‌های بنیادی، سلول‌های اولیه غیرتمایز یافته‌ای هستند که دارای خاصیت خودتکثیری بوده و قابلیت تمایز و تبدیل شدن به انواع دیگر سلول‌های بدن از جمله سلول‌های دوپامینرژیک را دارند (۱۴)، به نظر می‌رسد تلقیح سلول‌ها می‌تواند به عنوان یکی از استراتژی‌های درمانی جدید برای درمان بیماری‌های نورودژنراتیو از جمله بیماری پارکینسون مورد توجه قرار گیرد. با توجه به وجود عوارض جانبی گزارش شده ناشی از مصرف دارو جهت کنترل و درمان بیماری پارکینسون (۱۵) و از طرفی، آثار مثبت گزارش شده در خصوص انجام تمرینات ورزشی (۱۶، ۱۵) و استفاده از سلول‌های بنیادی (۱۷، ۱۲، ۳) به طور جداگانه به منظور کاهش علائم این بیماری و همچنین جلوگیری از ایجاد تومور ناشی از پیوند سلول (۱۸)، به نظر می‌رسد انجام ۸ هفته تمرین هوازی پس از تلقیح سلول‌های بنیادی مغز استخوان، بتواند به عنوان یک راهکار غیردارویی جدید، اثر مضاعف‌کننده کنترل بیماری پارکینسون داشته باشد. لذا هدف از این پژوهش ارزیابی رفتاری موش‌های پارکینسونی تلقیح شده با سلول‌های بنیادی مغز استخوان پس از ۸ هفته تمرین هوازی بود.

مواد و روش‌ها

طرح آزمایش

پژوهش حاضر توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی همدان مورد تایید قرار گرفت که در آن از ۳۵ سرموش صحرایی نر نژاد ویستار با سن هفت هفته که از مرکز انستیتو پاستور تهیه شد، استفاده گردید. حیوانات پس از

انتقال به محیط آزمایشگاه، به مدت یک هفته به منظور سازگاری با محیط جدید به صورت گروه‌های چهارتایی در قفسه‌های پلی کربنات شفاف در محیطی با دمای ۲۰ تا ۲۴ درجه سانتیگراد، رطوبت ۴۵ تا ۵۵ درصد و در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. حیوانات از غذای ساخت شرکت بهرپور به صورت پلت و با دسترسی آزاد مصرف کردند. آب مورد نیاز حیوان نیز به صورت آزادانه و از طریق بطری‌های ویژه در دسترس قرار داده شد. حیوانات پس از یک هفته آشنایی با نوارگردان به صورت تصادفی به پنج گروه هفت‌تایی شامل کنترل سالم، کنترل پارکینسون، پارکینسون - تلقیح سلول، پارکینسون - تمرین و پارکینسون - تلقیح سلول + تمرین تقسیم شدند.

جراحی استریوتاکسی و تزریق ۶-هیدروکسی دوپامین برای ایجاد مدل پارکینسونی

برای ایجاد مدل پارکینسونی، تخریب جسم مخطط موش‌ها به غیر از گروه کنترل سالم، با تزریق محلول ۶ هیدروکسی دوپامین (6-OHDA) به صورت استریوتاکسی به داخل جسم مخطط (سمت راست) صورت گرفت. به این صورت که با استفاده از اطلس واتسون و پاکسینوس مکان مناسب برای عمل استریوتاکسی با مختصات (قدامی - خلفی ۰/۵)، (جانبی ۱) و عمقی (۱/۵) مشخص و کانال ۲۷ گیج دندان پزشکی داخل جمجمه موش‌ها قرار گرفت. سپس از طریق این کانال و با استفاده از سرنگ همیلتون مقدار ۵ میکروگرم ۶ هیدروکسی دوپامین (با سرعت هر میکرولیتر محلول با سالیان در مدت ۳۰ ثانیه) به هر موش تزریق شد. پس از پایان تزریق از فنر ۸ میلی لیتری برای جلوگیری از خروج مایع از کانال استفاده و موش به مدت ۱ دقیقه ثابت نگه داشته شد. برای بررسی اثر تزریق ۶ هیدروکسی دوپامین و تأیید این موضوع که آیا با تزریق این ماده موش‌ها پارکینسونی شدند یا خیر، ۳ هفته بعد از تزریق (شکل ۱)، از تست چرخشی آپومورفین استفاده گردید (۹، ۱۰).

تست چرخشی آپومورفین

ابتدا هر موش به مدت ۱۵ دقیقه جهت آشنایی با محیط انجام این تست، در یک استوانه گرد (۲۲ سانتی متر قطر، ۲۶ سانتی متر ارتفاع) قرار گرفت. سپس مقدار ۰/۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن هیدروکلراید آپومورفین محلول در سالیان به صورت زیرجلدی تزریق و دوباره موش در داخل استوانه قرار داده شد. تعداد کل چرخش‌های کامل (۳۶۰ درجه) انجام شده در جهت‌موافق و مخالف سمت آسیب دیده جسم مخطط در طی یک دوره ۳۰ دقیقه‌ای با استفاده از نوار ویدئویی ضبط و سپس توسط محقق شمارش شد. تعداد چرخش‌های سمت آسیب دیده از سمت مخالف تفریق شد که بیانگر تعداد چرخش خالص به سمت مخالف است. چرخش بیشتر نشان دهنده شدت ضایعه از نظر از دست دادن سلول‌های دوپامینرژیک است (۲۰، ۱۹).

برداشت، کشت و تلقیح سلول‌های بنیادی مغز استخوان

به منظور جداسازی سلول‌های بنیادی مغز استخوان، از موش‌های صحرایی نر ۸-۶ هفته نژاد ویستار استفاده شد. روش کار به این صورت بود که در زیر بیهوشی استخوان فمور و تیبیای موش‌ها خارج شد. سپس مغز استخوان آن‌ها در دور ۱۲۰۰ (rpm) به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سلول‌های جدا شده در محیط کشت MEM- α (PAA, Pasching, Austria) حاوی FBS ۱۰ درصد و آنتی بیوتیک پنسیلین + استرپتومایسین یک درصد کشت داده شد. پس از ۳ پاساژ مکرر، سلول‌های بنیادی مزانشیمیچسبیده به کف فلاسک با تریپسین جدا و با دور ۱۲۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس سلول‌های بنیادی مزانشیمال با تکنیک ایمونوسیتوکمیستری با آنتی بادی CD71 و CD90 مورد تایید قرار گرفتند. در روز بیست و سوم (شکل ۱)، بعد از شستشو سلول‌ها با PBS

و پیمتاژ کردن در محیط کشت با استفاده از لام نئوبار، حدود 10^5 سلول در 2 میکرولیتر محیط برای هر موش جدا شد. محیط از طریق کانال وبا استفاده از سرنگ همیلتون به داخل جسم مخطط موش‌های گروه‌های سلول و تمرین + سلول با سرعت یک میکرولیتر در دقیقه تزریق شد (۲۱). به گروه کنترل سالم تنها محیط کشت به همین طریق تزریق شد.

برنامه تمرینی

یک روز بعد از تلقیح سلول‌های بنیادی به موش‌های پارکینسونی (در روز بیست و چهارم) (شکل ۱)، برنامه تمرینی موش‌ها شروع گردید. برنامه تمرینی شامل انجام تمرین اجباری دویدن روی دستگاه نوارگردان با سرعت 15 متر بر دقیقه بود که به مدت 8 هفته، 5 روز در هر هفته و روزانه 2 جلسه 15 دقیقه‌ای که حداقل 1 ساعت از هم فاصله داشتند، انجام شد (۲۰). این برنامه تمرینی از پژوهشی که توسط لندرس^۱ و همکاران (۲۰۱۴) انجام شد الگوبرداری شده است و به دلیل این که موش‌ها دارای بیماری پارکینسون می‌باشند و توانایی انجام 30 دقیقه تمرین مداوم را ندارند، برنامه تمرینی در دو زمان 15 دقیقه انجام شد.

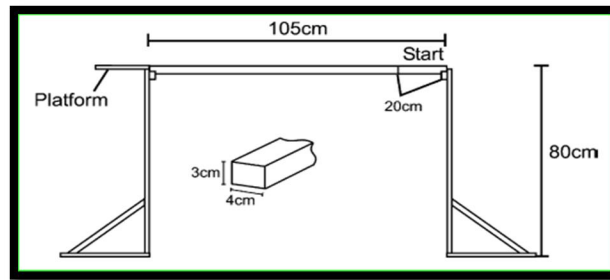
تست رفتاری سیلندر

تست سیلندر برای ارزیابی رفتاری پس از تزریق ۶- هیدروکسی و همچنین پس از پیوند سلول بنیادی و انجام 8 هفته تمرینات انجام شد. برای ارزیابی درجه عدم تقارن پنجه پای جلو، حیوانات به مدت 3 دقیقه در یک استوانه شفاف (قطر 20 سانتی متر، ارتفاع 30 سانتی متر) قرار گرفته و تعداد تماس‌های پنجه پای جلوی سمت راست (اندام همان سمتی که جسم مخطط آن آسیب دیده است) و سمت چپ (اندام طرف مقابل) موش‌ها به دیواره سیلندر شمارش شد. نمره آزمون سیلندر در این مطالعه به شکل زیر محاسبه گردید (۱۹):

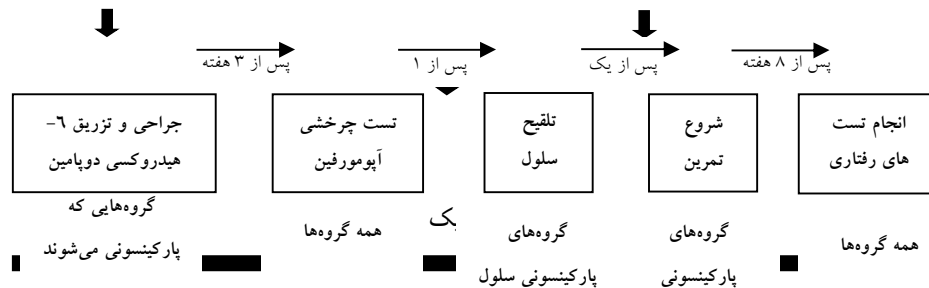
$$[(\text{تعداد تماس‌ها با اندام طرف مقابل}) - (\text{تعداد تماس‌ها با اندام همان طرف})] / (\text{تعداد کل تماس‌ها}) \times 100$$

تست رفتاری تعادل

این تست بعد از تلقیح سلول‌های بنیادی و انجام تمرینات صورت گرفت. بدین منظور از دستگاه چوبی به طول 105 سانتی متر، عرض 4 سانتی متر و ضخامت جانبی 3 سانتی متر استفاده شد (مطابق شکل ۱). ارتفاع این دستگاه از زمین 80 سانتی متر بود. 20 سانتی متر اول این چوب به عنوان خط شروع در نظر گرفته شد و در طرف مقابل نیز قفس موش قرار داشت. به محض حرکت از خط شروع با کرنومتر زمان عبور ثبت گردید (۲۲). حداکثر زمان برای عبور از طول چوب برای هر موش 2 دقیقه و حداکثر زمان توقف اولیه 1 دقیقه منظور گردید. همچنین تعداد سقوط‌ها نیز ثبت شد. این تست در هر مرحله، برای هر موش 3 بار تکرار و کمترین مقدار ثبت شد. به منظور آشنایی موش‌ها با این تست، قبل از اجرای آزمون اصلی، هر یک از موش‌ها 3 بار این تست را اجرا کردند (۷).



شکل ۱. دستگاه سنجش تعادل (۲۱)



روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

در این پژوهش پس از انجام آزمون کولموگروف اسمیرنوف و تایید نرمال بودن توزیع داده‌ها، از آزمون‌های پارامتریک استفاده گردید. برای بررسی تفاوت‌های موجود بین گروه‌های تجربی و کنترل از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه همچنین در صورت مشاهده اختلاف معنی‌داری از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. سطح معنی‌داری برای تمامی آزمون‌ها $P \leq 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

جدول (۱) میانگین و انحراف استاندارد آزمون‌های رفتاری را در پنج گروه مورد مطالعه، پس از تلقیح سلول‌های بنیادی و ۸ هفته تمرین هوازی نشان می‌دهد. نتایج آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که بین تعداد چرخش‌های مشاهده شده در پنج گروه اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P \leq 0.05$) که نتایج پس آزمون (آزمون تعقیبی) توکی حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های تجربی (تلقیح سلول، تمرین و تلقیح سلول + تمرین) با گروه کنترل سالم و پارکینسون می‌باشد. در واقع، تلقیح سلول بنیادی، انجام ۸ هفته تمرین و به خصوص ترکیب تلقیح سلول + تمرین، سبب کاهش معنی‌دار تعداد چرخش موش‌ها پس از تزریق آپومورفین شده است که دلالت بر بهبود موش‌های پارکینسونی دارد (جدول ۱). از طرفی، نتایج آزمون تعادل هم نشان داد که بین گروه‌ها اختلاف معنی‌داری وجود دارد. مدت زمان کل تست تعادل در گروه تمرین و تلقیح سلول + تمرین در مقایسه با گروه پارکینسون کاهش معنی‌داری یافت ($P \leq 0.05$). به عبارتی آزمودنی‌های این دو گروه آزمون تعادل را با سرعت بیشتری انجام دادند که نشان دهنده اثر مثبت تمرین و نیز پیوند سلول همراه با اعمال تمرین می‌باشد.

(جدول ۱). اما تلقیح سلول به تنهایی نتوانسته است کاهش معنی‌داری را در تست تعادل در مقایسه با گروه پارکینسون ایجاد نماید. با مراجعه به جدول مذکور مدت زمان تأخیر نیز در گروه تمرین و تلقیح سلول + تمرین نسبت به گروه پارکینسون کاهش معنی‌داری یافته است ($P \leq 0.05$). نتایج تست سیلتدر که بیانگر میزان عدم تقارن حرکتی می‌باشد، نشان می‌دهد که تنها بین گروه تلقیح سلول + تمرین با گروه کنترل سالم و پارکینسون اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۱).

جدول ۱. نتایج آزمون‌های رفتاری در گروه‌های مورد مطالعه (میانگین $\pm$ انحراف استاندارد)

گروه	تعداد	تست چرخشی آپومورفین	زمان تأخیر تست تعادل (ثانیه)	زمان کل تست تعادل (ثانیه)	تست سیلتدر
کنترل سالم	۷	$9/57 \pm 3/5$	$0/67 \pm 0/25$	$7/73 \pm 1/66$	$7/85 \pm 0/79$
کنترل پارکینسونی	۷	$216/14 \pm 27/9^*$	$2/19 \pm 0/50^*$	$29/34 \pm 3/68^*$	$72/57 \pm 2/92^*$
تلقیح سلول	۷	$186/85 \pm 7/08^{*\Phi}$	$1/80 \pm 1/69$	$26/00 \pm 3/66^*$	$68/71 \pm 4/68^*$
تمرین	۷	$170/14 \pm 11/56^{*\Phi}$	$0/91 \pm 0/39^{\Phi}$	$22/68 \pm 5/30^{*\Phi}$	$57/14 \pm 3/63^*$
تلقیح سلول + تمرین	۷	$149/00 \pm 21/8^{*\Phi}$	$0/85 \pm 0/18^{\Phi}$	$17/31 \pm 4/4^{*\Phi}$	$43/14 \pm 2/53^{*\Phi}$

(*) نشانه اختلاف معناداری نسبت به گروه کنترل (سالم)

(Φ): نشانه اختلاف معناداری نسبت به گروه کنترل (پارکینسون)

بحث و نتیجه‌گیری

بیماری پارکینسون دومین اختلال عصبی شایع در جهان می‌باشد که معمولاً در دهه پنجم یا ششم حیات بروز می‌کند (۲۳). درمان‌های پزشکی بسیار زیادی برای کاهش روند این بیماری وجود دارد که رایج‌ترین آنها دارو درمانی می‌باشد اما این داروها تنها برای یک دهه می‌توانند از بروز علائم این بیماری ممانعت نمایند. پژوهش‌ها نشان دادند که ورزش می‌تواند شرایط بالینی این بیماری را بهبود ببخشد (۱). همچنین اثر مثبت پیوند سلول‌های بنیادی مغز استخوان نیز به منظور درمان پارکینسون در بعضی از مطالعات گزارش شده است (۳، ۲۴). در خصوص ارتباط تمرین با سلول بنیادی، برخی از نشریات علمی شواهدی ارائه نمودند که تمرین و فعالیت جسمانی سبب به فعالیت درآوردن، تحرک و تمایز سلول‌های بنیادی مختلف و تبدیل آنها به سلول‌های دوپامینرژیک می‌شوند (۲۵). مطالعه حاضر با این فرضیه که شاید پیوند سلول بنیادی مغز استخوان همراه با ۸ هفته تمرین هوازی بتواند آثار درمانی مضاعفی در بیماری پارکینسون داشته باشد، در نمونه‌های حیوانی انجام گردید. نتایج نشان داد که شاخص‌های رفتاری در گروه تلقیح سلول + تمرین در مقایسه با گروه‌های تلقیح سلول و تمرین (به طور مجزا) نسبت به گروه کنترل پارکینسونی بهبود یافته است. به عبارتی پیوند سلول بنیادی مغز استخوان همراه با تمرین سبب کاهش معنی‌دار تعداد چرخش موش‌ها در تست چرخشی، بهبود تعادل و رفتار حرکتی موش‌های پارکینسونی شده است. با مقایسه ۳ گروه تجربی می‌توان دریافت که اثربخشی پیوند سلول بنیادی و به دنبال آن

انجام تمرین، بیشتر از اعمال هر یک از این متغیرها به طور جداگانه است که با مقایسه دو گروه سلول و تمرین، نقش تمرین در کسب چنین نتیجه‌ای بسیار با اهمیت‌تر می‌باشد. حاجی قاسم کاشانی و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی رفتاری موش‌های پارکینسونی پس از پیوند سلول‌های بنیادی مغز استخوان به جسم مخطط، دریافتند، موش‌های پارکینسونی که سلول دریافت کرده بودند نسبت به گروهی که فقط محیط کشت به جسم مخطط آنها تزریق شده بود، کاهش معنی‌داری را در تست چرخشی نشان می‌دهند (۳) که با نتایج پژوهش حاضر همسو می‌باشد. این محققین اذعان داشتند که احتمالاً سلول‌های بنیادی تزریق شده در محل ضایعه تحت تأثیر محیط اطرافشان، فاکتورهای رشد - از جمله BDNF و NGF- و سایتوکین‌ها را ترشح می‌کنند که با مکانیسم‌های اتوکراین و یا پاراکراین بر خود و سلول‌های میزبان اثر گذاشته، نه تنها میزان بقاء و تمایز سلولی را افزایش می‌دهند، بلکه منجر به عصب‌دهی مجدد و برقراری ارتباط عصبی نیز می‌شوند (۳).

مبانی نظری بیان می‌کنند که فاکتورهای نوروتروفیک ترشح شده از سلول‌های بنیادی پیوندی باعث می‌شوند که یا خود این سلول‌ها به سلول‌های عصبی تمایز یابند و جایگزین سلول‌های آسیب دیده شوند و یا سلول‌های اطراف تحت تأثیر این فاکتورها به سلول‌های عصبی تمایز یابند (۲۵،۲۶). بنابراین این موضوع می‌تواند یکی از دلایل احتمالی کسب بهبودی در پژوهش حاضر باشد. در تأیید این موضوع، توماس و همکاران (۲۰۱۱) نیز طی پژوهشی که در زمینه پیوند سلول بنیادی در بیماران پارکینسونی انجام دادند بیان کردند که سلول‌های بنیادی مغز استخوان یک منبع ایده آلی از سلول‌ها هستند که قابلیت تبدیل شدن به سلول‌های دوپامینرژیک را دارند که کاربرد آن به لحاظ اخلاقی قابل قبول بوده و نیز به آسانی استخراج و پیوند زده می‌شوند (۲۷). وال^۲ و همکاران (۲۰۰۸) نیز در یک مقاله مروری اذعان داشتند که انواع مختلفی از سلول‌های بنیادی و مکانیسم‌های مربوطه وجود دارد که بوسیله آنها می‌توان بازسازی و یا فعال کردن عوامل رشدی مختلف با استفاده از سلول‌های بنیادی در بافت یا دستگاه مربوطه را تحریک کرد (۲۵).

در پژوهش حاضر، نقش ورزش در بهبود شاخص‌های رفتاری موش‌ها بسیار با اهمیت‌تر می‌باشد. در این زمینه، نتایج تاجیری و همکاران (۲۰۱۰) موافق با نتایج کسب شده در پژوهش حاضر است. این پژوهشگران نیز دریافتند که تمرین سبب کاهش تعداد چرخش‌های انجام شده توسط موش‌ها در تست چرخشی و همچنین کاهش عدم تقارن حرکتی موش‌های پارکینسونی در تست سیلندر می‌شود. آنان بهبود حاصل شده در عملکرد رفتاری موش‌ها را ناشی از افزایش قدرت عضلانی و بهبود سرعت پاسخ به دنبال انجام تمرین دانسته‌اند و اظهار داشتند که تمرین از این طریق می‌تواند آثار محافظتی و رشد عصبی در بیماران پارکینسونی داشته باشد (۱۹). آلبوت^۳ و همکاران (۲۰۰۷) عملکرد رفتاری موش‌های پارکینسونی را با استفاده از تست تعادل ارزیابی کردند که یافته‌های آنها نیز تا حدودی همسو با این پژوهش است. آنان به این نتیجه دست یافتند که تمرین زمان اجرای تست تعادل را در موش‌های بیمار کاهش می‌دهد اما این کاهش معنی‌دار نمی‌باشد (۲۲).

در همین راستا، مورای^۴ و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که ورزش می‌تواند یک رویکرد کاملاً منطقی برای توسعه درمان‌های محافظتی و عصبی برای بیماری پارکینسون باشد. ورزش باعث افزایش تولید انرژی، تحریک دفاع آنتی اکسیدانی، کاهش التهاب، افزایش رگ زایی و استحکام سیناپسی می‌شود که از این طریق می‌تواند

۲. Wahl

۳. Allbutt

۴. Murray

سبب ایجاد سازگاری‌های مهم فیزیکی و متعاقب آن درمان اختلالات حرکتی بیماران پارکینسونی گردد (۲۷). محققان به طور گسترده‌ای به توافق در زمینه اثرات ورزش در مقابل سم ۶ هیدروکسی دوپامین دست یافته‌اند. نتایج در این زمینه اشاره می‌کند ورزش چه از نوع چرخ دوار و یا تردمیل در کاهش از دست رفتگی سلول‌های دوپامین موثر می‌باشد. این نتایج با سایر تحقیقات انجام شده در این زمینه همسو می‌باشد (۵).

در چند مطالعه کنترل شده بالینی، اجرای مستمر برنامه‌های ورزشی در افرادی که در مراحل اولیه بیماری پارکینسون بودند منجر به بهبود فعالیت روزانه، عملکردهای حرکتی و به طور کلی استقلال در عملکرد و رفتار شده است. نشان داده شده است که ورزش هوازی می‌تواند باعث آزاد سازی دوپامین در مغز انسان شود (۲۸، ۲۹). به نظر می‌رسد، بهبود عصبی و رفتاری حاصل از ورزش در مدل پارکینسونی می‌تواند با بهبود عملکرد و افزایش تعداد میتوکندری در مناطق مختلف مغز ارتباط داشته باشد. پژوهش‌های اخیر، این نقش را برای عوامل نوروتروفیک و سلول‌های گلیا نیز قائل شدند (۲۸، ۳۴).

در پژوهش حاضر، بررسی اثر تعاملی تمرین و تلقیح سلول بنیادی نشان داد که تمرین در مقایسه با تلقیح سلول نقش بیشتری را در بهبود رفتاری موش‌های پارکینسونی ایفا می‌کند. با توجه به مکانیسم‌های مطرح شده در پژوهش‌های اخیر، می‌توان بهبود حاصل شده در آزمون‌های رفتاری پژوهش حاضر را احتمالاً ناشی از افزایش تعداد میتوکندری و عوامل نوروتروفیک در مغز پس از انجام تمرین و نیز اثر تحریکی تمرین بر روی سلول‌های بنیادی تلقیح شده جهت تبدیل به سلول‌های دوپامینرژیک و از طرفی بهبود قدرت عضلانی و افزایش سرعت ناشی از تمرین دانست. به طور کلی، مجموع نتایج بررسی‌های رفتاری نشان داد که با تلقیح سلول‌های بنیادی مغز استخوان به حیوانات مدل پارکینسونی و به دنبال آن انجام تمرینات ورزشی، می‌توان گام مهمی را در جهت بهبود رفتاری بیماری پارکینسون برداشت و می‌توان از آن به عنوان یک روش درمانی غیردارویی بهره برد.

منابع

1. Zigmond MJ, Smeyne RJ. 2014. Exercise: Is it a neuroprotective and if so, how does it work? *Parkinsonism & related disorders*. 20: 123-127.
2. Young HE, Hyer L, Black Jr AC, Robinson JS. 2013. Treating Parkinson Disease with Adult Stem Cells. *Journal of Neurol Disorder*. 1(2):1-8.
3. Haji Ghasem Kashani M, Ghorbanian MT, Hosseinpour L. 2013. Transplantation of Deprenyl-Induced Tyrosine Hydroxylase-Positive Cells Improves 6-OHDA-Lesion Rat Model of Parkinson's Disease: Behavioral and Immunohistochemical Evaluation. *Cell Journal (Yakhteh)*. 15(1):55-64.
4. Han-Sam Cho, Mal-Soon Shin, Wook Song, Tae-Won Jun, Baek-Vin Lim, Young-Pyo Kim, Chang-Ju Kim. 2013. Treadmill exercise alleviates short-term memory impairment in 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's rats. *Journal of Exercise Rehabilitation*. 9(3):354-361.
5. Anstrom KK, Schallert T, Woodlee MT, Shattuck A, Roberts D. 2007. Repetitive vibrissae-elicited forelimb placing before and immediately after unilateral 6-hydroxydopamine improves outcome in a model of Parkinson's disease. *Behavioural brain research*. 179(2): 183-191.
6. Choe, M., Koo, B. S., An, G. J., & Jeon, S. 2012. Effects of Treadmill Exercise on the Recovery of Dopaminergic Neuron Loss and Muscle Atrophy in the 6-OHDA Lesioned

- Parkinson's Disease Rat Model. The Korean Journal of Physiology & Pharmacology. 16(5), 305-312.
7. Wang Tao, Liu Yan-Yong, Wang Xin, Yang Nan, Zhu Hai-Bo, Zuo Ping-Ping. 2010. Protective effects of octacosanol on 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rats via regulation of ProNGF and NGF signaling. *Acta Pharmacologica Sinica*. 31: 765–774.
8. Chitsaz A, Maracy M, Basiri K, Izadi Boroujeni M, Tanhaei AP, Rahimi M, Meamar R. 2013. 25-Hydroxyvitamin D and Severity of Parkinson's Disease. *International journal of endocrinology*. 10(11):1-4.
9. Fallah-mohammadi Zia, Hajizadeh-Moghaddam Akbar, Aghasi Mohammad, Esmaeili Amirhossein. 2013. Neuroprotective effects of voluntary exercise and hydroalcoholic extraction of *Eriobotrya Japonica* on dopamine and tyrosine hydroxylase in the striatum of parkinsonian rats. *Koomesh*. 15 (1):31-38.
10. Fallah Mohammadi Z, Mohammadi R, Aslani J. 2014. Pretreatment Effects of *Eriobotrya Japonica* Extraction on Malondialdehyde (MDA), Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and Superoxide Dismutase (SOD) Levels in Hippocampus of Rats with Parkinson's Disease Induced by 6-hydroxydopamine Following 12 weeks of Voluntary Exercise. *Journal of Isfahan Medicin Scholar*. 32(274):120-30.
11. Radak Z, Kumagai Sh, Taylor AW, Naito H, Goto S. 2007. Effects of exercise on brain function: role of free radicals. *Applied Physiology Nutrition Metabolism*. 32(5):942-946.
12. Haji Ghasem Kashani Maryam, Tiraihi Taghi, Ghorbanian Mohammad Taghi, Abrari Kataneh. 2010. In Vitro Expression of BDNF, GDNF, NGF, NT3 and NT4/5 Genes in Selegiline Induced Bone Marrow Stromal Cells. *Yakhteh Medical Journal*. 11(4):400-407.
13. Capitelli CS, Lopes CS, Alves AC, Barbiero J, Oliveira LF, Silva VJ, Frazão MA. 2014. Opposite Effects of Bone Marrow-Derived Cells Transplantation in MPTP-rat Model of Parkinson's Disease: A Comparison Study of Mononuclear and Mesenchymal Stem Cells. *International Journal of Medical Sciences*. 11(10): 1049-1064.
14. Gibson ASJ, Gao GD, McDonagh K, Shen S. 2012. Progress on stem cell research towards the treatment of Parkinson's disease. *Stem Cell Research & Therapy*. 3(11):1-10.
15. Al-Jarrah, Muhammed. 2013. Exercise training and rehabilitation of brain in parkinson's disease. *Clinical Medicine Research*. 2(2):11-17.
16. Mabandla MV, Russell VA. 2010. Voluntary exercise reduces the neurotoxic effects of 6-hydroxydopamine in maternally separated rats. *Behavioural brain research*. 211(1):16-22.
17. Valero M. Carmen, Heather D. Huntsman, Jianming Liu, Kai Zou, Marni D. Boppart. 2012. Eccentric Exercise Facilitates Mesenchymal Stem Cell Appearance in Skeletal Muscle. *Plos One*. 7(1):1-11.
18. Fathi F, Altiraihi T, Mowla SJ, Movahedin M. 2010. Transplantation of retinoic acid treated murine embryonic stem cells & behavioural deficit in Parkinsonian rats. *Indian Journal Medicine Research*. 131:536-544.
19. Tajiri N, Yasuhara T, Shingo T, Kondo A, Yuan W, Kadota T, Wang F, Baba T, Tayra TJ, Morimoto T, Jing M, Hikuchi Y, Kuramoto S, Agari T, Miyoshi Y, Fujino H, Obata F, Takeda I, Furuta T, Date I. 2010. Exercise exerts neuroprotective effects on Parkinson's disease model of rats. *Brain research*. 1310:200-207.

20. Landers MR, Kinney JW, Breukelen FV. 2014. Forced exercise before or after induction of 6-OHDA-mediated nigrostriatal insult does not mitigate behavioral asymmetry in a hemiparkinsonian rat model. *Brain research*. 1543: 263-270.
21. Nezhadi A, Ghazi F, Bakhtiari M, Ataiy Z, Mehdizadeh M. 2011. Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells in Dopaminergic Cells in Rat Model of Parkinson's Disease. *JAUMS*. 8(4):235-243.
22. Allbutt HN, Henderson JM. 2007. Use of the narrow beam test in the rat, 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience Methods*. 159:195-202.
23. Al-Jarrah M, Jamous M, Al-Zailaey K, O.Bweir S. 2010. Endurance exercise training promotes angiogenesis in the brain of chronic/progressive mouse model of Parkinson's Disease. *Neuro Rehabilitation*. 26(4):369-73.
24. Adami Raffaella, Scesa Giuseppe, Bottai Daniele. 2014. Stem cell transplantation in neurological diseases: improving effectiveness in animal models. *Cell And Developmental Biology*. 2(17):1-28.
25. Wahl P, Brixius K, Bloch W. 2008. Exercise-induced stem cell activation and its implication for cardiovascular and skeletal muscle regeneration. *Minimally Invasive Therapy*. 17(2):91-99.
26. Polgar S, Karimi L, Morris ME. 2013. Stem Cell Therapy for Parkinson's disease: Are Double-Blind Randomized Control Trials the Best Design for Quantifying Therapy Outcomes? *J Neurol Neurophysiol*. 4(5):1-6.
27. Thomas MG, Stone L, Evill L, Ong S, Ziman M, Hool L. 2011. Bone marrow stromal cells as replacement cells for Parkinson's disease: generation of an anatomical but not functional neuronal phenotype. *Transl Research*. 2(3):45-53.
28. Murray DK, Sacheli MA, Eng JJ, Stoessl AJ. 2014. The effects of exercise on cognition in Parkinson's disease: a systematic review. *Translational Neurodegeneration*. 3(5):1-13.
29. Villar-Cheda B, Sousa-Ribeiro D, Rodriguez-Pallares J, Rodriguez-Perez AI, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. 2008. Aging and sedentarism decrease vascularization and VEGF levels in the rat substantia nigra. Implications for Parkinson's disease. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 29(2): 230-234.