Physiology and Pharmacology, 12 (3), 194 - 200
Fall 2008 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Behavioral study of effects of mesenchymal stem cells transplant on motor deficits improvement in an animal model of Huntington's disease

Mohammad Amin Edalatmanesh [1], Ahmad Reza Bahrami [1,2*], Morteza Behnam Rasuli [2], Ali Moghimi [2], Maryam Moghadam Matin [1,2],Fatemeh Naseri [2]

1. Biotechnology & Tissue Engineering Research center, Ferdowsi University of Mashhad, Mashad, Iran
2. Dept. Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashad, Iran

Received: 6 Aug 2007 Revised: 10 Jul 2008 Accepted: 14 Jul 2008

Abstract

Introduction: Huntington's disease is an inherited neurodegenerative disease associated with widespread neuronal degeneration in neostriatum and neocortex. Progress of the disease causes disabling clinical effects on movements, cognition and physiology of the body, and finally results in death. Currently, there is no effective therapeutic strategy for diminishing the motor disabilities of Huntington's disease. In recent years, cellular transplantation has been an effective therapeutic method for neurodegenerative diseases.

Methods: In this study, the effects of bone marrow derived mesenchymal stem cells were assessed in an animal model of Huntington's disease. After causing ipsilateral lesion in the striatum with quinolinic acid, bone marrow derived mesenchymal stem cells which had been isolated and purified from 4-6 weeks old rats, were transplanted into the damaged striatum. The efficiency of cellular transplantation for improvement of motor disabilities was assessed by cylinder test and apomorphin induced rotation tests, during eight weeks after the transplant.

Results: Results showed significant improvement ($p < 0.0001$) in motor disability and the percentage of striatal atrophy.

Conclusion: According to these results, cell therapy with bone marrow derived adult stem cells seems promising for treatment of neurodegenerative diseases, especially Huntington's disease.

Keywords: Huntington's disease, Mesenchymal stem cells, Cell therapy, Drug induced rotation test, Quinolinic acid.

* Corresponding author e-mail: ar-bahrami@ferdowsi.um.ac.ir
Available online @: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۲ (۳)، ۱۹۴ – ۲۰۰
پاییز ۱۳۸۷

فیزیولوژی و فارماکولوژی

مطالعه رفتاری اثرات پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، بر بهبود اختلالات حرکتی در مدل حیوانی بیماری هانتینگتون

محمد امین عدالت منش[۱]، احمدرضا بهرامی[۱و۲*]، مرتضی بهنام رسولی[۲]، علی مقیمی[۲]، مریم مقدم متین[۱و۲]، فاطمه ناصری[۲]
۱. گروه تحقیقاتی بیوتکنولوژی سلولی و ملکولی- پژوهشکده‌ی فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران
۲. گروه زیست شناسی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

دریافت: ۱۶ مرداد ۸۶ بازبینی: ۲۰ تیر ۸۷ پذیرش: ۲۴ تیر ۸۷

چکیده

مقدمه: بیماری هانتینگتون نوعی اختلال نورودژنراتیو ارثی است که با تحلیل نورونی گسترده در نئواستریاتوم و نئوکورتکس همراه است و با پیشرفت بیماری، اثرات کلنیکی ناتوان کننده‌ای بر فعالیت‌های حرکتی، شناختی و فیزیولوژیکی بدن بر جا گذاشته و در نهایت منتهی به مرگ می‌شود. در حال حاضر هیچ روش درمانی که بتواند اختلال حرکتی بیماری هانتینگتون را به طور مؤثری برطرف نماید، در دسترس نیست. در سال‌های اخیر، کاشت سلولی به عنوان یک روش درمانی بالقوه برای برخی از بیماری‌های نورودژنراتیو مورد توجه قرار گرفته است. این مقاله، اثرات پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان را در مدل حیوانی بیماری هانتینگتون مورد بررسی قرار داده است.

روش‌ها: پس از ایجاد ضایعه یک طرفه در استریاتوم رت توسط کوئینولینیک اسید، سلول‌های بنیادی مزانشیمی که از مغز استخوان رت‌های ۶-۴ هفته‌ای نژاد ویستار جداسازی و خالص‌سازی شده بودند، به استریاتوم ضایعه دیده پیوند زده شدند. توانایی پیوند سلولی برای بهبودی اختلالات حرکتی توسط تست چرخش القایی با آپومورفین و تست سیلندر طی ۸ هفته پس از پیوند سلولی بررسی شد. در بررسی‌های بافت‌شناسی حجم استریاتوم و درصد آتروفی محاسبه گردید.

یافته‌ها: نتایج به دست آمده نشان می‌دهند که کاشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، به شکل معنی‌داری ($p < ۰/۰۰۰۱$) موجب بهبودی اختلالات حرکتی و جلوگیری از آتروفی استریاتوم می‌شود.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج حاصله از این تحقیق، سلول درمانی با استفاده از سلول‌های بنیادی بالغ مغز استخوان می‌تواند نویدی برای درمان بیماری‌های نورودژنراتیو به ویژه هانتینگتون محسوب شود.

واژه‌های کلیدی: بیماری هانتینگتون، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول درمانی، تست چرخش القایی، کوئینولینیک اسید

مقدمه

بیماری هانتینگتون، بیماری علاج ناپذیری است که در دوران بلوغ رخ می‌دهد. این بیماری، نوعی بیماری نورودژنراتیو ارثی است و به وسیله‌ی تکرارهای CAG در ناحیه‌ی کد کننده‌ی ۵' ژن *HD* (کد کننده‌ی پروتئین هانتینگتون که در تمام بافت‌ها بیان می‌شود) ایجاد می‌شود. تکرارCAG به طور طبیعی کمتر از ۳۶ بار است و اگر تکرار آن بیش از ۳۹ بار باشد، بیماری به وجود می‌آید. پیشرفت بیماری موجب بروز اثرات کلینیکی ویران کننده‌ای بر فعالیت‌های حرکتی، شناختی و فیزیولوژیک [۱۶، ۱۹ و ۲۸] شده و معمولاً ۱۸ سال بعد از شروع بیماری منتهی به مرگ

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: ar-bahrami@ferdowsi.um.ac.ir
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

می‌شود. این نشانه‌های کلینیکی، با مرگ پیشرونده‌ی نورون‌های خاردار متوسط گاباارژیک در استریاتوم و لایه‌های عمقی کورتکس همراه است و در طی مراحل بعدی بیماری دژنراسیون نورونی نواحی وسیعی از مغز شامل هیپوتالاموس و هیپوکامپ را نیز در برمی‌گیرد [۲۸ و ۲۹].

بیماری هانتینگتون، در استریاتوم بر جمعیت‌های نورونی متفاوتی اثر می‌گذارد و اثرات آن بر نورون‌های پروژکسیونی بیشتر از نورون‌های بینابینی است [۲۸]. اولین و بیشترین نورون‌هایی که متأثر می‌شوند، نورون‌های پروژکسیونی هستند که میانجی گابا آمینوبوتریک اسید (GABA) و انکفالین (Enk) یا ماده‌ی P آزاد می‌کنند [۲۸]. این نورون‌ها تقریباً ۹۰ درصد نورون‌های استریاتومی را تشکیل می‌دهند [۲۸].

در حال حاضر تأثیر روش‌های درمانی فارماکولوژیک در درمان بیماری هانتینگتون اندک است. درمان فارماکولوژیک تنها علائم بیماری را به طور نسبی کاهش می‌دهد [۱۳]. مشابه سایر بیماری‌های نورودژنراتیو، برای درمان بیماری هانتینگتون روش‌های درمانی مختلفی مانند بلوکه کردن نسخه‌برداری از ژن موتانت، افزایش فعالیت چاپرون، درمان تلفیقی میتوکندریایی و بیوانرژیک سلولی و ممانعت از آپوپتوزیس پیشنهاد می‌شود [۳ و ۱۳].

پیشرفت‌های اخیر در زمینه‌ی سلول درمانی نشان داده‌اند که سلول‌های مناسب پیوند را می‌توان از تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی در محیط کشت به دست آورد. این یافته‌ها درمان اختلالات نورودژنراتیو انسانی با استفاده از سلول‌های بنیادی را تقویت کرده است. در این رابطه پیوند سلول‌های بنیادی پیش‌ساز نورونی در استریاتوم افراد مبتلا به بیماری هانتینگتون برای بازسازی مدارهای عصبی عملکردی، هدف برنامه‌های تحقیقاتی اخیر بوده است [۱۹].

برای رسیدن به هدف اصلی سلول درمانی در بیماری هانتینگتون که همانا بقای سلول‌های استریاتومی است، پیوند بافت استریاتوم جنینی کارآمدی لازم را ندارد. با توجه به گسترش نامحدود سلول‌های بنیادی در محیط کشت و استعداد بالقوه‌ی آن‌ها برای تمایز به فنوتیپ مورد نظر، پیوند سلول‌های بنیادی می‌تواند جوابگوی نیازهای سلول درمانی در بیماری‌های نورودژنراتیو باشد.

مواد و روش‌ها

در تمام مراحل این تحقیق از رت‌های نر نژاد ویستار، حدوداً دو ماهه با میانگین وزنی حدود ۲۵۰ گرم به عنوان مدل حیوانی استفاده شد. رت‌ها تحت شرایط استاندارد دما (۲۵ ±۲ °c) و رطوبت نگهداری شدند. تغذیه با آب و غذا (*ad libitum*) صورت گرفت.

برای خالص سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی و به دست آوردن جمعیت نسبتاً همگنی از سلول‌ها از روش فریدنستین استفاده شد [۸]. به طور خلاصه، پس از جدا کردن پوست و عضلات از استخوان‌های ران و درشت نی، دو انتهای هر استخوان برای دستیابی به لومن استخوان قطع گردید. سپس با استفاده از سرنگ حاوی محیط کشت، مغز استخوان با فشار خارج و با PBS شستشو داده شد. بعد از دو مرحله سانتریفوژ با دور ۴۰۰ و زمان ۵ دقیقه سلول‌ها در محیط کشت DMEM حاوی ۱۵ درصد سرم جنینی گاو و ۰/۰۱ درصد آنتی بیوتیک (پنی‌سیلین/ استرپتومایسین) وارد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور (با دمای ۳۷درجه و CO_2 ۵ درصد) قرار گرفت. پس از آن با خارج کردن روشناور (سلول‌های خونی و جمعیتی از سلول‌های بنیادی غیر چسبنده) سلول‌های چسبیده به ته فلاسک که عمدتاً سلول‌های مزانشیمی و استرومایی مغز استخوان می‌باشند، مجدداً با محیط کشت فوق کشت داده شدند. با تغییر رنگ، محیط کشت هر ۲ روز یک بار تعویض شد. این دوره‌ی رشد تا ظهور سلول‌های فیبروبلاست مانند و تشکیل کلونی‌ها دنبال گردید و سرانجام با پر شدن کف فلاسک از سلول، سلول‌ها تریپسینه شده و پاساژ داده شدند. جمعیت به ظاهر همگن سلول‌های فیبروبلاست مانند جهت بررسی قابلیت‌های تمایزی در شرایط آزمایشگاهی، با استفاده از القاگر رتینوئیک اسید (RA, 10^{-2} μm) به سمت سلول‌های عصبی تمایز یافتند که با آنالیز فلوسایتومتری و استفاده از مارکر A2B5 (مارکر گانگلیوزیدی سطح نورون) به اثبات رسید (نتایج آورده نشده است).

به منظور ایجاد مدل بیماری هانتینگتون، ابتدا حیوانات با مخلوطی از دو داروی کتامین هیدروکلراید (۱۰۰ mg/kg) و زایلازین (۵ mg/kg) بیهوش شدند. پس از القای بیهوشی، برشی در حدود ۱ سانتی‌متر در پوست سر و در امتداد با محور

بزرگ بدن ایجاد و با استفاده از کورت تمامی بافت و عضله‌ی زیر پوست سر و بالای جمجمه کورتاژ شد. بدین ترتیب، نقاط لامبدا (نزدیک محل اتصال استخوان‌های آهیانه با استخوان پس‌سری) و برگما (محل اتصال استخوان‌های آهیانه با استخوان پیشانی) مشخص شدند. به منظور دست‌یابی به ناحیه‌ی استریاتوم (هسته‌ی دمدار و پوتامن) جراحی استریوتاکسیک صورت گرفت. بدین منظور با تعیین مختصات استریاتوم با استفاده از اطلس پاکسینوس و واتسون (AP: 1 mm، ML: 2.8 mm، DV: 5 mm) نقطه‌ی مورد نظر برای وارد کردن سوزن هامیلتون مشخص, سوزن به درون موضع وارد و مقدار ۲ میکرولیتر کوئینولینیک اسید (QA, 200 µM, Merck) به درون استریاتوم تزریق گردید.

تزریق QA به صورت بسیار آهسته و در یک دوره‌ی زمانی ۵ دقیقه‌ای انجام شد. از آن‌جایی که پس از پایان تزریق، سوزن را نباید یک مرتبه خارج کرد، بیرون کشیدن سوزن نیز در یک دوره‌ی زمانی ۳ دقیقه‌ای انجام شد. برای این کار ابتدا سوزن به کمک اهرم تا نیمه بالا آورده شد و پس از یک وقفه‌ی یک دقیقه‌ای مابقی سوزن به آهستگی خارج گردید. پس از بخیه زدن موضع جراحی و تا زمان به هوش آمدن کامل حیوان، بدن حیوان به وسیله‌ی پتوی برقی گرم نگهداشته شد. در طی این مدت علائم حیاتی، وضعیت تنفس، تعداد ضربانات قلب و دمای بدن کنترل شد.

در روز هفتم بعد از القای ضایعه، پیوند سلولی در رت‌های گروه تست انجام شد. در روز پیوند ابتدا پس از تریپسینه کردن سلول‌ها و متعاقب آن سانتریفوژ نمودن محتویات فلاسک در دور ۴۰۰ و زمان ۵ دقیقه تفکیک سلول‌ها از محیط کشت انجام شد و سلول‌ها تا زمان پیوند در درون یخ نگهداری شدند. پس از آماده‌سازی رت‌ها جهت پیوند سلول، ۲۰۰۰۰۰ سلول به همراه ۷ میکرولیتر حامل سلولی (PBS) به درون استریاتوم رت‌های گروه تست تزریق شد. تزریق بسیار آهسته و در دوره‌ی زمانی ۵ دقیقه‌ای و خارج کردن سوزن نیز به آهستگی صورت گرفت. رت‌های گروه شم فقط حامل سلولی دریافت داشتند. در پایان هر جراحی و به منظور جلوگیری از عفونت‌های احتمالی به هر یک از رت‌ها، ۵۰۰۰۰unit/kg پنی‌سیلین به صورت درون صفاقی تزریق شد [۶، ۷ و ۲۴].

پس از پیوند سلولی و به منظور ارزیابی بهبودی حاصله از پیوند، تست‌های رفتاری انجام شد. در این تحقیق از دو تست چرخش القایی با آپومورفین و تست سیلندر استفاده شد [۱۷، ۲۰].

تست چرخش القایی با آپومورفین در هفته‌ی اول، چهارم و هشتم پس از پیوند سلولی در رت‌های گروه شم و آزمون انجام شد. برای آشنایی حیوانات با شرایط آزمایش چند دقیقه قبل از شروع، حیوانات در استوانه‌ای که بدین منظور طراحی شده بود، قرار گرفتند. این استوانه ۲۰ سانتی‌متر قطر و ۳۰ سانتی‌متر ارتفاع و از جنس پلکسی‌گلاس ساخته شده بود. با تزریق درون صفاقی، هر یک از رت‌ها مقدار ۱ mg/kg آپومورفین (آپومورفین با ۰/۳ درصد اسکوربات محلول در سالین) دریافت نمودند. پس از آن به مدت یک ساعت تعداد چرخش‌های هم جهت با نیمه‌ی آسیب دیده‌ی مغز (ipsilateral) و چرخش‌های هم جهت با نیمه‌ی سالم مغز (contralateral) شمارش و تعداد چرخش‌های contralateral از ipsilateral کم شد. تمامی مراحل آزمایش با استفاده از دوربین مدار بسته‌ای که در بالای سیلندر نصب شده بود، ثبت گردید [۹، ۱۲ و ۱۴].

بلافاصله بعد از تخریب استریاتوم نیمکره‌ی راست، فلج شدگی در دست چپ بروز می‌کند. در تست سیلندر نسبت استفاده از دست فلج شده به دست سالم محاسبه می‌شود [۱۰ و ۱۸].

انجام این تست معمولاً در ساعاتی از شبانه‌روز که تحرک رت‌ها زیاد است، یعنی تاریک شدن هوا صورت می‌گیرد [۱۸]. در هر تست، دو بار متوالی و با فاصله‌ی زمانی یک ساعت رت‌ها در سیلندر شیشه‌ای یا پلکسی‌گلس به قطر ۱۰^{cm} و ارتفاع ۳۰^{cm} قرار داده شدند و هر بار که رت اقدام به خروج از سیلندر می‌نماید و دست خود را بر روی دیواره‌ی سیلندر قرار داد، بسته به این که دست چپ، راست یا هر دو دست را روی دیواره قرار داده باشد، نتایج ثبت شدند. پس از ۲۰ بار اقدام به خروج و قرار گرفتن دست بر روی دیواره حیوان به قفس خود بازگردانده شد و یک ساعت بعد این عمل تکرار شد.

برای انجام مطالعات بافت‌شناسی، حیوانات با مخلوطی از دو داروی کتامین هیدروکلراید (۱۰۰mg/kg) و زایلازین (۵ mg/kg) در هفته‌ی نهم پس از پیوند سلول بیهوش و به روش پرفیوژن ترانس‌کاردیالی مغزها فیکس شدند. برای بررسی‌های هیستولوژیک از رنگ‌آمیزی معمول آبی تولوئیدین استفاده شد (برای تهیه رنگ، مقدار ۰/۰۶۴ گرم آبی تولوئیدین در ۱۰۰^{cc} آب مقطر حل کرده از صافی عبور داده شد).

برای سنجش حجمی از قاعده‌ی کاوالیری استفاده شد. بر

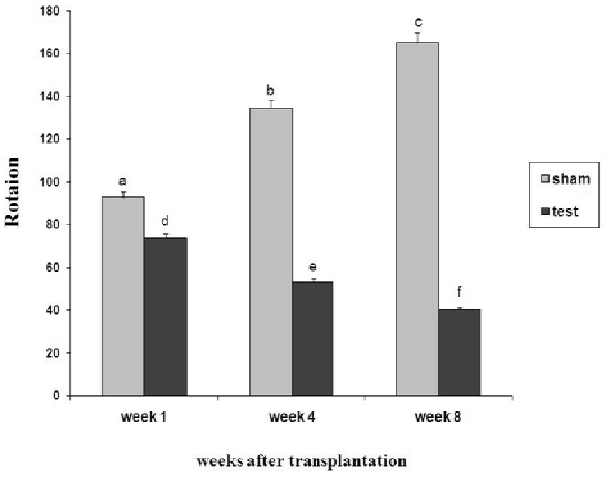
جدول ۱. نتایج حاصل از سنجش حجم استریاتوم در دو گروه تست و شم

گروه‌ها	شم		آزمون	
محل سنجش	نیمه‌ی ضایعه دیده (mm^3)	نیمه‌ی سالم (کنترل) (mm^3)	نیمه‌ی ضایعه دیده (mm^3)	نیمه‌ی سالم (کنترل) (mm^3)
حجم (میانگین ±SEM)	۳۰/۶۶۷ ±۲/۶	۵۲/۰۵۴ ±۳/۳	۵۱/۱۲۲ ±۷/۰۹	۵۶/۵۵۷ ±۸/۴

اساس قاعده‌ی کاوالیری، نقاط با توزیع یکنواخت در فواصل طولی و عرضی برابر روی صفحه‌ی ترنس‌پرنسی که درون فضای استریاتوم تصاویر به دست آمده قرار می‌گیرند؛ شمارش می‌شوند ($\sum P$). بدین ترتیب، مساحت سطح مقطع استریاتوم، بدست می‌آید. این عمل برای برش‌های سریال تکرار می‌شود و بدین ترتیب مجموع سطح مقطع ($\sum A$) استریاتوم حاصل و از طریق فرمول: $V = \sum A \times h$ حجم استریاتوم به دست می‌آید. در این فرمول، h فاصله‌ی بین برش‌های سریال یعنی ۲۵۰ میکرون و $A = \sum P \times a$ می‌باشد. در این آزمون، فاصله‌ی بین نقاط (a) با توجه به بزرگ‌نمایی برابر با $1mm^2$ خواهد شد.

بدین ترتیب می‌توان حجم کلی استریاتوم را به دست آورد. در نمونه‌های تست و شم، یک نیمکره که مورد پیوند یا تزریق حامل سلولی قرار گرفته است (نیمه‌ی ضایعه دیده‌ی مغز) به ترتیب به عنوان تست و شم و نیمکره‌ی مقابل (نیمه‌ی سالم مغز) به عنوان کنترل در نظر گرفته شد.

پس از محاسبه‌ی حجم استریاتوم، درصد آتروفی (حجم استریاتوم سالم- حجم استریاتوم ضایعه دیده تقسیم بر حجم استریاتوم سالم ضربدر ۱۰۰) محاسبه گردید.

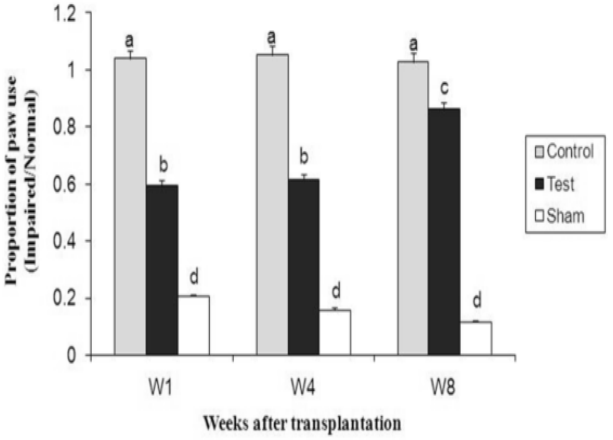


شکل ۱- نتایج حاصل از تست چرخش القایی با آپومورفین. ستون‌های هم نام با یکدیگر اختلاف معنی‌داری در سطح $p \leq ۰/۰۵$ ندارند.

یافته‌ها

نتایج به دست آمده از آزمون چرخش القایی با آپومورفین در دو گروه شم و تست و در طی سه هفته‌ی اول، چهارم و هشتم به دنبال پیوند انجام شد. آنالیز واریانس و آزمون توکی برای اثر زمان و پیوند مورد بررسی قرار گرفت و در سطح معنی‌داری $p \leq ۰/۰۵$ اختلاف معنی‌دار بین گروه شم وتست در ارتباط با اثر پیوند سلول دیده شد ($p \leq ۰/۰۰۰۱$). با گذشت زمان، کاهش نسبی تعداد چرخش در گروه تست و افزایش نسبی تعداد چرخش در گروه شم دیده شد. بررسی اثر زمان بیانگر اختلاف معنی‌داری در گروه تست طی هفته‌ی اول با هفته‌ی چهارم و هشتم ($p \leq ۰/۰۰۰۱$) و گروه شم طی هفته‌ی اول با هفته چهارم و هشتم ($p \leq ۰/۰۰۰۱$) می‌باشد. در دو گروه شم و تست اختلاف معنی‌دار در هفته‌ی چهارم با هفته‌ی هشتم دیده نشد.

در آزمون سیلندر اثر پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی در بهبود عملکرد، طی سه هفته‌ی اول، چهارم و هشتم پس از پیوند



شکل۲- نتایج حاصل از تست سیلندر ستون‌ها هم نام با هم تفاوت معنی‌دار ندارد.

مطالعه شد. نسبت استفاده از دست فلج (دست چپ) به دست سالم (دست راست) در گروه‌های کنترل، شم و تست مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از آن است که پیوند سلول در سه گروه کنترل، شم و تست اثر معنی‌داری دارد ($p\leq ۰/۰۰۰۱$). با گذشت زمان درگروه‌های کنترل و شم اختلاف معنی‌داری دیده نشد، در حالی که در گروه تست بین هفته‌ی اول و هشتم اختلاف معنی‌داری ($p\leq ۰/۰۱$) وجود دارد.

نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی حاکی از آن است که اختلاف معنی‌داری بین نتایج حاصل از اندازه‌گیری حجم استریاتوم بین گروه شم و تست ($p\leq ۰/۰۰۰۱$) و بین گروه کنترل و شم ($p\leq ۰/۰۰۰۱$) وجود دارد، در حالی که بین گروه تست و کنترل اختلاف معنی‌داری دیده نمی‌شود (جدول ۱).

در بررسی میزان آتروفی استریاتوم، نتایج حاکی از آتروفی حدود ۴۱ درصدی گروه شم (۴۰/۹۵۳±۰/۵۷) در برابر آتروفی حدود ۹/۵ درصدی گروه تست (۹/۴۴۳±۰/۲۵) می‌باشد که نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار بین گروه تست و شم است ($p\leq ۰/۰۰۰۱$).

بحث

تحقیق اخیر، تجربه‌ی استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در درمان اختلالات حرکتی ایجاد شده با کوئینولینیک اسید در مدل حیوانی بیماری هانتینگتون در رت‌های نژاد ویستار می‌باشد. بر این اساس و طبق انجام آزمایشات رفتاری مشخص شد که سلول‌های بنیادی مغز استخوان قادرند نواقص حرکتی را در این بیماری نورودژنراتیو کاهش دهند و نوعی بهبودی نسبی ایجاد نمایند. این بهبودی حرکتی با استفاده از تست سیلندر و تست چرخش القایی با آپومورفین مورد تأئید قرار گرفت. به طوری که تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل، گروه ضایعه دیده‌ی شم، و گروه تست در دو آزمون متوالی دیده شد.

اگرچه استفاده از سلول‌های بنیادی مغز استخوان در درمان بیماری‌های نورودژنراتیوی مانند پارکینسون نتایج خوبی داشته است [۲۳ و ۳۰]، در عین حال تنها در یک تحقیق عنوان شده است که سلول‌های بنیادی مغز استخوان قادرند اختلالات شناختی را در مدل حیوانی بیماری هانتینگتون کاهش دهند [۲۴] ولی هیچ تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های کنترل، گروه تیمار شده با کوئینولینیک اسید و گروه دریافت کننده‌ی سلول در تست جابه‌جاکردن پنجه‌ی دست و تست شنای اجباری مشاهده نکردند. بنابراین، به این نتیجه رسیده‌اند که اثر سودمند سلول‌های پیوندی، احتمالاً بهبود عملکرد حافظه‌ای است که با کاهش اختلال حافظه‌ی کاری نمود پیدا می‌کند [۱].

محتوای مغز استخوان، شامل سلول‌های بنیادی خون‌ساز و سلول‌های بنیادی مزانشیمی است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی در شرایط *in vivo* و *in vitro* قادرند به سلول‌های عصبی تمایز یابند [۲، ۴، ۱۵، ۲۲، ۲۵ و ۳۱]. اگرچه بعضی از محققین به دلیل مشکلات ناشی از رد پیوند سلول‌های بنیادی مغز استخوان را به صورت اتولوگ پیوند زدند، ولی هرگز به اثرات هیپوایمنوژنیسیته‌ی سلول‌های بنیادی مزانشیمی که در مطالعات مختلف بدان اشاره شده است؛ نپرداخته‌اند [۱]. این درحالی است که در تحقیق ما پیوند آلوگرافت سلول‌های بنیادی مزانشیمی انجام شد و در هر دو آزمون هیچ اثری از رد پیوند، ایجاد تومور یا پاسخ‌های التهابی پیوندی و سایر پاسخ‌های ایمنولوژیک دیده نشد. از این رو، در تمام مراحل آزمایش هیچ گونه نیازی به استفاده از داروهای سرکوبگر ایمنی احساس نشد.

در یک مطالعه از جمعیت سلولی استفاده شده است که حدود ۰/۱ درصد آن سلول‌های بنیادی مزانشیمی بودند، با این وجود این سلول‌ها پس از ده روز از پیوند ردیابی شدند اما این سلول‌های پیوندی فنوتیپ نورونی اندکی از خود نشان دادند، این احتمال داده شد که آزادسازی فاکتورهای رشد از سلول‌های پیوند یافته امکان بقای سلول‌ها در استریاتوم را فراهم کرده است [۱۹]. در تحقیق مذکور کاهش در اندازه‌ی ضایعه نیز ناچیز بوده است که با توجه به تعداد اندک سلول‌های جایگزین شده قابل توجیه می‌باشد. بر اساس این سوابق مطالعاتی در تحقیق حاضر تعداد بسیار بیشتری از سلول‌های بنیادی مزانشیمی نسبتاً خالص پیوند زده شد. نتایج حاصل بهبودی رفتاری قابل ملاحظه‌ای را نشان می‌دهد. این امر احتمالاً به دلیل استفاده از جمعیت خالص سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشد. در عین حال این امکان نیز وجود دارد که ملکول‌های مختلفی که از سلول‌های بنیادی مغز استخوان آزاد می‌شوند پاسخ‌های جبرانی را افزایش داده‌اند [۳۱]. سلول‌های بنیادی مغز استخوان قادرند

پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی (که تنظیم کننده‌ی رشد سلولی، مهاجرت و تمایز هستند) را بیان کنند [۱۹]. از این رو، در طی ترمیم عصبی تولید این گونه تنظیم کننده‌ها و فاکتورهای رشد می‌تواند نقش مؤثری بر تمایز پیش‌سازهای نورونی به فنوتیپ‌های مورد نظر داشته باشند [۳۱].

تخریب یک طرفه‌ی استریاتوم در مدل‌های حیوانی بیماری هانتینگتون باعث فلج‌شدگی نسبی یکی از دست‌ها می‌شود. در برخی از تحقیقات از تست سیلندر به منظور بررسی میزان فلج‌شدگی و نیز بازگشت آن استفاده شده است [۱۱]. در واقع، در این تست نسبت استفاده از دست فلج شده به دست سالم با گذشت زمان و پس از سلول درمانی بررسی می‌شود. تست‌هایی از این قبیل بهبودی عملکردی و برقراری مجدد مدارهای عصبی حرکتی را مورد بررسی قرار می‌دهند [۱۰ و ۱۴].

نتایج حاصل از تست چرخش القایی در پایان هفته‌ی اول، چهارم و هشتم پس از پیوند سلولی مؤید بهبودی رفتاری در گروه تست می‌باشد. کاهش نسبی تعداد دور چرخش در گروه دریافت کننده‌ی سلول و افزایش نسبی تعداد چرخش‌ها در گروه ضایعه دیده‌ی شم پس از گذشت هشت هفته بیانگر پایداری این بهبودی است. این پایداری احتمالاً نتیجه‌ی برقراری مجدد مدارهای عصبی ضایعه دیده می‌باشد.

با توسعه‌ی ناشی از گذشت زمان ضایعه در حیوانات تیمار شده با QA، اختلالات حرکتی نیز تشدید می‌شوند و نتایج حاصل از تست سیلندر و تست چرخش القایی با آپومورفین، اختلال حرکتی را مورد تأئید قرار می‌دهد. در مقابل، در حیوانات دریافت کننده‌ی پیوند، ضایعه و به تبع آن اختلالات حرکتی کمتر است. این یافته نشان می‌دهد که سلول‌های پیوندی احتمالاً جلوی دژنراسیون را می‌گیرند. در این رابطه تحقیقات قبلی نشان داده‌اند که سلول‌های پیوندی فاکتورهایی ترشح می‌کنند که با ممانعت از دژنراسیون نورونی موجب بهبود رفتاری می‌شوند [۲۶]. در عین حال در این تحقیقات، سلول‌های پیوندی، سلول‌های بنیادی نورونی بوده‌اند و نه سلول‌های بنیادی مزانشیمی. بر این اساس، استفاده از سلول‌های بنیادی مغز استخوان نیز ممکن است دارای اثرات حفاظت کنندگی باشد و از این رو بهبودی ناشی از پیوند این سلول‌ها ممکن است به دلیل ممانعت از دژنراسیون نورونی باشد و نه صرفاً جایگزینی آناتومیک سلولی [۲۳ و ۲۶].

تحقیق حاضر شاید اولین نشانه‌ای است که بیانگر بهبودی عملکردی بیماری هانتینگتون پس از سلول درمانی با استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی است. با پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی در استریاتوم، جایگزینی سلولی و برقراری مدارهای عصبی صورت می‌گیرد که با انجام تست‌های رفتاری اثبات و از این رو می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای مدل بیماری هانتینگتون احتمالاً با بهبود حرکتی همراه است. هرچند نیاز به انجام تحقیقات بیشتر به ویژه جهت بررسی پایداری بهبودی و بنابراین، افزایش طول دوره درمان ضروری به نظر می‌رسد. این مشاهدات توان بالقوه‌ی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در سلول درمانی بیماری‌های نورودژنراتیو را مورد تأئید قرار می‌دهد.

منابع

[1] Alhadlaq A, Mao JJ, Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. ***Stem Cells Dev*** 13 (2004) 436-448.

[2] Andsberg G, Kokaia Z, Klein LR, Muzyczka N, Lindvall O, Mandel JR, Neuropathological and behavioral consequences of adeno-associated viral vector-mediated continuous intrastriatal neurotrophin delivery in a focal ischemia model in rats. ***Neurobiol Dis*** 9 (2002) 187–204.

[3] Biesiadecki BJ, Brand PH, Koch LG, Metting PJ, Britton SL, Phenotypic variation in sensorimotor performance among eleven inbred rat strains. ***Am J Physiol*** 276 (1999) R1383-9

[4] Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM, From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. ***Science*** 290 (2000) 1775–9.

[5] Dunnet SB, Bjorklund A, Lindvall O, Cell therapy in Parkinson's disease: stop or go? ***Nat Rev Neurosci*** 2 (2001) 365-9.

[6] Dunnett SB, Rosser AE, Cell therapy in Huntington's disease. ***NeuroRx*** 1 (2004) 394–405.

[7] Huntington G, On Chorea. ***J Neuropsychiatry Clin Neurosci*** 15 (2003) 109-112.

[8] Jeong SW, Chu K, Jung KH, Kim SU, Kim M, Roh JK, Human neural stem cells transplantation promotes functional recovery in rats with experimental intracerebral hemorrhage. ***Stroke*** 34 (2003) 2258–63.

[9] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE,

Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM, Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. ***Nature*** 418 (2002) 41–9.

[10] Keene CD, Sonnen J, Montine TJ, Anatomic and histologic analysis of human fetal neural transplant survival and connectivity in two patients with Huntington's disease. ***Exp Neurol*** 198 (2006) 573.

[11] Kelly CM, Battersby A, Precious SV, Allen ND, Dunnett SB, Rosser AE, Neural stem cells for cell replacement therapy for Huntington's disease. ***Exp Neurol*** 198 (2006) 573.

[12] Kirik D, Georgievska B, Burger C, Winkler C, Muzyczka N, Mandel RJ, Bjorklund A, Reversal of motor impairments in parkinsonian rats by continuous intrastriatal delivery of L-dopa using rAAV-mediated gene transfer. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 99 (2002) 4708–13.

[13] Kirik D, Rosenblad C, Björklund, A, Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-Hydroxydopamine in the rat. ***Exp Neurol*** 152 (1998) 259–77.

[14] Kordower JH, Isacson O, Emerich DF, Cellular delivery of trophic factors for the treatment of Huntington's disease: is neuroprotection possible? ***Exp Neurol*** 159 (1999) 4–20.

[15] Kuhn HG, Palmer TD, Fuchs E, Adult neurogenesis: a compensatory mechanism for neural damage. ***Eur Arch Psychiatric Clin Nerosci*** 251 (2001) 152-8.

[16] Lebsanft HB, Mayerhofer A, Kovar KA, Schmidt WJ, Is the Ecstasy-induced ipsilateral rotation in 6-hydroxydopamine unilaterally lesioned rats dopamine independent? ***J Neural Transm*** 110 (2003) 707–18.

[17] Lee ST, Chu K, Park JE, Lee K, Kang L, Kim SU, Kim M, Intravenous administration of human neural stem cells induces functional recovery in Huntington's disease rat model. ***Neurosci Res*** 52 (2005) 243–9.

[18] Lee ST, Park JE, Lee K, Kang L, Chu K, Kim SU, Kim M, Roh JK, Noninvasive method of immortalized neural stem-like cell transplantation in an experimental model of Huntington's disease. ***J Neurosci Methods*** 152 (2006) 250–4.

[19] Lescaudron L, Unni D, Dunbar GL, Autologus adult bone marrow stem cell transplantation in an animal model of Huntington's disease: behavioral and morphological outcomes. ***Int J Neurosci*** 113 (2003) 945–56.

[20] McBride JL, Behrstock SP, Chen EY, Jakel RJ, Siegel I, Svendsen CN, Kodover JH, Human neural stem cell transplants improve motor function in a rat model of Huntington's disease. ***J Comp Neurol*** 475 (2004) 211–9.

[21] Melone MA, Jori FP, Pelus G, Huntington's disease: new frontiers for molecular and cell therapy. ***Curr Drug Targets*** 6 (2005) 43-56.

[22] Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher, SR, Turning blood into brain: Cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. ***Science*** 290 (2000) 1779–82.

[23] Roberts TJ, Price J, Williams SC, Modo M, Preservation of striatal tissue and behavioral function after neural stem cell transplantation in a rat model of Huntington's disease. ***Neuroscience*** 139 (2006) 1187–99.

[24] Ross CA, Margolis RL, Huntington's disease. ***Clin Neurosci Res*** 1 (2001) 142-152.

[25] Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sandberg PR, Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*. ***Exp Neurol*** 164 (2000) 247–56.

[26] Shi LH, Woodward DJ, Luo F, Anstrom K, Schallert T, Chang JY, High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus reverses limb-use asymmetry in rats with unilateral 6-hydroxydopamine lesions. ***Brain Res*** 1013 (2004) 98–106.

[27] Steindler DA, Pincus DW, Stem cells and neuropoiesis in the adult human brain. ***Lancet*** 359 (2002) 1047-54.

[28] Tayebati SK, Animal models of cognitive dysfunction. ***Mech Ageing Dev*** 127 (2006) 100–8.

[29] Winkler C, Kirik D, Bjorklund A, Cell transplantation in Parkinson's disease: how can we make it work? ***Trends Neurosci*** 28 (2005) 86–92.

[30] Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB, Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. ***J Neurosci Res*** 61 (2000) 364–370.

[31] Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC, Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. ***Exp Neurol*** 174 (2002) 11–20.