تاثیر ورزش تردمیل و سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان پیش شرطی‌شده با دی متیل اگزالیل گلیسین بر نوروتوکسیسیتی القاء شده توسط آمیلوئید بتا در موش‌های صحرائی نر بالغ

رخساره ابشناس [۱](M.Sc)، طیبه آرتیمانی [۲](Ph.D)، ایرج امیری [۲](Ph.D)، سیامک شهیدی [۱](Ph.D)، رضوان نجفی [۳](Ph.D)، سارا سلیمانی اصل [*۱](Ph.D)

۱- مرکز تحقیقات فیزیولوژی اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

۲ - مرکز تحقیقات اندومتر و اندومتریوزیس، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

۳- مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۱-۳۸۳۸۰۲۰۸ s.soleimaniasl@umsh.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۶/۱۱

چکیده

هدف: پیش شرطی کردن سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان روش امیدوارکننده‌ای برای افزایش قابلیت درمانی سلول‌های پیوند شده می‌باشد. در این مطالعه اثر درمانی سلول‌های بنیادی پیش شرطی شده با دی متیل اگزالیل گلیسین (DMOG) به همراه ورزش تردمیل را در مدل آلزایمر بررسی شد.

مواد و روش‌ها: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان به مدت ۲۴ ساعت با DMOG تیمار و سپس از طریق ورید دمی به موش‌های صحرائی مدل آلزایمری تزریق شدند. در کنار پیوند سلول، حیوانات به مدت یک ماه روی تردمیل ورزش گرفتند. سپس بیان ژن‌های bax, bcl-2, Nrf2, and NQO1 روش Real-time PCR بررسی گردید.

یافته ها: پیوند سلول‌های پیش شرطی شده تاثیر بیش‌تری در افزایش بیان ژن‌های فعال‌کننده آنتی‌اکسیدان (Nrf2, NQO1) و کاهش آپپتوزیس در مقایسه با سلول غیر شرطی داشت. در نهایت، انجام ورزش تردمیل به مدت یک ماه در کنار پیوند سلول‌های پیش شرطی شده با DMOG بیش‌ترین تاثیر حفاظتی عصبی را نشان داد.

نتیجه گیری: پیوند سلول‌های بنیادی تیمار شده با DMOG در کنار ورزش تردمیل ممکن است از طریق افزایش فاکتورهای آنتی‌اکسیدانی و کاهش آپپتوزیس اثرات حفاظتی در مدل آلزایمر داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: ورزش، آمیلوئید، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، اگزالیل گلیسین، آنتی‌اکسیدان‌ها، آپپتوزیس

مقدمه

بیماری آلزایمر یکی از فرم‌های رایج زوال شناختی می‌باشد که تا کنون درمانی برای آن گزارش نشده است. در این بیماری آمیلوئید بتا به فضای خارج سلولی ترشح می‌گردد و متعاقباً باعث مهار انعطاف‌پذیری سیناپسی و قدرت سلول‌های هیپوکمپ می‌شود. هم‌چنین پروتئین تائو هیپرفسفریله شده و در ادامه دولایه نوروفیبریلاری را در سلول‌های عصبی تشکیل می‌دهند که منجر به افزایش گونه‌های اکسیژن فعال در سلول‌های عصبی شده و در نهایت آپپتوزیس و مرگ نورونی در سلول‌های عصبی رت و موش می‌شود [۱].

آمیلوئید بتا منشاء استرس اکسیداتیو در مغز می‌باشد که ممکن است منجر به نورودژنراسیون گردد. هم‌چنین آمیلوئید بتا باعث اکسیداسیون پروتئین، پر اکسیداسیون لیپیدی، تولید رادیکال‌های آزاد، تجمع یون کلسیم و در نتیجه مرگ سولی می‌شود [۲].

از فعال‌کننده‌های اصلی پاسخ‌های آنتی‌اکسدانتی بدن فاکتور هسته‌ای اریتروئید (NRF2) می‌باشد که ژن‌های دیگری از قبیل NQO1 (NADPH quinoneooxido reductase)، HO-1 (Heme Oxygenase-1) را فعال کرده و از این طریق نقش مهمی را در ایجاد پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی ایفاء می‌کند. مطالعات در سال‌های اخیر نشان داده است که Nrf2 با افزایش بیان آنتی‌اکسیدان‌های وابسته به خود نقش مهمی در مهار اکسیداتیو استرس ایفا می‌کند [۳].

مطالعات حیوانی زیادی با هدف پیشگیری و در مواردی برای درمان بیماری آلزایمر انجام شده است که شامل استفاده از

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

[DOI: 10.29252/koomesh.22.2.325]

مواد شیمیائی، گیاهی و ورزش درمانی می‌باشد که تا به‌حال هیچ کدام در درمان آلزایمر موثر نبوده‌اند. پیشرفت‌های اخیر در علوم اعصاب رویکرد مهمی برای استفاده از سلول‌های بنیادی در درمان بیماری‌های نورودژنراتیو داشته است [۴].

با توجه به این‌که درصد بالائی از سلول‌های پیوندی طی آپپتوزیس از بین می‌روند بنابراین کاهش بقای سلول می‌تواند یکی از مشکلات مهم در سر راه درمان با سلول‌های بنیادی باشد [۵] که برای مقابله با این معضل می‌توان از پیش شرطی کردن برای افزایش کیفیت این سلول‌ها استفاده کرد [۶]. از روش‌های پیش شرطی کردن می‌توان به ایسکمی و هیپوکسی اشاره کرد که باعث فعال شدن مکانیسم دفاعی ذاتی می‌شوند. دوز غیر کشنده از هیپوکسی باعث افزایش بقاء و تکثیر سلول‌های بنیادی، تمایز عصبی، مهار فاکتورهای التهابی و پاسخ ایمنی، مهاجرت به سمت ناحیه‌ی آسیب‌دیده و ارتقاء کیفیت سلول می‌شود [۷]. مطالعات نشان می‌دهند که استفاده از مهارکننده‌های پرولیل هیدروکسیلاز از جمله(dimethyloxalylglycine) DMOG به عنوان عامل ایجادکننده هیپوکسی می‌تواند منجر به کاهش کاسپاز ۳ و آپپتوزیس در بافت‌های مختلف گردد [۸].

ورزش مزایای سلولی و ساختاری دارد که شامل بالا رفتن تولید نورون‌های جدید، گلیاها و عروق خونی، افزایش بیان نوروتروفین‌ها، بازسازی دندریت‌ها، تثبیت استرس، پاسخ‌ها و پیام‌دهی التهابی می‌باشند [۹]. برخی مطالعات اخیر، اثرات محافظتی و درمانی ورزش را به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نسبت می‌دهند [۱۰] به طوری که مطالعه Radak,Z و همکارانش نشان داد که ورزش منظم در حیوانات قدرت دفاع آنتی‌اکسیدانی را نسبت به گروه کنترل کم‌تحرک افزایش می‌دهد و هم‌چنین غلظت درون سلولی رادیکال‌های آزاد، قابلیت اتصال NF-KBبه DNA و نسخه‌برداری از ژن‌های التهابی را کاهش می‌دهد [۱۱]. اثرات مفید ورزش طولانی‌مدت و منظم در فعالیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش سطح پراکسیداسیون لیپیدی و پروتئینی مغز رت در بیش‌تر مطالعات گزارش شده است [۱۲،۱۰]. هم‌چنین طبق مطالعات، سلول‌های بنیادی جهت بقا، تمایز و حفظ سلول‌های میزبان مجاور، نیاز به ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مناسبی دارند. به نظر می‌رسد که ورزش با افزایش قابلیت آنتی‌اکسیدانی در عملکرد شناختی مغز موثر بوده و تغییراتی مانند افزایش پلاستیسیتی و نوروژنزیس را در مغز القاء می‌کند. بنابراین در مطالعه حاضر اثر توامان ورزش تردمیل و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان پیش شرطی شده با DMOG (به عنوان عامل ایجادکننده هیپوکسی و کاهنده آپپتوزیس در سلول‌های بنیادی) بر مرگ سلولی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در ناحیه هیپوکمپ رت‌های مدل آلزایمر بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مغز استخوان

در این مطالعه از سلول‌های بنیادی حاصل از طرح قبلی محققین که از نظر شاخص‌های سطحی ارزیابی شده بودند استفاده گردید [۱۳] که در زیر به طور خلاصه روش کشت آورده شده است. به طور خلاصه، بعد از بی‌هوش کردن رت‌های نر جوان ۸۰-۱۰۰ گرمی با کتامین/ گزیلایزین ۱۰/۱۰۰ میلی‌گرم به ازای یک کیلوگرم وزن حیوان مغز استخوان فمور و تیبیا تحت شرایط استریل جمع‌آوری و در درون یک فلاسک ۲۵ حاوی DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)، سرم و آنتی‌بیوتیک قرار گرفت و به داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ۵٪ CO2 منتقل شد. محیط سلول‌ها یک روز در میان تعویض گردید و در صورت پر شدن کف فلاسک با محلول تریپسین پنج صدم درصد پاساژ صورت گرفت. در نهایت سلول‌های پاساژ ۳ تا ۶ در فلاسک‌های ۷۵ به مدت ۲۴ ساعت در مواجه با دوز موثره (۷۵۰ میکرومول) قرار گرفتند [۱۳] و جهت تزریق آماده شدند.

گروه‌بندی حیوانات

۳۶ سر موش صحرایی نژاد ویستار در محدوده وزنی ۳۰۰-۲۵۰ گرم از آزمایشگاه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی همدان خریداری شده و در شرایط استاندارد آزمایشگاهی و دسترسی کامل به آب و غذا نگهداری شدند. تمام پروتکل‌های آزمایشی انجام شده توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی همدان (IR.UMSHA.REC.1396.99) تائید گردید. حیوانات به گروه‌های ۴ تایی و به ترتیب زیر تقسیم شدند:

گروه کنترل سالم

گروه sham جراحی: تحت عمل استریوتاکسی قرار گرفتند ولی هیچ داروئی دریافت نکردند.

گروه کنترل ورزش: رت‌های سالم به مدت یک ماه تحت ورزش تردمیل قرار گرفتند [۱۴].

گروه آلزایمر: با تزریق بتا- آمیلوئید در بطن طرفی مغز ایجاد شد.

گروه آلزایمر و ورزش: بعد از ایجاد مدل آلزایمر به مدت یک ماه تحت ورزش تردمیل قرار گرفتند.

گروه آلزایمر و BMSC: که ۱۴ روز بعد از ایجاد مدل آلزایمر سلول‌های BMSC را به صورت داخل وریدی دریافت کردند.

گروه آلزایمر و DMOG +BMSC: بعد از ایجاد مدل آلزایمر سلول‌های پیش شرطی شده BMSC را به صورت داخل وریدی دریافت کردند.

گروه آلزایمر، ورزش و BMSC: که ۱۴ روز بعد از ایجاد مدل آلزایمر سلول‌های BMSC را به صورت داخل وریدی

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

[DOI: 10.29252/koomesh.22.2.325]

دریافت کرده و به مدت یک ماه تحت ورزش تردمیل قرار گرفتند.

گروه آلزایمر، BMSC+DMOG و ورزش: بعد از ایجاد مدل آلزایمر سلول‌های پیش شرطی شده BMSC را به صورت داخل وریدی دریافت کرده و به مدت یک ماه تحت ورزش تردمیل قرار گرفتند.

ایجاد مدل آلزایمر و پیوند سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان

حیوانات با استفاده از کتامین (۱۰۰mg/kg) و گزیلایزین (۱۰mg/kg) بی‌هوش شده و به دستگاه استریوتاکسی منتقل گردیدند. پوست سر تراشیده شده و ناحیه برگما و لامبدا مشخص گردید. سپس بر اساس اطلس پاکسینوس مختصات مربوط به ناحیه بطن طرفی مغز تنظیم گردید. این مختصات عبارت بودند از: قدامی- خلفی: ۰/۹- ؛ طرفی ۳/۲؛ و پشتی ۱/۵ میلی‌متر. پس از سوراخ کردن ناحیه اخیر، آمیلوئید بتا (۴۲-۱) با استفاده از سرنگ همیلتون با دوز ۶ ماکروگرم تزریق گردید. گروه شم جراحی به جای آمیلوئید بتا نرمال سالین دریافت کردند. دو هفته بعد از ایجاد مدل تعداد یک میلیون سلول بنیادی در PBS حل شده و از طریق ورید دمی تزریق گردیدند [۱۵].

پروتکل ورزش هوازی

در ابتدا جهت آشنا شدن رت‌ها با دستگاه تردمیل، آن‌ها به مدت ۱۰ دقیقه طی ۷ روز و با سرعت کم (۱۰m/min) ورزش داده شدند. سپس با شیب صفر درجه ۱ ساعت در روز برای ۵ روز در هفته و به مدت یک ماه ورزش گرفتند. سرعت تردمیل در طول ورزش از ۱۸ متر در دقیقه به ۲۵ متر در دقیقه و زمان ورزش از روزی ۱۰ دقیقه به روزی ۳۰ دقیقه رسید. زمان به صورتی اضافه شد که رت‌ها در دو هفته آخر روزی ۳۰ دقیقه با حداکثر سرعت (۲۵ متر در دقیقه) ورزش کردند [۱۶].

بررسی بیان ژن‌ها با روش Real-Time PCR

برای بررسی بیان ژن‌های Nrf2 و NQ1 (از فعال‌کننده‌های اصلی بیان ژن‌های مربوط به پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی) و Bax و Bcl2 (از فاکتورهای مسیر داخلی آپپتوزیس) با روش Real-Time PCR، ابتدا RNA تام سلولی با روش فنل کلروفرم از بافت هیپوکمپ استخراج گردید. بدین صورت که بعد از پیپتاژ هیپوکمپ در ترایزول، ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به آن اضافه و در ۴ °C به مدت ۵ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. فاز رویی که حاوی RNA است به میکروتیوب جدید منتقل و به آن ایزوپروپانول اضافه شد. مخلوط حاصل دوباره در شرایط بالا به مدت ۱۵ سانتریفیوژ گردید. جهت شستشوی پلاک RNA از اتانول ۷۵٪ استفاده و پلیت نهایی در ۲۰ میکرولیتر آب مقطر حل گردید. بعد از اطمینان از سالم بودنRNA، با استفاده از کی RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis و طبق دستورالعمل شرکت سازنده، سنتز cDNA انجام شد. محصول واکنش تا زمان انجام PCR در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

Real-Time PCR

بعد از طراحی پرایمرهای اختصاصی با کمک نرم‌افزار Oligo 7 (جدول ۱)، Real-Time PCR با استفاده از SYBR Premix Ex Taq 2 Kit شرکت تاکارا انجام گرفت. دماها و زمان‌های واکنش مطابق دستورالعمل کیت تنظیم گردید (جدول ۲).

به منظور بررسی تفاوت میزان نسبی بیان ژن‌ها در گروه‌های مورد مطالعه از روش ΔΔCt که روش معمول بررسی میزان تفاوت بیان ژن qRT-PCR می‌باشد استفاده شد. ابتدا Ct value مربوط به مارکر و ژن رفرانس در هر نمونه از نتایج تست فوق استخراج و این دو عدد از یک‌دیگر کسر گردیدند. از اعداد به دست آمده (که ΔCt هر نمونه نامیده می‌شود) میانگین گرفته شد و بدین ترتیب یک میانگین در هر گروه مشخص گردید. این دو عدد از یک‌دیگر کسر شدند و نهایتاًΔΔCt به‌دست آمد که با به توان رساندن عدد ۲ با ΔΔCt میزان تفاوت بیان ژن‌های مورد مطالعه مشخص گردید.

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در واکنش Real-Time PCR

Gene	Forward primer	Reverce primer	Accession number	Annealing temperature
NQO1	CAGCGGCTCCATGTACT	GACCTGGAAGCCACAGAAG	NM_017000.3	61
Nrf2	CACATCCAGACAGACACCAGT	CTACAAATGGGAATGTCTCTGC	NM_031789.2	54
Bax	CCCCACCTGGAGTATTTT	ATCACGGGCGGACAGTAGACC	NM_017059	55
Bcl-2	CCCCACCTGGAGTATTTTGTG	ATCACGGGCGGACAGTAGACC	NM_016993	54
β-actin	CGCGAGTACAACCTTCTTGC	ATACCCACCATCACACCCTGG	NM_031144.3	60

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

[DOI: 10.29252/koomesh.22.2.325]

جدول ۲. دماها و زمان‌های واکنش Real-Time PCR

Real- tiem step	Temperature	Duration
Initial activation	95 ˚C	30 sec
38 cycles of Denaturation	95 ˚C	5 sec
Annealing	طبق جدول ۱ برای هر ژنی متفاوت بود.	30 sec
Extention	72 ˚C	30 sec

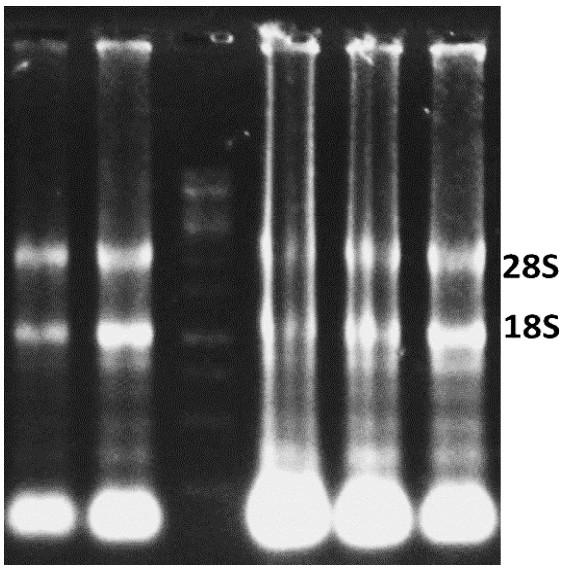
تجزیه و تحلیل داده‌ها

به‌منظور آنالیز آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS مدل ۲۰ استفاده شد. سطح معنی‌داری تست‌های آماری در مورد همه‌ی تست‌ها P≤۰/۰۵ در نظر گرفته شد. تمام داده‌ها بر اساس میانگین ±S.E.M نشان داده شدند. جهت مقایسه کمی از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و تست تعقیبی Tukey استفاده گردید.

نتایج

بررسی میزان بیان ژن‌های bax و bcl2 در بافت هیپوکمپ در گروه‌های مختلف

جهت بررسی ژن‌های bax و bcl2 از روش Real-time PCR استفاده شد و نتایج بر اساس میزان foldchang ارائه گردید. در ابتدا جهت اطمینان از سلامت RNA نمونه‌ها روی ژل الکتروفورز بررسی گردیدند که وجود باندهای RNA ریبوزومی srRNA۱۸ و srRNA۲۸ نشان‌دهنده سلامت و دست‌نخورده بودن نمونه و هم‌چنین حداقل اسمیر در الگوی باند نشان‌دهنده کیفیت عالی RNA می‌باشد (شکل ۱).



شکل ۱. بررسی سلامت و کیفیت RNA روی ژل الکتروفورز

در ارتباط با ژن bcl2 نتایج حاصل از آنالیز آماری داده‌های مربوط به foldchang این ژن نشان داد که در گروه آلزایمر بیان کم‌تری نسبت به گروه‌های کنترل، شم و تردمیل داشته است که این کاهش معنی‌دار بود (p<۰/۰۰۱) تجویز سلول چه به صورت غیر شرطی و چه به صورت شرطی شده با DMOG منجر به افزایش معنی‌دار بیان این ژن در مقایسه با گروه کنترل گردید (p<۰/۰۰۱) همین‌طور تفاوت معنی‌داری در گروه‌های دریافت‌کننده ورزش در مقایسه با گروه آلزایمر وجود داشت (p<۰/۰۰۱) بررسی‌های درون گروهی گروه‌های مختلف درمان نشان داد که گروه‌های آلزایمری که در کنار پیوند سلول (هم شرطی شده و هم غیر شرطی) به مدت یک‌ماه ورزش تردمیل را انجام دادند افزایش چشمگیری در بیان bcl-2 در مقایسه با گروه‌های دریافت‌کننده سلول غیر شرطی (p<۰/۰۱) و یا ورزش (p<۰/۰۰۱) به تنهائی داشتند که این نشانگر تاثیر بیش‌تر سلول در افزایش بیان این ژن می‌باشد (شکل ۲).

در رابطه با ژن پروآپپتوتیک bax نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان بیان این ژن در گروه آلزایمر به طور چشمگیری نسبت به گروه‌های کنترل، شم و تردمیل بیش‌تر بود (p<۰/۰۰۱) انجام ورزش تردمیل و پیوند سلول‌های بنیادی باعث کاهش میزان بیان bax در مقایسه با گروه آلزایمر گردید که در ارتباط با گروه‌های دریافت‌کننده ورزش با سلول غیر شرطی (p<۰/۰۵) و دریافت‌کننده سلول شرطی همراه با ورزش و یا بدون آن (p<۰/۰۱) معنی‌دار بود (شکل ۳).

بررسی میزان بیان ژن‌های Nrf2 و NQO1 در بافت هیپوکمپ در گروه‌های مختلف

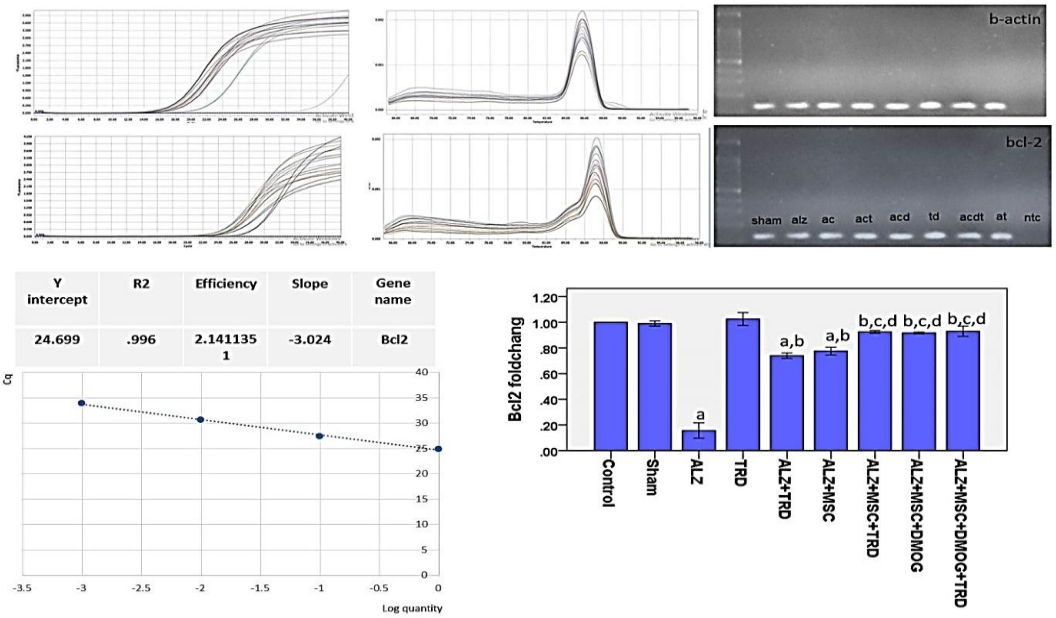
همان‌طوری که در بخش مقدمه ذکر گردید ژن‌های Nrf2 و NQO1 از فعال‌کننده‌های اصلی بیان ژن‌های مربوط به پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی می‌باشند و در این مطالعه بیان این ژن‌ها با روش Real-time PCR بررسی گردید. تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که میزان بیان هر دو ژن در گروه آلزایمر کاهش معنی‌داری نسبت به گروه‌های کنترل، شم و تردمیل داشت (p<۰/۰۵ و شکل ۴ برای ژن Nrf2 و p<۰/۰۰۱ و شکل ۵ برای ژن NQO1). تزریق سلول و همین‌طور انجام ورزش تردمیل میزان بیان Nrf2 را افزایش داد که این افزایش معنی‌دار نبود البته تفاوت نسبتاً معنی‌داری بین گروه دریافت‌کننده هم‌زمان سلول شرطی شده با DMOG و ورزش تردمیل با گروه آلزایمر وجود داشت (p=۰/۰۵۳). بررسی‌های درون گروهی گروه‌های مختلف درمان برای ژن NQO2 نشان داد که بیان این ژن به دنبال پیوند سلول غیر شرطی شده (p<۰/۰۵)، سلول شرطی و غیر شرطی با

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

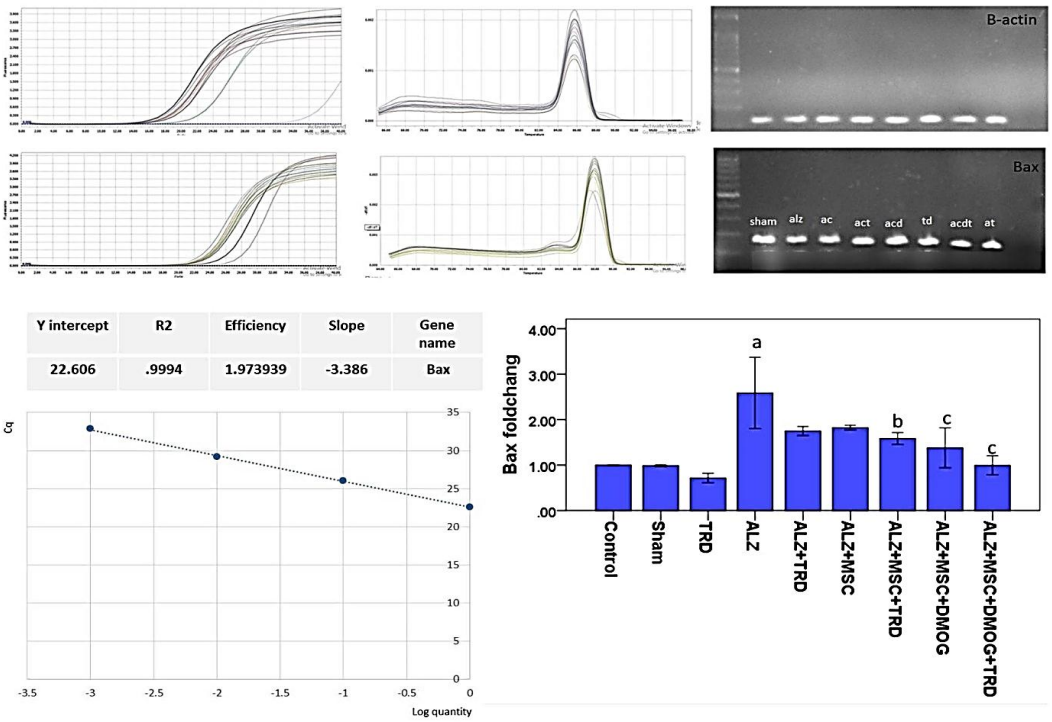
[DOI: 10.29252/koomesh.22.2.325]

ورزش (p<۰/۰۰۱) نسبت به گروه آلزایمر افزایش یافت. بررسی‌های بیش‌تر نشان داد که انجام ورزش در کنار پیوند سلول تاثیر بیش‌تری در بیان ژن NQO2 در مقایسه با گروهی داشت که بعد از تزریق آمیلوئید بتا به مدت یک‌ماه ورزش گرفته بودند (p<۰/۰۵) ولی پیوند سلول برای آن‌ها صورت نگرفته بود.

همین‌طور پیش شرطی کردن سلول با DMOG و تجویز آن همراه با ورزش و یا بدون آن بیان این ژن را در مقایسه با گروه آلزایمر دریافت‌کننده ورزش به تنهائی (p<۰/۰۱) و یا سلول غیر شرطی به تنهائی (p<۰/۰۵) افزایش داد.



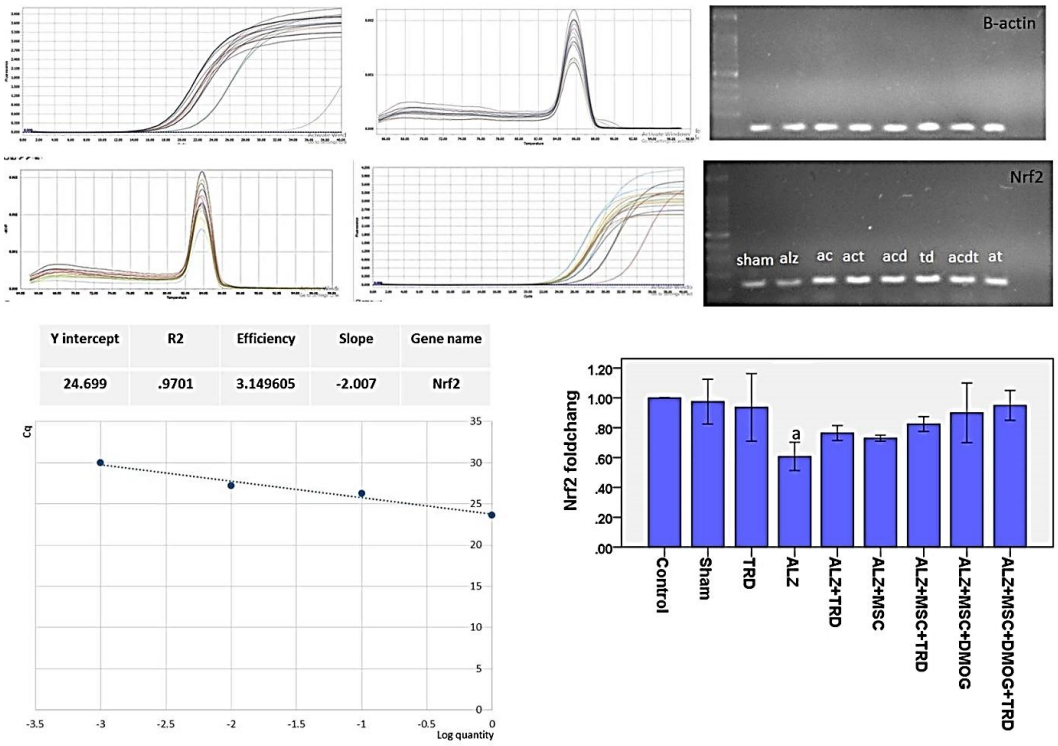
شکل ۲. الکتروفورز، منحنی های دمای ذوب، تکثیر (بالا) و منحنی استاندارد و میزان بیان ژن bal-2 در هیپوکمپ (پائین) در گروههای مختلف. نتایج بر اساس mean± S.E.M می باشد. (a: p< ۰/001 در مقایسه با گروه کنترل، شم و تردمیل، b: p<0.001 در مقایسه با گروه آلزایمر، c: p<0.001 در مقایسه با گروه آلزایمر و تردمیل، d: p<0.01 در مقایسه با گروه آلزایمر و سلول غیر شرطی).



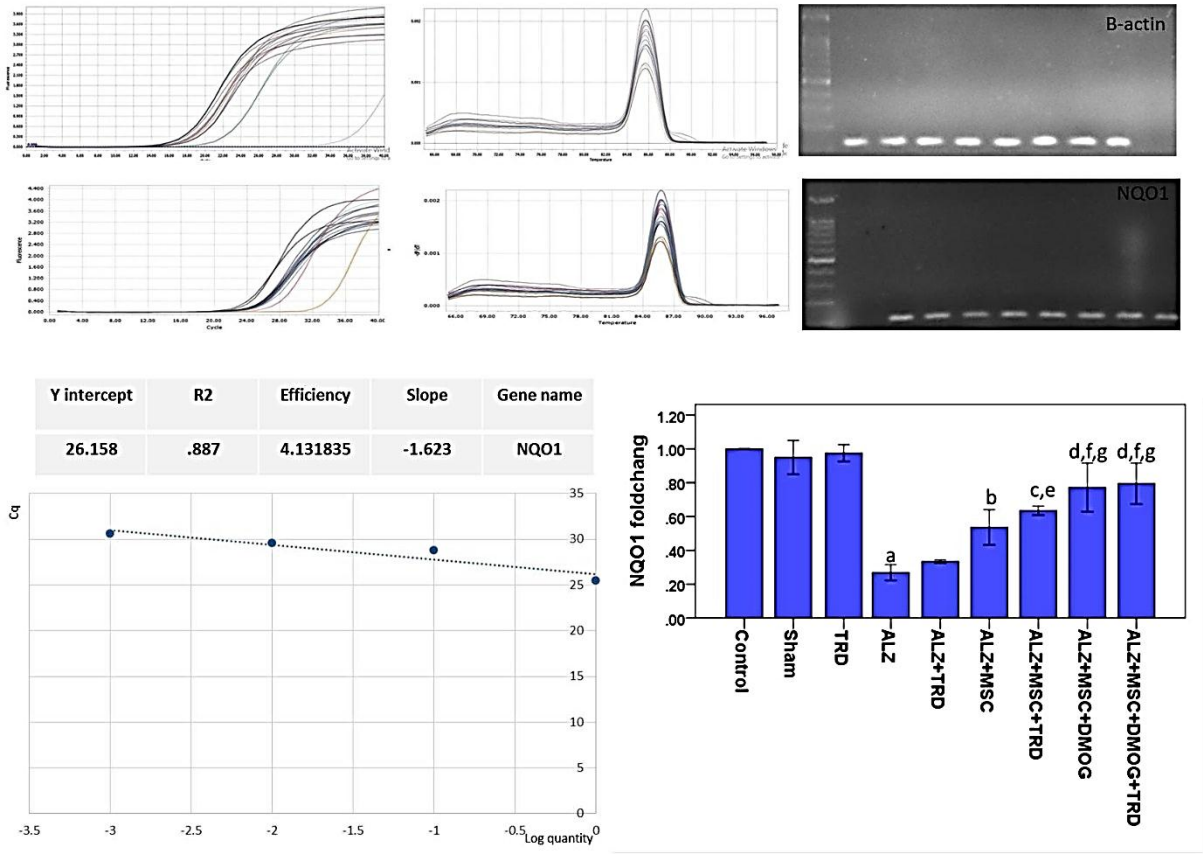
شکل ۳. الکتروفورز، منحنی دمای ذوب، تکثیر (بالا) و منحنی استاندارد و میزان بیان ژن bax در هیپوکمپ (پائین) در گروههای مختلف. نتایج بر اساس mean± S.E.M می باشد. (a: p< ۰/001 در مقایسه با گروه کنترل، شم و تردمیل، b: p<0.05 و c: p<0.01 در مقایسه با گروه آلزایمر).

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

[DOI: 10.29252/koomesh.22.2.325]



شکل ۴. الکتروفورز، منحنی های دمای ذوب، تکثیر (بالا)، منحنی استاندارد و میزان بیان ژن Nfr2 در هیپوکمپ (پائین) در گروههای مختلف. نتایج بر اساس mean± S.E.M می باشد. (a: p< ۰/05 در مقایسه با گروه کنترل، شم و تردمیل).



شکل ۵. الکتروفورز، منحنی های دمای ذوب، تکثیر (بالا)، منحنی استاندارد و میزان بیان ژن NQO1 در هیپوکمپ (پائین) در گروههای مختلف. نتایج بر اساس mean± S.E.M می باشد. (a: p< ۰/001 در مقایسه با گروه کنترل، شم و تردمیل، b: p<0.05 ، c: p<0.01 و d: p<0.001 در مقایسه با گروه آلزایمر، e: p<0.05 و f: p<0.01 در مقایسه با گروه آلزایمر و تردمیل، g: p<0.05 در مقایسه با گروه آلزایمر و سلول غیر شرطی).

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]
[DOI: 10.29252/koomesh.22.2.325]

بحث و نتیجه‌گیری

رسوب آمیلوئید بتا در مغز با اختلالات یادگیری و دژنراسیون سلول‌های کولینرژیک ارتباط دارد و رت‌های دریافت‌کننده این پروتئین می‌توانند به عنوان مدل آلزایمر استفاده شوند [۱۷]. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تزریق داخل بطنی آمیلوئید بتا منجر به کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و آپپتوزیس در هیپوکمپ گردید که موافق با مطالعات دیگر می‌باشد [۱۸]. به نظر می‌رسد که تجویز آمیلوئید بتا باعث کاهش بیان پروتئین‌های آنتی‌آپپتوتیک Bcl-w و Bcl-2 و افزایش بیان پروتئین‌های پروآپپتوتیک Bax شده و در نهایت با بیان C-JUN منجر به آپپتوزیس در ناحیه هیپوکمپ می‌شود [۱۹].

یکی دیگر از یافته‌های این مطالعه کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به دنبال تزریق آمیلوئد بتا بود. مغز به دلیل ترکیب لیپیدی غشاء سلولی و سطح پائین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی، ارگانی حساس نسبت به استرس اکسیداتیوها می‌باشد [۲۰]. استرس اکسیداتیوها با عدم تعادل بین تولید ROS و آنتی‌اکسیدان داخل سلولی ایجاد می‌شود. کاهش وضعیت آنتی‌اکسیدانی تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن را تسریع می‌کند، که باعث پراکسیداسیون لیپیدی غشا می‌شود.

با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه و مطالعات دیگر به نظر می‌رسد که جهت بهبود نوروتوکسیسیتی القاء شده توسط آمیلوئید بتا، نیاز به افزایش قابلیت آنتی‌اکسیدانی هیپوکمپ در کنار کاهش آپپتوزیس می‌باشد. روش‌های مختلف درمانی از جمله استفاده از داروهای شیمیائی، گیاهی، طب سنتی، فعالیت‌های فیزیکی در درمان آلزایمر استفاده شده است که متاسفانه هیچ‌کدام تا به حال به طور کامل موثر نبوده‌اند [۲۱].

در سال‌های اخیر استفاده از سلول‌های بنیادی در درمان بیماری‌های مختلفی از جمله بیماری‌های نورودژنراتیو افزایش یافته است. سلول‌های بنیادی در سیستم عصبی به دلیل اثرات پاراکرین، در ترمیم آسیب مورد توجه قرار می‌گیرند. آن‌ها ماکرومولکول‌های تنظیم‌کننده ایمنی متفاوتی را آزاد می‌کنند که در ساختار مجدد ناحیه آسیب‌دیده شرکت می‌کنند و التهاب منطقه را سرکوب کرده و شروع به تولید فاکتورهای رشد موضعی و سیتوکین‌های مورد نیاز برای بازسازی می‌کنند [۲۲].

علی‌رغم پیشرفت در حیطه سلول درمانی، هنوز مشکلات مهمی از جمله کاهش بقاء، ناکارآمد بودن سلول‌های تزریق شده و همین‌طور ناکافی بودن سلول‌های رسیده به بافت آسیب‌دیده وجود دارد. از این رو به نظر می‌رسد که مقاوم کردن و بهبود کیفیت سلول تزریقی راه حل مناسبی جهت غلبه بر این مشکل باشد. پیش شرطی کردن سلول که شامل تیمار کردن سلول با مواد مختلف شیمیائی قبل از تزریق می‌باشد باعث بقاء بهتر، تاثیرات پاراکرینی کارآمدتر، تمایز و مهاجرت بیش‌تر سلول می‌گردد [۲۳]. اگرچه بقاء و فعالیت سلول‌های بنیادی تزریق شده در مدل آلزایمر توسط عوامل پاتولوژی این بیماری تحت تاثیر قرار می‌گیرد [۲۴] ولی موافق با مطالعه حاضر، مطالعات دیگر نیز نشان داده‌اند که پیش شرطی کردن سلول‌ها می‌تواند باعث کاهش آپپتوزیس سلول‌های پیوند شده گردد که از طریق افزایش بیان ژن‌های فعال‌کننده آنتی‌اکسیدانی از جمله Nrf-2 و NQO1 می‌باشد [۲۵]. این مطالعات نشان می‌دهند که هیپوکسی یکی از مهم‌ترین و کارآمدترین روش‌های پیش شرطی کردن سلول‌های بنیادی می‌باشد که باعث فعال شدن مکانیسم دفاع ذاتی می‌شوند. دوز غیر کشنده از هیپوکسی باعث افزایش بقاء و تکثیر سلول‌های بنیادی، تمایز عصبی، مهار فاکتورهای التهابی و پاسخ ایمنی، مهاجرت به سمت ناحیه‌ی آسیب‌دیده و ارتقاء کیفیت سلول می‌شود [۷].

در راستای این تحقیقات، در مطالعه حاضر، MSCs را پیش از تزریق با مهارکننده پرولیل هیدروکسیلاز پیش شرطی کردیم و تاثیر آن را روی افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش آپپتوزیس بررسی کردیم. به نظر می‌رسد که DMOG به عنوان مهارکننده پرولیل هیدروکسیلاز باعث پایداری HIF-1 و از این طریق منجر به کاهش سیتوکروم c میتوکندری و آپپتوزیس سلول‌های بنیادی می‌شود [۲۶]. از طرف دیگر DMOG فعالیت رگ‌زائی را در سلول‌های بنیادی پرتوان القائی انسان افزایش داده و از این طریق باعث بهبود شرایط سلول و پرولیفراسیون آن می‌گردد [۲۷].

مداخلات غیر دارویی در کنار پیوند سلول و درمان‌های شیمیائی، اثرات سودمندی در درمان بیماری‌های سیتم عصبی دارند که از این میان می‌توان به ورزش اشاره کرد [۲۹،۲۸]. Kim و همکاران در مطالعه خود نشان دادند که بهبود شناخت در سالمندان مبتلا به آلزایمر با شدت کم، به همراه ورزش فیزیکی ۶ ماهه امکان‌پذیر است [۳۰]. به علاوه، بنا بر مطالعهLe Heusc فعالیت فیزیکی و ورزش از طریق کم کردن التهاب، منجر به افزایش بهبود در هدف‌های درمانی بالقوه پارکینسون می‌شود [۳۱].

برخی مطالعات اخیر، اثرات محافظتی و درمانی ورزش را به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نسبت می‌دهند به طوری که مطالعه Radak,Z و همکارانش نشان داد که ورزش منظم در حیوانات قدرت دفاع آنتی‌اکسیدانی را نسبت به گروه کنترل کم‌تحرک افزایش می‌دهد و هم‌چنین غلظت درون سلولی ROS، قابلیت اتصال NF-KB به DNA و نسخه‌برداری از ژن‌های التهابی را کاهش می‌دهد [۳۲] که می‌تواند دلیلی بر نتیجه حاصله

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

[DOI: 10.29252/koomesh.22.2.325]

در این مطالعه باشد که انجام ورزش تردمیل به دنبال یک‌ماه باعث افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام گردید.

علاوه بر این مطالعه ما نشان داد که تجویز آمیلوئید بتا به طور مشخصی باعث بالا رفتن آپپتوزیس در هیپوکمپ شد و ورزش تردمیل چه به تنهائی و چه در کنار پیوند سلول‌های بنیادی منجر به کاهش آن گردید. موافق با نتایج حاضر، در مطالعه دیگر، ورزش تردمیل، فعالیت Caspase 3 و شکست DNA را در هیپوکمپ متوقف می‌کند که نتایج ما را تایید می‌کند [۳۳] که نشان دادیم ورزش تردمیل باعث کاهش آپپتوزیس سلولی در هیپوکمپ مدل آلزایمر می‌شود. در مقایسه مطالعات انجام شده با مطالعه حاضر، ورزش مناسب سطح بیان مارکر اکسیداتیو در غشای میتوکندری مغز، کلیه و قلب را کاهش می‌دهد و منجر به افزایش مقاومت عضلات اسکلتی رت در برابر استرس اکسیداتیو می‌شود [۱۲].

ورزش هوازی دارای اثرات مثبت بر کاهش گلوکز، لیپید و سوخت و ساز بدن است و می‌تواند به تدریج منجر به افزایش بیان پروتئین BDNF در هیپوکمپ شود [۳۴]. به نظر می‌رسد که انجام تردمیل در مطالعه حاضر با افزایش میزان BDNF هیپوکمپ محیط مناسبی جهت رشد و تمایز سلول‌های پیوندی ایجاد کرده است. و با توجه به اهمیت این پروتئین در نوروژنزیس و پرولیفراسیون سلولی، باعث افزایش طول عمر سلول‌های تزریقی و کاهش آپپتوزیس آن‌ها شده است [۳۵].

از مکانیسم‌های مولکولی دیگر که از طریق ورزش القا می‌شوند انژیوژنزیس، سیناپتوژنزیس می‌باشند [۳۶]. ورزش با تغییر در فاکتورهای رشد مولکولی از قبیل BDNF مرتبط می‌باشد که نقش حیاتی در نوروپلاستیسیتی دارند و تولید IGF-1 را افزایش می‌دهند و در نتیجه باعث تنظیم سیستم‌های انتقال‌دهنده عصبی می‌شوند [۳۷].

سلول‌های پیوند شده جهت پرولیفراسیون، بقاء و تمایز نیاز به خون‌رسانی موثر و تشکیل سیناپس با سلول‌های دیگر دارند که به دنبال تجویز آمیلوئید بتا مختل شده و کاهش می‌یابند، آنژیوژنزیس و ایجاد آپپتوزیس به دنبال ورزش، محیط مناسبی جهت رشد سلول‌های بنیادی تزریق شده ایجاد کرده و از این طریق کیفیت سلول درمانی را افزایش می‌دهد.

در نهایت به نظر می‌رسد که پیش شرطی کردن سلول‌های بنیادی قبل از پیوند، کیفیت این سلول‌ها را افزایش داده و در بهبود آلزایمر از طریق کاهش آپپتوزییس و استرس اکسیداتیو و افزایش نوروژنزیس کارآمدتر می‌باشد. از طرف دیگر همراه کردن ورزش و فعالیت‌های فیزیکی با پیوند سلول می‌تواند تاثیر سلول درمانی را در بیماری‌های نورودژنراتیو از طریق افزایش فاکتورهای رشد و قابلیت آنتی‌اکسیدانی بیش‌تر کند.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی همدان با کد ۹۶۰۳۰۲۱۳۴ می‌باشد. بدین‌وسیله مراتب سپاس و قدردانی خود را از پرسنل محترم آزمایشگاه علوم تشریح و مرکز تحقیقات فیزیولوژی اعصاب اعلام می‌داریم.

منابع

[1] Awasthi A, Matsunaga Y, Yamada T. Amyloid-beta causes apoptosis of neuronal cells via caspase cascade, which can be prevented by amyloid-beta-derived short peptides. Exp Neurol 2005; 196: 282-289.

[2] Peng QL, Buz'Zard AR, Lau BH. Pycnogenol protects neurons from amyloid-beta peptide-induced apoptosis. Brain Res Mol Brain Res 2002; 104: 55-65.

[3] Hasanvand D, Amiri I, Soleimani Asl S, Saidijam M, Shabab N, Artimani T. Effects of CeO2 nanoparticles on the HO-1, NQO1, and GCLC expression in the testes of diabetic rats. Can J Physiol Pharmacol 2018; 96: 963-969.

[4] Safari M, Jadidi M, Sameni HR, Zarbakhsh S, Bandegi AR, Vafaei AA, Moghadas Biat S. 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. Koomesh 2015; 15: 224-232. (Persian).

[5] Zhang J, Huang X, Wang H, Liu X, Zhang T, Wang Y, Hu D. The challenges and promises of allogeneic mesenchymal stem cells for use as a cell-based therapy. Stem Cell Res Ther 2015; 6: 234.

[6] Saparov A, Ogay V, Nurgozhin T, Jumabay M, Chen WC. Preconditioning of human mesenchymal stem cells to enhance their regulation of the immune response. Stem Cells Int 2016; 2016: 3924858.

[7] Imura T, Tomiyasu M, Otsuru N, Nakagawa K, Otsuka T, Takahashi S, et al. Hypoxic preconditioning increases the neuroprotective effects of mesenchymal stem cells in a rat model of spinal cord injury. J Stem Cell Res Ther 2017; 7.

[8] Elks PM, van Eeden FJ, Dixon G, Wang X, Reyes-Aldasoro CC, Ingham PW, et al. Activation of hypoxia-inducible factor-1α (hif-1α) delays inflammation resolution by reducing neutrophil apoptosis and reverse migration in a zebrafish inflammation model. Blood 2011; 118: 712-722.

[9] Leigh Leasure J, West R. Can the brain benefits of exercise be enhanced without additional exercise? J Neurol Neuromedicine 2016; 1: 37-40.

[10] Radak Z, Suzuki K, Higuchi M, Balogh L, Boldogh I, Koltai E. Physical exercise, reactive oxygen species and neuroprotection. Free Radic Biol Med 2016; 98: 187-196.

[11] Radák Z, Chung HY, Naito H, Takahashi R, Jung KJ, Kim HJ, Goto S. Age-associated increase in oxidative stress and nuclear factor kappaB activation are attenuated in rat liver by regular exercise. Faseb J 2004; 18: 749-750.

[12] Navarro A, Gomez C, López-Cepero JM, Boveris A. Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2004; 286: R505-511.

[13] Esmaeilzade B, Artimani T, Amiri I, Najafi R, Shahidi S, Sabec M, et al. Dimethyloxalylglycine preconditioning enhances protective effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in AÎ²-induced Alzheimer disease. Physiol Behav 2019; 199: 265-272. (Persian).

[14] Radák Z, Chung HY, Naito H, Takahashi R, Jung KJ, Kim HJ, Goto S. Age-associated increase in oxidative stress and nuclear factor κB activation are attenuated in rat liver by regular exercise. FASEB J 2004; 18: 749-750.

[15] Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. Cell 2008; 132: 645-660.

[16] Sajadi A, Amiri I, Gharebaghi A, Komaki A, Asadbegi M, Shahidi S, et al., Treadmill exercise alters ecstasy- induced long- term potentiation disruption in the hippocampus of male rats. Metab Brain Dis 2017; 32: 1603-1607.

[17] Yamaguchi Y, Kawashima S. Effects of amyloid-beta-(25-35) on passive avoidance, radial-arm maze learning and choline acetyltransferase activity in the rat. Eur J Pharmacol 2001; 412: 265-272.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

[DOI: 10.29252/koomesh.22.2.325]

[18] Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. Nature 2000; 403: 98-103.

[19] Yao M, Nguyen TV, Pike CJ. β-Amyloid-induced neuronal apoptosis involves c-Jun N-terminal kinase-dependent downregulation of Bcl-w. J Neurosci 2005; 25: 1149-1158.

[20] Safaeinejad F, Bahrami S, Redl H, Niknejad H. Inhibition of inflammation, suppression of matrix metalloproteinases, induction of neurogenesis, and Antioxidant property make Bryostatin-1 a therapeutic choice for multiple sclerosis. Front Pharmacol 2018; 9: 625.

[21] Dolev I, Fogel H. Early diagnosis and treatment of alzheimer disease and mild cognitive impairment. United States patent US 2019; 470-485.

[22] O'brien KP, Khan S, Gilligan KE, Zafar H, Lalor P, Glynn C, et al. Employing mesenchymal stem cells to support tumor-targeted delivery of extracellular vesicle (EV)-encapsulated microRNA-379. Oncogene 2018; 37: 2137.

[23] Srijaya TC, Ramasamy TS, Kasim NH. Advancing stem cell therapy from bench to bedside: lessons from drug therapies. J Transl Med 2014; 12: 243.

[24] Wang X, Ma S, Yang B, Huang T, Meng N, Xu L, et al., Resveratrol promotes hUC-MSCs engraftment and neural repair in a mouse model of Alzheimer's disease. Behav Brain Res 2018; 339: 297-304.

[25] Mohammadzadeh M, Halabian R, Gharehbaghian A, Amirizadeh N, Jahanian-Najafabadi A, Roushandeh AM, Roudkenar MH. Nrf-2 overexpression in mesenchymal stem cells reduces oxidative stress-induced apoptosis and cytotoxicity. Cell Stress Chaperones 2012; 17: 553-565.

[26] Choo KB, Tai L, Hymavathee KS, Wong CY, Nguyen PN, Huang CJ, et al. Oxidative stress-induced premature senescence in Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. Int J Med Sci 2014; 11: 1201-1207.

[27] Zhang J, Guan J, Qi X, Ding H, Yuan H, Xie Z, et al. Dimethyloxaloylglycine promotes the angiogenic activity of mesenchymal stem cells derived from iPSCs via activation of the PI3K/Akt pathway for bone regeneration. Int J Biol Sci 2016; 12: 639-652.

[28] Olazarán J, Reisberg B, Clare L, Cruz I, Peña-Casanova J, Del Ser T, et al. Nonpharmacological therapies in Alzheimer's disease: a systematic review of efficacy. Dement Geriatr Cogn Disord 2010; 30: 161-178.

[29] Rashidy-Pour A, Vafaei AA, Mokhtari-Zaer A, Miladi-Gorji H. Physical activity alleviates anxiety but not hippocampal BDNF deficits in morphine abstinent rats. Koomesh 2018; 20: 594-602. (Persian).

[30] Kim MJ, Han CW, Min KY, Cho CY, Lee CW, Ogawa Y, et al. Physical exercise with multicomponent cognitive intervention for older adults with alzheimer's disease: a 6-Month randomized controlled trial. Dement Geriatr Cogn Dis Extra 2016; 6: 222-232.

[31] LaHue SC, Comella CL, Tanner CM. The best medicine? The influence of physical activity and inactivity on Parkinson's disease. Mov Disord 2016; 31: 1444-1454.

[32] Radák Z, Chung HY, Naito H, Takahashi R, Jung KJ, Kim HJ, Goto S. Age-associated increase in oxidative stress and nuclear factor kappaB activation are attenuated in rat liver by regular exercise. FASEB J 2004; 18: 749-750.

[33] Sim YJ, Kim SS, Kim JY, Shin MS, Kim CJ. Treadmill exercise improves short-term memory by suppressing ischemia-induced apoptosis of neuronal cells in gerbils. Neurosci Lett 2004; 372: 256-261.

[34] Cai M, Wang H, Li JJ, Zhang YL, Xin L, Li F, Lou SJ. The signaling mechanisms of hippocampal endoplasmic reticulum stress affecting neuronal plasticity-related protein levels in high fat diet-induced obese rats and the regulation of aerobic exercise. Brain Behav Immun 2016; 57: 347-359.

[35] van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. J Neurosci 2005; 25: 8680-8685.

[36] Swain RA, Harris AB, Wiener EC, Dutka MV, Morris HD, Theien BE, et al. Prolonged exercise induces angiogenesis and increases cerebral blood volume in primary motor cortex of the rat. Neuroscience 2003; 117: 1037-1046.

[37] Lista I, Sorrentino G. Biological mechanisms of physical activity in preventing cognitive decline. Cell Mol Neurobiol 2010; 30: 493-503.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

[DOI: 10.29252/koomesh.22.2.325]

Volume 22, Issue 2 (Spring 2020), 325- 333

Effects of treadmill exercise and preconditioned bone marrow- derived mesenchymal stem cells transplantation on Aβ-induced neurotoxicity in male rats

Rokhsareh Abshenas (M.Sc)[1], Tayebe Artimani (Ph.D)[2], Iraj Amiri (Ph.D)[2], Siamak Shahidi (Ph.D)[1], Rezvan Najafi (Ph.D)[3], Sara Soleimani Asl (Ph.D)[*1]

1 - Neurophysiology Research Centre, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
2 - Endometrium and Endometriosis Research Centre, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
3- Research Center for Molecular Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

* Corresponding author. +98 81-38380208 s.soleimaniasl@umsha.ac.ir
Received:21 May 2019; Accepted: 2 Sep 2019

Introduction: Preconditioning of mesenchymal stem cells (MSCs) is a promising strategy to enhance the therapeutic properties of transplanted MSCs. In this study, we investigated the synergistic effects of treadmill exercise and dimethyloxalylglycine (DMOG)-preconditioned stem cells in an Alzheimer's disease (AD) model.

Materials and Methods: DMOG- treated MSCs were intravenously transplanted in the AD model and the rats went on treadmill exercise for one month. Thusly, expression of bax, bcl-2, Nrf2, and NQO1 genes were assessed using real- time PCR.

Results: Transplantation of DMOG-treated cells had greater effects on increasing Nrf-2 and NQ1 expression and reducing apoptosis compared to non- treated cells. Ultimately, treadmill exercises for one month along with the transplantation of DMOG- treated cells showed the highest neuroprotective effect.

Conclusion: It seems that the transplantation of DMOG-treated cells beside exercise may have protective effects in the AD model via an increase in antioxidant capacity and a decrease in apoptosis.

Keywords: Exercise, Amyloid, Mesenchymal Stem cells; Oxalylglycine, Antioxidant, Apoptosis.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

[DOI: 10.29252/koomesh.22.2.325]