Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 15:55 +0330 on Friday February 23rd 2018

Original Article

Improvement of spatial memory of male parkinsonian rats after treatment with adipose stem cells and rosemary leaf extract

Ramezanihosseinabadi M[1], Haji-Ghasem-Kashani M[2*], Abrari K[2]

1- Faculty of Biology, Damghan University, Damghan, I. R. Iran.
2- Faculty of Biology and Institute of Biological Sciences, Damghan University, Damghan, I. R. Iran.

Received May 22, 2017; Accepted December 3, 2017

Abstract:

Background: Due to the neuroprotective effect of rosemary extract, this study aimed at examining the effect of co-treatment of adipose stem cells transplantation and the extract on memory disability of parkinsonian rats.
Materials and Methods: In this experimental study, male parkinsonian rats were prepared by bilateral injection of 6-OHDA. The sham group was injected normal saline into the substantia nigra. The extract+medium group was gavaged with the extract 14 days before until 8 weeks after the injury, and the medium was intravenously injected. The extract+cell group was orally gavaged with the extract and the cells were injected. Morris water maze training was conducted one week before and after the lesion and also a retrieval test was performed 4 and 8 weeks after the lesion.
Results: There was no significant difference in distance moved and escape latency at training days, before the injury, between the groups. However, a week after the injury, learning ability in lesioned animals was significantly decreased as compared to the sham group ($P<0.05$). Results of retention tests in four and eight weeks were similar. Duration of escape latency and time spent in target quadrant of lesioned rats were significantly increased and decreased respectively as compared to the sham ($P<0.05$). The extract+medium and extract+cell groups showed significant decrease and increase in escape latency and time spent in target quadrant as compared to the lesioned group ($P<0.05$), respectively.
Conclusion: The cell therapy accompanied with orally administration of the rosemary extract can improve memory deficit in Parkinson's disease.

Keywords: Stem cell, Rosemary extract, Parkinson, Spatial memory, Morris water maze

* **Corresponding Author.**
Email: kashani@du.ac.ir
Tel: 0098 937 454 9803
Fax: 0098 233 522 0120

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, February, 2018; Vol. 21, No 6, Pages 506-516

Please cite this article as: Ramezanihossienabadi M, Haji-Ghasem-Kashani M, Abrari K. Improvement of spatial memory of male Parkinsonian rats post treated by adipose-stem cells and Rosemary leaf extract. ***Feyz*** 2018; 21(6): 506-16.

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 15:55 +0330 on Friday February 23rd 2018

بهبود حافظه فضایی موش‌های صحرایی نر مدل پارکینسونی پس از تیمار با سلول‌های بنیادی چربی و عصاره برگ رزماری

مهدیه رمضانی حسین آبادی[۱]، مریم حاجی قاسم کاشانی[۲*]، کتانه ابراری[۳]

خلاصه:

سابقه و هدف: باتوجه به نقش نوروپروتکتیو عصاره رزماری، در مطالعه حاضر درمان همزمان پیوند سلول‌های بنیادی بافت چربی و عصاره بر اختلال حافظه موش‌های پارکینسونی مورد بررسی قرار گرفت.

مـواد و روش‌ها: موش‌های نر مدل پارکینسونی با تزریق دوطرفه 6-OHDA آماده شدند. به جسم سیاه گروه شم نرمال سالین تزریق شد. گروه عصاره+محیط کشت، گاواژ عصاره رزماری را ۱۴ روز قبل از آسیب تا ۸ هفته پس از آن دریافت کردند و به دنبال آن تزریق داخل وریدی محیط کشت انجام شد. گروه عصاره+سلول با عصاره گاواژ شدند و سپس سلول تزریق شد. آموزش ماز آبی موریس، یک هفته قبل و بعد از آسیب و همچنین آزمون به‌خاطرآوری در هفته‌های ۴ و ۸ پس از آسیب انجام شد.

نتایج: مسافت طی شده و تأخیر زمانی یافتن سکو در روزهای آموزش قبل از آسیب تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها نشان نداد. یک هفته پس از بروز آسیب توانایی یادگیری در حیوانات گروه آسیب نسبت به شم کاهش معنی‌داری داشت ($P<۰/۰۵$). نتایج تست‌های به‌خاطرآوری هفته‌های ۴ و ۸ مشابه یکدیگر بودند. مدت زمان پیدا کردن سکو و مدت سپری شده در ربع هدف در موش‌های آسیب دیده به‌ترتیب افزایش و کاهش معنی‌داری نسبت به شم نشان داد ($P<۰/۰۵$). گروه‌های عصاره+محیط کشت و عصاره+سلول، به‌ترتیب کاهش و افزایش معنی‌داری را در مدت زمان پیداکردن سکو و مدت زمان سپری شده در ربع هدف نسبت به گروه آسیب نشان دادند ($P<۰/۰۵$).

نتیـجه‌گیری: سلول‌درمانی به همراه تجویز خوراکی عصاره رزماری باعث بهبود اختلال حافظه در بیماری پارکینسون می‌گردد.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی، عصاره رزماری، پارکینسون، حافظه فضایی، ماز آبی موریس

دو ماه‌نامه علمی– پژوهشی فیض، دوره بیست و یکم، شماره ۶، بهمن و اسفند ۱۳۹۶، صفحات ۵۱۶-۵۰۶

مقدمـه

بیماری پارکینسون با تخریب نورون‌های دوپامینرژیک در بخش متراکم جسم سیاه واقع در مغز میانی و به‌دنبال آن کاهش دوپامین در جسم مخطط همراه است [۱]. از علائم این بیماری سفتی عضلات، کندی در حرکت، لرزش در هنگام استراحت [۳،۲]، اختلالات سیستم خودمختار، مشکلات شناختی و رفتاری، و اختلالات در حواس و خواب می‌باشد [۴]. Musilimovic و همکاران برای اولین‌بار اختلال حافظه را در بیماران پارکینسونی نشان داده و بیان کرده‌اند که با پیشرفت بیماری ۵۰ درصد بیماران دچار نقص شناختی و ۹۰ درصد دچار دمانس می‌شوند [۵].

دوپامین در بسیاری از عملکردهای سیستم عصبی مرکزی ازجمله رفتارهای حرکتی، هیجان، شناخت و تنظیم آندوکرینی نقش دارد [۶]. همچنین، دوپامین به‌عنوان یک سوبسترای بالقوه در شکل‌پذیری سیناپسی و مکانیسم‌های یادگیری و حافظه معرفی شده است [۸،۷]. پنج زیر گروه گیرنده دوپامینی شناخته شده است [۹] که تعدادی از آن‌ها در هیپوکمپ قرار داشته و در حافظه و یادگیری دخالت دارند [۱۱،۱۰]. خروجی‌های مربوط به نورون‌های دوپامینرژیک بخش شکمی تگمنتوم و جسم سیاه به هیپوکمپ، جسم مخطط و ناحیه پری‌فرونتال هدایت می‌شوند. دوپامین ترشح شده از این مسیر در هیپوکمپ روی حافظه به‌خصوص حافظه موقعیت‌یابی فضایی و یادگیری تأثیر می‌گذارد؛ به‌طوری‌که تأثیر دوپامین بر حافظه از طریق تحریک سیناپتوژنزیس در هیپوکمپ می‌باشد [۱۵-۱۲]. گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.) جزء گونه‌های دارویی خانواده نعنائیان (Labiatae) می‌باشد [۱۶]. اسید کارنوسیک به‌عنوان یک ماده آنتی‌اکسیدان، ضدمیکروب، نوروپروتکتیو، هپاتوپروتکتیو، ضدچاقی، ضدالتهاب، ضدسرطان و ضدافسردگی شناخته شده است [۱۸،۱۷]. اسید رزمارینیک از ترکیبات مهم رزماری است که خاصیت نوروپروتکتیو دارد. در مطالعه‌ای ۱۴ روز پس از خوراندن آن به موش‌های صحرایی،

[۱] کارشناس ارشد بافت شناسی- جنین شناسی، دانشکده زیست شناسی، دامغان، دانشگاه دامغان، ایران

[۲] استادیار، گروه سلولی و ملکولی، دانشکده زیست شناسی و پژوهشکده علوم زیستی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران

[۳] استادیار، گروه فیزیولوژی جانوری، دانشکده زیست شناسی و پژوهشکده علوم زیستی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران

* **نشانی نویسنده مسئول:**

دانشگاه دامغان، دانشکده زیست شناسی، گروه علوم سلولی- مولکولی

تلفن: ۰۹۳۷۴۵۴۹۸۰۳ **دورنویس:** ۰۲۳۳۵۲۲۰۱۲۰

پست الکترونیک: kashani@du.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۶/۳/۱ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۹۶/۹/۱۲

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 15:55 +0330 on Friday February 23rd 2018

افزایش سرعت تکثیر نورون‌های شکنج دندانه‌ای هیپوکمپ مشاهده شد. اسید رزمارینیک مانند داروهای ضدافسردگی اثرات نورو-پروتکتیو خود را از طریق کاهش آپوپتوز و تحریک نورون‌زائی ایفاء می‌کند [۱۸-۱۶]. پیوند سلول‌های بنیادی به‌عنوان یکی از روش‌های درمانی جدید برای بیماری‌های نورودژنراتیو ازجمله بیماری پارکینسون کاربرد دارد [۱۹]. سه روش درمان با استفاده از سلول‌های بنیادی، جایگزینی سلولی، حفاظت عصبی و انتقال ژن [۲۰] می‌باشد. در حفاظت عصبی، سلول‌های بنیادی پیوندی با ترشح سیتوکین‌ها و فاکتورهای نوروتروفیک از نورون‌ها محافظت می‌کنند و در انتقال ژن، سلول‌های بنیادی به‌عنوان ناقلی برای ژن مورد نظر استفاده می‌گردند [۲۱]. سلول‌های بنیادی بالغ از ویژگی-های مناسبی برای سلول‌درمانی برخوردارند. این سلول‌ها اغلب خاموش هستند و به کندی تکثیر پیدا می‌کنند، اما در زمان آسیب یا مرگ سلولی و بافتی توانایی ترمیم و قدرت تکثیر بالایی دارند. از مهم‌ترین سلول‌های بنیادی بالغ، سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal stem cell; MSC) هستند [۲۲]. آن‌ها سلول های استرومایی چندتوان بوده که قابلیت تمایز به انواع سلول‌های استخوانی، غضروفی، چربی، عصبی و همچنین انواع بافت‌ها از جمله کبد و کلیه را دارند [۲۵-۲۳]. MSC را می‌توان در بافت چربی نیز مشاهده نمود. به این سلول‌ها، سلول‌های بنیادی چربی (Adipose derived stem cells; ADSCs) می‌گویند. ADSC از لحاظ فنوتیپ ایمنی، مورفولوژی، و توانایی تمایزی مشابه سلول‌های بنیادی مغز استخوان می‌باشند. ADSCها قابلیت تمایز به دودمان‌های سلولی آدیپوسیت، میوسیت، و استئوسیت را دارند [۲۷،۲۶]. امروزه توجه بسیاری از محققین به پیوند ADSCs برای درمان بیماری پارکینسون جلب شده است. یکی از محدودیت‌های پیوند سلول در درمان بیماری‌های نورودژنراتیو، مرگ بیش از نیمی از سلوهای پیوندی قبل یا بعد از رسیدن به محل آسیب می‌باشد. عصاره رزماری با ترکیب اسید کارنوسیک توانایی محافظت نورونی و کاهش آپوپتوز را دارد [۱۷] و از طرفی مشابه فاکتورهای نوروتروفیک به حفاظت و تمایز سلول‌های بنیادی کمک می‌کند [۱۶]. تجویز درازمدت عصاره رزماری قبل از پیوند سلول امکان بقا سلول‌های بنیادی را در محل پیوند فراهم می‌سازد و از طرف دیگر در تمایز سلول-های پیش‌ساز عصبی به نورون در محل آسیب نقش دارد. هدف از این تحقیق بررسی اثرات درمان ترکیبی پیوند ADSCs و گیاه‌درمانی بر بهبود حافظه فضایی موش‌های مدل پارکینسونی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

حیوانات:

این مطالعه روی ۳۵ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۲۰-۲۸۰ گرم خریداری شده از انستیتو رازی کرج، در دانشکده زیست شناسی دامغان انجام شد. اصول اخلاقی کار روی حیوانات براساس دستور کار کمیته اخلاقی دانشکده زیست شناسی دامغان رعایت شد.

روش ایجاد مدل تجربی موش‌های صحرایی آسیب دیده با 6-OHDA (6-Hydroxy dopamine):

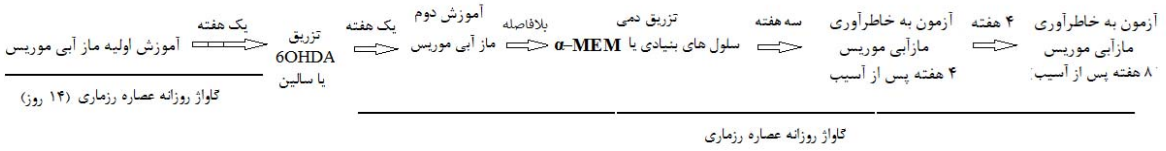
حیوانات پیش از عمل جراحی با تزریق درون‌صفاقی کتامین- زایلازین بیهوش شدند. سر حیوانات به کمک میله دهانی جلویی و میله‌های داخل گوشی در دستگاه استریوتاکس ثابت شد و پس از ایجاد برشی طولی در حد فاصل چشم‌ها و گوش‌ها، سطح روی جمجمه تمیز شده و سپس منطقه SN_C با مختصات ۵/۰- میلی‌متر قدامی-خلفی، ۷/۷- میلی‌متر شکمی-پشتی و ۲/۱±داخلی-خارجی مطابق با مختصات اطلس پاکسینوس، روی سطح جمجمه با کمک دستگاه تنظیم و علامت‌گذاری شد. پس از سوراخ کردن محل علامت‌گذاری شده به‌کمک دریل دندانپزشکی ۶ میکروگرم 6-OHDA در ۲ میکرولیتر محلول نمکی ۰/۹ درصد حل شد و درون SN_C دو طرف مغز تزریق گردید. تزریقات با سرنگ همیلتون ۵۰ میکرولیتری و با کمک پمپ میکروواینجکشن با سرعت ۰/۳۳ میکرولیتر در دقیقه انجام شد. به‌منظور جلوگیری از برگشت محلول به درون سرنگ و نیز برای انتشار بهتر محلول درون SNc (Substantia nigra pars compacta)، سرسوزن به‌مدت ۵ دقیقه پس از تزریق در جای خود باقی ماند [۲۸]. پس از اتمام عمل جراحی حیوانات جراحی شده تا زمان به هوش آمدن به اطاقی با دمای مناسب انتقال یافتند و پس از به هوش آمدن به-طور انفرادی نگه داشته شدند. پس از گذشت ۶ روز دوره بهبودی، حیوانات در قفس‌های سه‌تایی قرار داده شدند. همچنین، ۴ و۸ هفته پس از جراحی حافظه فضایی گروه‌های آزمایشی با ماز آبی موریس مورد بررسی قرار گرفت.

گروه‌های مطالعه:

موش‌های صحرایی مورد آزمایش به‌طور تصادفی به ۴ گروه ۸ تا ۱۰ تائی به‌ترتیب زیر تقسیم شدند: گروه آسیب: نوروتوکسین 6-OHDA (هیدروبرمید، سیگما) به میزان ۶ میکرو-گرم در ۲ میکرولیتر نرمال سالین با سرعت ۰/۳۳ میکرولیتر در دقیقه و به‌صورت دوطرفه در محل SNC دریافت کردند؛ گروه

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 15:55 +0330 on Friday February 23rd 2018

شم: به‌جای نوروتوکسین، نرمال سالین دریافت کردند؛ گروه سلول+عصاره: موش‌هایی بودند که با تزریق نوروتوکسین آسیب دیدند، با عصاره رزماری پیش‌تیمار شده و پاساژ چهارم سلول (1×10^6 سلول در ۰/۵ میلی‌لیتر محیط α–MEM)، یک هفته پس از آسیب و از طریق ورید دمی با سرنگ همیلتون به آن‌ها تزریق شد؛ و گروه عصاره+محیط کشت؛ موش‌هایی بودند که با تزریق نوروتوکسین آسیب دیدند، با عصاره رزماری پیش‌تیمار شده، ولی به‌جای سلول، ۰/۵ میلی‌لیتر محیط α–MEM، یک هفته پس از آسیب و از طریق ورید دمی با سرنگ همیلتون به آن‌ها تزریق شد. روش کار در محور زمانی زیر آورده شده است:



آزمون رفتاری ماز آبی موریس :

ماز آبی دارای یک وان مدور فلزی (قطر ۱۴۰ و ارتفاع ۴۵ سانتی‌متر) به رنگ مشکی می‌باشد. یک سکوی مدور در مرکز ربع جنوب شرقی ماز و ۳ سانتیمتر زیر سطح آب قرار می‌گیرد. برای شناسایی جهت و یادگیری فضایی، علائمی در چهار جهت ماز روی دیوارهای اتاق نصب گردید. هر حیوان در کنار دیواره ماز و به‌صورت تصادفی از یکی از جهات شمال، جنوب، شرق یا غرب به داخل آب رها می‌شد تا سکوی پنهان در زیر آب را پیدا نماید. اگر حیوان در عرض یک دقیقه موفق به یافتن سکو نمی‌شد، راهنمایی با دست صورت می‌گرفت تا سکو را پیدا نموده و پس از استقرار روی سکو مدت ۲۰ ثانیه روی آن توقف می‌نمود. به‌منظور یادگیری فضایی، آموزش حیوانات در ماز آبی طی ۴ روز و هر روز ۴ آموزش انجام گرفت و عملکرد حیوان در ماز از طریق یک دوربین مادون قرمز به رایانه منتقل و ضبط می‌شد. نحوه عملکرد حافظه ۲۴ ساعت پس از اجرای مراحل آموزش با اجرای آزمون به‌خاطرآوری به‌مدت ۶۰ ثانیه ارزیابی شد. در این مرحله پس از برداشتن سکو حیوان از ناحیه مخالف سکو در آب رها گردید تا محل سکو را پیدا نماید. شاخص‌های مدت زمان طی شده و مسافت طی شده برای یافتن سکو در روزهای آموزش، همچنین زمان رسیدن به سکو، طول مسیر پیموده شده و درصد زمان سپری شده در ناحیه هدف، در آزمون به‌خاطرآوری ارزیابی شد.

روش آنالیزآماری:

در این پژوهش از آمار توصیفی و میانگین داده‌ها (mean±S.E.) استفاده شد. توزیع داده‌ها با آزمون K-S و همگنی واریانس از طریق آماره لون بررسی شد. تحلیل واریانس با اندازه‌گیری تکراری برای بررسی میزان اثربخشی چهار روز تمرین در ماز آبی موریس استفاده شد. از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی به‌منظور مقایسه بین گروه‌ها استفاده شد. کلیه عملیات آماری در سطح معنی‌داری $P\leq۰/۰۵$ با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۶ انجام گرفت.

نتایج

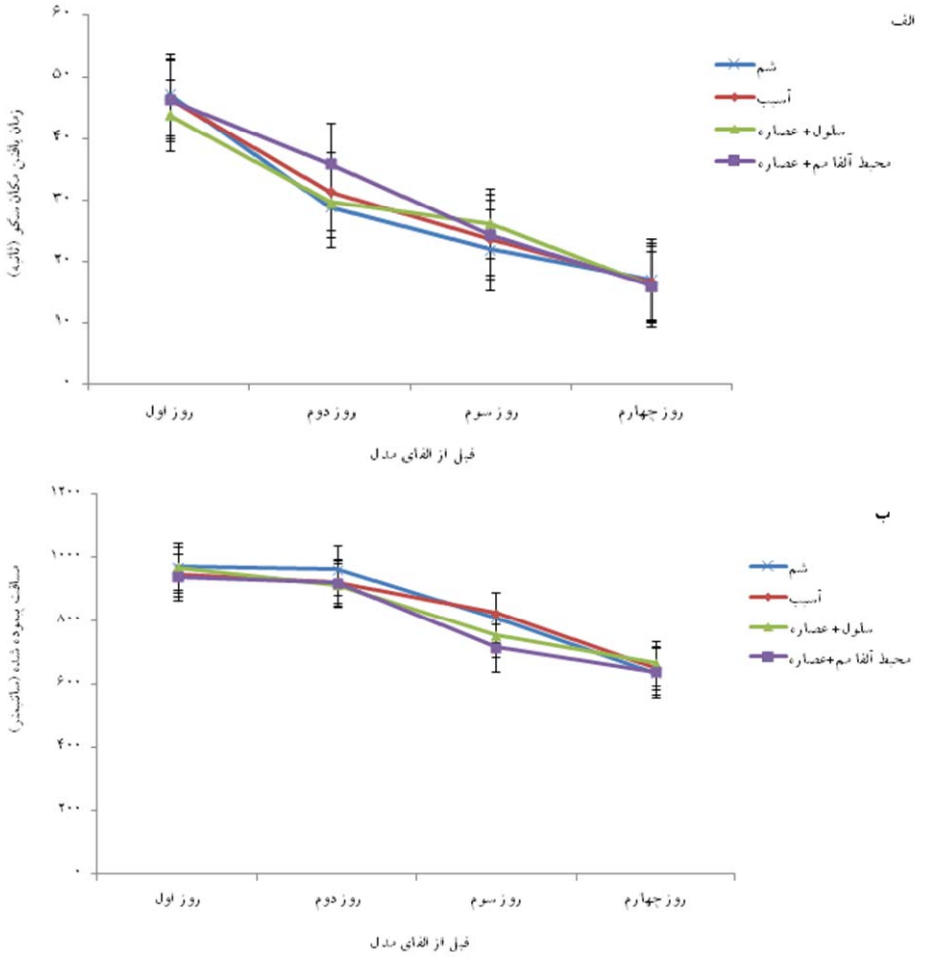
توانایی یادگیری یک هفته قبل از آسیب:

آموزش اول ماز آبی موریس بدین منظور انجام شد که نشان دهد حیوانات به‌طور تصادفی انتخاب شده‌اند و از توانایی یادگیری یکسانی برخوردارند. شکل شماره ۱ تأثیر تمرین روزانه را بر یادگیری فضایی نشان می‌دهد. کاهش زمان تأخیر رسیدن به سکو از روز اول تا چهارم تمرین (P=۰/۰۰۱) و مجموع مسافت طی شده در این ۴ روز (P=۰/۰۰۱) نشان می‌دهد که پروتکل تمرین مؤثر بوده و موش‌های همه گروه‌ها توانایی یادگیری داشتند. تفاوت معنی‌داری میان گروه‌ها از نظر زمان رسیدن به سکو (P=۰/۹۹۹) و مجموع مسافت طی شده (P=۰/۰۵۷) وجود نداشت (شکل شماره ۱-الف و ۱-ب).

توانایی یادگیری یک هفته پس از آسیب:

توانایی یادگیری فضایی حیوانات یک هفته پس از آسیب با نوروتوکسین نیز ارزیابی شد. شکل شماره ۲ تأثیر تمرین روزانه را بر یادگیری فضایی نشان می‌دهد. کاهش زمان تاخیر رسیدن به سکو از روز اول تا چهارم تمرین (P=۰/۰۴) در تمام گروه‌ها مشاهده شد. گروه‌های سلول+عصاره و عصاره+محیط کشت کاهش معنی‌داری را در مدت زمان شناسایی سکو نسبت به گروه آسیب نشان دادند (P=۰/۰۲) (شکل شماره ۲-الف). کاهش مجموع مسافت طی شده در این ۴ روز (P=۰/۰۱) در تمام گروه-ها وجود داشت. از طرفی اختلاف معنی‌داری میان گروه‌های شم، سلول+عصاره، و عصاره+محیط کشت با گروه آسیب وجود داشت

(P=۰/۰۳) (شکل شماره ۲-الف و ۲-ب). نتایج یادگیری فضایی یک هفته پس از آسیب نشان‌گر آن است که نوروتوکسین بر توانایی یادگیری فضایی حیوانات مؤثر بوده است.



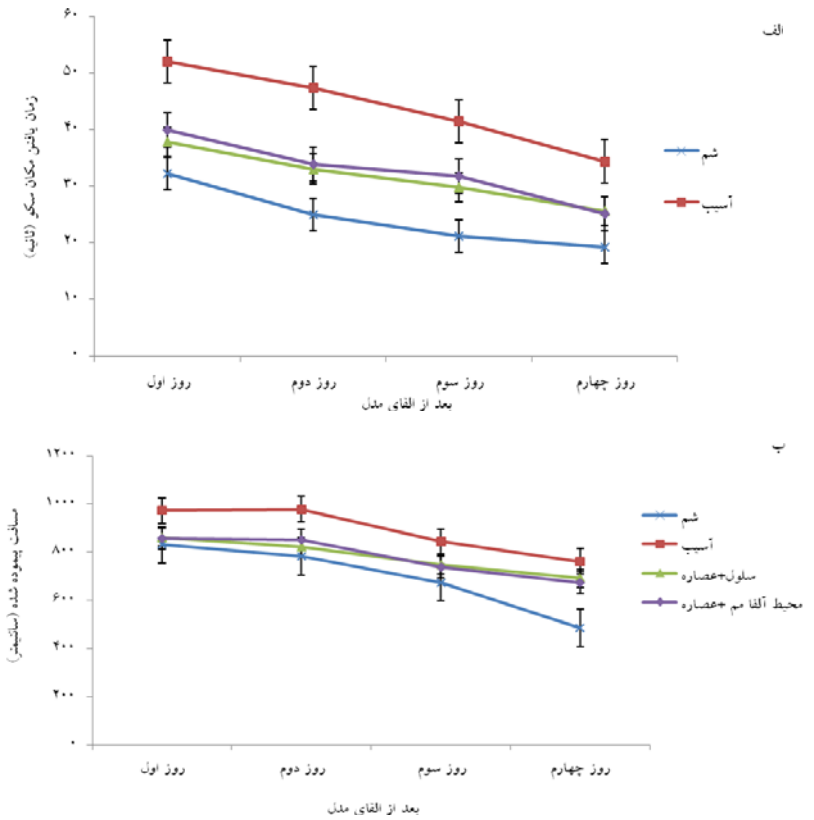
شکل شماره ۱- منحنی یادگیری فضائی در طول ۴ روز مرحله اکتساب در حیوانات مورد مطالعه
(الف) تاخیر زمانی رسیدن به سکو، (ب) مجموع مسافت طی شده. (n=۸-۱۰, # P<۰/۰۵).

نتایج آزمون به‌خاطرآوری در هفته چهارم پس از آسیب:

مطابق طرح زمانی ارائه شده برای پروتکل آزمایش ۴ هفته پس از آسیب و یا به‌عبارت دیگر یک هفته پس از پایان درمان ترکیبی با سلول و عصاره رزماری، آزمون به‌خاطرآوری حافظه فضایی انجام شد. آنالیز داده‌ها برای مسافت طی شده در روز به‌خاطرآوری نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار میان گروه‌های آزمایشی است (P=۰/۴۴۵). عدم وجود اختلاف حاکی از نبود اختلال حرکتی در موش‌های مورد آموزش است (شکل شماره ۳-الف). آنالیز زمان رسیدن به مکان سکو حاکی از وجود تفاوت معنی‌دار میان گروه‌ها است (P=۰/۰۰۱). زمان رسیدن به مکان سکو در گروه‌های عصاره+محیط کشت و سلول+عصاره نسبت به گروه آسیب کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد (شکل شماره ۳-ب). آنالیز درصد زمان طی شده در ربع هدف حاکی از وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد (P=۰/۰۰۱). افزایش معنی‌داری در گروه سلول+عصاره نسبت به گروه آسیب وجود داشت (P=۰/۰۰۱). همچنین، کاهش معنی‌داری در گروه آسیب نسبت به گروه شم وجود داشت. افزایش درصد حضور در ربع هدف بیان‌گر افزایش حافظه شناختی است (شکل شماره ۳-ج).

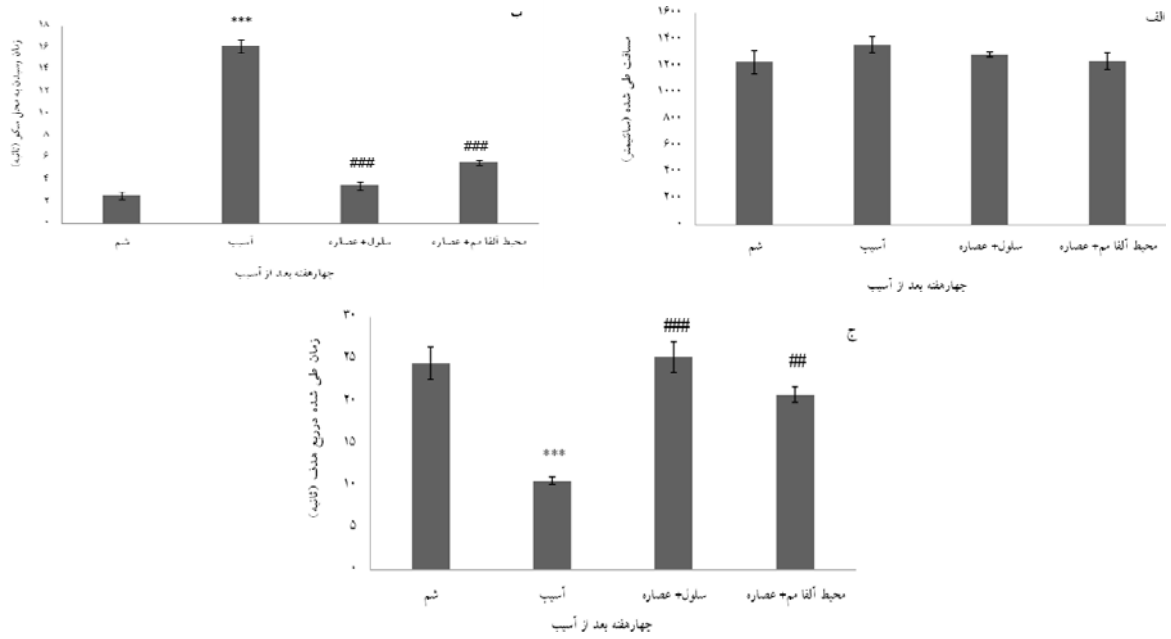
Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 15:55 +0330 on Friday February 23rd 2018

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 15:55 +0330 on Friday February 23rd 2018



شکل شماره ۲- یادگیری فضایی یک هفته پس از آسیب در گروه‌های مختلف آزمایش

(الف) از نظر تاخیر رسیدن به سکو، در هر روز آموزش تفاوت معنی‌داری میان گروه آسیب با گروه‌های سلول+ عصاره، عصاره+ محیط کشت و شم وجود داشت. همچنین، تفاوت معنی‌داری میان گروه شم با گروه‌های سلول+عصاره و عصاره+محیط کشت وجود داشت. تفاوت معنی‌داری میان گروه‌های سلول+عصاره و عصاره+محیط کشت وجود نداشت ($P<۰/۰۵$ *). (ب) از نظر مجموع مسافت طی شده نیز نتایج مشابه تاخیر در رسیدن به سکو است ($P<۰/۰۱$ ***).**



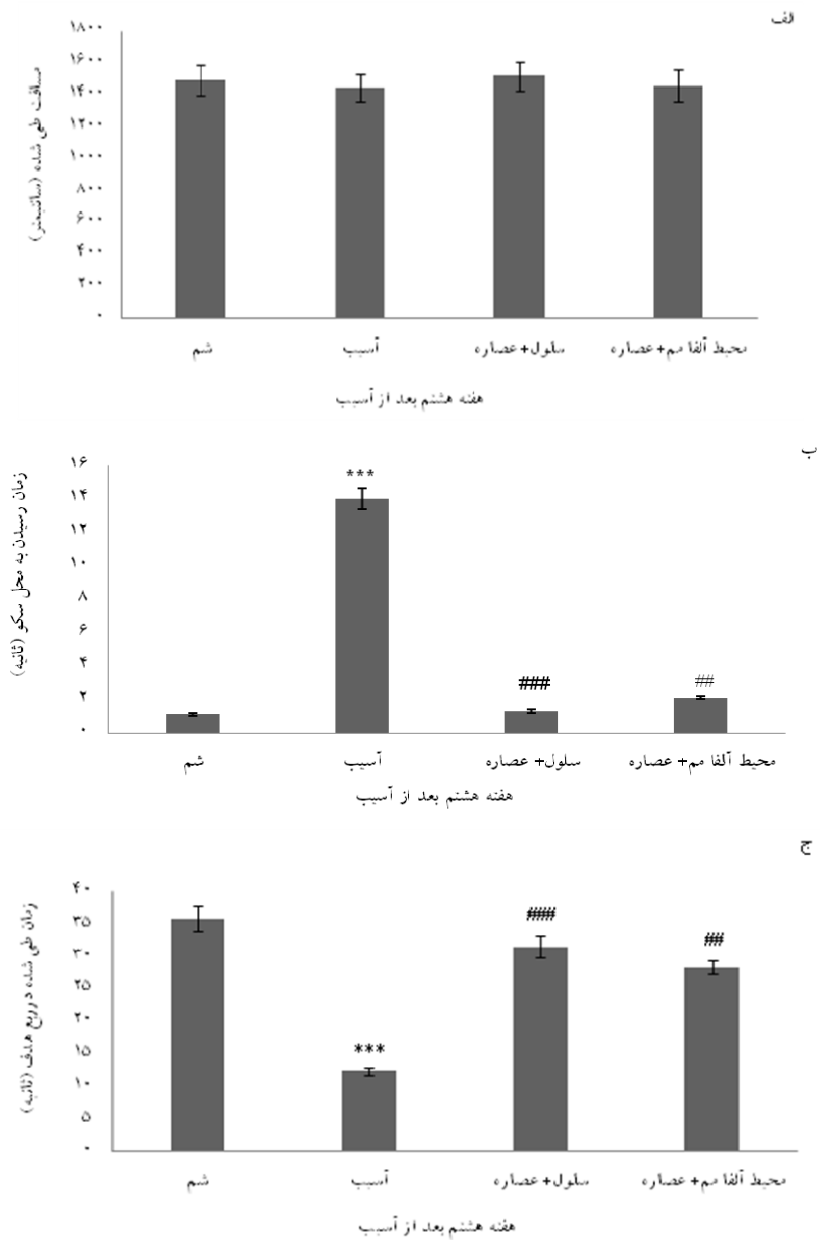
شکل شماره ۳- نتایج آزمون به‌خاطرآوری حافظه فضایی ۴ هفته پس از آسیب در گروه‌های مختلف آزمایش

(الف) مجموع مسافت طی شده و (ب) زمان رسیدن به مکان سکو. ***$P<۰/۰۰۱$ در مقایسه با گروه شم و ###$P<۰/۰۵$ در مقایسه با گروه آسیب. (ج) درصد زمان حضور در ربع هدف. گروه آسیب کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه شم نشان می‌دهد (*$P<۰/۰۰۱$). افزایش معنی‌داری در گروه‌های سلول+ عصاره و عصاره+ محیط کشت نسبت به گروه آسیب وجود دارد ($P<۰/۰۵$ ###). مقادیر بر حسب میانگین خطای استاندارد محاسبه شده‌اند (n=۸-۱۰).**

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 15:55 +0330 on Friday February 23rd 2018

نتایج آزمون به‌خاطرآوری در هفته هشتم پس از آسیب:

آزمون نهایی به‌خاطرآوری حافظه فضایی به‌منظور سنجش حافظه درازمدت حیوانات ۸ هفته پس از القا آسیب با نورو-توکسین و یا ۴ هفته پس از آزمون به‌خاطرآوری اول انجام شد. آنالیز داده‌ها در مورد مسافت طی شده در روز به‌خاطرآوری نشان-دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار میان گروه‌ها آزمایشی است (P=۰/۴۵۵). بنابراین موش‌های آموزشی اختلال حرکتی نداشتند (شکل شماره ۴-الف). بررسی زمان رسیدن به مکان سکو حاکی از وجود تفاوت معنی‌دار میان گروه‌ها است (P=۰/۰۰۱). شکل شماره ۴-ب کاهش معنی‌دار را در زمان رسیدن به مکان سکو در گروه سلول+عصاره نسبت به گروه آسیب نشان می‌دهد. از نظر درصد زمان طی شده در ربع هدف نیز آنالیز داده‌ها نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها وجود دارد (P=۰/۰۰۱). همچنین، افزایش معنی‌داری در گروه‌های سلول+عصاره و عصاره+محیط کشت نسبت به گروه آسیب وجود داشت (P=۰/۰۰۱). به‌علاوه، کاهش معنی‌داری در گروه آسیب نسبت به گروه شم وجود داشت (P=۰/۰۰۱) (شکل شماره ۴-ج).



شکل شماره ۴- آزمون دوم به‌خاطرآوری حافظه فضایی ۸ هفته پس از آسیب در گروه‌های مختلف مطالعه

(الف) مجموع مسافت طی شده و (ب) میانگین مدت زمان سپری شده برای رسیدن به سکو. $P<۰/۰۱^{***}$ در مقایسه با گروه شم. $P<۰/۰۱^{###}$ در مقایسه با گروه آسیب، (ج) مقایسه درصد زمان حضور در ربع هدف. $P<۰/۰۱^{***}$ در مقایسه با گروه شم و $P<۰/۰۱^{###}$ در مقایسه با گروه آسیب. مقادیر بر حسب خطای استاندارد محاسبه شده‌اند (n=۸-۱۰).

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 15:55 +0330 on Friday February 23rd 2018

بحث

اختلال حافظه در بیماری پارکینسون قبل از ناتوانی حرکتی شروع می‌شود و در مراحل شدیدتر به دمانس تبدیل شده و می‌تواند اعمال روزمره بیمار را مختل کند. در این تحقیق نورو-توکسین 6-OHDA در بخش‌های متراکم جسم سیاه دو طرف تزریق شد. به این ترتیب مسیر دوپامینرژیک مزوهیپوکمپال تخریب گردید و به‌دنبال آن با کاهش دوپامین در هیپوکمپ، مدل اختلال حافظه فضایی بیماری پارکینسون ایجاد شد. بیماری پارکینسون به‌عنوان یکی از شایع‌ترین بیماری‌های نورودژنراتیو است و شیوه‌های درمانی که تاکنون در این بیماری وجود داشته مؤثر نبوده‌اند. بنابراین یافتن راه درمانی مناسب و قطعی به‌جای درمان علائم بیماری بیشتر مورد توجه قرار گرفته است [۳۱-۲۹]. در این تحقیق برای اولین بار درمان ترکیبی، یعنی استفاده از عصاره برگ رزماری با نقش آنتی‌اکسیدانتی و ضدآپوپتوتیکی و سلول‌درمانی با روش تزریق مستقیم ADSCs به ورید دمی موش‌های صحرایی مدل پارکینسون، به‌صورت توأم به‌کار گرفته شد. حافظه فضایی با تکنیک ماز آبی موریس ارزیابی شد. نتایج روزهای آموزش نشان داد که حیوانات در گروه‌های شم، سلول+عصاره و عصاره+محیط کشت قادر به یادگیری روش ماز آبی موریس بودند؛ به‌طوری‌که مسافت طی شده و مدت زمان رسیدن به سکو از روز اول تا چهارم کاهش معنی‌داری را نشان داد. اما مقایسه بین گروهی نشان داد که روند یادگیری حیوانات گروه آسیب به‌طور معنی‌داری نسبت به شم کاهش یافته و در روز چهارم آموزش اختلاف معنی‌داری در دو شاخص بالا بین حیوانات دو گروه وجود داشت. قدرت یادگیری گروه‌های سلول+عصاره و عصاره+محیط کشت افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه آسیب نشان داد. از سوی دیگر بین گروه سلول+عصاره با شم تفاوت معنی‌دار وجود نداشت. همچنین، تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های سلول+عصاره و عصاره+محیط کشت در هفته هشتم بعد از آسیب وجود نداشت. ارزیابی روند به‌خاطرآوری حافظه یک روز پس از پایان دوره‌های آموزش، که ۴ و ۸ هفته پس از آسیب انجام شد، صورت گرفت. مسافت طی شده بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری را نشان نداد، که نشان‌دهنده عدم وجود اختلال حرکتی در حیوانات به‌ویژه موش‌های مدل پارکینسونی است. این یافته نشان داد ایجاد مدل به‌روش مذکور حتی قبل از آنکه اختلال حرکتی ظاهر شود، سبب بروز اختلال حافظه می‌گردد زمان رسیدن به جایگاه فرضی سکو شاخص مهم دیگری است که در آزمون به‌خاطرآوری سنجیده می‌شود. نتایج این تحقیق نشان داد که زمان رسیدن به جایگاه فرضی سکو در حیوانات گروه آسیب نسبت حیوانات گروه شم افزایش معنی‌داری داشت؛ بدین‌معنی که تزریق نوروتوکسین منجر به ایجاد اختلال حافظه فضایی شده بود، درحالی‌که مدت زمان رسیدن به سکو در گروه‌های پیوند سلول+عصاره رزماری و عصاره رزماری+محیط کشت در هفته‌های ۴ و ۸ پس از آسیب کاهش معنی‌داری را نسبت به موش‌های آسیب دیده نشان داد. می‌توان بیان کرد پیوند سلول+گاواژ عصاره رزماری و گاواژ عصاره رزماری+تزریق محیط کشت، سبب بهبود حافظه فضایی و کاهش زمان رسیدن به سکو شده است. همچنین، در هفته چهارم پس از آسیب موش‌های گاواژ شده با عصاره و تزریق محیط کشت تفاوت معنی‌داری با موش‌های پیوند شده با سلول و به‌دنبال آن گاواژ با رزماری نشان دادند و این گروه بهبود بیشتری نشان داده، ولی در هفته هشتم تفاوتی با یکدیگر نشان نداداند. همچنین، نتایج نشان داد که حیوانات گروه آسیب به‌طور معنی‌داری مدت زمان کمتری را در ربع هدف در مقایسه با گروه شم سپری کردند. گروه‌های پیوند سلول+گاواژ عصاره رزماری و عصاره رزماری+محیط کشت افزایش معنی‌داری را از این نظر نسبت به آسیب نشان دادند؛ به‌طوری‌که مدت زمان حضور در ربع هدف در گروه پیوند سلول+عصاره رزماری تفاوت معنی‌داری با گروه شم نداشت؛ بدین‌معنی که پیوند سلول+عصاره رزماری و گاواژ عصاره رزماری+محیط کشت سبب بهبود حافظه و جبران نقص شناختی حاصل از تزریق نوروتوکسین گردیده است. در هفته ۸ تنها گروه عصاره تفاوت معنی‌داری با گروه پیوند سلول+عصاره نشان داد. ازآنجاکه در نتایج آزمون به‌خاطرآوری هر دو فاکتور مدت زمان رسیدن به سکو و درصد زمان قرارگیری در ربع هدف در گروه آسیب نسبت به گروه شم کاهش یافته بود، بنابراین مدل استفاده شده توانسته اختلال شناختی و نقص در حافظه فضایی ایجاد کند. از طرف دیگر پیوند سلول، پیوند سلول+گاواژ عصاره رزماری و عصاره+تزریق محیط کشت با افزایش دادن این شاخص‌ها توانست اختلال حافظه حاصل از مدل را بهبود ببخشد. Lee و همکاران در سال ۲۰۱۲ گزارش دادند پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف استرس اکسیداتیو و آپوپتوز را در مغز موش آلزایمری کاهش داده و همچنین یادگیری و حافظه را بهبود می‌بخشد [۳۲]. بیان شده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از اپی‌تلیوم بویایی انسان قادرند یادگیری و حافظه را در هیپوکمپ موش‌های مدل آسیب دیده به حالت اول برگردانند. ایشان همچنین بیان کردند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی اپی‌تلیوم بویایی نه فقط نورون‌زائی بلکه هدایت سیناپسی را هم تحریک نموده و حافظه طولانی‌مدت را افزایش می‌دهند [۳۳]. اثر عصاره رزماری بر حافظه فضایی در مطالعات رفتاری دیگر نیز تأیید شده است. نشان داده

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 15:55 +0330 on Friday February 23rd 2018

شده است که اسید رزمارینیک علاوه بر کاهش استرس در موش صحرایی مدل آلزایمر، سبب بهبود یادگیری فضایی در ماز Y شکل می‌شود [۳۴]. Tsuji و همکارانش نشان داده‌اند که کافئیک اسید و رزمارینیک اسید باعث بازجذب فعال مونوآمین اکسیداز می‌شود [۳۵]. Sozio و همکارانش نیز اثبات کرده‌اند که کافئیک اسید و کارنوسول موجود در عصاره رزماری آزاد شدن دوپامین را در مغز بهبود می‌بخشد [۳۶]. تمدنی و همکاران نشان داده‌اند که گاواژ عصاره رزماری ۱۴ روز قبل و بعد از آسیب، بهبود حافظه را در موش‌های مدل پارکینسونی به‌همراه دارد [۳۷]. از سوی دیگر، درمان ترکیبی عنوان روش جدیدی می‌باشد که برای درمان بسیاری از بیماری‌ها به‌کار برده می‌شود [۳۹،۳۸]. مطالعات مختلفی این روش درمانی را بسیار مؤثرتر از سایر روش‌های درمانی دانسته‌اند. نتایج حاصل از سلول‌درمانی به‌همراه گاواژ عصاره رزماری نشان می‌دهد که استفاده از درمان ترکیبی عصاره و سلول، بهبود بالایی را نسبت به درمان با عصاره رزماری به‌تنهایی به‌همراه دارد. در همین راستا، Chen و همکاران در سال ۲۰۰۴ به درمان سکته مغزی در موش صحرایی با روش درمان ترکیبی با استفاده همزمان از سلول‌های بنیادی مغز استخوان و NOD (Nitric oxide donor) پرداخته و اثبات کردند که این امر باعث افزایش نورون‌زائی و رگ‌زائی در موش صحرایی می‌گردد؛ به‌طوری‌که در گروه‌هایی که از این دو روش به‌صورت توأم استفاده شده بود، در مقایسه با سایر گروه‌ها تکثیر سلول‌های اندوتلیال به‌صورت چشم‌گیری افزایش پیدا کرده بود [۴۰]. همچنین، نژادی و همکاران نشان داده‌اند که تجویز CoQ10 باعث کاهش قابل‌توجهی در میزان عوامل اکسیدان گردیده و تا حدی از نابود شدن سلول‌های مربوط به بخش متراکم جسم سیاه و جسم مخطط میزبان جلوگیری به‌عمل آورده، علاوه‌براین با خاصیت ضدآپوپتوزی که دارد باعث افزایش عمر و بقای سلول‌های BMSC در بافت میزبان شده و بنابراین سلول‌ها می‌توانند زمان کافی جهت ترشح فاکتورهای نوروتروفیک داشته باشند [۴۱]. سنجش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در هیپوکمپ از جمله مواردی بود که در این تحقیق مورد ارزیابی قرار نگرفت. ارزیابی عوامل آنتی‌اکسیدان تأییدی بود بر اثرات نوروپروتکتیو روش درمانی ترکیبی به‌کار رفته در این تحقیق. گرچه مطالعات نشان داده‌اند تعداد نورون‌های حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی در شرایط برون‌تنی بسیار کم بوده و مناسب برای پیوند نمی‌باشند و حتی تعداد زیادی از آنها پس از پیوند دچار مرگ سلولی می‌شوند [۴۲]، ولی می‌توان با انتخاب القاءگر مناسب تعداد بیشتری نورون در شرایط کشت آزمایشگاهی تهیه نمود و درصورتی‌که بیماران پیوندی با عصاره رزماری پیش‌تیمار شوند، تعداد بیشتری از نورون‌ها در محل آسیب باقی خواهند ماند و با شرایط نوروپروتکتیوی که عصاره ایجاد می‌کند، میزان بقاء نورون‌ها در محل آسیب افزایش خواهد یافت. بررسی میزان تکثیر، بقاء، تمایز و مهاجرت سلول‌ها پس از پیوند در حضور و عدم حضور عصاره رزماری، ضروری است تا کاربرد کلینیکی آن مورد تأیید قرار گیرد. همچنین، با بررسی سلول‌های آپوپتوتیک و سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در محل آسیب می‌توان ریزمحیط مناسبی را پیشنهاد داد، به‌طوری‌که سلول‌درمانی بیشترین تأثیر درمانی را در بیماران پارکینسونی داشته باشد.

نتیجه‌گیری

مجموع دو روش مصرف خوراکی عصاره و پیوند سلول باعث پاسخ درمانی بهتر در گروه درمانی توأم نسبت به دو گروه درمانی دیگر شده بود. به‌نظر می‌رسد که عصاره رزماری از مرگ نورون‌ها جلوگیری کرده و نیز ریزمحیط مناسبی برای بقاء و تمایز سلول‌های بنیادی ADSCs و تولید فاکتورهای نوروتروفیک توسط سلول‌ها فراهم می‌کند. در نتیجه استفاده توأم سلول‌درمانی و عصاره رزماری درمان مؤثرتری برای بیماری پارکینسون خواهد بود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه خانم مهدیه رمضانی حسین‌آبادی، کارشناس ارشد بافت شناسی و جنین شناسی از دانشگاه دامغان است. بدین‌وسیله از دانشکده زیست شناسی و پژوهشکده علوم زیستی دانشگاه دامغان به‌خاطر پرداخت هزینه مواد، وسایل و در اختیار گذاشتن امکانات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می‌گردد.

References:

[1] Fyfe I. Parkinson disease: Dopamine receptor variants improve response to rasagiline in PD. ***Nat Rev Neurol*** 2016; 12(7): 372.

[2] Behari M, Bhattacharyya KB, Borgohain R, Das SK,Ghosh B, Kishore A, et al. Parkinson's disease. ***Ann Indian Acad Neurol*** 2011; 14(Suppl 1): S2-6.

[3] McGeer PL, McGeer EG. Inflamation and neuodegeneration in Parkinson's disease. ***Parkinsonism Related Disord*** 2004; 10 Suppl 1: S3-7.

[4] Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. J ***Neurol Neurosurg Psychiatry*** 2008; 799(4): 368–76.

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 15:55 +0330 on Friday February 23rd 2018

[5] Domellöf ME, Forsgren L, Elgh E. Persistence of associations between cognitive impairment and motor dysfunction in the early phase of Parkinson's disease. ***J Neurol*** 2013; 260(9): 2228-36.
[6] Wurtman RJ. Personalized medicine strategies for managing patients with parkinsonism and cognitive deficits. ***Metabolism*** 2013; 62 Suppl 1: S27-9.
[7] Aarsland D, Bronnick K, Williams-Gray C, Weintraub D, Marder K, Kulisevsky J, et al. Mild cognitive impairment in Parkinson disease: a multicenter pooled analysis. ***Neurology*** 2010; 75(12): 1062-9.
[8] Somme JH, Molano Salazar A, Gonzalez A, Tijero B, Berganzo K, Lezcano E ,et al. Cognitive and behavioral symptoms in Parkinson's disease patients with the G2019S and R1441G mutations of the LRRK2 gene. ***Parkinsonism Relat Disord*** 2015; 21(5): 494-9.
[9] da Silva WC, Köhler CC, Radiske A, Cammarota M. D1/D5 dopamine receptors modulate spatial memory formation. ***Neurobiol Learn Mem*** 2012; 97(2): 271-5.
[10] Kempadoo KA, Mosharov EV, Choi SJ, Sulzer D, Kandel ER. Dopamine release from the locus coeruleus to the dorsal hippocampus promotes spatial learning and memory. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 2016; 113(51): 14835-40.
[11] Izquidero I, Da Cunha C, Rosat R, Jerusalinsky D, Ferreira MB, Medina JH. Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. ***Behav Neural Biol*** 1992; 58: 16-26.
[12] Dickerson BC, Eichenbaum H. The episodic memory system: neurocircuitry and disorders. ***Neuropsychopharmacology*** 2010; 35(1): 86-104.
[13] Knowles WD. Normal anatomy and neurophysiology of the hippocampal formation. ***J Clin Neurophysiol*** 1992; 9(2): 252-63.
[14] Martig AK, Mizumori SJ. Ventral tegmental area and substantia nigra neural correlates of spatial learning. ***Learn Mem*** 2011; 18(4): 260-71.
[15] Bethus I, Tse D, Morris RG. Dopamine and memory: modulation of the persistence of memory for novel hippocampal NMDA receptor-dependent paired associates. ***J Neurosci*** 2010; 30(5): 1610-8.
[16] Kosaka K, Yokoi T. Carnosic acid a component of rosemary (Rosmarinus officinalis L.) promotes synthesis of nerve growth factor in T98G human glioblastoma cells. ***Biol Pharm Bull*** 2003; 26(11): 1620-2.
[17] Park SE, Kim S, Sapkota K, Kim SJ. Neuroprotective effect of Rosmarinus officinalis extract on human dopaminergic cell line, SH-SY5Y. ***Cellular Molecular Neurobiol*** 2010; 30(5): 759–67.
[18] Bahri S, Jameleddine S, Shlyonsky V. Relevance of carnosic acid to the treatment of several health disorders: Molecular targets and mechanisms. ***Biomed Pharmacother*** 2016; 84: 569-582.
[19] Fu MH, Li CL, Lin HL, Chen PC, Calkins MJ, Chang YF ,et al. Stem cell transplantation therapy in Parkinson's disease. ***Springerplus*** 2015; 4: 597.
[20] Napoli E, Borlongan CV. Cell Therapy in Parkinson's disease: Host Brain Repair Machinery Gets a Boost from Stem Cell Grafts. ***Stem Cells*** 2017; 35(6): 1443-5.
[21] Braun SM, Jessberger S. Adult neurogenesis and its role in neuropsychiatric disease, brain repair and normal brain function. ***Neuropathol Appl Neurobiol*** 2014; 40(1): 3-12.
[22] Wang X, Wang Y, Gou W, Lu Q, Peng J, Lu S, et al. Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: a review. ***Int Orthop*** 2013; 37(12): 2491-8.
[23] Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. ***Cell Tissue Kinet*** 1970; 3(4): 393-403.
[24] Kim HJ, Park JS. Usage of Human Mesenchymal Stem Cells in Cell-based Therapy: Advantages and Disadvantages. ***Dev Reprod*** 2017; 21(1): 1-10.
[25] Lee JS, Park JC, Kim TW, Jung BJ, Lee Y, Shim EK, et al. Human bone marrow stem cells cultured under hypoxic conditions present altered characteristics and enhanced in vivo tissue regeneration. ***Bone*** 2015; 78: 34-45.
[26] Guilak F, Lott KE, Awad HA, Cao Q, Hicok KC, Fermor B, et al. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. ***J Cell Physiol*** 2006; 206(1): 229-37.
[27] Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robery PG, Storms RW, Gimble JM, et al. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. ***J Cell Physiol*** 2001; 189(1): 54-63.
[28] Ferro MM, Bellissimo MI, Anselmo-Franci JA, Angellucci ME, Canteras NS, Da Cunha C. Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: histological, neurochemical, motor and memory alterations***. J Neurosci Methods*** 2005; 148(1): 78-87.
[29] McDowell K, Chesselet MF. Animal models of the non-motor features of Parkinson's disease. ***Neurobiol Dis*** 2012; 46(3): 597-606.
[30] Da Cunha C, Angelucci ME, Canteras NS, Wonnacott S, Takahashi RN.The lesion of the rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons as a model for Parkinson's disease memory disabilities. ***Cell Mol Neurobiol*** 2002; 22(3): 227-37.
[31] Campos FL, Carvalho MM, Cristovão AC, Je G, Baltazar G, Salgado AJ, Kim YS, Sousa N. Rodent models of Parkinson's disease: beyond the motor symptomatology. ***Front Behav Neurosci*** 2013;7, 175-192.
[32] Lee HJ, Lee JK, Lee H, Carter JE, Chang JW, et al. Human umbilical cord blood-derived

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 15:55 +0330 on Friday February 23rd 2018

mesenchymal stem cells improve neuropathology and cognitive impairment in an Alzheimer's disease mouse model through modulation of neuroinflammation. ***Neurobiol Aging*** 2012; 33(3): 588-602.

[33] Girard SD, Devéze A, Nivet E, Gepner B, Roman FS, Féron F, et al. Isolating nasal olfactory stem cells from rodents or humans. ***J Vis Exp*** 2011; (54). pii: 2762.

[34] Alkam T, Nitta A, Mizoguchi H, Itoh A, Nabeshima T. A natural scavenger of peroxynitrites, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by Abeta (25-35). ***Behav Brain Res*** 2007; 180(2): 139-45.

[35] Tsuji M, Miyagawa K, Takeuchi T, Takeda H. Pharmacological characterization and mechanisms of novel antidepressive and/or anxiolytic-like substances identified from Perilla Herba. ***Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*** 2008; 28(4): 159-67.

[36] Sozio P, Iannitelli A, Cerasa LS, Cacciatore I, Cornacchia C, Giorgioni G, et al. New L-dopa codrugs as potential anti-Parkinson agents. ***Arch Pharm*** (Weinheim). 2008; 341(7): 412-7.

[37] Tamadoni M, HG Kashani M, Ghorbanian MT, Abrari K, Arashpour R. Neuroprotective effects of carnosic acid on the hippocampus of 6-hydroxydopamine injured rats. ***Koomesh*** 2014; 15(2): 232-41.

[38] Qiao L, Hou L, Lu A, Feng M, Qian C, et al. Differentiation to neural-like cells, a potential application of mesenchymal stem cells based on traditional Chinese medicine theories. ***Stem Cell Res Therapeutics*** 2016; 1(1): 41-52.

[39] Udalamaththa VL, Jayasinghe CD, Udagama PV. Potential role of herbal remedies in stem cell therapy: proliferation and differentiation of human mesenchymal stromal cells. ***Stem Cell Res Ther*** 2016; 7(1): 110.

[40] Chen J, Li Y, Zhang R, Katakowski M, Gautam SC, Lu M, et al. Combination therapy of stroke in rats with a nitric oxide donor and human bone marrow stromal cells enhances angiogenesis and neurogenesis. ***Brain Res*** 2004; 1005(1-2): 21-8.

[41] Nezhadi A, Ghazi F, Rassoli H, Bakhtiari M, Ataiy Z, Soleimani S, et al. BMSC and CoQ10 improve behavioural recovery and histological outcome in rat model of Parkinson's disease. Pathophysiology 2011; 18(4): 317-24.

[42] Brundin P, Karlsson J, Emgård M, Schierle GS, Hansson O, Petersén A. Castilho RF. Improving the survival of grafted dopaminergic neurons: a review over current approaches. ***Cell Transplant*** 2000; 9(2): 179-95.