مطالعه اثر درمانی آرتمیسینین به همراه سلول های بنیادی آندومتر حاوی ژن TSP-1 بر آلزایمر در موش های مدل آلزایمر-دیابت القا شده با استرپتوزوتوسین

پروین پورغلام[۱]، پریچهره یغمایی[۱*]، مهدی نورالدینی[۲]، زهرا حاج ابراهیمی[۳]

چکیده

آلزایمر شایع ترین بیماری تخریب کننده عصبی سالمندان است. استرس اکسیداتیو و التهاب نقش مهمی در بروز آلزایمر دارند. خطر ابتلا به آلزایمر در افراد دیابتی بالا می باشد و مقاومت به انسولین در مغز افراد آلزایمری اتفاق می افتد. تجمع پلاک های آمیلوئیدی منجر به رگزایی و افزایش نفوذپذیری رگ ها می گردد. امروزه گیاهان داروئی به دلیل عوارض جانبی کمتر نسبت به داروهای شیمیایی موردتوجه قرار گرفته اند. در پژوهش حاضر اثر محافظتی فرآورده گیاهی آرتیمیسیا (آرتمیسینین) به همراه سلول های بنیادی اندومتریوم حاوی ژن آنتی آنژیوژنز (Thrombospondins-1 یا TSP-1) در بیماری آلزایمر القاء شده توسط استرپتوزوتوسین در مدل آزمایشگاهی رت نر دیابتی بررسی شد. ۳ روز پس از القای آلزایمر و دیابت با استفاده از استرپتوزوتوسین، حیوانات سلول های بنیادی را ازطریق بینی دریافت کردند و سپس برای یک ماه آرتمیسینین را (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) دریافت کردند. وزن ابتدایی و انتهایی، میزان قند خون و اینترلوکین ٦ سرم سنجیده شد و پلاک های آمیلوئیدی مغز با رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین بررسی شد. نتایج نشان داد که القای آلزایمر و دیابت منجر به کاهش معنی دار وزن بدن و افزایش قندخون، اینترلوکین ٦ و پلاک های آمیلوئیدی مغز شد. تیمار با آرتمیسینین و سلول های بنیادی به طور مجزا و همزمان موجب بهبود این پارامترها گردید. نتایج نشان داد که می توان ازسلول های بنیادی آندومتر انسانی که حاوی ژنTSP-1 است به عنوان منبعی بالقوه از سلول های بنیادی در کنار آنتی اکسیدان طبیعی آرتیمیسینین جهت کاهش علائم بیماری آلزایمراستفاده نمود.

واژگان کلیدی: آلزایمر، دیابت، سلول های بنیادی آندومتر، آرتمیسینین، اینترلوکین ٦

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۲/۳۰

*۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم و فناوری های همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران yaghmaei_p@srbiau.ac.ir

۲- گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

۳- پژوهشگاه هوافضا، وزارت علوم تحقیقات و فناوری، تهران، ایران

مقدمه

بیماری آلزایمر نوعی بیماری پیش رونده مغزی و شایع ترین بیماری تخریب کننده عصبی در میان سالمندان است. از آنجا که این بیماری در نتیجه از دست دادن سلول های عصبی قشر مغز خصوصاً در نواحی کورتکس و هیپوکامپ ایجاد می شود، اولین و مهمترین نشانه آن فراموشی است. مبتلایان به این بیماری اغلب از کاهش شدید توانایی‌های هوشی و شناختی، اختلال در حافظه، تفکر و تغییر شخصیت رنج می برند (۱). از مهم ترین مشخصه های آسیب شناسی این بیماری، پلاک های پیری و کلاف های نوروفیبریلار می باشد. پلاک های پیری تجمع های خارج سلولی پروتئین آمیلوئید بتا هستند و شامل پروتئین بتا آمیلوئید بتا نامحلول می باشند (۲). آمیلوئید بتا نقش بسیار مهمی در ایجاد و پیشرفت بیماری آلزایمر دارد. این پروتئین ها در داخل نورون ها و فاصله بین آن ها رسوب می کند که در نتیجه بروز التهاب و واکنش استرس اکسیداتیو، باعث کاهش نورون در نواحی هیپوکامپ و قشر مغز می گردد (۳). مطالعات متعددی نشان داده اند که واکنش های استرس اکسیداتیو و التهاب نقش محوری در بروز و پیشرفت آلزایمر از طریق عملکرد نورونی و مرگ سلولی بازی می کند. تولید اکسیژن فعال که منجر به بروز استرس اکسیداتیو می شود، از طریق مسیرهای مختلف باعث آسیب

بافتی می شود (۱). همچنین تجمع پلاک های آمیلوئیدی منجر به رگزایی (نئوآنژیوژنز) و افزایش نفوذپذیری رگ ها می شود که این مسئله خود موجب تولید رگ های بیشتر می گردد(٤). مطالعات متعددی نشان داده اند که خطر ابتلا به بیماری آلزایمر در افراد دیابتی بسیار بالا می باشد. همچنین مشخص شده است که مقاومت در برابر انسولین در مغز نیز اتفاق می افتد. اخیراً یک همبستگی بین کاهش سیگنالینگ انسولین مغز و هیپرفسفوریلاسیون پروتئین tau نشان داده است که کمبود انسولین می تواند آمیلوئیدوز مغزی را تشدید کند. مشابه با آلزایمر، اختلال در عروق در بیماران دیابتی هم اتفاق می افتد و منجر به رتینوپاتی و نفروپاتی در بیماران دیابتی می گردد (٤). همچنین در بیماری آلزایمر نورون های کولینرژیک در ناحیه Basal forebrain به تدریج از بین میروند که منجر به اختلال حافظه در این بیماران میشود . بنابراین یکی از داروهای تأیید شده که هم اکنون برای کنترل این بیماری استفاده میشوند، داروهای مهارکننده آنزیم کولین استراز هستند. این داروها باعث بهبودی علایم بیماری میشوند ولی از پیشرفت بیماری جلوگیری نمی کنند (۵).

از آنجا که میزان بروز آلزایمر به شکل هشدار دهنده ای در حال افزایش است، در چند دهه اخیر تحقیقات گسترده ای به منظور دستیابی به روش های درمانی مناسب همچنان ادامه دارد. امروزه گیاهان داروئی به دلیل عوارض جانبی کمتر نسبت به داروهای شیمیایی موردتوجه قرار گرفته اند. محققان نشان داده اند که آنتی اکسیدان ها می توانند نقش مهمی در کاهش علایم آلزایمر بازی کنند. آنتی اکسیدان ها از عملکرد رادیکال های آزاد جلوگیری کرده و می توانند در پیشگیری و درمان بیماری آلزایمر مفید واقع شوند (۱، ٦).

آرتیمیسیا گیاهی است متعلق به خانواده Asteraceae درمنه یا کاسنی است. این گیاه دارای ٤۰۰-۲۰۰ گونه در سراسر جهان و ۳۳ گونه در ایران می باشد. از مهم ترین ترکیبات موجود در برگ آن، ترپنوئیدها و لاکتون ترین ها هستند که خواص داروئی مشابهی نیز دارند. ترکیبات شیمیایی موجود در جنس درمنه عبارتند از: مونوترپن ها، سزکوئی ترپن ها، فلاونوئیدها، فنیل پروپانوئید ها، پلی استیلن ها و کومارین ها (۷). فلاونوئیدها که آنتی اکسیدان های بر پایه گیاهی هستند به محافظت از سیستم عصبی مرکزی کمک می کنند. گیاه آرتیمیسیا دارای خواصی همچون ضد باکتریایی، ضد انگلی، ضد قارچی، ضد دیابت، ضد آلرژی، ضد التهابی، آنتی اکسیدان و ضد سرطانی می باشد. خواص آرتیمیسیا به دلیل داشتن ترکیبات شیمیایی خاص آن بوده و از این رو در صنایع دارویی، و غذایی و نیز طب سنتی بسیار کاربرد دارد. مهمترین ترکیب شیمیایی این گیاه، آرتیمیسینین با خواص ضد التهابی و آنتی اکسیدانتی می باشد (۸). از طرفی دیگر سلول های بنیادی آندومتر انسانی نوعی از سلول های آماده و در دسترس هستند که برای بازسای نورون های هیپوکامپ و اهداف سلول درمانی می توانند استفاده شوند. سلول های بنیادی آندومتر انسانی به دلیل ویژگی های تمایزی وسیع آن ها و مراحل جمع آوری غیرتهاجمی در مقایسه با سایر سلول ها منبعی مناسب از سلول های بنیادی محسوب می شوند (۹). بنابراین در پژوهش حاضر به بررسی اثر محافظتی فرآورده گیاهی آرتیمیسیا به همراه سلول های بنیادی اندومتریوم حاوی ژن آنتی آنژیوژنز یا ترومبوسپوندین یک (Thrombospondins-1 یا TSP-1) در بیماری آلزایمر القاء شده توسط استرپتوزوتوسین در مدل آزمایشگاهی رت نر دیابتی پرداخته شد. ترومبوسپوندین یک، گلیکوپروتئین متصل شونده به کلسیم است که ازطریق مهار گیرنده ۲فاکتور رشد اندوتلیال عروق موجب مهار رگزایی می شود.

مواد و روش‌کار

در این مطالعه از موش های نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۰۰ الی ۲۲۰ گرم استفاده شد که در دمای ۲٤-۲۲ درجه سانتی گراد، رطوبت ٤۰-۳۰ درصد و چرخه ۱۲ ساعت تاریکی/روشنایی با دسترسی آزاد به آب و غذا نگه داری شدند. مراحل آزمایش در دانشگاه علوم پزشکی کاشان با کد اخلاق (IR.IAU.SRB.REC.1398.191) انجام گرفت. استرپتوزوتوسین از شرکت شیمیایی سیگما و زایلازین(۲ درصد) از شرکت آلفاسان هلند تهیه شد.

روش القای آلزایمر و دیابتی کردن رت ها

در ابتدا موش ها با تزریق درون صفاقی ترکیب کتامین و زایلازین (با نسبت ۸۰ و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن؛ به ترتیب) بیهوش شدند. سپس حیوان در دستگاه استریوتاکس(برج صنعت آزما،ا یران) قرار گرفت و با استفاده از اطلس پاکسینوس کانول گذاری در ناحیه بطن با مختصات قدامی-خلفی: ۰/۸- میلی متر، میانی-جانبی±۱/٤ میلی متر و پشتی-شکمی۳ میلی متر انجام شد استرپتوزوتوسین حل شده در سالین (۳ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در ٤ میلی لیتر سالین حل شد) به وسیله سرنگ همیلتون درون هیپوکامپ حیوانات تزریق شد(۱۰). سپس بعد از یک هفته ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن استرپتوزوتوسین به صورت داخلی صفاقی جهت دیابتی کردن حیوان در دو نوبت (هر نوبت ۱۵ میلی گرم و نوبت دوم ٤۸ ساعت پس از تزریق اول) تزریق شد وطی ۱٤روز پلاکهای آمیلوئیدی در مغزحیوانات تشکیل شد(۱۱). حیوانات با قند خون بالای ۲۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر به عنوان دیابتی درنظر گرفته شدند. یک روز بعد از دیابتی شدن حیوانات، به صورت تک دوز و از طریق بینی سلول های بنیادی اندومتریوم انسانی حاوی ژن آنتی آنژیوژنز (TSP-1) تزریق شد. این سلول ها از دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه سلول های کاربردی دریافت شد. برای این منظور، بعد از بیهوش کردن حیوانات، لوله پلاستیکی داخل بینی راست و چپ قرار داده شد. قبل از تزریق سلول ها جهت افزایش حرکت سلول ها به سمت مغز، ۵ میکرولیتر هیالورونیداز (۱۰۰ یونیت آنزیم در ۲٤ میلی لیتر بافر سالین استریل حل شد؛ سیگما، آمریکا) به حیوانات داده شد. سپس ۱۰ میکرولیتر سلول در دو مرحله به هر بینی وارد شد (حاوی ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر سلول). جهت جلوگیری از پاسخ های ایمنی ناخواسته، قبل از تزریق سلول های بنیادی، سیکلوسپرین به صورت روزانه همراه با آب به حیوانات داده شد(۱۸).

گروه بندی حیوانات

موش ها بطور تصادفی در ۵ گروه ۸ تایی تقسیم شدند. گروه کنترل: حیوانات کنترل که در شرایط معمولی آزمایشگاه نگهداری شدند و آب و غذای معمولی دریافت کردند. گروه آلزایمر-دیابت: حیواناتی که مبتلا به دیابت و آلزایمر بوده و به مدت یک ماه محلول سالین را از طریق تزریق درون صفاقی (۰/۳ میلی لیتر) دریافت کردند. گروه آلزایمر-دیابت-آرتمیسینین: حیواناتی که مبتلا به دیابت و آلزایمر بوده و به مدت ۱ ماه ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن آرتیمیسینین را به صورت تزریق درون صفاقی دریافت کردند. گروه آلزایمر-دیابت-سلول بنیادی: حیواناتی که مبتلا به دیابت و آلزایمر بوده و به صورت تک دوز و از طریق بینی سلول های بنیادی اندومتریوم انسانی حاوی ژن آنتی آنژیوژنز (TSP-1) دریافت کردند. گروه آلزایمر-دیابت-سلول بنیادی-آرتمیسینین: حیواناتی که مبتلا به دیابت و آلزایمر بوده و به صورت تک دوز و از طریق بینی سلول های بنیادی اندومتریوم انسانی حاوی ژن آنتی آنژیوژنز (TSP-1) دریافت کردند و سپس به مدت ۱ ماه ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن آرتیمیسینین به صورت تزریق درون صفاقی دریافت کردند. سپس وزن اولیه و انتهایی موشها اندازه گیری شد.

روش خون‌گیری از موش ها

عمل خون‌گیری با استفاده از روش خون گیری مستقیم از قلب صورت گرفت. پس از پایان دوره آزمایش، حیوانات به مدت ۱۲ ساعت ناشتا نگه داشته شده و سپس با استفاده از کتامین –زایلازین، بیهوش شدند و خون مستقیماً از قلب آن‌ها گرفته شد به این صورت که، یک سر سوزن در طرف چپ قفسه سینه عبور داده و به طرف قلب، جلو رانده شد و عمل جمع آوری خون از قلب انجام گرفت. سپس بخشی از نمونه های خون جمع‌آوری شده بر اساس نوع آزمایش بطور کامل در EDTA و بخشی در لوله های فاقد EDTA ریخته و بعد از آن نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در ٤ درجه سانتی‌گراد در g ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و به وسیله سمپلر ۱۰۰۰ میکرولیتر، سرم به آرامی از گلبول های ته نشین شده جدا و برای سنجش پارامترهای بیوشیمیایی استفاده شد(۱۰).

سنجش میزان وزن بدن

وزن اولیه حیوان قبل از گروه بندی و وزن انتهایی در روز ۲۸ مطالعه قبل از خونگیری ثبت گردید.

سنجش پارامترهای بیوشیمیایی

میزان قند خون سرم حیوان با استفاده از کیت‌های تهیه شده توسط کمپانی پارس‌آزمون تعیین گردید. غلظت اینترلوکین ٦ (IL-6)در مایع سرمی با استفاده از تکنیک الایزا و کیت Interleukin-6 (IL6) شرکت KPG کارمانیا پارس ژن (KPG) سنجیده شد.

تثبیت، قالب گیری و برش گیری نمونه ها

پس از خارج نمودن بافت مغزی، به مدت ٤-۳ ساعت به داخل فیکساتیو فرمالین ۱۰ درصد منتقل و سپس به الکل ۷۰ درصد نیز وارد شدند. در ادامه، به منظور پاساژ نمونه ها، ابتدا آن ها را در الکل ۷۰ درصد قرار داده و سپس به الکل ۸۰ درصد انتقال داده شدند. پس از گذشت ۱ ساعت به الکل ۹۵ درصد منتقل شدند. پس از گذشت مدت زمان فوق، مجدداً به الکل ۹۵ درصد، آن هم به مدت ۱ ساعت انتقال داده شد. بعد از ۱ ساعت، درون الکل ۱۰۰ درصد به مدت ۱ ساعت قرار گرفت. مجدداً در الکل ۱۰۰ درصد به مدت ۱ ساعت و در نهایت برای مرتبه سوم درون الکل ۱۰۰ درصد به مدت ۱ ساعت قرار گرفت. در مرحله بعد، نمونه ها به مدت ۱ ساعت درون تولوئن قرار گرفتند و این عمل ۲ مرتبه انجام شد. سپس، نمونه ها به پارافین مایع منتقل و به مدت ۲ ساعت درون آون قرار گرفتند. در ادامه پارافین آن ها خارج گشته و پارافین جدید برروی نمونه ها ریخته شد و مجدداً در آون به مدت ۳ ساعت قرار گرفتند. بعد از این مرحله، مرحله قالب گیری نمونه ها صورت می گیرد که در قالب های فلزی ویژه این کار انجام خواهد شد. به این صورت که ابتدا کمی پارافین مذاب و خالص (عاری از هرگونه آلودگی) را در قالب ریخته و به سرعت، نمونه با جهت گیری مناسب برش گیری آتی و با کمک پنس گرم در آن قرار گرفتند و بلافاصله قالب با پارافین پر شد. بهتر است که در آن حباب تشکیل نشود و در صورت تشکیل باید آن را به وسیله میله ای داغ حباب گیری کرد. بعد از سرد شدن بلوک های پارافینی، نمونه ها به یخچال منتقل شد(۱۰، ۱۱).

رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین

بعد از تهیه برش های سریالی به ضخامت ٦-۵ میکرومتر توسط میکروتوم، نوارهای پارافینی حاصل را به کمک دو قلم موی تمیز به طور منظم بر سطح آب گرم در بنماری قرار داده تا با کمک آب چروکیدگی احتمالی در برش ها باز شود. سپس نوارهای پارافین توسط لام از سطح آب برداشته شد. بعد از خشک شدن و چسبیدن نمونه ها به سطح لام، مرحله رنگ آمیزی آن آغاز شد. برش گیری به گونه ای بوده که نمونه ها شامل بخش های هیپوکامپ مغزی بوده است. ابتدا به منظور پارافین زدایی برش های تهیه شده، نمونه ها طی ۳ مرحله ۲ دقیقه ای درون تولوئن

قرار داده شدند. از الکل با درجات ۱۰۰ درصد، ۱۰۰ درصد، ۹۵ درصد و ۹۵ درصد و هرکدام به مدت ۲ دقیقه جهت آبدهی استفاده شد. در ادامه، برش ها به مدت ۱۵ دقیقه در هماتوکسیلین قرار گرفتند و سپس در الکل و آب آمونیاک به ترتیب هر کدام به مدت ۱۰ ثانیه قرار داده شدند. بعد از این مرحله به مدت ۵ دقیقه در ائوزین و سپس در درجات صعودی الکل ۹۵ درصد، ۹۵ درصد، ۱۰۰ درصد و ۱۰۰ درصد در هر یک به مدت ۲ دقیقه قرار گرفتند. قبل از خشک شدن لام ها، یک قطره چسب انتلان بر روی لام ریخته و به طور زاویه دار از یک سمت لام به روی نمونه ها قرار می دهیم (زاویه دار بودن لام برای جلوگیری از ورود حباب هوا در زیر آن انجام می گیرد). بعد از اتمام این مرحله نمونه ها برای بررسی میکروسکوپی و عکس گرفتن آماده خواهند شد(۱۰،۱۱).

محاسبات آماری

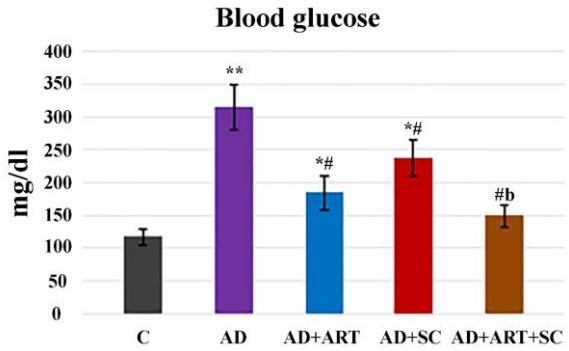
محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن ۱۷ و آنالیز واریانس یک طرفه (One-wayANOVA) و تست Tukey با در نظر گرفتن $p<0.05$ انجام شد. سپس نمودارهای مربوطه توسط نرم افزار EXCEL ترسیم شد.

نتایج

همانطور که در جدول ۱ مشخص است موش های آلزایمر–دیابت نسبت به گروه کنترل وزن انتهایی کمتری دارند ($p<0.05$). وزن انتهایی به طورمعناداری درهر سه گروه تیمار نسبت به گروه آلزایمر–دیابت بیشتر شد ($p<0.05$) و این افزایش وزن درگروه های تیمار نسبت به گروه کنترل معنی دار بود و نسبت به آلزایمر–دیابت به شکل معنی داری بالاتر بود ($p<0.05$).

اثرات مصرف روزانه آرتیمیسین و سلول های بنیادی بر روی میزان قند خون

با توجه به نتایج به دست آمده، قندخون گروه بیمار بصورت معنی داری بالاتراز گروه کنترل بود ($p<0.01$). بنابراین، میتوان گفت استرپتوزوتوسین بصورت معنی داری موجب افزایش قند خون شده و کاهش میزان قند خون بالا درهرسه گروه تیمار مشاهده گردید که این میزان در مقایسه با گروه بیمار معنی دار بود ($p<0.05$). از طرفی قند خون موش های دریافت کننده ی درمان ترکیبی (سلول بنیادی و آرتمیسینین) نسبت به گروه کنترل و آرتمیسینین معنی دار نبود اما در مقایسه با گروه سلول بنیادی معنی دار بود.



شکل ۱- تغییرات میزان قند خون در رت های نژاد ویستار در گروه های آلزایمری، کنترل و تیمار. #: اختلاف معنی دار با گروه آلزایمر در سطح P<0.05، *: اختلاف معنی دار با گروه کنترل در سطح P<0.05، **: اختلاف معنی دار با گروه کنترل در سطحP<0.01 و b: اختلاف معنی دار با گروه دریافت کننده سلول بنیادی در سطح P<0.05؛ C: گروه کنترل، AD: گروه آلزایمر–دیابت، AD+ART: گروه الزایمر–دیابت–آرتمیسینین، AD+SC: گروه آلزایمر–دیابت–سلول بنیادی، AD+ART+SC: گروه الزایمر–دیابت، آرتمیسینین–سلول بنیادی.

اثر مصرف روزانه آرتیمیسینین و سلول های بنیادی بر روی اینترلوکین٦

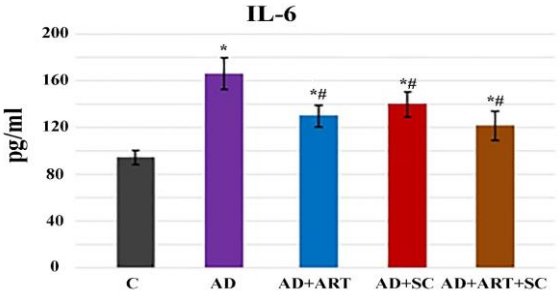
آنالیز داده های انترلوکین ٦ نشان داد، تیمار با استرپتوزوتوسین موجب افزایش میزان اینترلوکین ٦ در گروه آلزایمر–دیابت به صورت معنی داری نسبت به موش های گروه کنترل شد (P<0.05). هر سه مداخله (آرتیمیسینین، سلول بنیادی و ترکیبی از هر دو) کاهش

معنی دار اینترلوکین ٦ را نسبت به گروه آلزایمر-دیابت نشان دادند ($P<0.05$).

جدول ١- اثر مقایسه ای و ترکیبی روزانه فرآورده آرتیمیسینین و سلول بنیادی به مدت ٢٨ روز بروزن اولیه و وزن انتهایی دررت نرنژاد ویستاردرگروه های مختلف

گروه	کنترل	آلزایمر-دیابت	آلزایمر-دیابت-آرتمیسینین	آلزایمر-دیابت-سلول بنیادی	آلزایمر-دیابت-آرتمیسینین-سلول بنیادی
وزن اولیه	٢٠٩/٦ ± ٧/٥	٢٠٦/٤ ± ٨/٩	٢٠٠/٩ ± ١٠/٦	٢١٠/١ ± ١٠/٨	٢٠٩/٤ ± ٩/٦
وزن نهایی	٢٩٣ ± ١٣/٨	*١٩٣/١ ± ١٥/٩	#*٢٥٤/٤ ± ٢٠/٩	#*٢٤٤/١ ± ١٦/٩	#*٢٦١/٩ ± ١٥/٦

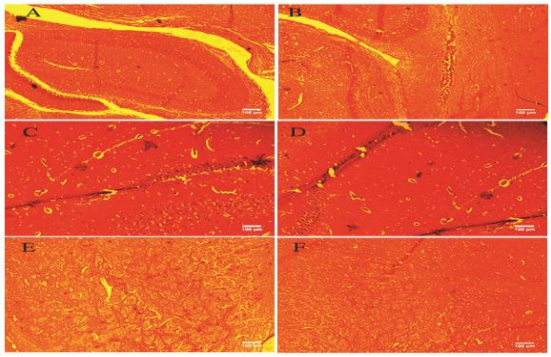
#: اختلاف معنی دار با گروه آلزایمر در سطح $P<0.05$، *: اختلاف معنی دار با گروه کنترل در سطح $P<0.05$.



شکل ٤- تغییرات میزان اینترلوکین ٦ در رت های نژاد ویستار در گروه های آلزایمری، کنترل و تیمار. # اختلاف معنی دار با گروه آلزایمر در سطح $P<0.05$ و *: اختلاف معنی دار با گروه کنترل در سطح $P<0.05$؛ C: گروه کنترل، AD: گروه آلزایمر-دیابت، AD+ART: گروه الزایمر-دیابت-آرتمیسینین، AD+SC: گروه آلزایمر-دیابت-سلول بنیادی، AD+ART+SC: گروه الزایمر-دیابت، آرتمیسینین-سلول بنیادی.

مطالعات بافتی

در گروه کنترل پس از رنگ آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین بافت شفاف و نورون ها به صورت رشته ای و دوکی شفاف با جسم سلولی همراه با هسته های مشخص در کناره های بافت هیپوکامپ مشاهده شد. در گروه آلزایمر-دیابت پس از رنگ آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین، نقطه های سیاه رنگ بزرگ که پلاک های آلزایمری هستند و همچنین التهاب نورونی مشاهده گردید. در گروه آلزایمر-دیابت دریافت کننده ی سلول بنیادی پس از رنگ آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین، تاحدودی حذف پلاک آلزایمری مشاهده گردید ولی التهاب بافتی شامل آپوپتوز بافتی منتشر و تحلیل نورونی دیده می شد. در گروه آلزایمر-دیابت دریافت کننده ی فرآورده آرتیمیسینین پس از رنگ آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین، پلاک آلزایمری بصورت نقاط سیاه تجمعی ولی به تعداد بسیار کمتر و کوچکتر نسبت به گروه آلزایمری قابل تشخیص بود. کاهش التهاب بافتی شامل بهبود و ممانعت از آپوپتوز هسته سلول عصبی نسبت به گروه آلزایمری نیز مشاهده گردید. در گروه آلزایمر-دیابت دریافت کننده ی سلول بنیادی به همراه فرآورده آرتیمیسینین پس از رنگ آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین،حذف پلاک، کاهش آپوپتوز و کاهش تحلیل نورونی و کاهش التهاب مشاهده شد.



شکل ٥- مقایسه فتومیکروگراف های رنگ آمیزی H&E روی بافت مغز در گروه های مختلف. A: گروه کنترل با بزرگنمایی ١٠٠X، B: گروه کنترل با بزرگنمایی٤٠٠X، C: گروه آلزایمر-دیابت با بزرگنمایی٤٠٠X، D: گروه الزایمر-دیابت-آرتمیسینین با بزرگنمایی٤٠٠X، E: گروه آلزایمر-دیابت-سلول بنیادی با بزرگنمایی٤٠٠X، F: گروه الزایمر-دیابت، آرتمیسینین-سلول بنیادی با بزرگنمایی٤٠٠X.

بحث

در مطالعه حاضر اثر درمانی سلول های بنیادی مشتق از آندومتر انسانی(TSP-1-HEDSCs) ترانسفکت شده با ژن TSP-1و همچنین فرآورده آرتیمیسینین به صورت مقایسه ای و ترکیبی بر رت نر آلزایمری نژاد ویستار که همزمان مبتلا به دیابت هستند بررسی گردید. بر اساس یافته های این پژوهش، استرپتوزوتوسین به صورت تزریق داخل مغزی و داخل صفاقی علاوه بر شکل‌گیری پلاک آلزایمری، باعث افزایش قند خون درموش مبتلا به آلزایمر گردید. ژانگ و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان داد که تزریق استرپتوزوتوسین در هیپوکامپ حیوانات درایجاد مدل آلزایمر و دیابت با یافته های بافت شناسی تشکیل پلاک Aβ و تجزیه و تحلیل بیوشیمیایی مانند افزایش سطح گلوکز خون همراه است (۱۲). استرپتوزوتوسین یک آنتی بیوتیک با ویژگی های سمی برای سلول های بتای پانکراس استکه باعث تخریب سلول های بنای پانکراس می شود و به طور گسترده برای ایجاد مدل های آلزایمر یا دیابت در حیوانات و جوندگانی که ویژگی های مشترک دارند استفاده می شود (۱۲). حسین اشرفی درسال ۲۰۱٤ نشان داد تزریق استرپتوزوتوسین با افزایش پروفایل لیپیدی همچون TG، LDL،TC و همچنین قند خون همراه است (۱۳). متابولیسم قند و چربی با یکدیگر ارتباط دارد. افزایش گلوکز منجر به مقاومت به انسولین و اختلال در جذب گلوکز می شود. ناقل GLUT4 (حمل کننده گلوکز نوع ٤ یا glucose transporter type 4) به طور غالب در بافت های چربی، عضلات اسکلتی و عضلات قلبی بیان می شود (١٤). افزایش استرس اکسیداتیو و مقاومت به انسولین منجر به کاهش این ناقل در سطح سلولی می شود و در نتیجه جذب گلوکز در این اندام ها کاهش می یابد. این امر موجب می شود که جذب گلوکز در کبد افزایش یابد و درنتیجه سنتز چربی ها در کبد به خاطر افزایش بیان گلوکوکیناز کبدی و آنزیم کلیدی سنتز چربی ها ACC و SREBP-1c افزایش پیدا کند (۱۵). در نتیجه متابولیسم چربی ها تغییر کرده و ساخت چربی ها در کبد افزایش پیدا می کند.

ژانگ و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان داده است که گاواژ با آرتیمیسینین باعث کاهش پروفایل های لیپیدی در موش های تغذیه شده با غذای پرچرب شده است (١٦). همچنیین سولیس و همکاران در سال ۲۰۱۹ نشان داده است که سلول های بنیادی توان درمان دیابیت را دارا می باشند و میتوانند در بافت لوزالمعده جایگزین و ترمیم کننده ی بافتی باشند (۱۷). همچنین افزایش قند خون با افزایش استرس اکسیداتیو همراه است(۱۸) که متعاقبا افزایش استرس اکسیداتیو منجر به افزایش التهاب می شود(۱۹). بنابراین با توجه به مطالعات گذشته و بر اساس نتایج این تحقیق به نظر میرسد استرپتوزوتوسین از مسیر افزایش قند خون و پروفایل لیپیدی به عنوان مسیر ثانویه علاوه بر تخریب بافت مغزی باعث تقویت روند التهاب بافتی و رسوب پروتئین تائو و در نتیجه تسریع در روند شکل گیری و تعداد پلاک های آلزایمری در کورتکس و هیپوکامپ موش های آلزایمری دیابتی می شود و احتمالا فرآورده آرتیمیسینین به عنوان یک پلی فنول طبیعی با کاهش میزان قند خون و پروفایل لیپیدی باعث کاهش عوارض دیابت ناشی از قند خون و پراکسیداسیون لیپیدی می گردد. تیمار با فرآورده آرتیمیسینین و همچنین آرتیمیسینین و سلول بنیادی حاوی ژنTSP-1 باعث تغییرات کاهش میزان قندخون بالا گردید (۱۱).

علاوه بر این نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان می دهد که موش های آلزایمر-دیابت افزایش سطح سرمی اینترلوکین ٦ نسبت به گروه کنترل دارند که این میزان افزایش معنی دار می باشد و این در حالی است که تیمار در هر سه گروه باعث کاهش معنی دار میزان اینترلوکین ٦

گردیده است. اینترلوکین ٦ از فاکتورهای التهابی و بیانگر افزایش التهاب است(۱۹). از فاکتورهای اصلی در ایجاد آلزایمر و دیابت، التهاب و استرس اکسیداتیو هست (۱) و همانطور که ذکر شد افزایش قند خون می تواند منجر به افزایش استرس اکسیداتیو و التهاب گردد(۱۸، ۱۹). از طرفی تیمار با آرتمیسینین و سلول های بنیادی منجر به کاهش قند خون و کاهش اینترلوکین ٦ گردید که نشان دهنده کاهش التهاب می باشد و موجب کاهش آپوپتوز و پلاک های آلزایمری نیز گردید. بنابراین کاهش پلاک ها می تواند ناشی از کاهش التهاب به دنبال کاهش قند خون باشد و نشان دهنده خواص ضد التهابی آرتمیسینین می باشد.

از طرفی استرپتوزوتوسین می تواند بسیاری از ویژگی های بالینی آلزایمر و دیابت از جمله اختلال در حافظه و فرآیند یادگیری، اختلال در متابولیسم انسولین و گلوکز، تشکیل پلاکAβ و تجمع کلافه های نوروفیبریلاری را تقلید کند(۱۱). به نظر می رسد، ناهنجاری در متابولیسم گلوکز و انسولین، نقش کلیدی در انحطاط شکل پذیری نورونی و اختلال در رفتار شناختی در مدل حیوانی آلزایمری و دیابتی و ناشی از تزریق استرپتوزوتوسین دارد که این تغییرات نورونی به صورت پلاک بافتی در بخش های هیپوکامپ کورتکس مغزی مشاهده میگردد (۲۰). این یافته ها با بسیاری از گزارش ها ی قبلی که اختلال در متابولیسم گلوکز می تواند عملکرد قبل و بعد از سیناپسی سلول های عصبی هیپوکامپ را تغییر دهد همخوانی ایجاد می کند (۲۱). نتایج قبلی این تحقیق نشان داد، موش های مبتلا به آلزایمر که همزمان درگیر بیماری دیابت هستند کاهش رفتار یادگیری و کاهش حافظه را تجربه کردند و این کاهش رفتار حافظه ای در تست ماز آبی موریس و به طور معنی دار و مشخص بود(۱۱). داده های آزمون های رفتاری پژوهش قبلی ما نشان داد که عملکرد شناختی هیپوکامپ در موش های استرپتوزوتوسین تزریق شده در مقایسه با حیوانات کنترل مختل شده است و استرپتوزوتوسین باعث افزایش قابل توجهی در مسافت پیموده شده و تأخیر در یافتن سکو در آزمایش ماز آبی موریس در حیوانات مدل آلزایمری نسبت به حیوانات کنترل شد که نشان دهنده اختلال در حافظه و توانایی یادگیری مربوط به هیپوکامپ است(۱۱). ازطرفی درمان با فرآورده آرتیمیسینین، اختلال شناختی ناشی از استرپتوزوتوسین را در حیوانات آلزایمری-دیابتی که آرتیمیسینین را دریافت کردند در مقایسه با حیوانات آلزایمری- دیابتی بهبود بخشید. بنابراین آرتیمیسینین ممکن است از پیشرفت نقص های شناختی و دیابت جلوگیری کند(۱۱).

ترکیب سلول بنیادی به همراه فرآورده آرتیمیسینین بیشترین اثر بخشی در شکل پذیری سیناپسی، حافظه فضایی و رفتار حافظه ای را دارا بود(۱۱). و این به دلیل جایگزینی سلول های بنیادی در بخش های آسب دیده ی مغزی و نقش ترمیم کنندگی بافتی می باشد. سعید باقری محمدی در سال ۲۰۱۸ تاثیر انتقال سلولهای بنیادی اندومتر انسانی رهاسازی شده در داخل بینی به ماده سیاه و اثرات درمانی آن ها بر چرخش موشهای کوچک آزمایشگاهی مدل پارکینسون را مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که این سلول ها قدرت تمایز به نورون ها و سلول های عصبی را دارا است (۲۲). مطالعات قبلی نشان داده است که سلول های بنیادی مزانشیمی از طریق بینی می توانند به مغز مهاجرت کرده و باعث بهبود اسیب های مغزی گردند(۲۳، ۲٤).

یافته های این پژوهش نشان داد که می توان ازسلول های بنیادی آندومتر انسانی که حاوی ژنTSP-1 است به عنوان منبعی بالقوه از سلول های بنیادی آلوژنیک در کنار آنتی اکسیدان طبیعی همچون فرآورده آرتیمیسینین جهت درمان بیماری آلزایمراستفاده نمود که می توانند علائم مدل آلزایمری را بهبود ببخشند. در این مطالعه ی تجربی برای اولین بار کاربرد داخل بینی سلول های بنیادی آندومتریال

حاوی ژنTSP-1 برای بیماری آلزایمر استفاده گردید. که این سلول های بنیادی اندومتر انسانی به کاربرده شده در داخل بینی، توانستند وارد ناحیه ی هیپوکامپ مغز شده و به سلول های عصبی و نورون های حافظه ای تمایز پیدا کنند و باعث کاهش پلاک بتاآمیلوئیدی و همچنین کاهش میزان قند خون و فاکتورهای التهابی در موش های آلزایمری همزمان مبتلا به دیابت شوند.

فهرست منابع

1. Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. Lancet. 2006; 368: 387 – 403.
2 .Hardy J, Dennis J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. Science. 2002; 297(5580): 353 - 6.
3 .Cilippingdale AB, Wade JD, Barrow CJ. The amyloid beta peptide and its role in Alzheimer's disease. Journal of Peptide Science. 2001; 7: 227-49 .
4 .Yan C, Zhou Y, Chen Q, Luo Y, Zhang JH, Huang H, Shao A. Dysfunction of the neurovascular unit in diabetes-related neurodegeneration. Biomedicine and Pharmacotherapy. 2020; 131:110656 .
5 .Schliebs R. Basal forebrain cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease interrelationship with beta-amyloid, inflammation and neurotrophin signaling. Neurochemical Research. 2005; 30: 895 - 908.
6 .Di Domenico F, Barone E, Perluigi M, Butterfield DA. Strategy to reduce free radical species in Alzheimer's disease: an update of selected antioxidants. Expert Review of Neurotherapeutics. 2015; 15(1): 19-40.
7 .Rustaiyan AH, Masoudi Sh. Chemical constituents and biological activities of Iranian Artemisia species. Phytochemistry Letters. 2011; 4(4): 440-47
8 .Eidi A. Antidiabetic effect of Artemisia deserti ethanolic extract in normal and Streptozotocin-induced diabetic rats. Qom University of Medical Sciences Journal. 2014;8(2):12-19.
9 .Zhou Y, Shao A, Xu W, Wu H, Deng Y. Advance of Stem Cell Treatment for Traumatic Brain Injury. Frontiers in Cellular Neuroscience. 2019; 13:301.
10 -Poorgholam P, Yaghmaei P, Hajebrahimi Z. Thymoquinone recovers learning function in a rat model of Alzheimer's disease. Avicenna J0urnal Phytomedicine. 2018;8 (3):188-197
11 -Poorgholam P, Yaghmaei P, Noureddini M, Hajebrahimi Z. Artemisin and human endometrial-derived stem cells improve cognitive function and synaptic plasticity in a rat model of Alzheimer disease and diabetes. Metabolic Brain Disease. 2023. https://doi.org/10.1007/s11011-023-01200-y.
12 .Zhang M, Lv XY, Li J, Xu ZG, Chen L. The characterization of high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model. Experimental Diabetes Research. 2008; 2008: 704045.
13 .Ashraf H, Heidari R, Nejati V. Antihyperglycemic and antihyperlipidemic effects of fruit aqueous extract of berberis integerrima bge in streptozotocin-induced diabetic rats. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 2014; 13(4): 1313–1318.
14 -Huang S, Czech MP. The GLUT4 glucose transporter. Cell Metabolism. 2007; 5: 237–252.
15 -Kotani K, Peroni OD, Minokoshi Y, Boss O, Kahn BB. GLUT4 glucose transporter deficiency increases hepatic lipid production and peripheral lipid utilization. J of Clinical Investigation. 2004; 114: 1666–1675.
16 .Jang WS, Kim YS, Seol IC. Antioxidant and lipid-lowering effects of Artemisia capillaris on a rat model of hyperlipidemia. The

Journal of Korean Oriental Medicine. 2012; 33(2): 11-24

17 .Solis MA, Velásquez IM, Correa R, Huang LLH. Stem cells as a potential therapy for diabetes mellitus: a call-to-action in Latin America. Diabetology & Metabolic Syndrome. 2019; 11: 20.

18 -Albert-Garay JS, Riesgo-Escovar JR, Salceda R. High glucose concentrations induce oxidative stress by inhibiting Nrf2 expression in rat Müller retinal cells in vitro. Scientific Reports, 2022; 12: 1261.

19 -Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. Journal of Clinival Investigation, 2005; 115(15):1111–9 .

20 .Arvanitakis Z, Shah RC, Bennett DA. Diagnosis and management of dementia: review. JAMA 2019; 322: 1589–1599.

21 .Kandimalla R, Thirumala V, Hemachandra Reddy P. Is Alzheimer's disease a Type 3 Diabetes? A critical appraisal. Biochimica et Biophysica Acta. 2017; 1863: 1078–108

22 .Bagheri-Mohammadi S, Alani B, Noureddini M. Evaluation of intranasal delivery of human endometrial stem cells to the substantia nigra and their therapeutic effects on rotational behavior recovery in mice model of Parkinson's disease. JAMS, 2018; 21(6), 14-24.

23 -Balyasnikova IV, Prasol MS, Ferguson SD, Han Y, Ahmed AU, Gutova M, Tobias AL, Mustafi D, Rincon E, Zhang L, Aboody KS, Lesniak MS. Intranasal Delivery of Mesenchymal Stem Cells Significantly Extends Survival of Irradiated Mice with Experimental Brain Tumors. Molecular Therapy, 2014; 22(1): 140-148 .

24- Li G, Bonamici N, Dey M, Lesniak MS, Balyasnikova IV. Intranasal delivery of stem cell-based therapies for the treatment of brain malignancies. Expert Opinion on Drug Delivery, 2018;15(2); 163-172.