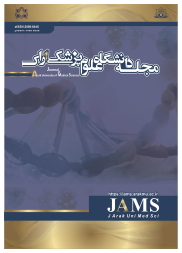
JAMS

مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک

دوره بیست و یک، شماره شش، آذر و دی ۱۳۹۷

journal homepage: http://jams.arakmu.ac.ir



مقاله پژوهشی

بررسی انتقال سلول‌های بنیادی اندومتر انسانی رهاسازی‌شده در داخل بینی به ماده سیاه و اثرات درمانی آن ها بر چرخش موش‌های کوچک آزمایشگاهی مدل پارکینسون

سعید باقری محمدی[۱]، بهرنگ علنی[۲]، مهدی نورالدینی[۳*]

۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران.

۲. گروه علوم سلولی کاربردی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران.

۳. مرکز تحقیقات فیزیولوژی، گروه علوم سلولی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۳/۰۲

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۴/۰۹

تاریخ انتشار: ۹۷/۱۰/۰۱

واژگان کلیدی

پارکینسون

سلول‌های بنیادی آندومتر

کاربرد داخل بینی

موش‌های کوچک آزمایشگاهی

*نویسنده مسئول:

مهدی نورالدینی

آدرس پستی: ایران، کاشان، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، گروه علوم سلولی کاربردی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی.

نمابر: +98 31 5557 9028

E-mail:
mnoureddini@kaums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: تحقیقات اخیر در مورد سلول درمانی جنبه‌های جدیدی از درمان بیماری‌های تحلیل نورونی را فراهم آورده است. بر اساس تحقیقات اخیر، کاربرد داخل بینی سلول‌های بنیادی در درمان موش‌های آزمایشگاهی مدل پارکینسون توانسته باعث بهبودی طولانی مدت این بیماری شود. سلول‌های بالغ بنیادی آندومتر انسانی نوعی از سلول‌های آماده و در دسترس هستند که برای تولید نورون‌های دوپامینرژیک و اهداف سلول درمانی استفاده می‌شوند. هدف از این تحقیق، کاربرد داخل بینی سلول‌های بنیادی آندومتر انسانی در موش‌های آزمایشگاهی مدل پارکینسون است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق تجربی، از ۳۵ سر موش نر با محدوده ی وزنی ۲۵ تا ۳۰ گرم در ۵ گروه استفاده شده است. صد و بیست روز پس از سلول درمانی، رفتار چرخشی موش‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. برای آشکارسازی سلول‌های بنیادی در مغز از رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی استفاده گردید.

یافته‌ها: سلول‌های بنیادی اندومتر انسانی به کاربرده شده در داخل بینی توانستند وارد ناحیه ی جسم سیاه مغز شوند و چرخش موش‌های پارکینسونی را بهبود بخشند.

نتیجه‌گیری: سلول‌های بنیادی اندومتر انسانی به عنوان منبعی بالقوه از سلول‌های بنیادی آلوژنیک می‌توانند بیماری پارکینسون را بهبود ببخشد.

تمامی حقوق انتشار این اثر، متعلق به دانشگاه علوم پزشکی اراک می‌باشد.

۱. مقدمه

بیماری پارکینسون در اثر از دست رفتن نورون‌های دوپامینرژیک در بخش متراکم جسم سیاه مغز میانی ایجاد می‌شود و علائمی چون لرزش، سفتی اندام‌ها، کندی حرکات، بی‌ثباتی و اختلال در تعادل و هماهنگی را در پی دارد و علاوه بر این علائم، اختلالات شناختی و زوال عقل هم در این بیماران دیده می‌شود که می‌تواند باعث کاهش کیفیت زندگی شده و حتی خطر مرگ را تا دو برابر افزایش دهد (۱، ۲). طیف وسیعی از درمان ها از جمله دارویی، جراحی و تحریک عمیق مغزی جهت کاهش علائم بیماری پارکینسون انجام شده است، ولی هیچ‌کدام نتوانسته‌اند جایگزین سلول‌های از دست‌رفته و مانع پیشرفت بیماری شوند. در دو دهه اخیر استفاده از پیوند سلول‌های بنیادی جهت درمان بیماری‌های عصبی در مدل‌های حیوانی افزایش یافته و امیدهای فراوانی را برای درمان آسیب‌های شبکه‌ی عصبی ایجاد نموده است. این درمان ها در انسان هم به طور محدود انجام شده است (۳، ۴). هر چند مشکلات متعددی در مورد کاربرد موفقیت آمیز این سلول ها وجود دارد. به‌عنوان مثال، سد خونی مغزی یکی از موانع اصلی انتقال سلول‌های بنیادی به مغز بعد از کاربرد سیستمیک آن‌ها می‌باشد. پیوند یا تزریق مستقیم این سلول‌ها به داخل مغز نیز از لحاظ استراتژی و کاربرد کلینیکی آسان نبوده و ممکن است منجر به آسیب‌های مغزی شود. از این‌رو، یافتن روشی مناسب همراه با کارایی بالا و با حداقل آسیب مغزی برای کاربرد سلول‌های بنیادی جهت درمان بیماری‌های سیستم عصبی در حال انجام است. از جمله ی این روش ها کاربرد داخل بینی سلول‌های بنیادی است که یک روش غیرتهاجمی و موثر برای تحویل داروها، ویروس‌های حاوی وکتورها و یا حتی فاژها به درون مغز می‌باشد. طبق مطالعات اخیر، سلول‌های بنیادی قادر به تمایز به نورون‌ها در محیط کشت و بدن موجود زنده بوده و به همین دلیل استفاده از آن‌ها در درمان بیماری‌های مختلف عصبی از قبیل آلزایمر، پارکینسون، مالتیپل اسکلروزیس، آمیلوتروفیک لترال اسکلروزیس و همچنین آسیب‌های فیزیکی مغزی-نخاعی اهمیت بالایی یافته است (۵، ۶) تا از یک طرف از سلول‌های باقیمانده نگهداری کرده و مانع پیشرفت بیماری شوند و از طرف دیگر با تبدیل به سلول‌های عصبی موردنظر منجر به بهبودی نیز گردند (۳). مدل‌های حیوانی متعددی جهت بررسی اثرات درمانی سلول‌های بنیادی در مورد بیماری‌های عصبی از جمله بیماری پارکینسون وجود دارد (۷). از جمله آن‌ها، ایجاد مدل موش‌های پارکینسونی است که با تزریق داخل مغزی شش هیدروکسی دوپامین دچار این بیماری شده‌اند (۸). تاکنون از منابع مختلفی از سلول‌های بنیادی یا استرومایی برای اهداف سلول درمانی سیستم عصبی از جمله بیماری پارکینسون استفاده شده است (۱۱-۹).

تحقیقات اخیر نشان داده که پیوند سلول‌های بنیادی جنینی (Embryonic stem cell) یا چندتوانی تحریک‌شده (Induced pluripotent stem cell) درجات متفاوتی از موفقیت در جایگزینی نورون‌های دپامینرژیک را ایجاد می‌کنند؛ هر چند مشکلات عدیده‌ی اخلاقی، تهیه و نگهداری سلول‌های بنیادی جنینی، ریسک بالای تومورزایی سلول‌های بنیادی جنینی وچندتوانی تحریک‌شده از جمله موانع و محدودیت‌های کاربرد این سلول‌ها در درمان این بیماری‌ها می‌باشد. از طرف دیگر، برخی تحقیقات کاربرد موفق سلول‌های بنیادی مزانشیمی را در درمان بیماری پارکینسون نشان داده‌اند (۱۲). سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal stromal cell) سلول‌های بنیادی بالغی هستند که به دودمان مزودرمی تعلق داشته و برای اولین بار به صورت سنتی در مغز استخوان یافت شده‌اند و سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان (Bone marrow mesenchymal stem cell) نامیده می‌شوند.

سلول‌های بنیادی مزانشیمی را می‌توان از سایر بافت‌های مزانشیمی مثل بندناف، خون بندناف، درمیس، بافت چربی، خون محیطی، جفت و پالپ دندان، بافت همبند، تاندون، غشای سینوویال، مایع آمنیوتیک، خون قاعدگی و بافت لیمبال جدا نمود (۱۱، ۱۳، ۱۴). برخلاف سایر سلول‌های بنیادی مثل سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی

عصبی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی را می‌توان از خود بیمار یا از فرد دهنده سالم و از بافت‌های مزانشیمی مثل چربی، مغز استخوان و بند ناف تأمین نمود (۱۵). بنابراین سلول‌های بنیادی مزانشیمی منبع مناسبی برای پزشکی ترمیمی محسوب می‌شوند (۱۶). از جمله آن‌ها سلول‌های مزانشیمی بنیادی مشتق از اندومتر انسانی (HEDSCs) هستند که به راحتی، بدون جراحی و بیهوشی به‌دست آمده و بسیاری از مشکلات سلول‌های بنیادی جنینی و چندتوانی تحریک‌شده و سایر سلول‌های مزانشیمی را ندارند (۱۷، ۱۸). به‌خصوص این‌که این سلول‌ها به آسانی و به کمک یک بیوپسی ساده قابل دستیابی بوده و در سنین بالا به دلیل باقی ماندن لایه پایه هم‌چنان می‌توان آن ها را برداشت نمود. هم‌چنین این نوع سلول‌ها نسبت به سلول‌های مغز استخوان جمعیت خالص‌تری دارند و با توجه به سرعت تکثیر زیاد، امکان ذخیره‌سازی آن‌ها نیز وجود دارد. بنابراین سهولت دستیابی به سلول‌های بنیادی آندومتریال، امکان استفاده از آن در خانم‌ها حتی در سنین بالا، تومورزایی پایین، داشتن جمعیت سلولی نسبتاً خالص‌تر از سلول‌های بنیادی مغز استخوان و سرعت تکثیر بیشتر، از دلایل استفاده از این نوع سلول بنیادی می‌باشند (۱۹، ۲۰). از طرف دیگر، تحقیقات نشان داده که این سلول‌ها در محیط کشت تحت تاثیر فاکتورهای خاصی قادر به تمایز به سلول‌های عصبی (۲۱) هستند، یعنی سلول‌های حاوی تیروزین هیدروکسیلاز (آنزیم کلیدی در تولید دوپامین) را نیز می‌توانند تولید کنند. هم‌چنین تزریق سلول‌های بنیادی اندومتر به داخل مغز (نزدیک استریاتوم) در موش‌های کوچک آزمایشگاهی مدل پارکینسونی (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) نشان داده که این سلول‌ها به استریاتوم مهاجرت نموده و به سلول‌های حاوی تیروزین هیدروکسیلاز تبدیل شده و سطح دوپامین و متابولیت‌های آن را در آن ناحیه افزایش داده‌اند (۱۸). جراحی و تزریق داخل وریدی و شریانی از جمله روش‌های پیوند سلول‌های بنیادی هستند که هر کدام دارای خطرات متعددی هستند (۲۲، ۲۳).

از طرف دیگر، تحقیقات متعددی جهت به‌دست آوردن روشی مناسب با حداقل آسیب و حداکثر کارایی در طب ترمیمی در حال انجام است. از جمله‌ی این تحقیقات، کاربرد داخل بینی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بوده است که نشان داده این سلول‌ها می‌توانند به داخل مغز از جمله به نواحی پیاز بویایی، هسته بویایی قدامی، اینتورینال کورتکس، لایه‌ی سلولی پورکینژ مخچه، جسم سیاه، هیپوکامپ و کورتکس مغز مهاجرت کنند. ولی توزیع این سلول‌ها در قسمت‌های محیطی از طریق مخاط بینی ناچیز گزارش شده است. میزان انتقال این سلول‌ها از بینی به مغز در برخی مطالعات حدود یک پنجم و در برخی دیگر حدود ۶۰ تا ۸۹ درصد از کل سلول‌های رهاشده داخل بینی بوده است (۲۴، ۲۵).

از جمله فواید کاربرد داخل بینی سلول‌های بنیادی در مقایسه با انتقال سیستمیک یا روش جراحی و تزریق مستقیم داخل مغزی آن‌ها، غیرتهاجمی بودن، امکان کاربرد چندگانه، کارایی بالا، پاسخ ایمنی ناچیز و انتقال محیطی پایین آن‌ها می‌باشد. هم‌چنین، احتمال تومورزایی آن‌ها در مقایسه با تزریق داخل مغزی بسیار پایین‌تر است (۲۵).

تاکنون هیچ مطالعه‌ای به بررسی انتقال سلول‌های بنیادی اندومتر انسانی از داخل بینی به ماده سیاه مغز و بهبود رفتار چرخشی موش‌های پارکینسونی نپرداخته است. از این‌رو، هدف از مطالعه حاضر، بررسی انتقال سلول‌های بنیادی اندومتر رهاسازی شده در داخل بینی به ماده سیاه مغز و اثرات درمانی آن‌ها بر چرخش موش‌های کوچک آزمایشگاهی مدل پارکینسون می‌باشد.

۲. ملاحظات اخلاقی

این مطالعه با کد اخلاق IR.KAUMS.REC.1395.109 به تصویب کمیته اخلاق معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کاشان رسیده است.

۳. مواد و روش‌ها

حیوانات و گروه‌بندی

مطالعه ی انجام گرفته از نوع تجربی بوده که در آن، تعداد ۳۵ سر موش نر کوچک آزمایشگاهی با وزن ۲۵ تا ۳۰ گرم از حیوان‌خانه‌ی مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی کاشان تهیه گردید. در زمان انجام آزمایش حیوانات در مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی کاشان با شرایط نوری فصلی (۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی)، در قفس‌های پلاستیکی مخصوص و دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. تمام آزمایشات با توجه به دستورالعمل‌های جهانی نگهداری (NIH) انجام گردید. در این آزمایش حیوانات به پنج گروه هفت تایی به شرح زیر تقسیم شدند:

یک گروه شامل موش‌های سالم که حامل سلول‌های بنیادی را از طریق کاربرد داخل بینی دریافت نمودند (Control group/Vehicle)؛

چهار گروه از موش‌های پارکینسون که به ترتیب از طریق کاربرد داخل بینی، حامل سلول‌های بنیادی (6-OHDA group/Vehicle) یا خود سلول‌های بنیادی را به تعداد 10^4, 5×10^4 and 10^5 cells μl^{-1} (6-OHDA+HEDSCs groups) دریافت نمودند.

نحوه ی ایجاد مدل پارکینسون

جهت ایجاد مدل پارکینسون از تزریق درون جسم مخطط شش هیدروکسی دوپامین استفاده شد. ابتدا موش‌ها با تزریق درون صفاقی کتامین با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم و زایلازین ۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن بیهوش شدند و سپس سر موش‌های کوچک آزمایشگاهی به کمک میله‌های دستگاه استرئوتاکسی ثابت گردید. مختصات دستگاه برای ایجاد ضایعه در ناحیه‌ی استریاتوم، ۲ میلی‌متر لترال به سمت راست نسبت به برگما، ۰/۵ میلی‌متر قدامی نسبت به برگما و ۳ میلی‌متر از سطح سخت شامه تنظیم شد. هم‌چنین میله دندان ۱ میلی‌متر زیر سطح افق قرار گرفت. برای انجام جراحی و یافتن مختصات قبل از انجام اعمال یادشده از اطلس پاکسینوس و واتسون استفاده گردید. قبل از ثابت کردن سر حیوان در دستگاه موهای سر حیوان کاملاً تراشیده شد تا پوست سر در معرض دید کامل قرار گیرد. سپس حیوان در دستگاه فیکس گردید و بعد از ضدعفونی‌کردن محل جراحی با الکل ۷۰ درصد، به وسیله تیغ جراحی شکافی موازی باصفحه ساژیتال از محل فاصله بین چشم ها تا ناحیه فاصله بین گوش ها ایجاد گردید، اسکالپ به آرامی به عقب رانده شد تا سطح استخوان تمیز گردد. با پیدا کردن مختصات، استخوان محل تزریق توسط سوزن مخصوص با سرعت پایین به منظور جلوگیری از آسیب بافت مغز سوراخ گردید. آن‌گاه با نمایان شدن سطح سخت شامه، تزریق به وسیله سرنگ هامیلتون ۱۰ میکرولیتری صورت گرفت. برای این کار نوک سرنگ SGC به عمق ۳ میلی‌متری از سخت شامه فرستاده شد. سپس ۶ میکروگرم پودر شش هیدروکسی دوپامین (سیگما) در ۴ میکرولیتر محلول نمکی ۰/۹ درصد که حاوی متا بی سولفید سدیم است به صورت یک‌طرفه (نیمه ی راست مغز) به جسم مخطط مغز تزریق گردید. این تزریقات با سرعت ۰/۵ میکرولیتر در دقیقه و به مدت ۸ دقیقه انجام گرفت. ۵ دقیقه اضافه تر بعد از پایان هر تزریق نیز برای انتشار محلول به‌داخل بافت زمان داده شد و پس از آن سرنگ به آرامی بیرون کشیده شد.

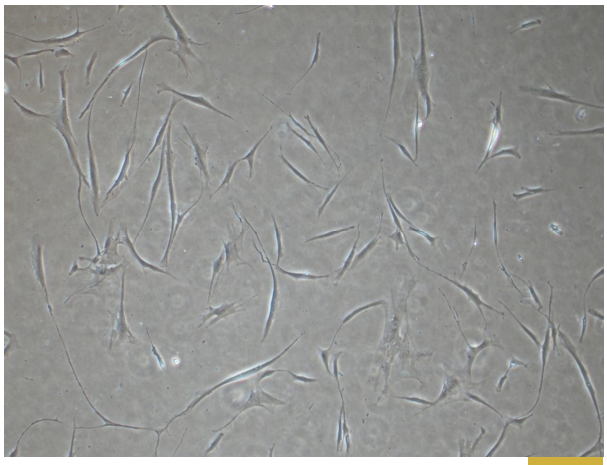
چگونگی انتخاب نمونه و آزمون آپومورفین

در این تحقیق از موش‌های مدل پارکینسونی که رفتار چرخشی یک‌طرفه (چرخش‌های کامل بیشتر از ۳۰ بار در هر ساعت) را به‌دنبال تزریق داخل صفاقی آپومورفین به میزان نیم میلی‌گرم بر کیلوگرم نشان می‌دادند، استفاده شد.

تهیه، کشت وآماده‌سازی سلول‌های بنیادی اندومتریال انسانی

در این مطالعه از سلول‌های بنیادی اندومتریال نشان‌دار شده (Green Fluorescent Protein surface labelled) تولیدی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان استفاده شد. این سلول‌ها در محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS و (پنی‌سیلین، استرپتومایسین) در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO2 و ۹۵ درصد رطوبت به مدت ۴ تا ۶ هفته کشت داده شدند. محیط کشت هر ۳ روز یکبار تعویض شده و در زیر میکروسکوپ مورد مطالعه قرار گرفت.

قابلیت زیستی سلول‌ها بر اساس بررسی هر روزه آن‌ها و مشاهده رشد سلول‌ها و چسبندگی آن‌ها به کف دیش مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱).



شکل ۱. سلول‌های بنیادی اندومتر انسانی در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS و آنتی بیوتیک. سلول‌های بنیادی به‌کار برده شده بعد از قرارگیری در محیط کشت به راحتی توانستند به کف محیط کشت چسبیده و رشد کنند. مقیاس: (40x, 0.09 µm/px)

انتقال داخل بینی سلول‌ها

عمل انتقال داخل بینی ماده حامل یا سلول‌ها توسط سرنگ هامیلتون در حالت بیهوشی (کتامین/زایلوزین) انجام شد. ابتدا ۵ میکرولیتر هیالورونیداز (hyaluronidase) (sigma Aldrich- stlouis mouse) به داخل هر کدام از سوراخ‌های بینی انتقال یافت تا میزان مهاجرت سلول‌ها به‌داخل مغز افزایش یابد. سی دقیقه بعد از تزریق هیالورونیداز، ۲۰ میکرولیتر بافر فسفات سالین (مقدار ۱۰ میکرولیتر برای هر سوراخ بینی) به تنهایی یا حاوی ۱۰۰۰۰۰، ۵۰۰۰۰، ۱۰۰۰۰ سلول به‌داخل سوراخ‌های بینی در چهار مرحله (به فاصله یک دقیقه) و هربار ۵ میکرولیتر به طور متناوب انتقال یافت. جهت جلوگیری از واکنش‌های ایمنی، سیکلوسپورین از دو روز قبل از کاربرد داخل بینی سلول‌ها به صورت خوراکی به حیوانات داده شد و این روند تا پایان آزمایش ادامه یافت.

ارزیابی وجود سلول‌های بنیادی اندومتریال انسانی در جسم سیاه

موش‌ها ۱۶ هفته پس از کاربرد داخل بینی سلول‌ها یا ۲۰ هفته پس از تزریق شش هیدروکسی دوپامین و پس از انجام آزمون آپومورفین، بیهوش شدند.

برای تشخیص سلول‌های انتقال یافته به ماده سیاه، سلول‌های اندومتریوم موجود در محیط کشت را قبل از کاربرد داخل بینی به ژن حامل GFP آغشته نمودیم. در هفته شانزدهم پس از کاربرد داخل بینی و اتمام آزمایشات، حیوان را بیهوش و به وسیله‌ی پرفیوژن کردن با نرمال سالین و سپس فیکس نمودن با ۱۰ درصد NBF (Neutral-buffered Formalin) آماده نموده و سپس مغز را از جمجمه خارج کرده و در دستگاه Tissue processor قرار دادیم و بعد از آن بلوک‌های پارافینی تهیه نموده و بعد از برش‌گیری جهت مطالعات بافت شناختی آماده نمودیم. پس از تهیه برش‌های مغزی و انجام ایمونوهیستوشیمی به وسیله‌ی آنتی بادی بر علیه GFP، آن‌ها را توسط میکروسکوپ بررسی کردیم (۲۶).

ایمونوهیستوشیمی

بعد از پارافین‌زدایی و مرحله‌ی بازیابی آنتی ژن مراحل تکنیک ایمونوهیستوشیمی به قرار زیر انجام پذیرفت:

بلوکه کردن آنزیم‌های پروکسیداز با (H_2O_2)

به منظور کاهش رنگ‌های زمینه‌ای غیراختصاصی به وسیله آنزیم‌های پراکسیداز بافت، نمونه‌ها در H_2O_2 انکوبه شدند. برای این منظور، حدود ۵ میلی‌لیتر H_2O_2 را در ۴۵ میلی‌لیتر متانول حل نمودیم و نمونه‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه در این محلول در تاریکی قرار دادیم. سپس آن‌ها را سه بار و هر بار ۲ دقیقه با PBS Tween20 شستشو دادیم.

بلوکه‌کردن جایگاه‌های غیراختصاصی

به منظور جلوگیری از چسبیدن اشتباه آنتی بادی به جایگاه‌های غیراختصاصی در بافت، مرحله بلوکه‌کردن انجام گرفت. برای بلوکه‌کردن جایگاه‌های غیر اختصاصی از محلول Super Block موجود در کیت استفاده کردیم و به مدت ۷

دقیقه در محیطی مرطوب روی اسلایدها قرار دادیم. سپس سه بار و هر بار ۲ دقیقه با PBS Tween20 شستشو دادیم.

انکوبه کردن با آنتی بادی اولیه

در این مرحله نوبت به انکوبه‌کردن با آنتی بادی می‌رسد. آنتی بادی مورداستفاده به ترتیب زیر بوده است (آنتی بادی، نسبت، شرکت):

GFP (dilution, 1:100; GFP Antibody (B-2), sc-9996; Santa cruz biotechnology).

سپس نمونه ها یک شب در دمای ۴ درجه یا ۹۰ دقیقه در دمای اتاق با آنتی بادی مربوطه انکوبه شدند. پس از آن برش‌های باف مغز را دو بار، هر بار ۲ دقیقه با PBS Tween20 شستشو دادیم.

روش تهیه‌ی محلول رقیق کننده آنتی بادی

مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم BSA را به یک میلی‌لیتر FBS اضافه می‌کنیم، سپس محلول به دست آمده را در ۴۹ میلی‌لیتر PBS حل می‌کنیم.

استفاده از محلول لینکر موجود در کیت

در این مرحله به میزان ۵۰ میکرولیتر از محلول لینکر موجود در کیت به نمونه ها اضافه می‌کنیم (۲۰ دقیقه).

سپس نمونه‌ها را سه بار و هر بار ۲ دقیقه با PBS Tween20 شستشو دادیم.

انکوبه کردن با آنتی بادی ثانویه

در مرحله ی بعدی نوبت به انکوبه‌کردن با آنتی بادی ثانویه می‌رسد که از محلول Polymer موجود در کیت استفاده کردیم. آنتی بادی به HRP متصل می‌باشد. آن گاه یک قطره از این آنتی بادی را روی نمونه ها ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه نمودیم. آنتی بادی ثانویه به آنتی بادی اولیه می‌چسبد.

سپس نمونه ها را دو بار و هر بار ۵ دقیقه با PBS شستشو دادیم تا آنتی بادی ثانویه‌ی اضافه از بین برود.

واکنش کروموژن

در این مرحله حدود ۲۰ میکرولیتر از DAB Chromogen را با ۱۰۰۰ میکرولیتر از DAB Substrate موجود در کیت حل کرده و روی نمونه ها ریختیم. واکنش آن با HRP رنگ قهوه‌ای تولید می‌کند که به این مرحله ظاهرسازی گفته می‌شود.

سپس لام‌ها را به مدت ۱۰ ثانیه در محلول هماتوکسیلین غوطه‌ور نمودیم.

پس از این مرحله لام‌ها را در آب مقطر شستشو دادیم تا رنگ اضافه برداشته شود.

Mounting

با استفاده از چسب گلیسرول روی لام‌ها را پوشاندیم. بعد از چسباندن به مدت ۲۴ ساعت باید لام‌ها خشک شوند.

شمارش سلولی

برای شمارش سلولی و عکس‌برداری، از میکروسکوپ (nikon, Japan) و از نرم‌افزار NIS-Elements AR 4.60.00 استفاده گردید. برای این منظور از لام‌های بافتی عکس‌هایی با بزرگ‌نمایی 400X تهیه گردید و با یک مساحت مشخص برای همه‌ی نمونه‌ها در ناحیه‌ی جسم سیاه مغز، شمارش سلولی توسط نرم‌افزار NIS-Elements AR 4.60.00 انجام گرفت.

تحلیل آماری

تمامی داده‌های آزمایش به صورت میانگین ± انحراف معیار ذکر شده‌اند. در مورد نتایج حاصل از بررسی رفتار چرخش القاشده توسط آپومورفین و شمارش سلول‌های حاوی GFP از آنالیز آماری واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی توکی استفاده شد. تعداد خالص چرخش ها به درصد (روز ۱۲۰ به روز اول) بیان شده است. تحلیل آماری داده‌ها در برنامه SPSS نسخه ۱۷ انجام گرفت و جهت رسم نمودارها از برنامه اکسل ۲۰۱۰ استفاده شد.

۴. یافته‌ها

نتایج حاصل از آزمون اپومورفین قبل و بعد از سلول درمانی

جدول ۱ نتایج حاصل از بررسی رفتار چرخشی القاشده توسط آپومورفین (۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت داخل صفاقی در گروه‌های پارکینسونی (6-OHDA + حامل/بینی) و

گروه‌های پارکینسونی+ سلول بنیادی (10^4, 5×10^4 and 10^5 cells µl-1, intranasal) را ۱۲۰ روز پس از سلول درمانی نسبت به روز اول و قبل از درمان به درصد نشان می‌دهد. در این ارتباط تعداد خالص چرخش در گروه‌های پارکینسونی (6-OHDA group/Vehicle) و در گروه‌های پارکینسونی+سلول بنیادی (چرخش به سمت مقابل ضایعه) بود. تحلیل آماری نشان داد که کاربرد داخل بینی سلول‌های بنیادی اندومتریال به طور معنی‌دار منجر به کاهش میزان چرخش در گروه‌های پارکینسونی درمان شده نسبت به گروه‌های پارکینسونی دریافت کننده‌ی حامل شده است ($p <$ ۰/۰۰۱). هم‌چنین مشخص شد که در گروه های تزریق داخل بینی سلول های بنیادی، افزایش تعداد سلول‌های داخل بینی به پنجاه هزار نسبت به ده هزار تفاوت معنی داری ندارد، ولی افزایش تعداد سلول‌های داخل بینی به صد هزار نسبت به ده هزار و پنجاه هزار به طور معنی‌داری منجر به کاهش اثر درمانی می‌شود ($p <$ ۰/۰۵).

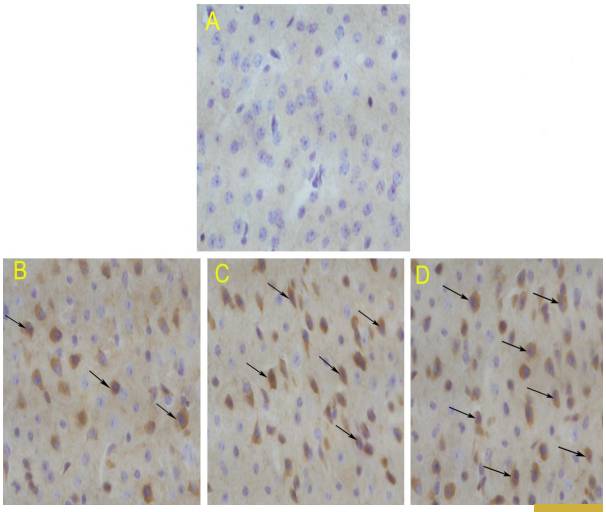
جدول ۱. نتایج حاصل از آزمون آپومورفین

گروه‌ها	6-OHDA	6-OHDA+ HEDSCs (10^4 cells µl^{-1})	6-OHDA+ HEDSCs (5×10^4 cells µl^{-1})	6-OHDA+ HEDSCs (10^5 cells µl^{-1})
میزان چرخش (درصد)	103.73±0.85	49.63±3.07*	45.33±5.17*	58.05±3.32*+

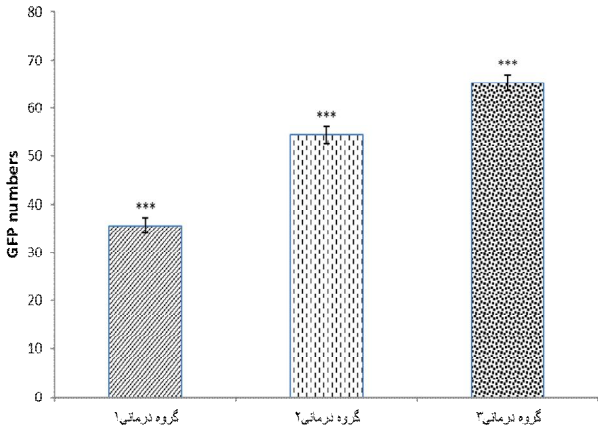
نتایج حاصل از بررسی رفتار چرخشی القاء شده توسط آپومورفین در گروه‌های پارکینسونی دریافت کننده ی حامل (6-OHDA/Vehile) و گروه‌های پارکینسونی درمان شده با سلول‌های بنیادی اندومتریال از طریق کاربرد داخل بینی (۱۲۰ روز پس از سلول درمانی). مقادیر چرخش ها به درصد (روز۱۲۰ به روز اول هر موش) بیان شده است. داده‌های این آزمایش به صورت میانگین ± انحراف معیار ذکرشده‌اند. ۰/۰۵ ≥p * در مقایسه با گروه 6-OHDA/Vehile؛
۰/۰۵ ≥p+ در مقایسه با گروه (10^4& 5×10^4 cells µl^{-1}) 6-OHDA+ HEDSCs.

بررسی مهاجرت سلول‌های بنیادی اندومتر به ماده سیاه مغز بعد از کاربرد داخل بینی آن‌ها به وسیله‌ی تکنیک ایمونوهیستوشیمی

برای بررسی مهاجرت سلول‌های بنیادی به کاربرده شده داخل بینی به ماده سیاه مغز از تکنیک ایمونوهیستوشیمی با استفاده از آنتی بادی GFP در ناحیه‌ی جسم سیاه استفاده شد (شکل ۲). در این تکنیک سلول‌های حاوی GFP طبق پروتکل کیت به‌کار برده شده (BiopharmaDX, Germany) به رنگ قهوه‌ای در می‌آیند (DAB Chromogen reaction). هم‌چنین میزان انتقال سلول‌های بنیادی با افزایش تعداد آن ها افزایش می‌یابد (p<۰/۰۰۱) (نمودار۱).



شکل ۲. استفاده از تکنیک ایمونوهیستوشیمی برای شناسایی سلول‌های انسانی حاوی GFP در ناحیه ی جسم سیاه مغز. شکل A گروه پارکینسونی دریافت کننده‌ی حامل و شکل‌های B-D به ترتیب گروه‌های دریافت کننده ی سلول‌های بنیادی اندومتریال از طریق کاربرد داخل بینی (10^4, 5×10^4 and 10^5 cells µl^{-1}) می‌باشند. سلول‌های حاوی GFP به رنگ قهوه ای درآمده‌اند. تعدادی از سلول‌های حاوی GFP نیز با علامت فلش مشخص شده‌اند.
مقیاس: (40x, 0.09 µm/px).



نمودار ۱. نتایج حاصل از شمارش سلول‌های بنیادی در ناحیه‌ی جسم سیاه مغز با استفاده از تکنیک ایمونوهیستوشیمی و آنتی بادی GFP. گروه‌های درمانی اول تا سوم به ترتیب تعداد 10^4, 5×10^4 and 10^5 cells μl^{-1} سلول بنیادی را از طریق کاربرد داخل بینی دریافت نموده‌اند ($p < ۰/۰۰۱$).

۵. بحث

بر طبق تحقیق حاضر، سلول‌های بنیادی اندومتر به کاربرده شده از طریق کاربرد داخل بینی توانستند به ناحیه‌ی جسم سیاه مغز مهاجرت نموده و باعث بهبود رفتار چرخشی موش‌های پارکینسونی شوند.

سلول‌های بنیادی مزانشیمی اندومتر انسانی منابعی جدید از سلول‌های بنیادی جهت درمان بیماری‌های مربوط به سیستم عصبی را ارائه نموده است. از ویژگی این سلول‌ها این است که منابع این سلول‌ها فراوان بوده و جداسازی آن ها ساده و ایمن و بدون درد می‌باشد که می‌توان آن ها را فقط طی یک پروسه‌ی گرفتن پاپ اسمیر تهیه نمود (۲۷). از این‌رو سلول‌های بنیادی مزانشیمی اندومتر انسانی یک راه‌کار درمانی امیدبخش را برای تولید نورون‌های دوپامینرژیک در بیماری پارکینسون ایجاد کرده‌اند. این سلول‌ها قابلیت استفاده به عنوان منابع سلولی autologous یا allogenic را داشته و بنابراین مشکلاتی از قبیل رد پیوند را ندارند. عدم رد پیوند این سلول‌ها در مدل‌های به کاربرده شده به دلیل عبور این سلول‌ها از سد خونی مغزی و عدم واکنش‌های ایمونولوژیک در برابر آن‌ها می‌باشد که این ویژگی آن‌ها را به یکی از بهترین انواع سلول‌های بنیادی تبدیل نموده است. یکی از بهترین مزایای این سلول‌ها نسبت به سایر سلول‌ها، میزان بسیار پایین خاصیت ایجاد تومور در آن‌ها است که بعد از کابردشان درون مغز جهت درمان بیماری پارکینسون، باعث ایجاد gliosis درون مغز نمی‌شوند (۲۸). سلول‌درمانی برای بیماری پارکینسون به عنوان یک راه‌کار درمانی مناسب مطرح می‌باشد. اگر چه در روش‌های کاشت سلول‌های بنیادی محدودیت‌هایی وجود دارد که باعث می‌شود متودهای کاشت سلول و روش‌های تهاجمی برای کاربرد بالینی آن راه‌کار مناسب را ایجاد نکند (۲۷). یکی از راه‌کارهای مورد تحقیق و بررسی جهت درمان بیماری‌های سیستم عصبی، روش‌های کاربرد داخل بینی سلول‌های بنیادی است.

در روش‌های اولیه، کاربرد مستقیم داخل بینی سلول‌های بنیادی باعث ورود سلول به نواحی عصبی بویایی می‌شده است، اما اخیراً در روش‌های جدیدتر برای این منظور، انتشار سلول‌های به کاربرده شده در نواحی پیش عصبی و کانال‌های لمفاتیک یا فضاهای پیش عروقی به عنوان روشی برای کاربرد سلول‌های بنیادی جهت درمان بیماری‌های سیستم عصبی و نیز به عنوان یک فرضیه ی قابل اجرا مطرح شده است (۲۹).

در مورد کاربرد داخل بینی سلول‌های بنیادی، ساده بودن و کارایی بالای آن و هم‌چنین سرعت بالایی که این روش برای استعمال سلول‌ها دارد باعث شده که تحقیقات زیادی در مورد آن جهت درمان بیماری‌های سیستم عصبی خصوصاً بیماری تحلیل عصبی مثل پارکسنیون انجام گیرد. کاربرد داخل بینی برای انتقال داروها به نواحی مغزی توسط حامل‌های مختلفی در روش‌های به‌کار برده شده امکان‌پذیر می‌باشد. در صورت اثبات کارایی روش کاربرد داخل بینی سلول‌های بنیادی، می‌توان به دلیل سادگی و آسان بودن این روش غیرتهاجمی از دوزهای مختلف سلولی به طور مکرر برای انتقال سلول‌های موردنظر بهره برد. کاربرد داخل بینی سلول‌های بنیادی باعث می‌شود تا این سلول‌ها بتوانند به سیستم عصبی مرکزی وارد شوند و به دلیل کارایی بالای این روش دیگر نیازی به استفاده از دوز بالای سلول‌ها نیست و هم‌چنین در این روش انتشار سیستمیک این سلول‌ها به نواحی مختلف بدن به حداقل ممکن می‌رسد (۲۵).

همچنین تاکنون مطالعه‌ای در مورد کاربرد داخل بینی سلول‌های بنیادی اندومتر انسانی و غیرانسانی انجام نشده است، اما برای نشان دادن کارایی روش تزریق داخل بینی از سلول‌های بنیادی دیگری در درمان بیماری‌های تحلیل عصبی از جمله پارکینسون استفاده شده است. این مطالعات نشان می‌دهد که می‌توان برای درمان بیماری پارکینسون از سلول‌های بنیادی استفاده نمود و همچنین می‌توان از کابرد داخل بینی این سلول‌ها به عنوان روشی غیرتهاجمی با کارایی بالا بهره برد. همچنین سلول‌های بنیادی مزانشیمی نیز یکی از بهترین منابع سلول‌های بنیادی جهت سلول درمانی می‌باشند (۳۰).

در مورد کاربرد داخل بینی سلول‌های بنیادی اندومتریال انسانی با افزایش تعداد سلول‌ها تا پنجاه هزار سلول در هر میکرولیتر، اثرات درمانی مطلوبی مشاهده شد و میزان چرخش موش‌های پارکینسونی به طور معنی‌داری کاهش پیدا نمود، اما با افزایش تعداد سلول‌ها به مقدار صدهزار سلول میزان بهبودی بیماری کاهش و چرخش موش‌های پارکینسونی نسبت به گروه‌های ده هزار و پنجاه هزار سلول‌های بنیادی، افزایش یافت. بنابراین در این تحقیق برای اولین بار نشان داده شد که اثرات سلول‌های بنیادی در درمان و بهبودی بیماری‌های تحلیل عصبی از جمله پارکینسون وابسته به دوز سلولی می‌باشد.

در مورد میزان انتقال سلول‌های بنیادی از طریق کاربرد داخل بینی مشخص شد که با افزایش تعداد سلول‌ها، به طور معنی‌داری میزان انتقال آن‌ها به نواحی مغزی افزایش پیدا می‌کند، اما اثرات درمانی آن‌ها بر رفتار چرخشی موش‌ها با افزایش تعداد سلول‌ها به صدهزار سلول کاهش پیدا خواهد کرد.

۶. نتیجه‌گیری

کاربرد داخل بینی سلول‌های بنیادی مزانشیمی اندومتر انسانی برای درمان بیماری پارکینسون یکی از کارآمدترین، ساده‌ترین و غیرتهاجمی‌ترین روش‌های درمانی است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی اندومتر انسانی با توجه به روش‌های ساده‌ی تهیه‌ی آن‌ها، مهاجرت وابسته به دوز سلولی از ناحیه بینی به ناحیه جسم سیاه مغز و اثرات درمانی آن‌ها در بهبودی بیماری پارکینسون می‌توانند یکی از بهترین انواع سلول‌های بنیادی جهت درمان بیماری‌های تحلیل سیستم عصبی مطرح شوند.

۷. تقدیر و تشکر

مقاله حاضر برگرفته از دو پایان نامه دانشجویی است. نویسندگان مقاله از معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی کاشان به دلیل تأمین هزینه‌های این تحقیق (شماره‌های طرح: ۹۵۱۴۴، ۹۵۹۳) تشکر و قدردانی می‌نمایند.

۸. سهم نویسندگان

تمامی نویسندگان معیارهای استاندارد نویسندگی بر اساس پیشنهادات کمیته بین المللی ناشران مجلات پزشکی را دارا بودند.

۹. تضاد منافع

بدین‌وسیله نویسندگان تصریح می‌نمایند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

References

1. Pakkenberg B, Møller A, Gundersen H, Dam AM, Pakkenberg H. The absolute number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson's disease estimated with an unbiased stereological method. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry. 1991; 54(1):30-3.
2. Levy G, Tang M-X, Louis ED, Cote LJ, Alfaro B, Mejia H, et al. The association of incident dementia with mortality in PD. Neurology. 2002; 59(11):1708-13.
3. Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders. Nature. 2006; 441(7097):1094.
4. Barker RA, Barrett J, Mason SL, Björklund A. Fetal dopaminergic transplantation trials and the future of neural grafting in Parkinson's disease. The Lancet Neurology. 2013; 12(1):84-91.
5. John GR, Shankar SL, Shafit-Zagardo B, Massimi A, Lee SC, Raine CS, et al. Multiple sclerosis: re-expression of a developmental pathway that restricts oligodendrocyte maturation. Nature medicine. 2002; 8(10):1115.
6. Kim C, Lee HC, Sung J-J. Amyotrophic lateral sclerosis-cell based therapy and novel therapeutic development. Experimental neurobiology. 2014; 23(3):207-14.
7. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. Neuron. 2003; 39(6):889-909.
8. Blesa J, Phani S, Jackson-Lewis V, Przedborski S. Classic and new animal models of Parkinson's disease. BioMed Research International. 2012; 2012.
9. Nam H, Lee K-H, Nam D-H, Joo KM. Adult human neural stem cell therapeutics: Current developmental status and prospect. World journal of stem cells. 2015; 7(1):126.
10. Ikegame Y, Yamashita K, Nakashima S, Nomura Y, Yonezawa S, Asano Y, et al. Fate of graft cells: what should be clarified for development of mesenchymal stem cell therapy for ischemic stroke? Frontiers in cellular neuroscience. 2014; 8:322.
11. Kitada M, Dezawa M. Parkinson's disease and mesenchymal stem cells: potential for cell-based therapy. Parkinson's disease. 2012; 2012.
12. Sundberg M, Isacson O. Advances in stem-cell–generated transplantation therapy for Parkinson's disease. Expert opinion on biological therapy. 2014; 14(4):437-53.
13. Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. Ageing research reviews. 2006; 5(1):91-116.
14. Vishnubalaji R, Al-Nbaheen M, Kadalmani B, Aldahmash A, Ramesh T. Comparative investigation of the differentiation capability of bone-marrow-and adipose-derived mesenchymal stem cells by qualitative and quantitative analysis. Cell and tissue research. 2012; 347(2):419-27.
15. Bellantuono I, Aldahmash A, Kassem M. Aging of marrow stromal (skeletal) stem cells and their contribution to age-related bone loss. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease. 2009; 1792(4):364-70.
16. Dvorakova J, Hruba A, Velebny V, Kubala L. Isolation and characterization of mesenchymal stem cell population entrapped in bone marrow collection sets. Cell biology international. 2008; 32(9):1116-25.
17. Ghobadi F, Mehrabani D, Mehrabani G. Regenerative potential of endometrial stem cells: a mini review. World journal of plastic surgery. 2015; 4(1):3.
18. Wolff EF, Mutlu L, Massasa EE, Elsworth JD, Eugene Redmond D, Taylor HS. Endometrial stem cell transplantation in MPTP-exposed primates: an alternative cell source for treatment of Parkinson's disease. Journal of cellular and molecular medicine. 2015; 19(1):249-56.
19. Verdi J, Tan A, Shoae-Hassani A, Seifalian AM. Endometrial stem cells in regenerative medicine. Journal of Biological Engineering. 2014; 8(1):20.
20. Shoae-Hassani A, Sharif S, Seifalian AM, Mortazavi-Tabatabaei SA, Rezaie S, Verdi J. Endometrial stem cell differentiation into smooth muscle cell: a novel approach for bladder tissue engineering in women. BJU international. 2013; 112(6):854-63.
21. Noureddini M, Verdi J, Mortazavi-Tabatabaei SA, Sharif S, Azimi A, Keyhanvar P, et al. Human endometrial stem cell neurogenesis in response to NGF and bFGF. Cell biology international. 2012; 36(10):961-6.
22. Kozłowska H, Jabłonka J, Janowski M, Jurga M, Kossut M, Domańska-Janik K. Transplantation of a novel human cord blood-derived neural-like stem cell line in a rat

model of cortical infarct. Stem cells and development. 2007; 16(3):481-8.
23. Yang B, Migliati E, Parsha K, Schaar K, Xi X, Aronowski J, et al. Intra-arterial delivery is not superior to intravenous delivery of autologous bone marrow mononuclear cells in acute ischemic stroke. Stroke. 2013; 44(12):3463-72.
24. Fransson M, Piras E, Wang H, Burman J, Duprez I, Harris RA, et al. Intranasal delivery of central nervous system-retargeted human mesenchymal stromal cells prolongs treatment efficacy of experimental autoimmune encephalomyelitis. Immunology. 2014; 142(3):431-41.
25. Danielyan L, Beer-Hammer S, Stolzing A, Schäfer R, Siegel G, Fabian C, et al. Intranasal delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells, macrophages, and microglia to the brain in mouse models of Alzheimer's and Parkinson's disease. Cell transplantation. 2014; 23(1):S123-S39.
26. Vahidinia Z, Alipour N, Atlasi MA, Naderian H, Beyer C, Azami Tameh A. Gonadal steroids block the calpain-1-dependent intrinsic pathway of apoptosis in an experimental rat stroke model. Neurological research. 2017; 39(1):54-64.
27. Lee S, Choi E, Cha M-J, Hwang K-C. Cell adhesion and long-term survival of transplanted mesenchymal stem cells: a prerequisite for cell therapy. Oxidative medicine and cellular longevity. 2015; 2015.
28. Wolff EF, Gao XB, Yao KV, Andrews ZB, Du H, Elsworth JD, et al. Endometrial stem cell transplantation restores dopamine production in a Parkinson's disease model. Journal of cellular and molecular medicine. 2011; 15(4):747-55.
29. Dhanda DS, Frey W, Leopold D, Kompella UB. Approaches for drug deposition in the human olfactory epithelium. Drug Deliv Technol. 2005; 5(4):64-72.
30. Darzi S, Werkmeister JA, Deane JA, Gargett CE. Identification and characterization of human endometrial mesenchymal stem/stromal cells and their potential for cellular therapy. Stem cells translational medicine. 2016; 5(9):1127-32.

JAMS
Journal of Arak University of Medical Sciences
2018; 21(6)
Journal Homepage: http://jams.arakmu.ac.ir

ORIGINAL RESEARCH

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

Saeid Bagheri-Mohammadi[1], Behrang Alani[2], Mahdi Noureddini [3*]

1. Department of Physiology, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran.
2. Department of Applied Cell Sciences, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran.
3. Physiology Research Centre, Department of Applied Cell Sciences, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran.

ARTICLE INFORMATION

Article history:
Received: *23 May 2018*
Accepted: *30 June 2018*
Published online: *22 December 2018*

Keywords:
Endometrial stem cells
Intranasal delivery
Mice
Parkinson's disease

**** Corresponding Author:***
Mahdi Noureddini; Physiology Research Centre, Department of Applied Cell Sciences, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran.

Fax: *+98 31 5557 9028*
Email: *mnoureddini@kaums.ac.ir*

ABSTRACT

Background and Aim: Recent findings in cell therapy have presented new perspectives and opportunities for the treatment of neurodegenerative disease. The experimental research with intranasal (IN) administration of Stem Cells in Parkinson's disease (PD) mouse model can work and in some cases induce major, long-lasting improvement. Adult Human endometrial derived stem cells (HEDSCs), a readily obtainable type of mesenchymal stem-like cell were used to generate dopaminergic cells and for cell therapy. In this study, we investigated the therapeutic effects of IN-delivered HEDSCs in mice model of Parkinson.

Materials and Methods: In this experimental research, 35 male mouse weighting 25-30 g were divided into 5 groups. On day 120 post cell administration, the rotational behavior was measured. Immunohistochemistry staining was used to detect HEDSCs in mice brain.

Findings: IN application of HEDSCs resulted in the appearance of cells in the substantia nigra (SN) and decrease in the rotational behavior of case group.

Conclusion: HEDSCs are a highly inducible source of allogenic stem cells that improve Parkinson's disease.

© Copyright (2018) Arak University of Medical Sciences

Cite this article as: 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. J Arak Uni Med Sci. 2018; 21(6): 14-25.

This open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution NonCommercial 4.0 License (CC BY-NC 4.0).