



بررسی تأثیر داروی L-Dopa لیپوزومی و اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های SH-Sy5y بر بقای

نورون‌های دوپامینرژیک از طریق تنظیم بیان ژن‌های Bdnf و Dat

پرستو زرین^۱، محمود دهقانی اشکذری^{۱*}، سید مرتضی سیفتی^۱

۱- گروه زیست‌شناسی - مرکز تحقیقات زیست‌فناوری پزشکی - واحد اشکذر - دانشگاه آزاد اسلامی - اشکذر - یزد - ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۹، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱/۱۴

چکیده

مقدمه: بیماری پارکینسون یک ناهنجاری نورودژنراتیو پیش‌رونده می‌باشد که در طی آن نورون‌های دوپامینرژیک در ناحیه جسم سیاه به تدریج از بین می‌روند. اخیراً، روش‌های درمانی ترکیبی به عنوان رویکردهای درمانی مؤثر بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. در این مطالعه، اثرات بالقوه اگزوزوم‌های جدا شده از سلول‌های SH-Sy5y و داروی L-Dopa لیپوزومی بر شرایط پاتولوژیکی موش‌های صحرایی مبتلا به پارکینسون بررسی گردید.

مواد و روش‌ها: ۲۵ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در پنج گروه طبقه‌بندی شدند. مدل پارکینسون از طریق تزریق ترکیب ۶-OHDA در ناحیه جسم سیاه سمت راست مغز ایجاد شد. اگزوزوم‌های جداسازی شده از سلول‌های SH-Sy5y به تنهایی و همراه با داروی L-Dopa لیپوزومی شده به مدل‌های بیمار تزریق شدند. اثرات تیمارهای صورت گرفته از طریق انجام تست رفتاری، بررسی‌های بافت‌شناسی و بررسی تغییرات بیان دو ژن Bdnf و Dat به روش real-time PCR بررسی گردیدند.

نتایج: تیمار همزمان مدل‌های بیمار با اگزوزوم و داروی L-Dopa لیپوزومی شده باعث افزایش جمعیت نورون‌های دوپامینرژیک در ناحیه جسم سیاه مغز گردید. همچنین در مدل‌های تیمار شده با هر دو اگزوزوم و داروی L-Dopa لیپوزومی شده افزایش معنادار سطح بیان ژن‌های Bdnf و Dat مشاهده شد در حالیکه افزایش بیان مشاهده شده در تیمارهای جداگانه از نظر آماری معنادار نبودند ($P > 0/05$).

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان دادند که استفاده از داروی L-Dopa به همراه اگزوزوم‌های سلول‌های SH-Sy5y اثرات سینرژیک مثبتی بر افزایش بیان ژن‌های Bdnf و Dat داشته و باعث القای تمایز سلول‌های پیش‌ساز عصبی به نورون‌های دوپامینرژیک و در نتیجه افزایش جمعیت و بقای آنها در ناحیه جسم سیاه مغز می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: پارکینسون، نانولیپوزوم، L-Dopa، اگزوزوم، Bdnf، Dat

*نویسنده مسئول: یزد- اشکذر- بلوار دانشگاه- دانشگاه آزاد اسلامی واحد اشکذر، تلفن: ۰۳۵۱-۳۲۷۲۵۹۵، شماره: ۰۳-۳۲۷۲۵۹۵۲۵، Email: mdashkezary@yahoo.com

ارجاع: زرین پرستو، دهقانی اشکذری محمود، سیفتی سیدمرتضی. بررسی تأثیر داروی L-Dopa لیپوزومی و اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های SH-Sy5y بر بقای نورون‌های دوپامینرژیک از طریق تنظیم بیان ژن‌های Bdnf و Dat. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۰؛ ۱۶(۱): ۳۱-۲۱.

مقدمه

در سال‌های اخیر جمعیت افرادی که از آسیب‌های سیستم عصبی مرکزی (CNS) مانند آسیب مغزی TBI، سکته مغزی ایسکمی (IS) و بیماری پارکینسون (PD) رنج می‌برند، با روند رو به رشدی همراه بوده است. بر طبق گزارشات آسیب‌های دژنراتیو مغزی سالانه ۶۹ میلیون نفر در جهان را درگیر می‌کند. از جمله بیماری‌های دژنراتیو مغزی شایع در جهان بیماری پارکینسون (PD) می‌باشد که با از دست دادن تدریجی عملکردهای حرکتی، تغییرات در راه رفتن و بی ثباتی وضعیتی، اختلال عملکرد شناختی، درد و ناهنجاری‌های خواب همراه است (۴-۱). مطالعات نشان دادند که مرگ سلول‌های عصبی تولیدکننده دوپامین (نورون‌های دوپامینرژیک) و در نتیجه کاهش دوپامین (DA) در مغز منجر به اختلال در برقراری ارتباطات نورونی در مغز میانی می‌گردد (۵). همچنین مطالعات متعددی نشان دادند که ضایعات عصبی دوپامینرژیک مغز میانی به تنهایی می‌تواند منجر به علائمی مشابه PD در مدل‌های حیوانی شود. تاکنون روش‌های درمانی مختلفی برای کاهش علائم و روند پیشرفت PD گزارش شده است. درمان‌های دارویی نظیر استفاده از L-DOPA و DBS اغلب برای تقویت سیستم دوپامینرژیک مغز و کنترل علائم PD به کار می‌روند (۶). داروی L-DOPA به آسانی از سد خونی-مغزی عبور کرده و توسط آنزیم دکربوکسیلاز L-آمینواسید (AADC) به DA تبدیل می‌شود. پس از پاسخ اولیه خوب، این دارو قادر است برخی عوارض بیماری شامل نوسانات حرکتی، دیسکینزیس و تغییرات ذهنی را در طولانی مدت کنترل کند (۷). اگرچه داروی L-DOPA می‌تواند علائم PD را تا حدودی کاهش دهد، اما در متوقف کردن پیشرفت PD تأثیر مثبتی ندارد. همچنین این دارو معایبی نظیر حلالیت پایین در آب، حساسیت به اکسیداسیون شیمیایی و آنزیمی و دکربوکسیلاسیون محیطی را دارا می‌باشد که استفاده کارآمد از آن را در فاز بالینی با مشکل روبرو می‌سازد (۸). لذا در مطالعات فراوانی به بررسی راهکارهایی جهت افزایش حلالیت در آب و افزایش مقاومت و پایداری این دارو در شرایط فیزیولوژیکی مختلف پرداخته شده است (۹). یکی از روش‌های کاربردی جهت افزایش ماندگاری و کارایی داروها، لیپوزومال کردن آنها می‌باشد. از لیپوزوم‌ها به عنوان حامل مواد دارویی برای کنترل تحویل یا هدف قرار دادن عوامل بیولوژیکی فعال استفاده می‌شود که می‌توانند منجر به تأثیر بهتر، اثر طولانی مدت و کاهش سمیت دارو گردند. مطالعات نشان دادند که کپسوله کردن مواد دارویی در لیپوزوم‌ها، از آنها در برابر تخریب محافظت کرده و همچنین باعث افزایش طول عمر دارو در پلاسما و افزایش اثربخشی آن با دوز کمتر می‌گردد (۱۰). به دلیل میزان بالای سازگاری، لیپوزوم‌ها به عنوان یک ابزار بیولوژیکی مناسب جهت تحویل مولکول‌های مختلف از جمله داروها بافت‌های

مختلف بدن مورد استفاده قرار گرفته اند. لیپوزوم‌ها با کاهش سرعت رهایش دارو به درون مایعات بیولوژیکی باعث افزایش اثربخشی و عملکرد دارو در بدن می‌شوند. همچنین این ترکیبات باعث کند شدن روند متابولیسم دارو به متابولیت‌های غیرفعال آن شده که در نتیجه آن پایداری و نیمه عمر دارو افزایش خواهد یافت (۱۱). در کنار درمان‌های دارویی مورد استفاده، روش‌های جایگزینی سلول جهت بازگرداندن جمعیت نورون‌های دوپامینرژیک نیز مورد توجه می‌باشد (۱۲). مطالعات نشان دادند که پیوند سلول‌های بنیادی یا پروژنیوتوری عصبی به ناحیه آسیب دیده مغزی می‌تواند نتایج امیدوارکننده‌ای را در احیا و بازسازی برخی اتصالات و سیناپس‌های عصبی مغز میزبان ارائه دهند (۱۳). همچنین در سال‌های اخیر، مطالعات نشان دادند که بسیاری از فاکتورهای ترشحی از سلول‌های بنیادی و همچنین سلول‌های تمایز یافته بافت‌های مختلف می‌توانند بر سلول‌های مجاور اثرات محافظتی داشته و عملکرد آنها را بهبود بخشند (۱۴). در همین راستا، اخیراً آگروزوم‌ها به عنوان دسته‌ای از وزیکول‌های دو لایه لیپیدی کوچک قابل ترشح از سلول‌های مختلف شناخته شده اند که حاوی ترکیبات مختلفی نظیر فاکتورهای رشد، آنزیم، هورمون‌ها، miRNA و غیره می‌باشند. این آگروزوم‌های ترشحی می‌توانند توسط سلول‌های مجاور جذب شده و یا از طریق جریان خون به سلول‌های اندام‌های دیگر منتقل شوند (۱۵). در مطالعات اخیر، اثرات محافظتی و درمانی آگروزوم‌ها در بیماری‌های التهابی، قلبی-عروقی، عصبی، پارکینسون و غیره گزارش شده است (۱۶).

با توجه به مطالب ذکر شده، در این مطالعه اثرات بالقوه آگروزوم‌های جداسازی شده از سلول‌های SH-Sy5y، به عنوان یک رده سلولی منشأ عصبی، و داروی لیپوزومال L-Dopa بر مدل موش صحرایی مبتلا به پارکینسون بر ویژگی‌های رفتاری حیوان، تراکم نورون‌های دوپامینرژیک ناحیه جسم سیاه (NS) مغز و بیان ژن‌های Bdnf و Dat در سطح مولکولی بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

در مطالعه تجربی از ۲۵ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار آلبینو با محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم (با سن حدود ۸ هفته) استفاده شد. حیوانات در شرایط استاندارد (دمای 21 ± 2 درجه سانتی‌گراد و سیکل ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) با دسترسی آزاد به آب و غذای یکسان نگهداری شدند. موش‌های صحرایی به صورت تصادفی به ۵ گروه ۵ تایی تقسیم شدند: (۱) مدل پارکینسون، (۲) مدل پارکینسون تحت درمان با داروی L-Dopa، (۳) مدل پارکینسون تحت درمان با Liposomal L-آگروزوم، (۴) مدل پارکینسون تحت درمان با داروی Liposomal L-Dopa (L-Dopa-LIP) روز تحت درمان، (۵) مدل پارکینسون

در نهایت، سوسپانسیون حاصل سانتریفیوژ گردید (sigma, Germany) تا یک سوسپانسیون شفاف حاوی نانولیپوزوم‌های حامل داروی L-Dopa به دست آید.

خصوصیات مورفولوژیکی نانولیپوزوم‌های تولید شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM, LEO 1430VP, Germany and UK Zeta) انجام شد. همچنین اندازه و قطر متوسط نانوذرات لیپوزومی به روش پراکندگی نور دینامیکی (DLS) با استفاده از دستگاه Zeta (Malvern, UK) اندازه‌گیری شد. همچنین جهت تعیین میزان داروی L-Dopa بارگذاری شده در نانولیپوزوم‌ها میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۸۸ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (England PG-Instrument LTD) قرائت شد. میزان داروی بارگذاری شده در نانولیپوزوم‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

میزان داروی بارگذاری شده = (L-Dopa کل - L-Dopa باقیمانده) / L-Dopa کل × ۱۰۰

سلول‌های Sh-Sy5y از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران (تهران، ایران) خریداری شده و در محیط‌های کشت DMEM/F12 و RPMI-1640 کشت داده شد (سیگما-آلدریج، سنت لوئیس، MO، آمریکا). محیط‌های کشت مورد استفاده با ۱۰٪ FBS و آنتی‌بیوتیک‌ها پنی‌سیلین و استرپتومایسین (۱٪) (Gibco) (Thermo Fisher, pen/strep) (USA, III, Rockford, Scientific Inc) غنی شدند. سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در ۵٪ CO₂ تحت رطوبت ۹۵-۹۰٪ نگهداری شدند و با استفاده از تریپسین (Thermo Fisher, Gibco) (USA, III, Rockford, Scientific Inc) و محلول نمکی بافر فسفات (PBS) تحت پاساژهای متوالی قرار گرفتند.

دو هفته پس از کشت سلول‌های Sh-Sy5y، کشت‌های سلولی با تراکم ۸۰ الی ۹۰ درصد حاصل گردید. ۲۴ ساعت قبل از استخراج آگروزوم، محیط کشت سلول‌ها تعویض شد. در روز بعد، محیط رویی سلول‌های متراکم جمع‌آوری شده و به مدت ۲ ساعت تحت اولتراسانتریفیوژ با سرعت بالای ۱۲۰,۰۰۰ × g قرار گرفتند تا آگروزوم‌های موجود از مایع رویی جدا گردند. رسوب حاصل حاوی آگروزوم در یک میلی‌لیتر بافر PBS استریل سوسپانسیون شده و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه نگهداری شد.

جهت بررسی اختلالات حرکتی در موش‌های مدل پارکینسون تیمار شده و همچنین تیمار نشده آزمون میله انجام شد. در این آزمون از یک میله پارفیکس و یک سکو استفاده شد. ارتفاع بارفیکس از سکو ۱۰ سانتی متر بود. در لحظه شروع آزمون، موش‌ها در موقعیتی مستقر شدند که دو دست آن‌ها بر روی میله بارفیکس قرار داده شده بود. زمان پایان آزمایش، لحظه ای بود که حیوان یک یا هر دو دست خود را از روی

تحت درمان با Liposomal L-Dopa و آگروزوم (۲۸ روز تحت درمان / یک بار تزریق آگروزوم به مغز).

ایجاد مدل پارکینسونی با ماده ۶-هیدروکسی دوپامین (6-OHDA). موش‌های صحرایی با تزریق داخل صفاقی کنامین زیلانین (به نسبت ۳ به ۵) بیهوش شده و بر روی یک قاب استریوتاکسی ثابت نگه داشته شدند. مطابق مختصات زیر دو سوراخ در جمجمه بالای ناحیه توده سیاه یا (substantia nigra) SN سمت راست ایجاد شد:

(۱) قدامی-خلفی (AP): ۵/۲- میلی‌متر؛ داخلی-جانبی (ML): ۱/۹- میلی‌متر؛ در قسمت عمق شکم (DV): ۸.۲- میلی‌متر.

(۲) قدامی-خلفی: ۵/۵ میلی‌متر؛ داخلی-جانبی: ۲/۴- میلی‌متر؛ عمق شکم: ۷/۶- میلی‌متر.

حجم کل ۶ میلی‌لیتر از 6-OHDA (۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با سرعت ۱/۰ میلی‌لیتر در دقیقه به SN سمت راست تزریق شد. سوزن میکرواینجکشن قبل از اینکه به آرامی خارج شود، ۵ دقیقه پس از تزریق در جای خود قرار گرفت. موش‌ها در قفس‌های تمیز روی بالشتک‌های گرم‌کننده قرار گرفتند تا بعد از جراحی بهبود یابند.

در گروه‌های ۳ و ۵، آگروزوم‌ها مستقیماً به ناحیه SN مغز موش‌های صحرایی مدل پارکینسون تزریق شدند. در گروه‌های ۴ و ۵ نیز داروی L-Dopa لیپوزومی به مقدار ۸۰ mg/kg به صورت خوراکی و به مدت یک ماه روزانه به موش‌های مدل خوراندند.

به منظور تهیه ساختارهای نانولیپوزوم از روش آب پوشانی لایه نازک استفاده شد. بدین منظور، ابتدا یک نوع فسفولیپید موجود در لسیتین به نام ال-آلفا-فسفاتیدیل کولین در حلال اتانول حل شد. محلول حاصل در دستگاه اوپراتور روتاری (شرکت Heidolph، کشور آلمان) در دمای ۳۰ درجه و تحت خلا قرار داده شد تا اتانول آن تبخیر شود. جهت جلوگیری از اکسیداسیون لیپیدها، فرآیند تبخیر در مجاورت گاز نیتروژن صورت گرفت. فرآیند تبخیر به مدت ۲ ساعت ادامه یافت تا حلال آلی به طور کامل تبخیر شده و تنها یک لایه نازک لیپیدی باقی بماند.

داروی L-Dopa در آب مقطر استریل حل شد به طوری که غلظت نهایی ۱mM از آن حاصل گردد و سپس محلول حاصل به لایه نازک لیپیدی به دست آمده اضافه گردید. جهت افزایش راندمان هیدراته شدن لایه نازک لیپیدی، دانه‌های شیشه ای به قطر ۰/۵ میلی متر اضافه شد مخلوط حاصل بر روی دستگاه استیرر قرار داده شد تا لایه لیپیدی ناپدید گردد. در ادامه به منظور همگن سازی سوسپانسیون به دست آمده و تولید لیپوزوم‌هایی در ابعاد نانو، نمونه‌های به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه هموژنایزر اولتراسونیک (UP200H, Hielischer, Germany) سونیکه شدند. سپس سوسپانسیون هموژنایز شده به مدت یک ساعت در مجاورت گاز نیتروژن و در دمای انتقال فاز لیپیدی نگه داشته شدند.

غلظت و خلوص RNA استخراج شده توسط اسپکتروفوتومتر نانودراپ بررسی شد. جذب نوری نمونه‌ها در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شده و غلظت آن براساس ضریب رقت بر حسب ng/μl به دست آمد. در مرحله بعد، با استفاده از کیت سنتز cDNA (Thermoscientific, UK) واکنش ساخت رشته cDNA از RNA با استفاده از آنزیم نسخه‌بردار معکوس (RT) انجام شد. سپس واکنش Real-Time PCR با استفاده از دستگاه stepone ABI system برای ژن‌های BDNF و DAT انجام و تغییرات بیان ژن‌ها در گروه‌های تحت مطالعه به روش $2^{-\Delta\Delta ct}$ سنجیده شد. پرایمرهای دو ژن انتخابی با استفاده از نرم‌افزار (gene runner نسخه ۶/۵) طراحی شده و اختصاصیت آنها با استفاده از برنامه برخط Primer-Blast در پایگاه NCBI تأیید شد. لیست پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است. همچنین ژن Gapdh به عنوان ژن کنترل داخلی انتخاب گردید. واکنش‌های PCR طبق برنامه دمایی زیر انجام شدند: دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و مرحله تکثیر شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه در ۴۰ سیکل متوالی انجام شد. صحت و دقت نتایج PCR با استفاده از منحنی‌های تکثیر و ذوب مربوط به محصول PCR هر ژن ارزیابی شدند. آنالیزهای تغییرات بیان ژن با استفاده از نرم‌افزار prism 3 انجام شد.

میله بر می داشت. مدت زمان استاندارد در نظر گرفته برای این آزمون ۱۱۰ ثانیه بود (۱۷).

موش‌ها ۲۴ ساعت پس از آخرین آزمایش با کتامین (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند. سپس سر موش‌ها در بیهوشی کامل قطع گردید و مغز آن‌ها جدا شد و در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد و سپس مغزها در قالب‌های پارافینی فیکس شد. با استفاده از دستگاه میکروتوم روتاتوری، برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون تهیه شد. برش‌ها روی لام‌های آلومینه قرار داده شدند و مراحل شفاف سازی و آبدی بر روی آن‌ها صورت گرفت. لام‌ها با استفاده از رنگ کریزل و یوله رنگ آمیزی و سپس با چسب انتلان و لامل پوشانده شد.

مطالعه میکروسکوپی در مورد کلیه نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری انجام گردید. در هر حیوان برش‌های مغز میانی طبق روش بیان شده توسط Blandin و همکاران بررسی گردید (۱۸). شمارش نورون‌های واقع در بخش متراکم جسم سیاه توسط نرم‌افزار image J انجام گرفت و با استفاده از روش مورفومتریک در واحد سطح سنجش شد (فقط سلول‌های با هسته‌های مشخص شمارش شدند). بررسی بافت شناسی و شمارش تعداد نورون‌های بخش متراکم جسم سیاه در هر پنج گروه با بزرگنمایی ۴۰ و ۱۰ و ۴ مورد صورت گرفت.

ابتدا استخراج RNA کامل از ناحیه جسم سیاه مغز حیوانات تمامی گروه‌ها با استفاده از QIAzol reagent طبق دستورالعمل ارایه شده توسط شرکت کواژن (QIAGEN Inc., Valencia, CA) انجام شد.

جدول ۱- توالی و مشخصات پرایمرهای طراحی شده برای ژن‌های Dat، Bdnf و Gapdh

نام ژن	توالی پرایمر (5'-3')	دمای ذوب (°C)	طول قطعه تکثیر شونده	کد دسترسی ژن
r-Bdnf-F	CTTATGAATCGCCAGCCAATTCTC	60		NM_001270630.1
r-Bdnf-R	TGCAGGGGCATAGACAAAAGG	60	110 bp	
r-Dat-F	ACCAACTCCACCCTCATCAA	58		NM_012694.2
r-Dat-R	CAGTTAGGGCACCAGGAAG	57	183 bp	
r-Gapdh-F	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	60		NM_017008.4
r-Gapdh-R	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	58	123 bp	

اندازه و مورفولوژی همگن بودند. همچنین نتایج تجزیه و تحلیل‌های DLS نشان دادند که میانگین اندازه نانولیپوزوم‌های تهیه‌شده در محدوده ۱۰ تا ۲۰ نانومتر قرار دارد (شکل ۱ ب). علاوه بر این، طبق فرمول مورد استفاده، میزان کارایی بارگذاری داروی L-Dopa در نانولیپوزوم‌ها حدود ۶۵ درصد به دست آمد.

براساس نتایج حاصل از آزمون رفتاری میله، در مدل‌های تیمار شده با داروی L-Dopa لیپوزومال به تنهایی و همچنین داروی L-Dopa لیپوزومال به همراه آگزوزوم در مقایسه با گروه بیمار تیمار نشده توان حرکتی موش‌ها به میزان قابل توجهی بهبود یافته بود ($P < 0.05$). گروه‌های تیمار شده با آگزوزوم به تنهایی و L-Dopa بدون پوشش به

تمامی آزمایشات به صورت سه بار تکرار انجام شدند. داده‌های حاصل ابتدا از نظر توزیع نرمال بررسی شدند و سپس برای مقایسه داده‌های حاصل از گروه‌های مختلف و بررسی معناداری آن‌ها، آزمون آنوای یک طرفه و تست تعقیبی توکی انجام شد. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شدند و سطح معناداری برابر با $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

میکروگراف‌های حاصل از SEM نشان دادند که لیپوزوم‌های ساخته شده همگی دارای ساختارهای منسجم و یکپارچه‌ای بوده و شکل کروی مورد انتظار را نشان می‌دادند (شکل ۱ الف). تمامی لیپوزوم‌ها از نظر

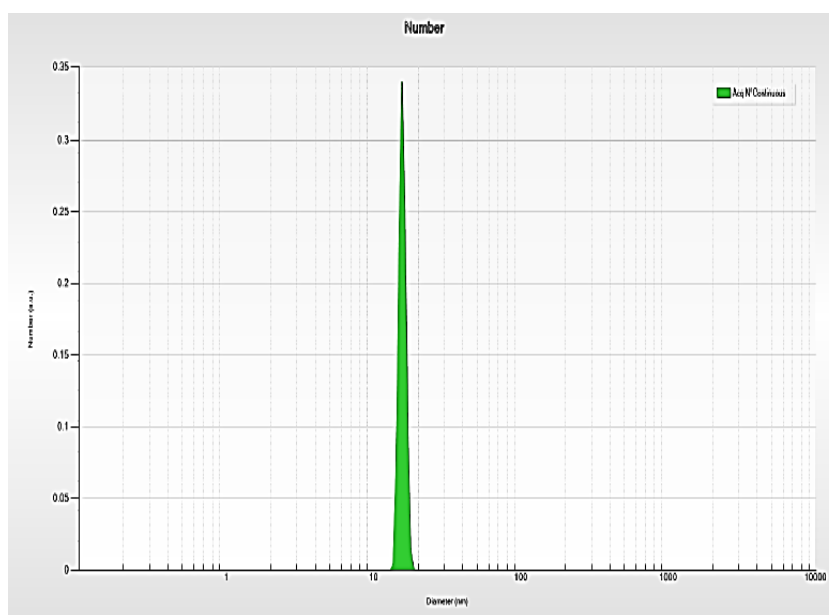
L-Dopa، L-Dopa لیپوزومال و آگروزوم-L-Dopa لیپوزومال به مدت ۲۸ روز به روش real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است، میزان بیان ژن Bdnf در گروه تیمار شده با آگروزوم-L-Dopa لیپوزومی نسبت به گروه بیمار و سایر گروه‌های تیمار شده افزایش معناداری را نشان داد ($0/045 \pm 0/019$). همچنین در مقایسه با گروه مدل ($0/0113 \pm 0/0036$)، میزان بیان ژن Bdnf در گروه‌های تیمار شده با L-Dopa ($0/028 \pm 0/0068$)، آگروزوم ($0/011 \pm 0/018$) و L-Dopa لیپوزومال ($0/031 \pm 0/014$) افزایش یافته بود اما از نظر آماری اختلاف معناداری مشاهده نشد. همچنین، بیان ژن Dat نیز در گروه تیمار شده با آگروزوم-L-Dopa لیپوزومی نسبت به مدل بیمار و سایر گروه‌های تیمار شده افزایش معناداری را نشان داد ($0/0004 \pm 0/0001$). در مقایسه با گروه مدل ($0/0001 \pm 3/99$)، ژن Dat در گروه‌های تیمار شده با L-Dopa ($0/0003 \pm 6/27$)، آگروزوم ($0/0002 \pm 7/89$) و L-Dopa لیپوزومال ($0/0003 \pm 3/29$) افزایش بیان را نشان داد اما از نظر آماری معنادار نبود.

تنهایی نسبت به گروه بیمار نشده افزایشی را مدت زمان انجام آزمون نشان دادند اما از نظر آماری معنادار نبود (شکل ۲).

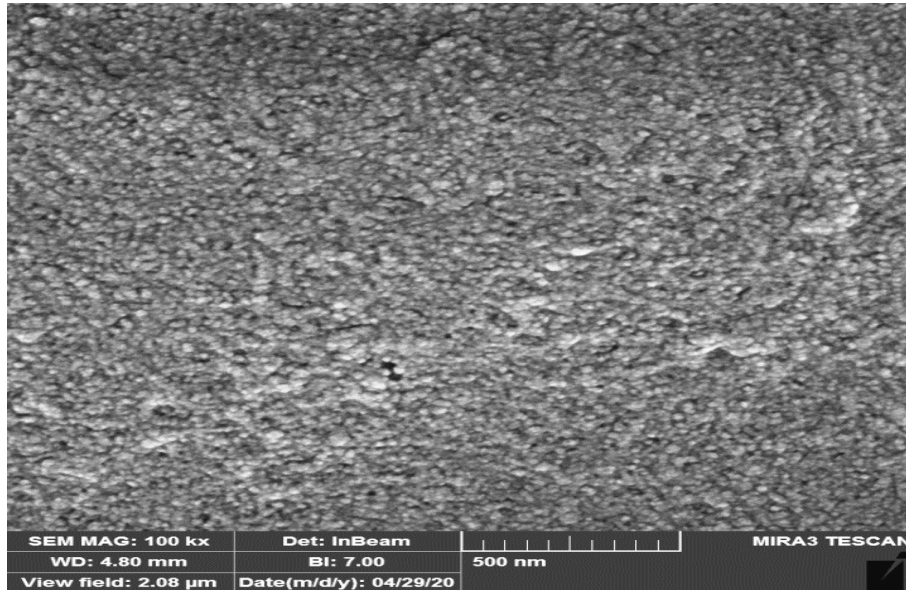
به منظور بررسی تأثیر آگروزوم‌های جداسازی شده از سلول‌های SH-Sy5y و داروی L-Dopa لیپوزومال به صورت جداگانه و در ترکیب با یکدیگر بر جمعیت نورون‌های دوپامینرژیک ناحیه NS مدل‌های حیوانی پارکینسون، رنگ‌آمیزی کرزلی ویوله بر بافت‌های مورد نظر انجام شد (شکل ۳). تصاویر حاصل از رنگ‌آمیزی نشان دادند که جمعیت نورون‌های دوپامینرژیک در بافت‌های گروه مدل به میزان معناداری ($P < 0/05$) کاهش یافته بود. در گروه‌های تیمار شده با داروی L-Dopa لیپوزومی، L-Dopa لیپوزومال و آگروزوم-L-Dopa لیپوزومال افزایش معنادار تعداد نورون‌های دوپامینرژیک نسبت به گروه مدل مشاهده گردید که این افزایش جمعیت سلولی در گروه تیمار شده با آگروزوم-L-Dopa لیپوزومال نسبت به سایر گروه‌های تیمار شده کاملاً معنادار ($P < 0/05$) مشاهده گردید. افزایش مشاهده شده تعداد نورون‌های دوپامینرژیک بین دو گروه تیمار شده با داروی L-Dopa به تنهایی و L-Dopa لیپوزومال معنادار نبود ($P > 0/05$). همچنین افزایش مشاهده شده در گروه تیمار شده با آگروزوم به تنهایی در مقایسه با گروه مدل معنادار نبود.

در سطح ارزیابی‌های مولکولی، تغییرات بیان دو ژن Bdnf و Dat در مدل بیمار پارکینسون و گروه‌های بیمار تحت درمان با آگروزوم، داروی

(الف)

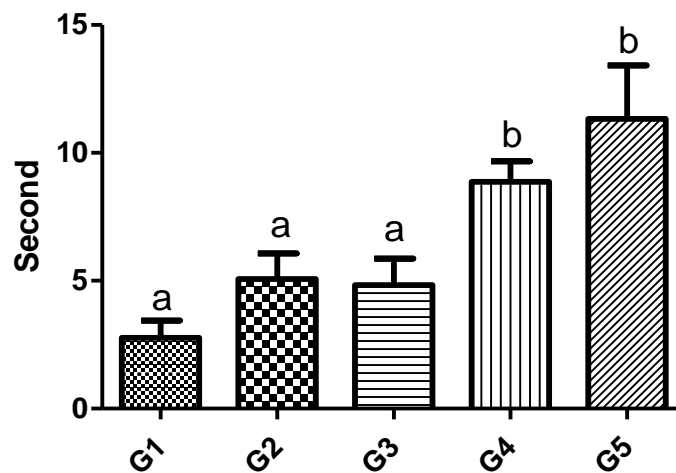


(ب)



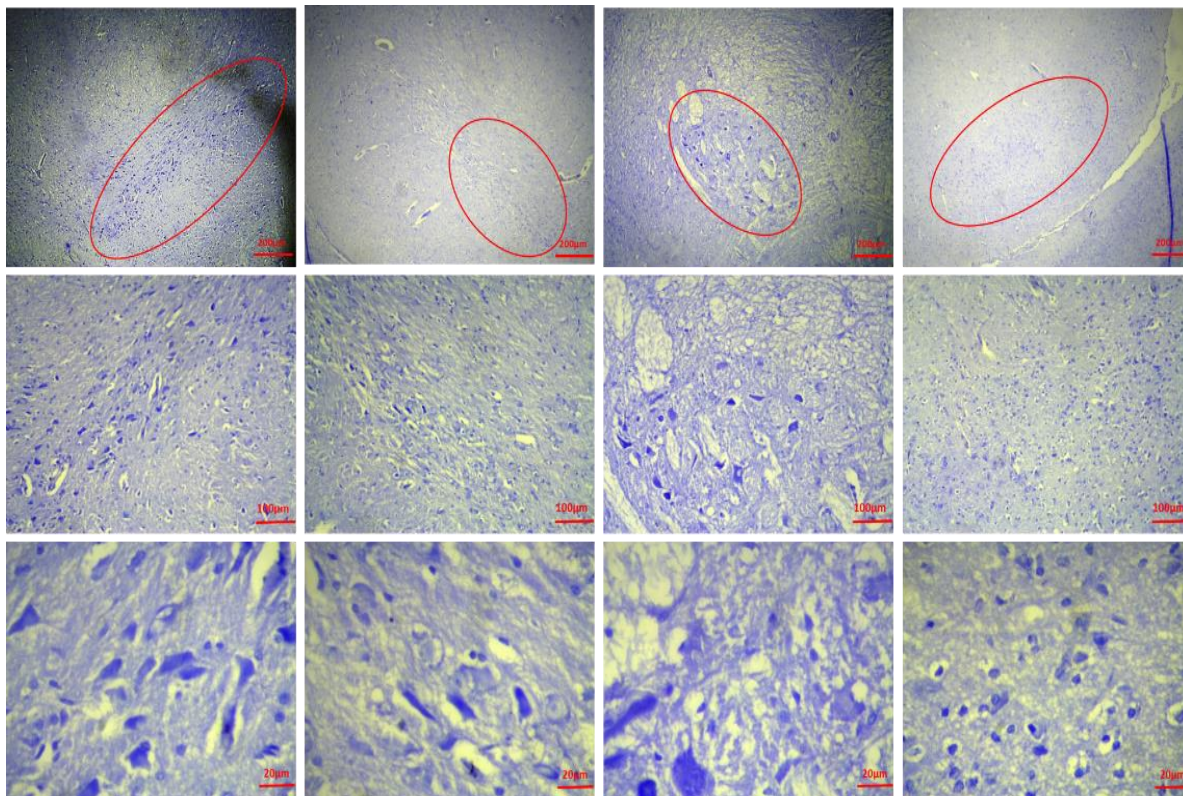
شکل ۱- تعیین خصوصیات نانولیپوزوم‌های حاوی داروی L-Dopa از نظر اندازه و مورفولوژی (الف) نتایج تجزیه و تحلیل DLS بیانگر اندازه نانوذرات در محدود ۱۰ الی ۲۰ نانومتر بود. (ب) تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی SEM نشان دادند که مخلوط همگنی از نانوذرات لیپوزومی با ساختارهای کروی شکل حاصل گردیده است.

Bar test

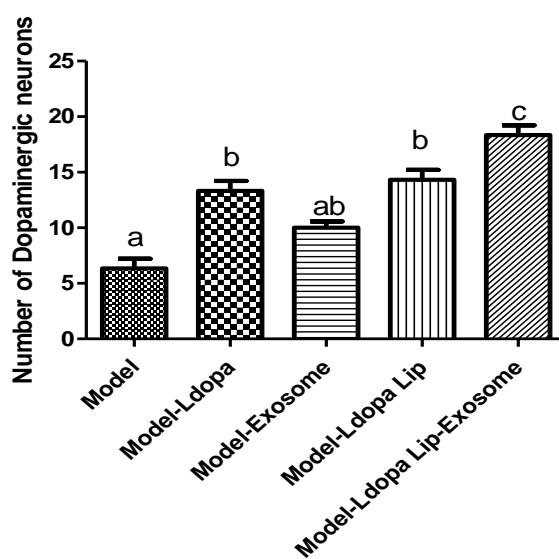


شکل ۲- آزمون میله. G1، مدل بیمار پارکینسون؛ G2، مدل بیمار تیمار شده با L-Dopa بدون پوشش؛ G3، مدل بیمار تیمار شده با اگزوزوم؛ G4، مدل بیمار تیمار شده با L-Dopa لیپوزومال و G5، مدل بیمار تیمار شده با اگزوزوم و L-Dopa لیپوزومال با هم در مدل‌های تیمار شده با داروی L-Dopa لیپوزومال به تنهایی و داروی L-Dopa لیپوزومال به همراه اگزوزوم بهبود معنادار توان حرکتی موش‌ها در مقایسه با گروه بیمار تیمار نشده مشاهده گردید ($P < 0.05$). تغییرات مشاهده شده در گروه‌های تیمار شده با اگزوزوم به تنهایی و L-Dopa بدون در مقایسه با گروه بیمار از نظر آماری معنادار نبودند.

(الف)

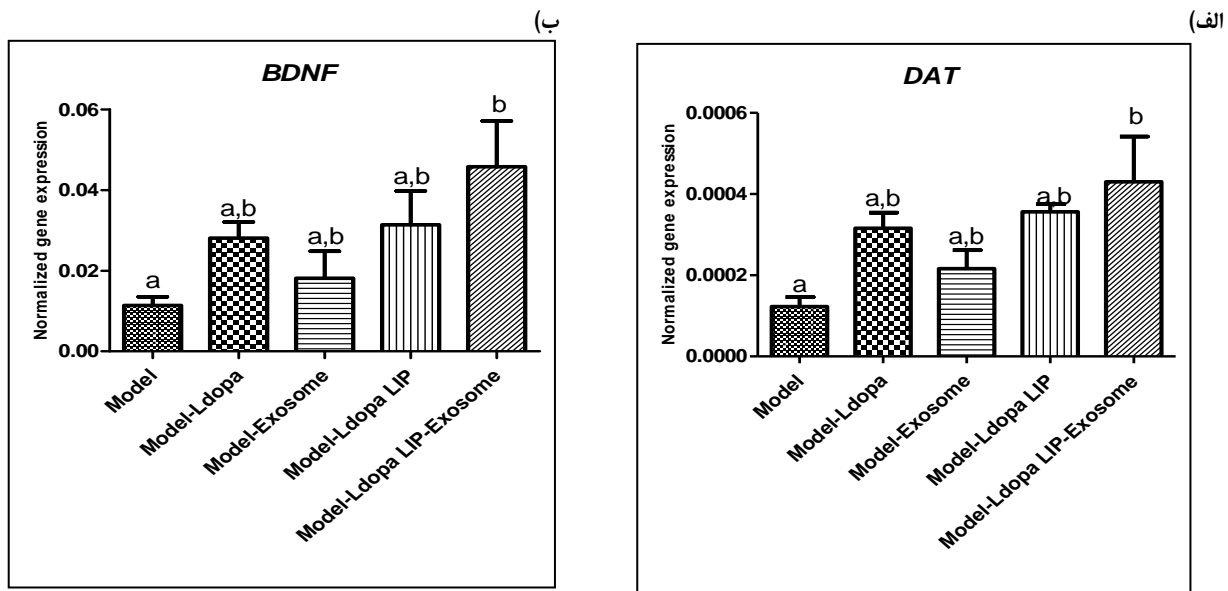


(ب)



شکل ۳- تغییرات جمعیت سلول‌های دوپامینرژیک در گروه‌های بیمار و تحت درمان مختلف (الف) تصاویر حاصل از رنگ‌آمیزی کروزیل ویوله بیانگر کاهش تعداد سلول‌های دوپامینرژیک در گروه بیمار پارکینسون بود که پس از انجام تیمارهای مختلف افزایش جمعیت سلول‌ها مشاهده شد. افزایش مشاهده شده در گروه تحت تیمار با آگزوزوم- L-Dopa لیپوزومی نسبت به تمامی گروه‌های دیگر کاملاً معنادار بود. همچنین در گروه‌های تحت تیمار با هر دو نوع شکل L-Dopa بدون لیپوزوم و بارگذاری شده در لیپوزوم افزایش معنادار جمعیت نورون‌های دوپامینرژیک نسبت به گروه بیمار مشاهده گردید. مقدار ($P < 0.05$) به عنوان سطح معنادار در نظر گرفته شد.

(ب) نتایج کمی شده مطالعات بافت‌شناسی با استفاده از برنامه image J. حروف یکسان بر روی ستون‌ها به منزله عدم وجود تفاوت معنادار بین گروه‌های مورد نظر می‌باشد.



شکل ۴- تغییرات بیان ژن‌های *Bdnf* و *Dat* در مدل بیمار پارکینسون و گروه‌های تیمار شده مختلف.

(الف) بیان ژن *Dat* نیز در گروه تیمار شده با اگزوزوم *L-Dopa* لیپوزومی نسبت به مدل بیمار و سایر گروه‌های تیمار شده افزایش معناداری را نشان داد (0.0001 ± 0.0000). اما در گروه‌های تیمار شده با *L-Dopa* (0.0003 ± 0.0002)، اگزوزوم (0.0002 ± 0.0001) و *L-Dopa* لیپوزومال (0.0003 ± 0.0002)، افزایش بیان *Dat* در مقایسه با گروه مدل (0.0001 ± 0.0000) از نظر آماری معنادار نبود.

(ب) میزان بیان ژن *Bdnf* در گروه تیمار شده با اگزوزوم *L-Dopa* لیپوزومی نسبت به مدل بیمار و سایر گروه‌های تیمار شده افزایش معناداری را نشان داد (0.012 ± 0.005). در مقایسه با گروه مدل (0.028 ± 0.010)، بیان ژن *Bdnf* در گروه‌های تیمار شده با *L-Dopa* (0.018 ± 0.008)، اگزوزوم (0.032 ± 0.012) و *L-Dopa* لیپوزومال (0.045 ± 0.015)، افزایش یافته بود اما از نظر آماری اختلاف معناداری مشاهده نشد.

بحث

در مدل موش صحرایی مبتلا به PD و تنظیم بیان ژن‌های *Bdnf* و *Dat* دخیل در مسیر رشد و بقای نورون‌ها بررسی گردید. به منظور افزایش پایداری و اثربخشی داروی *L-Dopa*، فرم لیپوزومال این دارو تهیه گردید و نتایج حاصل از این مطالعه نیز نشان داد که *L-Dopa* لیپوزومی در مقایسه با فرم لیپوزومی نشده دارو عملکرد بهتری را نشان می‌دهد. پیش از این، استفانو و همکارانش (۲۰۰۶) نشان دادند که تجویز *L-DOPA* به صورت لیپوزومال سبب انتشار نسبتاً آهسته دارو در پلاسما و تولید و انتقال پایدار DA به جسم مخطط مغز موش‌های صحرایی می‌گردد. نتایج این محققان نشان داد که تغییر در فرم داروی *L-DOPA* می‌تواند باعث افزایش انتشار آن در مغز موش شود و تحویل کنترل شده آن را افزایش دهد (۲۲). همچنین در این مطالعه از اگزوزوم‌های ترشحی از سلول‌های SH-Sy5y به عنوان منبعی غنی از فاکتورهای رشد و ترکیبات مؤثره سلولی استفاده شد. از آنجایی که در این مطالعه استفاده از اگزوزوم‌های ترشحی سلول‌های عصبی جهت مطالعه تأثیر آن بر بیماری پارکینسون به عنوان یک بیماری عصبی مدنظر بود لذا از رده سلولی SH-Sy5y مشتق شده از سلول‌های نوروبلاستوما استفاده گردید که به عنوان یک رده سلولی مدل به طور گسترده در تحقیقات پایه استفاده می‌شوند بویژه از آنجایی که این رده سلولی به خوبی مارکرهای

بیماری پارکینسون (PD)، به عنوان یکی از چالش‌برانگیزترین بیماری‌های نورودژنراتیو حرکتی شناخته شده است که بیماران را با مشکلات حرکتی، اختلالات ذهنی و روانی متعددی روبرو می‌کند. در حال حاضر هیچ درمانی قطعی برای بیماری پارکینسون وجود ندارد و به دلیل عدم توانایی در یافتن روش‌های درمانی پیشگیرانه یا درمانی مؤثر، پیش‌بینی‌های اپیدمیولوژیک برای کنترل و مهار این بیماری در سراسر جهان خوشبینانه نیست (۱۹). اما همچنان استفاده از روش‌های دارو درمانی مرسوم‌ترین راهکار درمانی برای کاهش عوارض این بیماری محسوب می‌شود. در این بین، داروی *L-Dopa* همچنان در صدر لیست داروهای مورد استفاده برای بیماران مبتلا به پارکینسون می‌باشد که قادر است تا حدودی علائم بالینی بیماری را کاهش دهد. در سال‌های اخیر، استفاده از روش‌های درمانی ترکیبی شامل ادغام روش‌های درمانی مرسوم مانند دارو درمانی با روش‌های نوینی نظیر سلول درمانی یا استفاده از فاکتورهای ترشحی یا به طور کلی ترشحات سلولی بسیار مورد توجه محققان قرار گرفته است (۲۰ و ۲۱). بر همین اساس، در این مطالعه، اثر داروی *L-Dopa* لیپوزومال شده و اگزوزوم‌های ترشحی از رده سلولی SH-Sy5y بر بهبود علائم پاتولوژیکی بیماری پارکینسون

ژن‌های مهمی همچون Bdnf و Dat باعث القای تمایز سلول‌های پیش ساز عصبی به نورون‌های دوپامینرژیک و در نتیجه افزایش جمعیت این نورون‌ها و همچنین بقای نورون‌های دوپامینرژیک موجود شده و می‌توانند تا حدودی روند پیشرفت آسیب وارده در ناحیه جسم سیاه مغز را کاهش و یا حتی بهبود بخشند به طوری که تأثیر مثبت این روش درمانی ترکیبی بر وضعیت حرکتی مدل حیوانی تحت درمان نیز بسیار مثبت ارزیابی شد.

تشکر و قدردانی

از همکاری و مساعدت‌های کارشناسان و همکاران محترم دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اشکذر، یزد قدردانی می‌گردد.

References

- Dexter DT, Jenner P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine* 2013;62:132-44.
 - Lindqvist D, Kaufman E, Brundin L, Hall S, Surova Y, Hansson O. Non-motor symptoms in patients with Parkinson's disease—correlations with inflammatory cytokines in serum. *PLoS one* 2012;7.
 - Schapira AH, Fox SH, Hauser RA, Jankovic J, Jost WH, Kenney C, et al. Assessment of safety and efficacy of safinamide as a levodopa adjunct in patients with Parkinson disease and motor fluctuations: a randomized clinical trial. *JAMA Neurology* 2017;74:216-24.
 - Vezzani A, Aronica E, Mazarati A, Pittman QJ. Epilepsy and brain inflammation. *Experimental neurology* 2013;244:11-21.
 - Blonder LX, Slevin JT. Emotional dysfunction in Parkinson's disease. *Behavioural Neurology* 2011;24:201-17.
 - Litvan I, Goldman JG, Tröster AI, Schmand BA, Weintraub D, Petersen RC, et al. Diagnostic criteria for mild cognitive impairment in Parkinson's disease: Movement disorder society task force guidelines. *Movement Disorders* 2012;27:349-56.
 - Pahwa R, Koller WC. Advances in the treatment of Parkinson's disease. *Drugs of Today* 1998;34:95-106.
 - Gandhi KR. Levodopa (L-Dopa) In: StatPearls [Internet] Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.
 - Bilia AR, Guccione C, Isacchi B, Righeschi C, Firenzuoli F, Bergonzi MC. Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014;2014:651593. doi:10.1155/2014/651593
 - Ceruti M, Crosasso P, Brusa P, Arpicco S, Dosio F, Cattel L. Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes containing water-soluble prodrugs of paclitaxel. *Journal of Controlled Release* 2000;63:141-53.
 - Yurasov V, Kucheryanu V, Kudrin V, Zhigal'tsev I, Nikushkin E, Sandalov YG, et al. Effect of long-term parenteral administration of empty and L-Dopa-loaded liposomes on the turnover of dopamine and its metabolites in the striatum of mice with experimental Parkinson's syndrome. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 1997;123:126-9.
 - Stoker TB, Blair NF, Barker RA. Neural grafting for Parkinson's disease: challenges and prospects. *Neural Regeneration Research* 2017;12:389.
 - Björklund A, Stenevi U, Svendgaard N-A. Growth of transplanted monoaminergic neurones into the adult hippocampus along the perforant path. *Nature* 1976;262:787-90.
- دوپامینرژیک را بیان می‌کنند به طور گسترده در مطالعات مربوط به بیماری پارکینسون، فرآیند نورون‌زایی و سایر خصوصیات سلول‌های مغزی استفاده می‌شوند (۲۳). سارکو و مکینی در مطالعه خود بر خواص آگزوزومها و پتانسیل درمانی آنها در بیماری‌های نورودژنراتیو تأکید کردند. این محققان بیان کردند که محتوای آگزوزومی به طور فزاینده به توسعه اتصالات عصبی کمک می‌کنند. همچنین از آنجایی که آگزوزومها قادر به عبور از سد خونی-مغزی هستند، می‌توانند به عنوان ابزار مناسبی با نیمه عمر و پایداری بالا جهت حمل دارو مورد استفاده قرار گیرند (۲۴). بررسی‌های بافتی مطالعه حاضر نشان دادند تیمار همزمان حیوانات با داروی L-Dopa لیپوزومی و آگزوزومهای ترشحی به طور قابل توجهی باعث افزایش جمعیت نورون‌های دوپامینرژیک در ناحیه جسم سیاه مغز و در نتیجه کاهش آسیب بافتی ایجاد شده می‌گردد. در مطالعه ای مشابه، فریکر و همکاران نشان دادند که تیمار موش‌های مبتلا به پارکینسون با اسید آسکوربیک به عنوان یک آنتی اکسیدانت باعث افزایش تعداد نورون‌های دوپامینرژیک احتمالاً از طریق فعال کردن مسیرهای تمایز نورون‌های دوپامینرژیک از سلول‌های پیش ساز عصبی می‌گردند (۲۵). همچنین، در سطح مولکولی نتایج حاصل از این مطالعه نشان دادند که روش تیمار ترکیبی حیوانات با داروی L-Dopa لیپوزومی و آگزوزومهای حاصل از SH-Sy5y باعث افزایش قابل توجه بیان دو ژن Bdnf و Dat در مقایسه با مدل بیمار گردید. بیان این دو ژن از این نظر مورد ارزیابی قرار گرفت که مطالعات پیشین نشان دادند که محصول ژن Bdnf به عنوان یک فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز در بقای سلول‌های عصبی از جمله نورون‌های دوپامینرژیک نقش حائز اهمیت دارند. به طوریکه مشخص شده است که سطح بیان این ژن در افراد مبتلا به بیماری‌های نورودژنراتیو از جمله پارکینسون افت می‌کند (۲۶). از طرف دیگر، رنگ آمیزی‌های ایمنوهیستوشیمی نشان دادند که پروتئین Dat به طور عمده در ناحیه جسم سیاه و استراتیوم مغز متراکم شده اند که تأییدکننده نقش مهم آنها در جذب و انتقال دوپامین به اتصالات دندریتی و اکسونی نورون‌های دوپامینرژیک می‌باشد (۲۷). همچنین مطالعات نشان دادند که بین سطح سرمی پروتئین Bdnf و میزان پروتئین ناقل دوپامین (Dat) ارتباط مستقیمی وجود دارد به طوری که بررسی‌ها نشان دادند کاهش پروتئین Dat یا فقدان آن منجر به کاهش سطح سرمی پروتئین BDNF می‌گردد (۲۸). هایمن و همکاران نشان دادند که افزایش بیان ژن Bdnf می‌تواند بقای نورون‌های دوپامینرژیک در حال تخریب در بیماری پارکینسون را افزایش داده و مرگ سلولی را به تأخیر اندازد (۲۹). بنابراین نتایج مطالعه حاضر پیشنهاد می‌دهند که استفاده از داروی L-Dopa به عنوان پیش‌ساز دوپامین به همراه آگزوزوم‌های حاوی فاکتورهای رشد و نوروتروفیک متعدد با ایجاد تنظیمات مثبت بر بیان

14. Pick H, Alves AC, Vogel H. Single-vesicle assays using liposomes and cell-derived vesicles: From modeling complex membrane processes to synthetic biology and biomedical applications. *Chemical Reviews* 2018;118:8598-654. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00777
15. Mentkowski KI, Snitzer JD, Rusnak S, Lang JK. Therapeutic potential of engineered extracellular vesicles. *The AAPS Journal* 2018;20:50. doi:10.1208/s12248-018-0211-z
16. Antimisariis SG, Mourtas S, Marazioti A. Exosomes and exosome-inspired vesicles for targeted drug delivery. *Pharmaceutics* 2018;10:218. doi:10.3390/pharmaceutics10040218
17. Zhang Z-N, Zhang J-S, Xiang J, Yu Z-H, Zhang W, Cai M, et al. Subcutaneous rotenone rat model of Parkinson's disease: Dose exploration study. *Brain Research* 2017;1655:104-13.
18. Blandini F, Porter RH, Greenamyre JT. Glutamate and Parkinson's disease. *Molecular Neurobiology* 1996;12:73-94. doi:10.1007/bf02740748
19. Fox SH, Katzenschlager R, Lim SY, Barton B, de Bie RM, Seppi K, et al. International parkinson and movement disorder society evidence-based medicine review: update on treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease. *Movement Disorders* 2018;33:1248-66.
20. Kulisevsky J, Oliveira L, Fox SH. Update in therapeutic strategies for Parkinson's disease. *Current Opinion in Neurology* 2018;31:439-47. doi:10.1097/wco.0000000000000579
21. Ogawa N. [New therapeutic strategy for Parkinson's disease based on pharmacological profiles]. *Nihon rinsho Japanese Journal of Clinical Medicine* 1997;55:43-51.
22. Di Stefano A, Sozio P, Iannitelli A, Marianecci C, Santucci E, Carafa M. Maleic-and fumaric-diamides of (O, O-diacetyl)-L-Dopa-methylester as anti-Parkinson prodrugs in liposomal formulation. *Journal of Drug Targeting* 2006;14:652-61.
23. Xicoy H, Wieringa B, Martens GJM. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Molecular Neurodegeneration* 2017;12:10. doi:10.1186/s13024-017-0149-0
24. Sarko DK, McKinney CE. Exosomes: origins and therapeutic potential for neurodegenerative disease. *Frontiers in Neuroscience* 2017;11:82.
25. Bagga V, Dunnett SB, Fricker-Gates RA. Ascorbic acid increases the number of dopamine neurons in vitro and in transplants to the 6-OHDA-lesioned rat brain. *Cell transplantation* 2008;17:763-73.
26. Jiang L, Zhang H, Wang C, Ming F, Shi X, Yang M. Serum level of brain-derived neurotrophic factor in Parkinson's disease: a meta-analysis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2019;88:168-74. doi:10.1016/j.pnpbp.2018.07.010
27. Nirenberg MJ, Vaughan RA, Uhl GR, Kuhar MJ, Pickel VM. The dopamine transporter is localized to dendritic and axonal plasma membranes of nigrostriatal dopaminergic neurons. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 1996;16:436-47. doi:10.1523/jneurosci.16-02-00436.1996
28. Ziebell M, Khalid U, Klein AB, Aznar S, Thomsen G, Jensen P, et al. Striatal dopamine transporter binding correlates with serum BDNF levels in patients with striatal dopaminergic neurodegeneration. *Neurobiology of Aging* 2012;33:428.e1-5. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2010.11.010
29. Hyman C, Hofer M, Barde Y-A, Juhasz M, Yancopoulos GD, Squinto SP, et al. BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature* 1991;350:230-2. doi:10.1038/350230a0



Evaluation of the Effect of Liposomal L-Dopa and Exosomes Derived from SH-Sy5y Cells on the Survival of Dopaminergic Neurons by Regulating the Expression of Bdnf and Dat Genes

Parastoo Zarrin (Ph.D.)¹, Mahmood Dehghani Ashkezari (Ph.D.)^{1*}, Seyed Morteza Seifati (Ph.D.)¹

1- Dept. of Biology, Medical Biotechnology Research Center, Ashkezar Branch, Islamic Azad University, Ashkezar, Yazd, Iran.

Received: 28 January 2021, Accepted: 3 April 2021

Abstract:

Introduction: Parkinson's disease is a progressive neurodegenerative complication in which dopaminergic neurons located in substantia nigra are gradually lost. Currently, the combined therapy strategies received more attentions as potential therapeutic approaches for Parkinson's disease. This study aimed to evaluate the potential effects of exosomes released from SH-Sy5y cells and liposomal L-dopa drug on Parkinson's rat models.

Methods: Twenty five male Wistar albino rats, in 5 groups, were included in this study. Parkinson's rat models were induced through microinjection of 6-OHDA (2.5 mg/mL) into the right substantia nigra. The exosomes released from SH-Sy5y cell line were isolated and administrated alone or in combination with liposomal L-Dopa to the defined model groups. The effects of the treatments were evaluated by behavioral testing, histological studies and expression changes of bdnf and dat genes by real-time PCR.

Results: The rats in groups received the combined liposomal L-Dopa and exosome treatment and liposomal L-Dopa alone showed a significant improvement in their movement abilities. Also, in the models treated with both exosomes and liposomal L-Dopa drug, a significant increase in the expression level of Bdnf and Dat genes was observed, while the increase in expression observed in separate treatments was not statistically significant ($P > 0.05$).

Conclusion: The results of the present study showed that the use of L-Dopa with exosomes of SH-Sy5y cells had positive synergistic effects on increasing the expression of Bdnf and Dat genes and induced differentiation of neuronal progenitor cells into dopaminergic neurons and thus increased their population and survival in the area.

Keywords: Exosomes, liposomal L-Dopa, Parkinson's disease, SH-Sy5y cell line.

Conflict of Interest: No

*Corresponding author: M. Dehghani Ashkezari, Email: mdashkezary@yahoo.com

Citation: Zarrin P, Dehghani Ashkezari M, Seifati S.M. Evaluation of the effect of liposomal L-Dopa and exosomes derived from SH-Sy5y cells on the survival of dopaminergic neurons by regulating the expression of bdnf and dat genes. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2021;16(1):21-31.