Original Article

Study of the Effects of Adipose-tissue Mesenchymal Stem Cells and Conditioned Medium on Cell Infiltration in the Brains of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis C57 BL/6 Mice

Forouzan Yousefi[1], Masoumeh Ebtekar[2*], Masoud Soleimani[3], Seyed Mahmoud Hashemi[4]

1- M.Sc., Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Associated Professor, Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Associated Professor, Department of Hematology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

4- Ph.D. Candidate, Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
Email: ebtekarm@modares.ac.ir

Received: 11/Jul/2011, Accepted: 26/Dec/2011

Abstract

Objective: This study investigated the effects of adipose-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and conditioned medium injection on cell infiltration in the brains of an experimental C57BL/6 mice model of autoimmune encephalomyelitis (EAE).

Methods: EAE was induced with myelin oligodendrocyte glycoprotein (35-55 peptides) in 20 mice. MSCs were obtained from the adipose tissue of C57BL/6 mice and cultured with Eagle's minimum essential medium/alpha medium (DMEM) after removal of non-adherent cells. After 2 to 3 passages, 15 days after induction of EAE, 4 groups (n=5) of C57BL/6 mice were treated as follows: i) MSCs were injected intraperitoneally, ii) MSCs were injected intravenously, iii) conditioned medium was administrated intraperitoneally, and iv) the control group received no treatment. After day 60, the mice brains were removed and the effect of adipose-tissue MSCs and administration of conditioned medium was investigated.

Results: Leukocyte infiltration and clinical scores were significantly reduced in animals that received MSC and conditioned medium compared to untreated animals. Body weight increased significantly in the treated groups compared to the control group. Percentage of survival also increased in the animals that received MSCs and conditioned medium as compared to the control group.

Conclusion: MSCs had immunomodulatory and neurogenerative functions which reduced leukocyte infiltration and improved clinical scores in the EAE animals that received MSC and conditioned medium compared to untreated animals with EAE.

Keywords: Adipose-Tissue Mesenchymal Stem Cells, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE), Conditioned Medium

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 14, No 4, Winter 2012, Pages: 75-88

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

مقاله اصیل

بررسی اثر تزریق سلول‌های بنیادی مزاشیمی جدا شده از بافت چربی و محیط رویی کشت این سلول‌ها بر ارتشاح لکوسیتی مغز موش‌های مبتلا به آنسفالومیلیت خودایمن تجربی

فروزان یوسفی[1]، معصومه ابتکار[2*]، مسعود سلیمانی[3]، سیدمحمود هاشمی[4]

۱- کارشناس ارشد، گروه ایمونولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه ایمنولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- دانشیار، گروه خون‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۴- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ایمنولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ایمنولوژی
Email: ebtekarm@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۰/۰۴/۲۱ پذیرش مقاله: ۹۰/۱۰/۰۶

چکیده

هدف: بررسی اثر تزریق سلول‌های بنیادی مزاشیمی جدا شده از بافت چربی و محیط رویی کشت این سلول‌ها بر ارتشاح لکوسیتی مغز موش‌های مبتلا به آنسفالومیلیت خودایمن تجربی

مواد و روش‌ها: در ۲۰ سر موش ماده C57BL/6 مدل آنسفالومیلیت خودایمن تجربی القا و سپس موش‌ها به چهار گروه پنج‌تایی تقسیم شدند و پس از ۱۵ روز، زمانی که تقریباً شدت بالینی علایم به یک رسید، به دو گروه از موش‌ها 10^6 عدد سلول بنیادی مزانشیمی جدا شده از بافت چربی موش C57BL/6 به‌صورت درون‌رگی و 2×10^6 عدد سلول بنیادی مزانشیمی جدا شده از بافت چربی به درون صفاق و به یک گروه از آن‌ها ٦ نوبت محیط رویی کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی و هر نوبت یک سی‌سی به‌صورت درون صفاقی تزریق شد. یک گروه از موش‌ها نیز بدون هیچ تیماری به‌عنوان گروه کنترل باقی ماند. پس از ٦٠ روز اثر سلول‌ها و محیط رویی کشت این سلول‌ها بر ارتشاح لوکوسیتی مغز در چهار گروه با هم مقایسه شد.

نتایج: ارتشاح لوکوسیتی در گروه‌هایی که سلول بنیادی مزانشیمی و محیط رویی کشت سلول‌های مزانشیمی را دریافت کرده بودند در مقایسه با گروه کنترل آنسفالومیلیت خودایمن تجربی که هیچ تیماری دریافت نکرده بود، کاهش معنی‌داری نشان داد ($P<0.05$). وزن و میزان بقای موش‌های تیمار شده در مقایسه با گروه کنترل افزایش داشت.

نتیجه‌گیری: سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از چربی خواص تنظیمی ایمنی و ترمیم بافت عصبی دارند که می‌تواند سبب بهبود موش‌های مبتلا به آنسفالومیلیت خودایمن تجربی در مقایسه با گروه کنترل شود.

کلیدواژگان: سلول بنیادی مزانشیمی جدا شده از بافت چربی، آنسفالومیلیت خودایمن تجربی، محیط رویی کشت

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۴، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۰، صفحات: ۷۵-۸۸

مقدمه

ام اس (Multiple Sclerosis: MS) یک بیماری مزمن و خودایمن سیستم عصبی مرکزی (Central Nervous System) است که باعث التهاب در مغز و نخاع، دمیلینه شدن پیشرونده بافت سیستم عصبی مرکزی، آسیب آکسون‌های نورونی و از دست رفتن عملکرد نورون‌های سیستم عصبی مرکزی می‌شود

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[۱]. هم‌اکنون MS رایج‌ترین بیماری عصبی است که اغلب افراد زیر ۳۰ سال را متأثر می‌کند و مشکلات اجتماعی و اقتصادی قابل ملاحظه‌ای را به همراه دارد [۲]. عواملی که دقیقاً منجر به MS می‌شوند تاکنون شناسایی نشده‌اند؛ اما برطبق برخی از شواهد عواملی همچون زمینه ژنتیکی افراد، عفونت ویروسی، نقص در عملکرد میتوکندری و تفاوت‌های وابسته به جنس از قبیل تفاوت‌های هورمونی را عوامل احتمالی این بیماری می‌دانند [۳-۵]. حالت فعال MS شامل ارتشاح و مهاجرت سلول‌های ایمنی فعال شده از جمله لنفوسیت B، لنفوسیت T و ماکروفاژها به بافت عصبی مرکزی و تغییرات متقابل در آستروسیت‌ها (Astrocytes) و میکروگلیاهای (Microglia) این ناحیه است. به این صورت که ابتدا در اثر عاملی ناشناخته آنتی‌ژن‌های میلین توسط سلول دندریتیکی عرضه کننده آنتی‌ژن (Antigen Presenting Dendritic Cells) در سیستم لنفاوی محیطی به سلول T عرضه شده و باعث تکثیر سلول‌های T خود واکنشگر و فعال در گره‌های لنفاوی می‌شود. سپس این سلول‌های T خود واکنشگر از سد خونی- مغزی عبور کرده و وارد سیستم عصبی مرکزی شده و در این مکان با آنتی‌ژن‌های میلین واکنش داده و سیتوکین‌های التهابی و کموکین‌هایی را تولید می‌کند که باعث مهاجرت بیشتر سلول‌های ایمنی به این مکان و تخریب پیش‌رونده میلین در سیستم عصبی مرکزی و ایجاد پلاک‌های اسکلروزی (Sclerosistic Plaques) در مغز و نخاع می‌شود [٦].

آنسفالومیلیت خودایمن تجربی (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: EAE) یک مدل حیوانی جایگزین مناسب برای MS است که از نظر آسیب‌های بافت‌شناسی‌و علایم بالینی می‌تواند MS را به‌خوبی تقلید کند؛ چرا که در این مدل نیز بیماری عصبی به‌صورت مزمن، همراه با فازهای حمله (Relapse) و سرکوب حمله (Remission) ایجاد و همانند MS پلاک‌های سخت اسکلروزی در سیستم عصبی مرکزی تشکیل می‌شود [۷].

درمان‌های رایج برای این بیماری شامل اینترفرون بتا (Interferon Beta: IFN-β)، گلاتیرامر استات (Glatiramer Acetate)، میتوکساندران (Mitoxandran) و ناتالیزامب (Natalizamb) است که اغلب به دلیل مسمومیت کبدی، هزینه زیاد و عدم پاسخ‌دهی تمامی بیماران به این داروها، درمان‌های قطعی محسوب نمی‌شوند و از آن‌جایی که این داروها فقط سیستم ایمنی را سرکوب می‌کند و در ترمیم بافت عصبی نقشی ندارد [۸، ۹]، و از سوی دیگر؛ این بیماری علاوه بر زیان‌های اقتصادی زیادی که به دنبال دارد، اغلب افراد زیر ٤۰ سال را دچار می‌کند، بنابراین نیاز به رویکردهای جدید برای درمان این بیماری، اجتناب‌ناپذیر است. در این راستا سلول درمانی (Cell Therapy) با استفاده از سلول‌های بنیادی توجهات زیادی را در دهه‌های اخیر به سمت خود معطوف کرده است.

سلول‌های بنیادی سلول‌های چند توانه با قابلیت تکثیر و بازسازی خود هستند که می‌توانند با تمایز به سلول‌های سایر بافت‌ها از جمله سلول‌های عصبی در ترمیم آسیب‌های بافتی نقش داشته باشند. در این راستا تاکنون پژوهش‌های گوناگونی در ارتباط با استفاده از سلول‌های بنیادی خون‌ساز، جنینی، پیش‌سازهای عصبی برای درمان MS انجام شده است. اغلب این تحقیقات در مدل حیوانی این بیماری یعنی EAE انجام گرفته شده است. اگر چه همگی این پژوهش‌ها استفاده از این سلول‌ها را امیدبخش گزارش داده اند [۱۰-۱۲] اما استفاده از هریک این سلول‌ها با محدودیت‌هایی همراه است؛ مثلاً استفاده از سلول‌های پیش‌ساز عصبی (Neural Progenitor Cell: NPC) نخستین بار در سال ۲۰۰۵ برای درمان این بیماری به‌کار رفت اما به دلیل محدودیت دسترسی به این سلول‌ها و کشت سلولی نسبتاً دشوار آن‌ها استفاده آن‌ها نیز محدود شد یا براساس پژوهشی که در سال ۲۰۰۸ انجام شده، اگر چه استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی (Embryonic Stem Cell: ESC) در درمان MS با موفقیت‌هایی همراه بوده است اما مشکلاتی از قبیل مستعد بودن این سلول‌ها برای تشکیل تومور، استفاده از آن‌ها را تا زمان حل این مشکل به تعویق انداخته است [۱۳].

سلول‌های بنیادی خون‌ساز (Hematopoietic Stem Cells:

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

(HSC نیز تاکنون در تحقیقات مختلف برای درمان بیماری‌های خودایمن از جمله MS به‌کار رفته است اما از آن‌جا که هنگام استفاده از این سلول‌ها باید از داروهای سرکوب کننده ایمنی استفاده کرد، بنابراین اخیراً توجه پژوهشگران به سمت سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cell: MSC) که محدودیت‌های ذکر شده در مورد سایر سلول‌های بنیادی را ندارد جذب شده است. سلول‌های MSC، سلول‌های فیبروبلاستی شکل با منشاء مزودرمی، از دسته سلول‌های غیرخون‌ساز هستند که به دلیل برخی از ویژگی‌های منحصر به فرد خود از جمله دفع ایمنی کمتر و ترشح فاکتورهای ضروری برای تکثیر و تمایز، توجه پژوهشگران را برای استفاده از آن‌ها در فرایند ترمیم بافت‌ها و سلول‌های تخریب شده به خود جلب کرده است [۱٤-۱٦].

سلول‌های MSC را می‌توان از اندام‌های مختلف از جمله مغز استخوان، چربی، کبد، پوست و بند ناف جدا کرد [۱۷].

در این میان سلول‌های MSC جدا شده از بافت چربی به دلیل تهیه و دسترسی آسان‌تر و همچنین مقدار فراوان‌تر نسبت به سلول‌های MSC جدا شده از سایر بافت‌ها بیشتر مورد توجه قرار گرفته است، به‌گونه‌ای که مقدار سلول‌های MSC جدا شده از چربی نسبت به سلول‌های بنیادی جدا شده از مغز استخوان ۵۰۰ برابرتخمین زده می‌شود و فرایند جداسازی این نوع سلول‌ها در بافت چربی راحت‌تر بوده و با درد و هزینه کمتری همراه است [۱۸، ۱۹]. در مطالعه حاضر برای اولین بار اثر سلول‌های MSC جدا شده از بافت چربی و همچنین محیط کشت رویی این سلول‌ها بر ارتشاح لوکوسیتی مغز موش‌های مبتلا به EAE و مقایسه این گروه با موش‌های تیمار نشده بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی صفاقی موش C57BL/6

بافت چربی شکمی دو موش C57BL/6 در شرایط استریل جدا و پس از قطعه قطعه شدن، نیم ساعت در مجاور کلاژناز نوع ۱ قرار داده شد. بافت چربی هر موش در لوله‌های ۲۰ میلی‌لیتری جداگانه قرار گرفت و درون هر لوله یک سی‌سی کلاژناز که در ٤ سی‌سی محیط DMEM (Eagle Minimum Essential Medium/Alpha Medium) بدون سرم رقیق شده است، ریخته شد و هم زمان بافت چربی را طی بارهای متوالی و با سرعت وارد پیپت کرده و خارج شد و سپس در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. سپس لوله‌ها از انکوباتور خارج و به‌منظور خنثی کردن اثر کلاژناز محلول با ٤ سی‌سی محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS (Fetal Bovine Serum) رقیق و سپس سانتریفوژ انجام شد (به‌مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰ دور در دقیقه). پس از سانتریفوژ سلول‌های بافت چربی در مایع رویی قرار می‌گیرند و سایر سلول‌ها به همراه گلبول‌های قرمز در کف لوله قرار می‌گیرند و از سوسپانسیون $NHCl_4$ برای لیز گلبول‌های قرمز استفاده، سپس شستشو و مجدداً سانتریفوژ انجام شد. پس از جدا کردن مایع رویی، رسوب کف لوله که حاوی سلول‌های MSC است، تکان داده شد و در یک سی‌سی محیط DMEM حل و به فلاسک‌های T25 منتقل شد.

کشت سلولی و جدا کردن سلول‌های MSC با استفاده از خاصیت چسبندگی آن‌ها به کف ظرف

پس از آن‌که محتوی هر لوله به یک فلاسک T25 منتقل شد، ۱۰ سی‌سی محیط کشت DMEM حاوی FBS ۱۵ درصد درون هر فلاسک ریخته و فلاسک‌ها به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل شد. سلول‌های مزانشیمی به دلیل خاصیت چسبندگی خود پس از ۲٤ ساعت به کف فلاسک می‌چسبند و شروع به تکثیر می‌کنند. پس از ٤ روز کف فلاسک تقریباً از سلول سرریز می‌شود. سلول‌های MSC در این مرحله دوکی شکل و کاملاً کشیده شده و به‌صورت تقریباً موازی با هم قرار می‌گیرند. طی این ٤ روز یک بار محیط کشت سلول‌ها با محیط تازه تعویض شد (روز سوم) تا

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

سلول‌های غیرچسبنده جدا شده و از طرفی محیط تازه برای سلول‌های مزانشیمی در حال تکثیر فراهم شود و درصد خلوص سلول‌های MSC بیشتر شود. پس از پر شدن کف فلاسک از سلول‌های دوکی شکل، سلول‌ها تریپسینه و سپس پاساژ داده شدند. سپس فلاسک‌ها به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل شد. محیط کشت به‌مدت ۱۰ روز هر ۳ روز یک‌بار تعویض شد تا سلول‌ها به حالت سرریزی (Confluency) برسند.

تمایز سلول‌های MSC به سلول‌های چربی و استخوان

سلول‌های MSC از پاساژ دوم پس از تریپسینه شدن از کف فلاسک جدا و در محیط‌های تمایزی ویژه چربی و استخوان قرار داده شد. عمل تریپسینه کردن به این صورت انجام شد که به سلول‌های چسبیده به کف فلاسک ۲ سی‌سی تریپسین اضافه کرده و فلاسک به آرامی تکان داده شد و پس از ۲ دقیقه فلاسک زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شد که اغلب سلول‌ها از حالت کشیده به حالت کروی درآمده باشند. سلول‌ها پس از شمرده شدن به دو پلیت ٦ خانه منتقل شدند. در این دو پلیت سلول‌های MSC به گونه‌ای توزیع می‌شود که در هر خانه ۲۰۰۰۰۰ سلول وجود داشته باشد. سپس در پلیت اول محیط تمایزی مخصوص چربی اضافه شد که شامل ۱۰ سی‌سی محیط DMEM حاوی FBS ده درصد، پنی‌سیلین- استرپتومیسین ۱ درصد، دگزامتازون (Dexamethasone) ۰/۵ میلی‌مولار (Sigma, Germany)، اندومتازین ۵۰ میلی‌مولار (Sigma)، ایزوبوتیل متیل زانتین (Isobutyl Methyl Xanthine) ۰/۵ میلی‌مولار (Sigma) بود و در پلیت دوم محیط مخصوص تمایز سلول‌های چربی افزوده شد که شامل ۱۰ سی‌سی محیط DMEM حاوی FBS ده درصد، آسکوربیک اسید ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، بتا گلیسرول فسفات ۱۰ میلی‌مولار و 10^{-8} مولار دگزامتازون بود. پس از ۲۱ روز پلیتی که محیط تمایزی چربی در آن قرار داشت با رنگ اویل رد (Oil Red O) و پلیتی که محیط تمایزی استخوان در آن قرار داشت با رنگ آلیزارین قرمز (Alizarin Red) مطابق با روش‌های استاندارد رنگ‌آمیزی شد.

شناسایی سلول‌های MSC ها با استفاده از شاخص‌های سطحی CD

محیط رویی ٤ فلاسک T75 که به درجه سرریزی رسیده و تقریباً ۹۰ درصد کف فلاسک را پوشانده بودند خالی کرده و کف فلاسک خالی شده با PBS (Phosphate Buffer Saline) و EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid) شستشو داده شد. سپس سلول‌ها به‌مدت ۳ دقیقه تریپسینه شدند تا به‌صورت تک تک و منفرد در آیند. پس از آن فلاسک حاوی تریپسین با دو سی‌سی FBS ۵ درصد + PBS + EDTA خنثی شد و در نهایت محتوی همه فلاسک‌ها در یک لوله ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد و سلول‌ها پس از شمارش، سانتریفوژ و محیط رویی آن‌ها دور ریخته شد و ۱۰ سی‌سی از FBS ۵ درصد + PBS + EDTA به رسوب کف لوله اضافه شد. سپس مجدداً ۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و پس از دور ریختن محیط رویی لوله، سلول‌های رسوب شده در کف لوله با ۱۰ میلی‌لیتر از محلول (BSA ۳ درصد + FBS ۵ درصد) + PBS به‌مدت ۳۰ دقیقه مجاور شد. پس از ۳۰ دقیقه محلول مورد نظر سانتریفوژ و مجدداً پس از تخلیه محلول رویی لوله با ۱۰ سی‌سی PBS + EDTA100 سانتریفوژ انجام شد. سپس در هر لوله اپندورف ۱۰ لاندا محیط حاوی سلول + FBS ۵ درصد + PBS ریخته و از این مرحله به بعد در تاریکی و سرما انجام شد. سپس لوله‌های اپندورف ۳ بار و هر بار با دو سی‌سی محلول FBS ۵ درصد و PBS میکروسانتریفوژ شد (۱۰ دقیقه با ۳۲۰۰ دور در دقیقه). در مرحله بعد، محلولی متشکل از ۱۰ سی‌سی PBS و ۱۰ سی‌سی پارافرمالدهید و ۱۰ سی‌سی PBS + FBS تهیه کرده و ۲ سی‌سی از این محلول به هرکدام از اپندورف‌های تهیه شده در مرحله قبل اضافه شد. سپس آنتی‌بادی‌های مربوط به هر لوله به محتوی اپندورف‌ها افزوده

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

شد. در مرحله آخر محتوی اپندورف به لوله‌های مخصوص فلوسیتومتری منتقل و به‌منظور تحلیل نتایج، لوله‌ها به دستگاه فلوسیتومتری منتقل شد. آنتی‌بادی‌هایی که برای شناسایی MSCs مورد استفاده قرار گرفت بر علیه نشانگرهای زیر بود:

CD105، CD73، CD29 که انتظار می‌رود MSCs برای این نشانگرها مثبت باشند.

CD45، CD11b، CD31، CD24، CD34 که انتظار می‌رود MSC برای این شاخص‌ها منفی باشد.

CD45، CD24، CD11b هر سه یک ایزوتیپ مشترک به‌نام IgG2a داشتند.

جدول ۱ شدت علایم بالینی در موش‌های C57

علایم	درجه شدت علایم
سالم	۰
ضعف انتهایی دم و از بین رفتن تونوس دم	۰/۵
فلج کامل دم	۱
ضعیف شدن پاهای عقبی و لرزش	۱/۵
ضعیف شدت بیشتر پاهای عقبی، عدم تعادل، راه رفتن ناموزون	۲
فلج جزیی پاهای عقبی یا فلج کامل یک پای عقبی	۲/۵
فلج کامل پاهای عقبی به گونه‌ای که حیوان پای خود را روی زمین می‌کشد	۳
فلج جزیی پاهای جلویی که این فلج از طریق قدرت آویزان شدن حیوان به کمک پاهای جلویی سنجیده می‌شود	٤
فلج کامل پاهای جلویی	٤/۵
مرگ حیوان با واسطه EAE	۵

ایجاد مدل EAE

۱۵ سر موش ماده C57BL/6 ۷ هفته‌ای با پپتید MOG (Myelin Oligodendritic Glycoprotein) به‌صورت زیر ایمن شدند:

به ۳ میلی‌گرم پپتید MOG، ۱۵۰۰ لاندا PBS و ۱۵۰۰ لاندا ادجوانت فروند (Complement Fraud Adjuant: CFA) اضافه شد و به هر موش ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از این سوسپانسیون به‌صورت زیرجلدی در ناحیه پهلو تزریق شد. پس از تزریق پپتید بلافاصله به هر موش ۲۰۰ نانوگرم سم پرتوزیس (Pertussis Toxin) به ازای ۱۰۰ میکرولیتر PBS، به‌صورت زیرجلدی تزریق و ٤۸ ساعت بعد همین مقدار از سم پرتوزیس یعنی معادل ۲۰۰ نانوگرم سم پرتوزیس به ازای ۱۰۰ میکرولیتر PBS به‌صورت زیرجلدی تزریق شد. پس از این مرحله درجه شدت علایم بالینی آسیب‌های نورونی موش امتیازبندی شد. القای مدل و امتیازبندی شدت علایم بالینی براساس روش توماس جفرسون (Thomas Jefferson) انجام گرفت (جدول ۱) [۷].

پیوند سلول MSC به موش‌های C57BL/6

۲۰ سر موش که مدل EAE در آن‌ها القا شده بود به چهار گروه ۵تایی تقسیم شد و یک گروه ۵تایی دیگر متشکل از موش‌های سالم به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد و در مجموع در این آزمایش ۵ گروه به‌ترتیب زیر وجود داشت:

۱- گروه سالم که به‌عنوان کنترل در نظر گرفته می‌شد، در این گروه PBS به‌صورت درون‌رگی تزریق شد.

۲-گروه EAE بدون هیچ تیماری

۳-گروه EAE با تزریق $۱۰^{٦}$ سلول MSC به‌صورت درون صفاقی

٤- گروه EAE با تزریق $۱۰^{٦}$ سلول MSC به صورت درون‌رگی

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

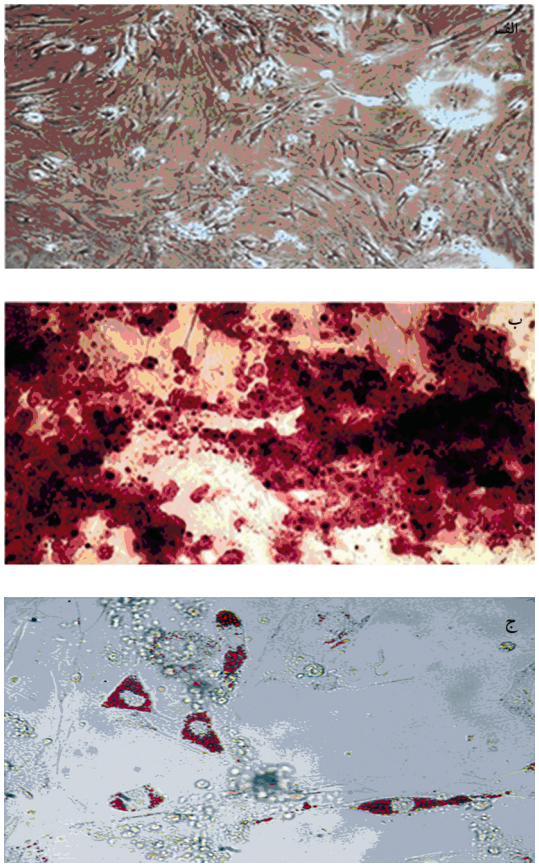
۵- گروه EAE با تزریق ٦ نوبت محیط رویی کشت سلول‌های MSC

در روز پانزدهم پس از ایمن شدن موش‌ها با MOG، زمانی که تقریباً درجه شدت علایم بالینی (Score) همگی موش‌ها به یک رسید، به اندازه $۲×۱۰^{٦}$ سلول MSC به‌صورت درون صفاقی در موش‌های گروه سوم و $۱۰^{٦}$ سلول MSC در رگ‌های پهلویی دمی موش‌های گروه چهارم و شش نوبت محیط رویی کشت سلول‌های MSC از پاساژ دوم به موش‌های گروه پنجم به‌صورت درون صفاقی تزریق شد (هر نوبت یک سی‌سی). مقدار سلول در مسیر درون صفاقی دو برابر تزریق شد زیرا بر طبق پژوهش‌های انجام شده در سال ۲۰۰۸ دسترسی و مهاجرت سلول‌های تزریق شده از طریق این مسیر به مغز، کمتر ار مسیر درون‌رگی است [۱۹].

آزمون هیستوپاتولوژی مغز

در پایان ٦۰ روز، مغز تمامی موش‌ها (هر ۵ گروه) اعم از موش‌هایی که سلول‌های MSC به آن‌ها تزریق شده و موش‌هایی که مایع کشت رویی سلول‌های MSC را دریافت کرده بودند و همچنین مغز موش‌های سالم جدا شد؛ به این صورت که استخوان جمجمه به آهستگی با قیچی برش داده و پس از جدا شدن مغز به‌منظور تثبیت بافت، در پارافرم آلدهید ۱ درصد قرار داده شد. پس از ٤ ساعت بافت‌های مغز با پارافین منجمد و در پایان با دستگاه میکروتوم (Microtome) بافت‌های مغز به اندازه ۵ میکرومتر برش داده شد به‌گونه‌ای که در هر برش تمامی بخش‌های بافت مغز وجود داشته باشد. سپس برش‌ها با استفاده از رنگ هماتوکسیلین و ائوزین (Hematoxylin and Eosin) رنگ شده و ارتشاحات لوکوسیتی که اغلب در اطراف عروق متمرکز شده بودند، مشخص و شمارش شد.

از آزمون تی زوج غیروابسته (Independent Pair T Test) و آنووا (ANOVA) برای تجزیه و تحلیل آماری استفاده شد.



شکل ۱ الف) سلول‌های MSC با استفاده از خاصیت چسبندگی خود به کف ظرف و شکل دوکی و کشیده خود از سایر سلول‌های بافت چربی صفاقی متمایز می‌شود. **ب)** سلول‌های MSC پس از تمایز به سلول چربی و به دنبال رنگ‌آمیزی اویل رد O از حالت کشیده در شکل الف به‌صورت سلول‌هایی گرد همراه با واکوئل قرمز رنگ مشاهده شد. **ج)** پس از آن‌که سلول‌های MSC به سلول استخوانی تمایز یافت ساختارهای کلسیمی را می‌توان به کمک رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز شناسایی کرد، ساختارهای کلسیمی به حالت رسوب‌های قرمز تیره و سیاه دیده می‌شود.

نتایج

یکی از روش‌هایی که در این پژوهش برای جداسازی MSC از سایر سلول‌ها به‌کار رفت، شناسایی نشانگرهای سطحی MSC بود. برای این منظور سلول‌های چسبیده به کف فلاسک را با کمک تریپسین جدا و برخی از نشانگرهای سطحی این سلول‌های چسبنده که در پژوهش‌های گذشته به

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

منزله شاخص‌های MSC شناسایی شده بودند با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی مشخص شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از خاصیت چسبندگی به کف فلاسک و همچنین شکل دوکی و فیبروبلاست مانند خود، از سایر سلول‌ها تشخص داده شد (شکل ۱). سلول‌های MSC پس از تمایز به سلول چربی و به دنبال رنگ‌آمیزی اویل رد O از حالت کشیده در شکل ۱ (الف) به‌صورت سلول‌هایی گرد، همراه با واکوئل قرمز رنگ مشاهده شد. پس از آنکه سلول‌های MSC به سلول استخوانی تمایز یافت ساختارهای کلسیمی به کمک رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز شناسایی شد که ساختارهای کلسیمی به حالت رسوب‌های قرمز تیره و سیاه دیده شد (شکل ۱). علاوه بر تمایز MSC به استخوان و چربی از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال (Monoclonal Antibodies) برای بررسی شاخص‌های سطحی MSC استفاده شد. پس از پایان کار داده‌ها با استفاده از فلوسیتومتری و نرم‌افزار cyflogic تحلیل شد و نتایج زیر به‌دست آمد (جدول ۱):

جدول ۱ درصد نشانگرهای سطحی (CD) روی سلول‌های MSC

CD	درصد در MSC
CD29	۸۲
CD73	۵۳
CD105	٦٤
CD31	۰/۸۳
CD34	۰/۷
CD45	۰/٥٤
CD24	۰/٤۳
CD11b	۰/٥۳

در این آزمایش مطابق با آنچه که در گذشته انجام شده بود، MSC برای شاخص CD73، CD29 و CD105 مثبت و برای شاخص‌های CD31، CD45، CD34، CD24 و CD11b منفی شد.

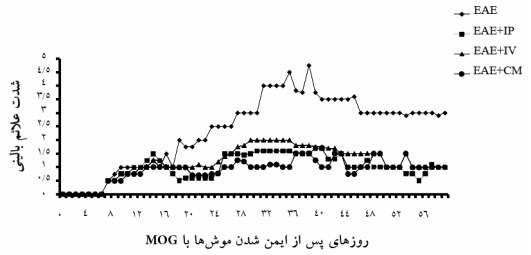
جدول ۲ زمان‌بندی شدت علایم بالینی EAE

گروه	زمان شروع علایم	زمان حداکثر علایم	زمان تثبیت بیماری
گروه EAE بدون هیچ تیمار	روز ۱۵	روز ۳۰ تا ٤۰	روز ٤۷ تا ٦۰
گروهی که درون‌رگی سلول دریافت کردند	روز ۱۵	روز ۲۸ تا ۳٤	روز ٤۹ تا ٦۰
گروهی که درون صفاقی سلول دریافت کردند	روز ۱۵	روز ۲٤ تا ٤۰	روز ٤٦ تا ٦۰
گروهی که محیط کشت سلول‌های مزانشیمی دریافت نمود	روز ۱۵	روز ۳٤ تا ٤۰	روز ٥۱ تا ٦۰

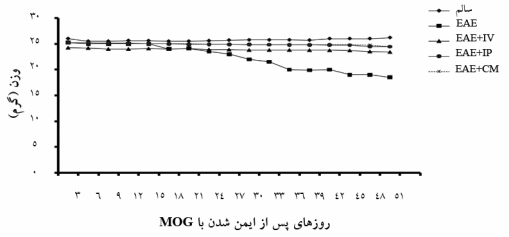
نخستین تظاهرات بالینی EAE، ۱۵ روز پس از ایمن شدن موش‌ها با MOG آغاز شد. این علایم در مرحله آغازین بیماری به‌صورت ضعیف شدن و شل شدن دم، کشیده شدن نسبی دم روی زمین و از بین رفتن حالت عمود دم ظاهر شد. بین روزهای ۳۰ تا ٤۰ میانگین شدت علایم بالینی در گروه EAE که هیچ تیماری دریافت نکرده بود، به حداکثر رسید (درجه شدت علامت بالینی: ٤). در گروهی که سلول را به‌صورت درون صفاقی دریافت کرده بود، شدت علایم بین روزهای ۲٤ تا ٤۰ حداکثر شد (درجه شدت علامت بالینی= ۱/۷۵)، در گروهی که به‌صورت درون‌رگی سلول MSC دریافت کرده بود، میانگین شدت علایم بین روزهای ۲۸ تا ۳٤ حداکثر شد (درجه شدت علامت بالینی= ۱/٦) و در گروهی که شش نوبت محیط کشت رویی سلول‌های MSC دریافت کرده بود، میانگین شدت علایم، بین روزهای ۳٤ تا ٤۹ حداکثر بود (درجه شدت علامت بالینی= ۱/۵). در گروه EAE تیمار شده با سلول از طریق مسیر درون‌رگی بین روزهای ۳٦ تا ۵۰ میانگین شدت علایم بالینی به حد ثابتی در حدود ۱ رسید. در گروه EAE که محیط کشت رویی سلول‌های MSC را به‌صورت درون صفاقی دریافت کرده بود بین روزهای ٤۰ تا ٦۰ و در گروه EAE که سلول‌های MSC را به‌صورت درون صفاقی دریافت کرده بود بین روزهای ٤٤ تا ٦۰ شدت علایم بالینی به حد ثابت ۱

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

رسید؛ در حالی‌که در گروه EAE تیمار نشده بین روزهـای ۳۹ تـا ۵۰ شدت علایم بالینی به حد ثابت میانگین ۳/۲۵ رسید. در گـروه EAE تیمار نشده در روزهای ۱۳ تا ۵۰ شدت علایم بالینی به‌طور معنی‌داری بیشتر از سـایر گـروه‌هـا بـود (P<۰/۰۵) در حـالی‌کـه میانگین شدت علایم بالینی در گروه‌هایی که سلول و محیط رویی کشت سلول‌های MSC دریافت کرده بودند، تفاوت معنی‌داری بـا هم نداشت (جدول ۲ و نمـودار ۱). وزن مـوش‌هـایی کـه سـلول MSC و یا محیط رویی کشت سلول‌هـای MSC دریافـت کـرده بودند به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه EAE تیمار نشده بهبود یافت (P<۰/۰۵) (نمودار ۲).



نمـودار ۱ شـدت علائـم بـالینی EAE در گـروه‌هـای مختلـف، IP= درون صفاقی،IV=درون‌رگی، CM= محیط رویی کشت سلول‌های MSC



نمودار ۲ مقایسه وزن در گروه‌های سالم، EAE بـدون تیمـار، گـروه EAE کـه به‌صورت درون‌رگی (IV) سلول دریافت نموده و گـروه EAE کـه بـه‌صـورت درون صفاقی (IP) سلول دریافت نمـوده و گروهـی کـه محـیط رویـی کـشت سلول‌های بنیادی (CM) مزانشیمی دریافت نمـوده اسـت. وزن گـروه EAE در مقایسه با گروه سالم و گروه‌های تیمار شده به‌طور معنی داری کمتر بـود (۰/۰۳ =P) در حالی‌که وزن موش‌ها، در گروه‌هایی که سلول یا محیط کـشت دریافـت کرده بودند تفاوت معنی‌داری با هم نداشت اما تفاوت وزن گروه‌های تیمار شده با سلول و محیط کشت با گروه EAE تیمار نشده معنی‌دار بود. P< ۰/05

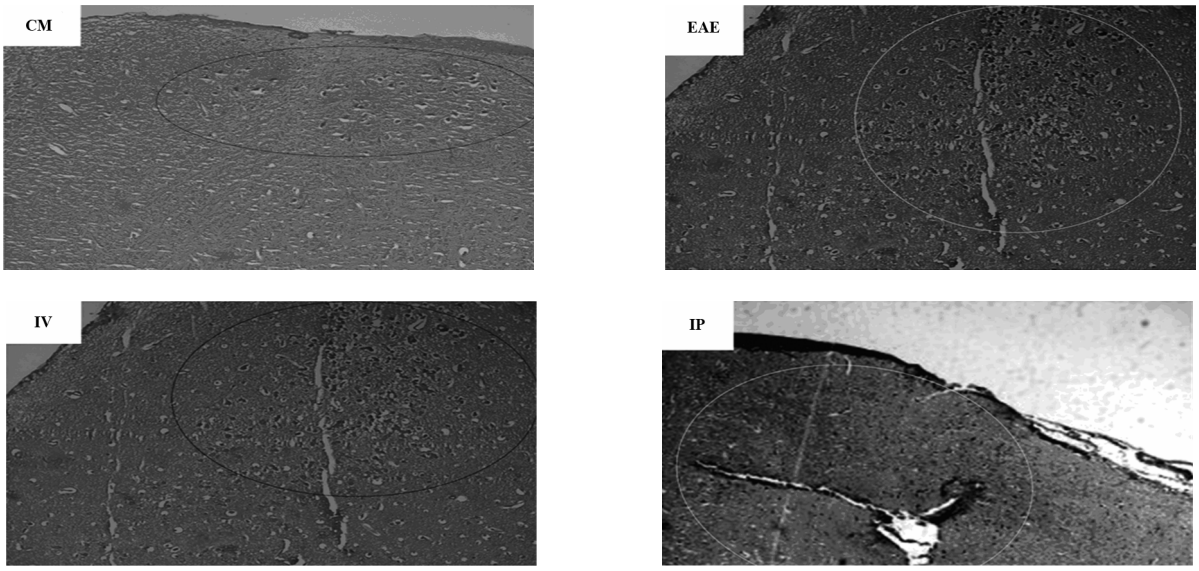
پس از پایان ۵۰ روز، سه عدد از مـوش‌هـای گـروه EAE تیمار نشده، یک عدد از موش‌هایی که MSC به‌طور درون‌رگی دریافت کرده بود، ۲ عدد از موش‌هایی که MSC درون صفاقی دریافت کرده بودند و دو عدد از موش‌هایی کـه محـیط رویـی کشت MSC را دریافت کرده بودند، مردند (نمودار ۳).

نمودار ۳ مقایسهٔ درصد بقا در موش‌های گروه‌های مختلـف از جملـه گـروه سالم، EAE بدون تیمار، گروه EAE که به‌صـورت درون‌رگـی (IV) سـلول دریافت نموده، گروه EAE که به‌صورت درون صفاقی (IP) سـلول دریافـت نموده و گروهی که ٦ نوبت محیط رویی کشت سلول‌های بنیـادی مزانـشیمی (CM) دریافت نموده است.

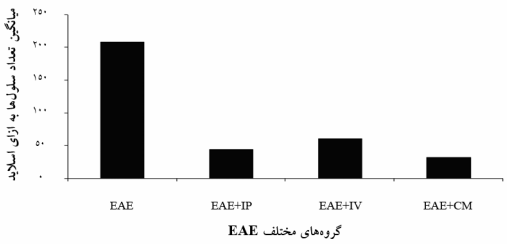
در پایـــان ٦٠ روز میـــزان ارتـــشاح لوکوســـیتی و تعـــداد لوکوسیت‌ها در مغز موش‌های گروه‌های مختلف شمارش شـد. در پژوهش حاضر بر مبنای تجربیاتی که از پژوهش‌هـای دیگـر به‌دست آمده بود، پس از رنـگ‌آمیـزی هماتوکـسیلین- ائـوزین سلول‌هایی به‌عنوان سلول‌های ارتـشاحی شـمارش شـد کـه بـا هسته‌های تیره رنگ به‌صورت مجتمع کنار هم قرار گرفته بودند که اغلب این سلول‌ها نوتروفیل هستند؛ در صـورتی کـه سـایر سلول‌های تک هسته‌ای که به‌صورت پراکنده قرار دارنـد، رنـگ هماتوکسیلین ائوزین را به خود جذب نکرده و در این شمارش قرار نگرفتند. در گروه EAE تعداد سلول‌هـای ارتـشاحی مغـز شـــامل ۲۰۸ ســـلول بـــه ازای میـــانگین، ٤ بـــرش در زمینـــه میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۲۰ برابر بود. در این گروه دو موش در پایان کار باقی مانده بود (n=۲) و به ازای هـر مـوش دو برش ۵ میکرومتری در زمینـه میکروسـکوپی ۲۰× شـمارش شد. در گروهی کـه بـه‌صـورت درون صـفاقی MSC دریافـت کرده بودند، میانگین سلول‌های ارتشاحی مغز ٤٤ سلول به ازای میانگین ٦ قطعه برش از بافت مغز در سه موش (n=۳) بود. در

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

گروهی که به‌صورت درون‌رگی MSC دریافت کرده بودند، سلول‌های ارتشاحی مغز در یک زمینه میکروسکوپ با بزرگنمایی ۲۰× میانگین سلول‌ها، ٦١ سلول به ازای میانگین ٦ قطعهٔ برش در چهار موش (n=٤) و در گروهی که ٦ نوبت محیط رویی کشت MSC را دریافت کرده بودند، میانگین سلول‌های ارتشاحی بافت مغز در سه موش (n=۳) به ازای میانگین ٦ برش در یک زمینه میکروسکوپ با بزرگنمایی ۲۰×، ۳۱ عدد بود (شکل ۲ و نمودار ٤).



شکل ۲ میزان ارتشاح لوکوسیتی در مغز گروه‌های EAE تیمار شده و تیمار نشده به دنبال رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین و شمارش سلول‌های هسته‌دار و تیره رنگ که به‌صورت تجمعی در کنار هم قرار گرفته بودند. در گروه EAE به ازای دو موش (n=۲) سلول‌های چهار اسلاید شمارش شد و میانگین ۲۰۸ سلول در یک زمینه میکروسکوپ با بزرگنمایی× ۲۰ در این گروه وجود داشت. در گروهی که MSC به‌صورت درون صفاقی(IP) دریافت کرده بود، میانگین سلول‌های ارتشاحی مغز به ازای ٦ قطعهٔ برش در یک زمینه میکروسکوپ با بزرگنمایی ×۲۰، در سه موش (n=۳) بود، در گروهی که به‌صورت درون‌رگی MSC (IV) دریافت کرده بود، میانگین سلول‌های ارتشاحی مغز ٦١ سلول به ازای ٦ قطعهٔ برش در یک زمینه میکروسکوپ با بزرگنمایی ×۲۰ در چهار موش (n=٤) بود و در گروهی که محیط رویی کشت MSC (CM) را دریافت کرده بود، میانگین سلول‌های ارتشاحی بافت مغز در سه موش (n=۳) به ازای ٦ برش، ۳۱ عدد بود.



نمودار ٤ مقایسه ارتشاح لوکوسیتی در گروه‌های EAE، درون صفاقی (IP)، درون‌رگی (IV)، محیط رویی کشت سلول‌های MSC (CM)

بحث

در این پژوهش مشاهده شد که ارتشاح لوکوسیتی در گروه‌های تیمار شده با سلول و محیط کشت سلول‌های MSC در مقایسه با موش‌های EAE تیمار نشده کاهش معنی‌داری داشت که این کار تأیید کننده مطالعات دیگر است که در آن‌ها از سلول‌های بنیادی با منشاء مختلف از جمله مغز استخوان یا پیش‌سازهای نورونی برای درمان موش‌های EAE استفاده شده است و نتایج با کاهش معنی‌داری در شدت علایم بالینی و ارتشاح لوکوسیتی در مغز همراه بود [۲۰-۲۲]. در مطالعه حاضر اثر MSC های جدا شده از بافت چربی روی کاهش شدت EAE هم از روی علایم بافت‌شناسی مغز و هم از نظر شدت علایم بیماری سنجیده شد که انطباق شدت علایم بالینی و

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

ارتشاح لوکوسیتی در مغز و ارتباط آن با شدت بیماری مشاهده شد. نتایج ما نشان می‌دهد شدت علایم بالینی در روزهای مختلف نوسان دارد و در روزهای متوالی شدت علایم بالینی بالا و پایین می‌آید که این امر در مورد EAE که یک بیماری مزمن با فازهای متناوب حمله و بهبود (Relapse- Remission) است، طبیعی است چرا که در MS و مدل حیوانی آن پس از یک دوره ظاهر شدن علایم، سیستم ترمیمی درون‌زاد بدن از جمله سلول‌های پیش‌ساز عصبی درون‌زاد، باعث بهبود زودگذر علایم می‌شود.

سلول‌های MSC ترجیحاً به مناطق آسیب دیده در سیستم عصبی مرکزی مهاجرت کرده و با ترشح فاکتورهای سرکوب کننده سیستم ایمنی از جمله اینترلوکین ۱۰ (Interleukin 10: IL-10)، TGF-β (Transforming Growth Factor Beta)، باعث کاهش ارتشاح لنفوسیت‌ها و کاهش مهاجرت سلول‌ها به این ناحیه و سرکوب سیستم ایمنی هم به‌صورت سیستمیک و هم موضعی در مغز می‌شوند. در مطالعات پیشین نیز نقش تعدیل کنندگی ایمنی سلول‌های MSC اثبات شده بود [۲۳، ۲٤]. در این آزمایش ٦ نوبت محیط رویی کشت MSC به یکی از گروه‌ها تزریق شد زیرا در پژوهش دیگری که برای بررسی اثر MSC روی بیماری‌های نقص کلیوی انجام شده بود، از یک نوبت محیط رویی کشت استفاده شد و پاسخی در بهبودی بیماری مشاهده نشد [۲۵]. تزریق محیط رویی کشت سلول‌های MSC از آن‌جا که هم حاوی فاکتورهای ترشحی لازم برای رشد سلول‌های پیش‌ساز عصبی آندوژن است و هم فاکتورهایی دارد که عمل DC را مهار کرده و DC تحملی را ایجاد و مانع تکثیر T خودواکنشگر می‌شود، می‌تواند در کاهش شدت علایم و ارتشاح لوکوسیتی مغز نقش داشته باشد زیرا لنفوسیت T به‌عنوان سلول کمک کننده برای تکثیر سایر سلول‌ها عمل می‌کند و در نتیجه مهار لنفوسیت T به‌واسطه سلول‌های MSC باعث بهبود شدت علایم بیماری می‌شود. در سال ۲۰۰۸ گوردون (Gordon) و همکاران سلول‌های بنیادی مزانشیمی را به‌صورت درون صفاقی به موش‌های C57 تزریق نموده و مهاجرت آن‌ها را به سیستم عصبی مرکزی با استفاده از پروتئین نشاندار GFP (Green Fluorescent Protein) ردیابی و مشاهده کردند. اگر چه مهاجرت این سلول‌ها به سیستم عصبی مرکزی از طریق مسیر درون صفاقی نسبت به تزریق درون‌رگی به مقدار کمتری اتفاق می‌افتد [۲۳] اما ثابت شد که تزریق سلول‌ها از این طریق و حضورشان در سیستم عصبی مرکزی بر کاهش شدت علایم EAE نقش دارد. در تحقیقات زاپیا (Zappia) و ژردونی (Gerdoni) در سال‌های ۲۰۰۵ و ۲۰۰۷ ثابت شد که تزریق درون‌رگی MSC باعث کاهش ارتشاح لوکوسیتی از طریق تعدیل ایمنی در اندام‌های لنفاوی محیطی و مغز می‌شود [۱۱]. در بررسی که توسط محققان حاضر انجام گرفت مشاهده شد که شدت علایم بیماری در گروهی که به‌صورت درون‌رگی سلول دریافت کرده بودند بیشتر از سایر گروه‌های تیمار شده بود. در این پژوهش مقدار سلول در مسیر درون صفاقی دو برابر تزریق شد زیرا در مسیر درون‌رگی ممکن است سلول‌ها دچار میکروآمبولی (Microemboli) ریوی شده و در ریه تجمع پیدا کرده و به دام افتند و در نتیجه به سیستم عصبی مرکزی نرسند. از طرف دیگر زمانی که سلول از طریق مسیر درون‌رگی تزریق می‌شود مستقیماً وارد طحال شده و در نتیجه برخلاف مسیر درون صفاقی در فاصله زمانی کوتاه‌تری به سیستم عصبی مرکزی می‌رسند. در این آزمایش اثر ٦ سی‌سی محیط کشت سلول‌های MSC بر شدت علایم بالینی EAE و ارتشاح لوکوسیتی در مغز و وزن موش‌ها تقریباً مشابه اثر تزریق دو میلیون سلول از طریق مسیر درون صفاقی بود که این امر می‌تواند بیانگر آن باشد که سلول‌های MSC برای اعمال آثار ترمیمی، بازسازی و مهاری خود لزوماً نیازی به تماس مستقیم با سلول‌های بافت هدف ندارند بلکه از فاصله دور و به واسطه میانجی‌ها و مواد واکنشگر ترشحی که تولید می‌کنند، نیز می‌توانند آثار خود را بر بافت هدف برجا بگذارند. در این بررسی شدت علایم بالینی در گروه‌های تیمار شده با سلول و محیط رویی کشت MSC تقریباً یکسان بود در صورتی که وزن موش‌ها و ارتشاح لوکوسیتی در موش‌هایی که

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

به‌صورت درون صفاقی سلول دریافت کرده بودند و همچنین در گروهی که محیط رویی کشت سلول‌های MSC را دریافت کرده بودند، با گروهی که MSC به‌صورت درون‌رگی دریافت کرده بود متفاوت بود که عدم تطابق شدت علایم بالینی با وزن موش‌ها و ارتشاح لوکوسیتی در گروه‌های مختلف شاید به این علت باشد که علایم بالینی به‌طور روزانه ثبت شد در حالی که وزن موش‌ها هر سه روز یک‌بار و ارتشاح لوکوسیتی پس از پایان ٦٠ روز ثبت شد؛ به‌عبارت دیگر مراحل کار به‌گونه‌ای بود که همزمانی در اجرای این سه آزمایش وجود نداشت. با توجه به پژوهش حاضر و مطالعاتی که تا اکنون انجام شده، تزریق سلول‌ها در درون بطن‌های مغز می‌تواند برای درمان MS به‌عنوان راه‌کارجدیدتری بررسی شود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی پژوهشکده بن‌یاخته و همچنین بودجه‌ای که دانشگاه تربیت مدرس برای پژوهش‌های مربوط به سلول‌های بنیادی درنظر گرفته بود، انجام شد که در این‌جا مراتب قدردانی خود را نسبت به حامیان مالی این تحقیق ابراز می‌داریم.

منابع

[1] Keegan BM, Noseworthy JH. Multiple sclerosis. Annu Rev Med 2005; 53: 285-302.

[2] Anderson DW, Ellenberg JH, Leventhal CM, Reingold SC, Rodriguez M, Silberberg DH. Revised estimate of the prevalence of multiple sclerosis in the United States. Ann Neurol 1992; 31(3): 333-6.

[3] Oksenberg JR, Barcellos LF. The complex genetic aetiology of multiple sclerosis. J Neurovirol 2002; 6 Suppl 2: S10-2.

[4] Murray TJ. The history of multiple sclerosis: the changing frame of the disease over the centuries. J Neurol Sci 2009; 277 Suppl 1: S3-8.

[5] Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. N Engl J Med 2000; 343(13): 938-52.

[6] Makar TK, Trisler D, Bever CT, Goolsby JE, Sura KT, Balasubramanian S, Sultana S, Patel N, Ford D, Singh IS, Gupta A, Valenzuela RM, Dhib-Jalbut S. Stem cell based delivery of IFN-beta reduces relapses in experimental autoimmune encephalomyelitis. J Neuroimmunol 2008; 196(1-2): 67-81.

[7] Furlan R, Cuomo C, Martino G. Animal models of multiple sclerosis. Methods Mol Biol 2009; 549: 157-73.

[8] Corboy JR, Goodin DS, Frohman EM. Disease-modifying Therapies for Multiple Sclerosis. Curr Treat Options Neurol 2003; 5(1): 35-54.

[9] Trapp BD, Ransohoff R, Rudick R. Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability. Curr Opin Neurol 1992; 12(3): 295-302.

[10] Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, Pennesi G. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. Eur J Immunol 2005; 35(5): 1482-90.

[11] Gerdoni E, Gallo B, Casazza S, Musio S, Bonanni I, Pedemonte E, Mantegazza R, Frassoni F, Mancardi G, Pedotti R, Uccelli A. Mesenchymal stem cells effectively modulate

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. Ann Neurol 2007; 61(3): 219-27.

[12] Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, Giunti D, Ceravolo A, Cazzanti F, Frassoni F, Mancardi G, Uccelli A. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. Blood 2005; 106(5): 1755-61.

[13] Aharonowiz M, Einstein O, Fainstein N, Lassmann H, Reubinoff B, Ben-Hur T. Neuroprotective effect of transplanted human embryonic stem cell-derived neural precursors in an animal model of multiple sclerosis. PLoS One 2008; 3(9): e3145.

[14] Snowden JA, Brooks PM, Biggs JC. Haemopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases. Br J Haematol 2003; 99(1): 9-22.

[15] Uccelli A, Zappia E, Benvenuto F, Frassoni F, Mancardi G. Stem cells in inflammatory demyelinating disorders: a dual role for immunosuppression and neuroprotection. Expert Opin Biol Ther 2006; 6(1): 17-22.

[16] Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. J Cell Physiol 2007; 213(2): 341-7.

[17] Dvorakova J, Hruba A, Velebny V, Kubala L. Isolation and characterization of mesenchymal stem cell population entrapped in bone marrow collection sets. Cell Biol Int 2008; 32(9): 1116-25.

[18] Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, Chou YF, Mari C, Thomas R, Quarto N, Contag CH, Wu B, Longaker MT. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. Nat Biotechnol 2004; 22(5): 560-7.

[19] Constantin G, Marconi S, Rossi B, Angiari S, Calderan L, Anghileri E, Gini B, Bach SD, Martinello M, Bifari F, Galiè M, Turano E, Budui S, Sbarbati A, Krampera M, Bonetti B. Adipose-derived mesen-chymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. Stem Cells 2009; 27(10): 2624-35.

[20] Hsu YC, Lee DC, Chiu IM. Neural stem cells, neural progenitors, and neurotrophic factors. Cell Transplant 2007; 16(2): 133-50.

[21] Pluchino S, Quattrini A, Brambilla E, Gritti A, Salani G, Dina G, Galli R, Del Carro U, Amadio S, Bergami A, Furlan R, Comi G, Vescovi AL, Martino G. Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. Nature 2003; 422(6933): 688-94.

[22] Pluchino S, Zanotti L, Rossi B, Brambilla E, Ottoboni L, Salani G, Martinello M, Cattalini A, Bergami A, Furlan R, Comi G, Constantin G, Martino G. Neurosphere-derived multipotent precursors promote neuroprotection by an immunomodulatory mechanism. Nature 2005; 436(7048): 266-71.

[23] Gordon D, Pavlovsk G, Glover CP, Uney JB, Wraith D, Scolding NJ. Human mesenchymal stem cells abrogate experimental allergic encephalomyelitis after intraperitoneal injection, and with sparse CNS infiltration. Neurosci Lett 2008; 448(1): 71-3.

[24] Kassis I, Grigoriadis N, Gowda-Kurkalli B, Mizrachi-Kol R, Ben-Hur T, Slavin S, Abramsky O, Karussis D. Neuroprotection and immunomodulation with mesenchymal stem cells in chronic experimental autoimmune

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]

encephalomyelitis. Arch Neurol 2008; 65(6): 753-61.

[25] Gheisari Y, Ahmadbeigi N, Naderi M, Nassiri SM, Nadri S, Soleimani M. Stem cell-conditioned medium does not protect against kidney failure. Cell Biol Int 2011; 35(3): 209-13.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-10-12]