

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 Yousefi¹, Masoumeh Ebtekar^{2*}, Masoud Soleimani³, Seyed Mahmoud Hashemi⁴

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 administered 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

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

فروزان یوسفی^۱، معصومه ابتکار^{۲*}، مسعود سلیمانی^۳، سید محمود هاشمی^۴

۱- کارشناس ارشد، گروه ایمنولوژی، 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: ۱۴۱۷۱۳۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ایمنولوژی
 Email: ebttekarm@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۰/۱۰/۰۶

دریافت مقاله: ۹۰/۰۴/۲۱

چکیده

هدف: بررسی اثر تزریق سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از بافت چربی و محیط رویی کشت این سلول‌ها بر ارتشاح لکوسیته 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 علائم به یک رسید، به دو گروه از موش‌ها ۱۰^۶ عدد سلول بنیادی مزانشیمی جدا شده از بافت چربی موش C57BL/6 به صورت درون‌رگی و ۲×۱۰^۶ عدد سلول بنیادی مزانشیمی جدا شده از بافت چربی به درون صفاق و به یک گروه از آن‌ها ۶ نوبت محیط رویی کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی و هر نوبت یک سی‌سی به صورت درون صفاقی تزریق شد. یک گروه از موش‌ها نیز بدون هیچ تیماری به عنوان گروه کنترل باقی ماند. پس از ۶۰ روز اثر سلول‌ها و محیط رویی کشت این سلول‌ها بر ارتشاح لکوسیته مغز در چهار گروه با هم مقایسه شد.

نتایج: ارتشاح لکوسیته 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: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۴، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۰، صفحات: ۷۵-۸۸

مقدمه

است که باعث التهاب در مغز و نخاع، دمیالینه شدن پیشرونده بافت سیستم عصبی مرکزی، آسیب آکسون‌های نورونی و از دست رفتن عملکرد نورون‌های سیستم عصبی مرکزی می‌شود

ام اس (Multiple Sclerosis: MS) یک بیماری مزمن و خودایمن سیستم عصبی مرکزی (Central Nervous System)

[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 اسکروزوزی (Sclerosistic Plaques) در مغز و نخاع می‌شود [۶].

آنفالومیلیت خودایمن تجربی (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: EAE) یک مدل حیوانی جایگزین مناسب برای MS است که از نظر آسیب‌های بافت‌شناسی و علائم 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 اسکروزوزی در سیستم عصبی مرکزی تشکیل می‌شود [۷].

درمان‌های رایج برای این بیماری شامل اینترفرون بتا (Interferon Beta: IFN-β)، گلاتیرامر استات (Glatiramer

(Acetate)، میتوکساندرا (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 ۴۰ 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 چندتوانه 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

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 ۴ 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 پیست کرده و خارج شد و سپس در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. سپس لوله‌ها از انکوباتور خارج و به منظور خشتی کردن اثر کلاژناز محلول با ۴ سی‌سی محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS (Fetal Bovine Serum) رقیق و سپس سانتریفوژ انجام شد (به مدت 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 ۲۴ ساعت به کف فلاسک می‌چسبند و شروع به تکثیر می‌کنند. پس از ۴ روز کف فلاسک تقریباً از سلول سرریز می‌شود. سلول‌های MSC در این مرحله دوکی شکل و کاملاً کشیده شده و به صورت تقریباً موازی با هم قرار می‌گیرند. طی این ۴ روز یک بار محیط کشت سلول‌ها با محیط تازه تعویض شد (روز سوم) تا

(HSC) نیز تاکنون در تحقیقات مختلف برای درمان بیماری‌های خودایمن از جمله MS به کار 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 فیروبلستی 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 [۱۴-۱۶].

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، به گونه‌ای که مقدار سلول‌های MSC جدا شده از چربی نسبت به سلول‌های بنیادی جدا شده از مغز استخوان ۵۰۰ برابر تخمین 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

اوایل 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 ۴ 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 به مدت ۳ دقیقه تریپسینه شدند تا به صورت تک تک و منفرد در آیند. پس از آن فلاسک حاوی تریپسین با دو سی سی 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 سی سی 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 به مدت ۳۰ دقیقه مجاور شد. پس از ۳۰ دقیقه محلول مورد نظر سانتریفوژ و مجدداً پس از تخلیه محلول رویی لوله با ۱۰ سی سی PBS + EDTA ۱۰۰ سانتریفوژ انجام شد. سپس در هر لوله اپندورف ۱۰ لاند 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 سی سی محلول FBS ۵ درصد + PBS میکروسانتریفوژ شد (۱۰ دقیقه با ۳۲۰۰ دور در دقیقه). در مرحله بعد، محلولی متشکل از ۱۰ سی سی PBS و ۱۰ سی سی پارافرمالدهید و ۱۰ سی سی PBS + FBS تهیه کرده و ۲ سی سی از این محلول به هر کدام از اپندورف‌های تهیه شده در مرحله قبل اضافه شد. سپس آنتی‌بادی‌های مربوط به هر لوله به محتوی اپندورف‌ها افزوده

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 به مدت 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 سی سی 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 ۶ 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 سی سی محیط DMEM حاوی FBS ۱۰ 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 سی سی محیط DMEM حاوی FBS ۱۰ درصد، آسکوربیک اسید ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، بتا گلیسرول فسفات ۱۰ میلی‌مولار و ^{-۸} ۱۰^{-۸} مولار دگزامتازون بود. پس از ۲۱ روز پلیتی که محیط تمایزی چربی در آن قرار داشت با رنگ

اثر سلول‌های بنیادی در ارتشاح لوکوسیتی در مغز موش‌های EAE

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 به نام IgG2a داشتند.

شد. در مرحله آخر محتوی اپندورف به لوله‌های مخصوص فلوسیتومتری منتقل و به منظور 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

جدول ۱ شدت علائم بالینی در موش‌های C57

علائم	درجه شدت علائم
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 جزئی 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 جزئی پاهای جلویی که این فلج از طریق قدرت آویزان شدن حیوان به کمک پاهای جلویی سنجیده می‌شود	۴
فلج کامل پاهای جلویی	۴/۵
مرگ حیوان با واسطه EAE	۵

براساس روش توماس جفرسون (Thomas Jefferson) انجام گرفت (جدول ۱) [۷].

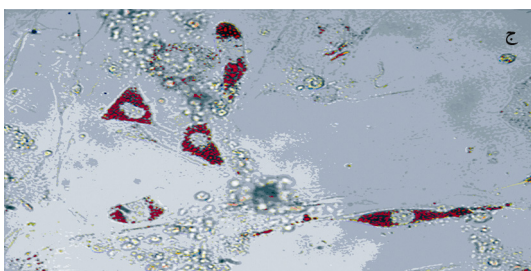
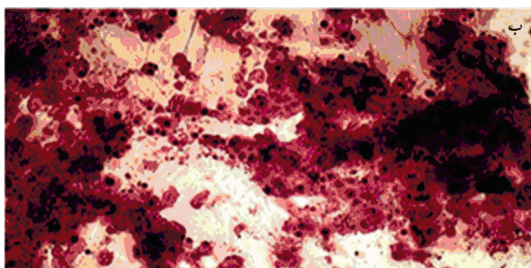
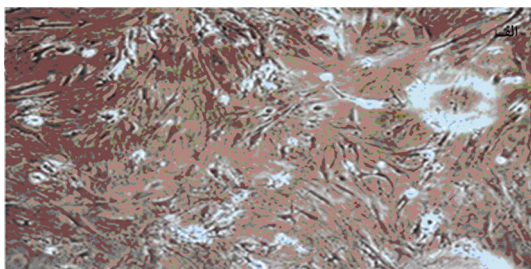
پیوند سلول MSC به موش‌های C57BL/6

۲۰ سر موش که مدل EAE در آن‌ها القا شده بود به چهار گروه ۵ تایی تقسیم شد و یک گروه ۵ تایی دیگر متشکل از موش‌های سالم به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد و در مجموع در این آزمایش ۵ گروه به ترتیب زیر وجود داشت:
۱- گروه سالم که به عنوان کنترل در نظر گرفته می‌شد، در این گروه PBS به صورت درون‌رگی تزریق شد.
۲- گروه EAE بدون هیچ تیماری
۳- گروه EAE با تزریق 10^6 سلول MSC به صورت درون‌رگی
۴- گروه EAE با تزریق 10^6 سلول MSC به صورت درون‌رگی

ایجاد مدل EAE

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

به ۳ میلی گرم پپتید MOG، ۱۵۰۰ لاندا PBS و ۱۵۰۰ لاندا ادجوانت فروند (Complement Fraud Adjuvant: CFA) اضافه شد و به هر موش ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از این سوسپانسیون به صورت 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، به صورت زیرجلدی تزریق و ۴۸ ساعت بعد همین مقدار از سم پرتوزیس یعنی معادل ۲۰۰ نانوگرم سم پرتوزیس به ازای ۱۰۰ میکرولیتر PBS به صورت زیرجلدی تزریق شد. پس از این مرحله درجه شدت علائم بالینی آسیب‌های نورونی موش امتیازبندی شد. القای مدل و امتیازبندی شدت علائم بالینی



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 صفاتی متمایز می‌شود. ب) سلول‌های MSC پس از تمایز به سلول چربی و به دنبال رنگ‌آمیزی اوایل رد O از حالت کشیده در شکل الف به صورت سلول‌هایی گرد همراه با واکنش 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 به کار 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 چسبیده که در پژوهش‌های گذشته به

۵- گروه EAE با تزریق ۶ نوبت محیط رویی کشت سلول‌های MSC در روز پانزدهم پس از ایمن شدن موش‌ها با MOG، زمانی که تقریباً درجه شدت علائم بالینی (Score) همگی موش‌ها به یک رسید، به اندازه 2×10^6 سلول MSC به صورت درون صفاقی در موش‌های گروه سوم و 10^6 سلول MSC در رگ‌های پهلویی دمی موش‌های گروه چهارم و شش نوبت محیط رویی کشت سلول‌های MSC از پاساژ دوم به موش‌های گروه پنجم به صورت 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 از مسیر درون‌رگی است [۱۹].

آزمون هیستوپاتولوژی مغز

در پایان ۶۰ 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 به منظور تثبیت بافت، در پارافرم آلدئید ۱ درصد قرار داده شد. پس از ۴ ساعت بافت‌های مغز با پارافین منجمد و در پایان با دستگاه میکروتوم (Microtome) بافت‌های مغز به اندازه ۵ میکرومتر برش داده شد به گونه‌ای 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.

نتایج زیر به‌دست آمد (جدول ۱):

جدول ۱ درصد نشانگرهای سطحی (CD) روی سلول‌های MSC

درصد در MSC	CD
۸۲	CD29
۵۳	CD73
۶۴	CD105
۰/۸۳	CD31
۰/۷	CD34
۰/۵۴	CD45
۰/۴۳	CD24
۰/۵۳	CD11b

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

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 فیروپلاست مانند خود، از سایر سلول‌ها تشخیص داده شد (شکل ۱). سلول‌های MSC پس از تمایز به سلول چربی و به دنبال رنگ‌آمیزی اوایل 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

جدول ۲ زمان‌بندی شدت علائم بالینی EAE

گروه	زمان شروع علائم	زمان حداکثر علائم	زمان تثبیت بیماری
گروه EAE بدون هیچ تیمار	روز ۱۵	روز ۳۰ تا ۴۰	روز ۴۷ تا ۶۰
گروهی که درون‌رگی سلول دریافت کردند	روز ۱۵	روز ۲۸ تا ۳۴	روز ۴۹ تا ۶۰
گروهی که درون صفاقی سلول دریافت کردند	روز ۱۵	روز ۲۴ تا ۴۰	روز ۴۶ تا ۶۰
گروهی که محیط کشت سلول‌های مزانشیمی دریافت نمود	روز ۱۵	روز ۳۴ تا ۴۰	روز ۵۱ تا ۶۰

۲۸ تا ۳۴ حداکثر شد (درجه شدت علامت بالینی = ۱/۶) و در گروهی که شش نوبت محیط کشت رویی سلول‌های MSC دریافت کرده بود، میانگین شدت علائم، بین روزهای ۳۴ تا ۴۹ حداکثر بود (درجه شدت علامت بالینی = ۱/۵). در گروه EAE تیمار شده با سلول از طریق مسیر درون‌رگی بین روزهای ۳۶ تا ۵۰ میانگین شدت علائم 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 ۴۰ تا ۶۰ و در گروه EAE که سلول‌های MSC را به‌صورت درون صفاقی دریافت کرده بود بین روزهای ۴۴ تا ۶۰ شدت علائم بالینی به حد ثابت ۱

نخستین تظاهرات بالینی EAE، ۱۵ روز پس از ایمن شدن موش‌ها با MOG آغاز شد. این علائم 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 ۴۰ میانگین شدت علائم بالینی در گروه EAE که هیچ تیماری دریافت نکرده بود، به حداکثر رسید (درجه شدت علامت بالینی: ۴). در گروهی که سلول را به‌صورت درون صفاقی دریافت کرده بود، شدت علائم بین روزهای ۲۴ تا ۴۰ حداکثر شد (درجه شدت علامت بالینی = ۱/۵)، در گروهی که به‌صورت درون‌رگی سلول MSC دریافت کرده بود، میانگین شدت علائم بین روزهای

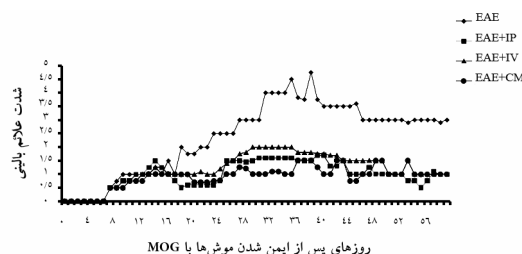
تیمار نشده، یک عدد از موش‌هایی که MSC به‌طور درون‌رگی دریافت کرده بود، ۲ عدد از موش‌هایی که MSC درون صفاقی دریافت کرده بودند و دو عدد از موش‌هایی که محیط رویی کشت MSC را دریافت کرده بودند، مردند (نمودار ۳).



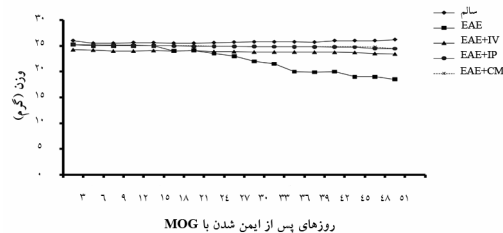
نمودار ۳ مقایسه درصد بقا در موش‌های گروه‌های مختلف از جمله گروه سالم، EAE بدون تیمار، گروه EAE که به‌صورت درون‌رگی (IV) سلول دریافت نموده، گروه EAE که به‌صورت درون صفاقی (IP) سلول دریافت نموده و گروهی که ۶ نوبت محیط رویی کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی (CM) دریافت نموده است.

در پایان ۶۰ روز میزان ارتشاح لوکوسیتی و تعداد لوکوسیت‌ها در مغز موش‌های گروه‌های مختلف شمارش شد. در پژوهش حاضر بر مبنای تجربیاتی که از پژوهش‌های دیگر به‌دست آمده بود، پس از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین سلول‌هایی به‌عنوان سلول‌های ارتشاحی شمارش شد که با هسته‌های تیره رنگ به‌صورت مجتمع کنار هم قرار گرفته بودند که اغلب این سلول‌ها نوتروفیل هستند؛ در صورتی که سایر سلول‌های تک هسته‌ای که به‌صورت پراکنده قرار دارند، رنگ هماتوکسیلین ائوزین را به خود جذب نکرده و در این شمارش قرار نگرفتند. در گروه EAE تعداد سلول‌های ارتشاحی مغز شامل ۲۰۸ سلول به ازای میانگین، ۴ برش در زمینه میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۲۰ برابر بود. در این گروه دو موش در پایان کار باقی مانده بود ($n=2$) و به ازای هر موش دو برش ۵ میکرومتری در زمینه میکروسکوپی $\times 20$ شمارش شد. در گروهی که به‌صورت درون صفاقی MSC دریافت کرده بودند، میانگین سلول‌های ارتشاحی مغز ۴۴ سلول به ازای میانگین ۶ قطعه برش از بافت مغز در سه موش ($n=3$) بود. در

رسید؛ در حالی که در گروه EAE تیمار نشده بین روزهای ۳۹ تا ۵۰ شدت علائم بالینی به حد ثابت میانگین $3/25$ رسید. در گروه EAE تیمار نشده در روزهای ۱۳ تا ۵۰ شدت علائم بالینی به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر گروه‌ها بود ($P<0/05$) در حالی که میانگین شدت علائم بالینی در گروه‌هایی که سلول و محیط رویی کشت سلول‌های MSC دریافت کرده بودند، تفاوت معنی‌داری با هم نداشت (جدول ۲ و نمودار ۱). وزن موش‌هایی که سلول MSC و یا محیط رویی کشت سلول‌های MSC دریافت کرده بودند به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه EAE تیمار نشده بهبود یافت ($P<0/05$) (نمودار ۲).



نمودار ۱ شدت علائم بالینی EAE در گروه‌های مختلف، IP=درون صفاقی، IV=درون‌رگی، CM=محیط رویی کشت سلول‌های MSC



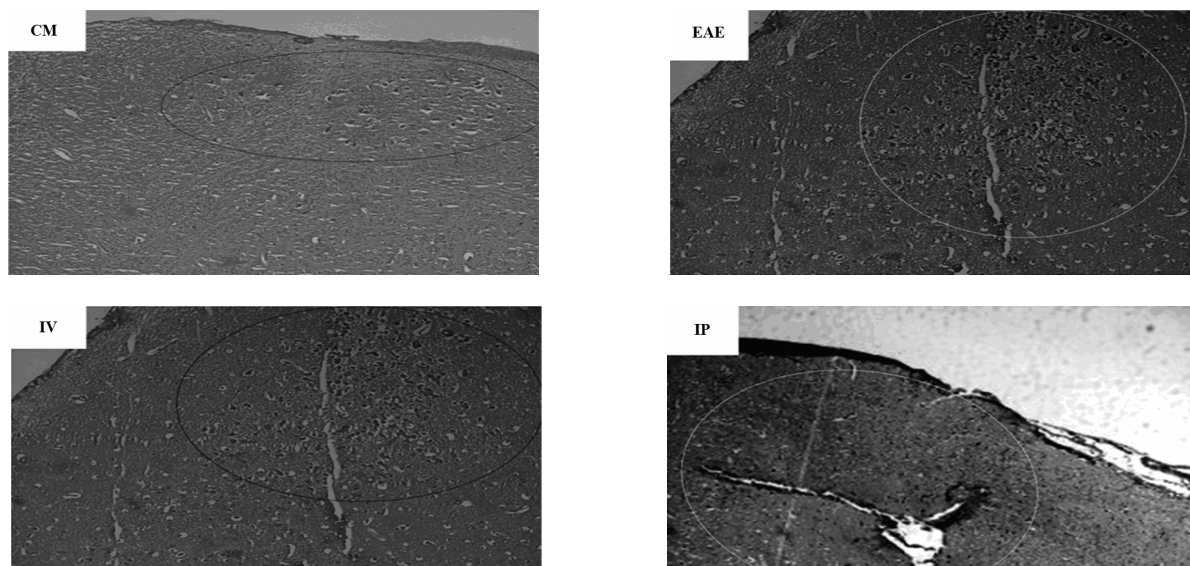
نمودار ۲ مقایسه وزن در گروه‌های سالم، EAE بدون تیمار، گروه EAE که به‌صورت درون‌رگی (IV) سلول دریافت نموده و گروه EAE که به‌صورت درون صفاقی (IP) سلول دریافت نموده و گروهی که محیط رویی کشت سلول‌های بنیادی (CM) مزانشیمی دریافت نموده است. وزن گروه EAE در مقایسه با گروه سالم و گروه‌های تیمار شده به‌طور معنی‌داری کمتر بود ($P=0/03$) در حالی که وزن موش‌ها، در گروه‌هایی که سلول یا محیط کشت دریافت 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. $P<0/05$

پس از پایان ۵۰ روز، سه عدد از موش‌های گروه EAE

اثر سلول‌های بنیادی در ارتشاح لوکوسیتی در مغز موش‌های EAE

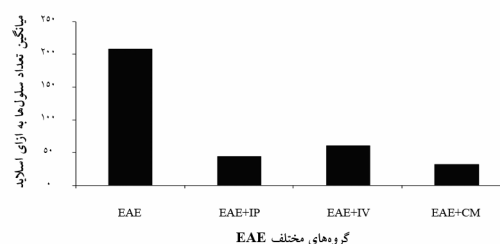
محیط رویی کشت MSC را دریافت کرده بودند، میانگین سلول‌های ارتشاحی بافت مغز در سه موش ($n=3$) به ازای میانگین ۶ برش در یک زمینه میکروسکوپ با بزرگنمایی $\times 20$ ، ۳۱ عدد بود (شکل ۲ و نمودار ۴).

گروهی که به صورت درون‌رگی MSC دریافت کرده بودند، سلول‌های ارتشاحی مغز در یک زمینه میکروسکوپ با بزرگنمایی $\times 20$ میانگین سلول‌ها، ۶۱ سلول به ازای میانگین ۶ قطعه برش در چهار موش ($n=4$) و در گروهی که ۶ نوبت



شکل ۲ میزان ارتشاح لوکوسیتی در مغز گروه‌های EAE تیمار شده و تیمار نشده به دنبال رنگ‌آمیزی همتوکسیلین-ائوزین و شمارش سلول‌های هسته‌دار و تیره رنگ که به صورت تجمعی در کنار هم قرار گرفته بودند. در گروه EAE به ازای دو موش ($n=2$) سلول‌های چهار اسلاید شمارش شد و میانگین ۲۰۸ سلول در یک زمینه میکروسکوپ با بزرگنمایی $\times 20$ در این گروه وجود داشت. در گروهی که MSC به صورت درون صفاقی (IP) دریافت کرده بود، میانگین سلول‌های ارتشاحی مغز به ازای ۶ قطعه برش در یک زمینه میکروسکوپ با بزرگنمایی $\times 20$ ، در سه موش ($n=3$) بود، در گروهی که به صورت درون‌رگی (IV) MSC دریافت کرده بود، میانگین سلول‌های ارتشاحی مغز ۶۱ سلول به ازای ۶ قطعه برش در یک زمینه میکروسکوپ با بزرگنمایی $\times 20$ در چهار موش ($n=4$) بود و در گروهی که محیط رویی کشت MSC (CM) را دریافت کرده بود، میانگین سلول‌های ارتشاحی بافت مغز در سه موش ($n=3$) به ازای ۶ برش، ۳۱ عدد بود.

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 منشأ مختلف از جمله مغز استخوان یا پیش‌سازهای نورونی برای درمان موش‌های EAE استفاده شده است و نتایج با کاهش معنی‌داری در شدت علائم 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 علائم بافت‌شناسی مغز و هم از نظر شدت علائم بیماری سنجیده شد که انطباق شدت علائم بالینی و



نمودار ۴ 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

ارتشاح لوکوسیتی در مغز و ارتباط آن با شدت بیماری مشاهده شد. نتایج ما نشان می‌دهد شدت علائم بالینی در روزهای مختلف نوسان دارد و در روزهای متوالی شدت علائم 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 علائم، سیستم ترمیمی درون‌زاد بدن از جمله سلول‌های پیش‌ساز عصبی درون‌زاد، باعث بهبود زودگذر علائم 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: TGF- β , IL-10)، باعث کاهش ارتشاح لنفوسیت‌ها و کاهش مهاجرت سلول‌ها به این ناحیه و سرکوب سیستم ایمنی هم به صورت سیستمیک و هم موضعی در مغز می‌شوند. در مطالعات پیشین نیز نقش تعدیل کنندگی ایمنی سلول‌های MSC اثبات شده بود [۲۳]، [۲۴]. در این آزمایش ۶ 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 تحمیلی را ایجاد و مانع تکثیر T خودواکنشگر می‌شود، می‌تواند در کاهش شدت علائم و ارتشاح لوکوسیتی مغز نقش داشته باشد زیرا لنفوسیت T به عنوان سلول کمک کننده برای تکثیر سایر سلول‌ها عمل می‌کند و در نتیجه مهار لنفوسیت T به واسطه سلول‌های MSC باعث بهبود شدت علائم بیماری می‌شود. در سال ۲۰۰۸ گوردون (Gordon) و همکاران سلول‌های بنیادی مزانشیمی را به صورت درون صفاقی به موش‌های C57 تزریق

نموده و مهاجرت آن‌ها را به سیستم عصبی مرکزی با استفاده از پروتئین نشاندار (Green Fluorescent Protein) GFP 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 علائم 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 علائم بیماری در گروهی که به صورت 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) رویی 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 ۶ سی‌سی محیط کشت سلول‌های MSC بر شدت علائم 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 مهارت 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 علائم 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

سلول‌ها در درون بطن‌های مغز می‌تواند برای درمان MS به‌عنوان راه‌کار جدیدتری بررسی شود.

تشکر و قدردانی

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

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 علائم بالینی با وزن موش‌ها و ارتشاح لوکوسیتی در گروه‌های مختلف شاید به این علت باشد که علائم بالینی به‌طور روزانه ثبت شد در حالی که وزن موش‌ها هر سه روز یک‌بار و ارتشاح لوکوسیتی پس از پایان ۶۰ 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

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

- 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, Hrubá A, Velebný 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 mesenchymal 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

اثر سلول‌های بنیادی در ارتشاح لوکوسیتی در مغز موش‌های EAE

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.