

Remyelination of Demyelinated Rat Spinal Cord Model by Transplanting Neural Stem Cells

Samane Adib¹, Taki Tirahi^{2*}, Taher Taheri³

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

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

3- Neurosurgeon, Shefa Neuroscience Research Center, Khatam al-Anbia Hospital, Tehran, Iran

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

Received: 05/Jun/2012, Accepted: 26/Jun/2012

Abstract

Objective: Demyelination of CNS axons occurs under pathological conditions such as multiple sclerosis and spinal cord injuries, but can be repaired by cell therapy. Within the CNS remyelination can be achieved by transplantation of neural stem cells (NSCs). NSCs are self-renewing cells that maintain the capacity to differentiate into CNS-specific cell types and can differentiate into the three main neural phenotypes: astroglia, oligodendroglia and neurons. They may also replace or repair diseased CNS tissue.

Methods: Bone marrow stromal cells (BMSCs) were aseptically isolated from the tibia and femurs of young adult Sprague Dawley rats. BMSCs were evaluated by fibronectin and CD31 markers. BMSC-derived NSCs were evaluated by nestin and NF-68. An ethidium bromide-induced demyelinated dorsal column lesion was produced in young adult rats. Transplanting NSCs derived-BMSCs into demyelinated lesions after 3 days in adult rat spinal cords was done. Three weeks after transplantation of NSCs, the spinal cords were processed to evaluate remyelination by Luxol fast blue staining.

Results: After passage 3, BMSCs were evaluated and the result, showed the percentage of immunoreactive cells to fibronectin (94.7 ± 2.65), however BMSC-derived NSCs expressed nestin (86.15 ± 0.64) and NF-68 (84.55 ± 0.94) which correlated with fibronectin down regulation. Histologically, the lesions showed slightly irregular elongated areas and had an average length of $1336.36 \pm 39.43 \mu\text{m}$. Transplanted NSCs were capable of eliciting remyelination.

Conclusion: These data support the conclusion that transplantation of NSCs results in functional remyelination of a dorsal column lesion and have valuable applications in the treatment of neurodegenerative diseases such as spinal cord injuries.

Keywords: Neural Stem Cell, Bone Marrow Stromal Cell, Demyelination

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 15, No 2, Summer 2012, Pages: 23-34

ترمیم میلین با استفاده از پیوند سلول‌های بنیادی عصبی در نخاع موش صحرائی مدل تخریب غلاف میلین

سمانه ادیب^۱، تقی طریحی^۲، طاهر طاهری^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استاد، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- جراح مغز و اعصاب، مرکز تحقیقات علوم و اعصاب شفا، بیمارستان خاتم الانبیاء، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح

Email: takialtr@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۱/۰۳/۱۶

پذیرش مقاله: ۹۱/۰۴/۰۶

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه، تمایز سلول‌های استرومایی مغز استخوان به سلول‌های بنیادی عصبی، سپس ترمیم غلاف میلین توسط این سلول‌های بنیادی عصبی است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق سلول‌های استرومایی مغز استخوان، از استخوان فمور و تیبیای موش صحرائی بالغ نژاد اسپراگو- داوولی جداسازی و پس از پاساژ سوم با استفاده از نشانگر فیبرونکتین و CD31 تحت تجزیه و تحلیل ایمونوسیتوشیمی قرار گرفتند. پس از تمایز سلول‌های استرومایی مغز استخوان به سلول‌های بنیادی عصبی هویت سلول‌ها توسط فاکتور نستین و نوروفیلانمنت ۶۸ تأیید شد. در نخاع موش صحرائی ضایعه‌ای در قطعه T13 توسط اتیدیوم بروماید ایجاد شد و پس از گذشت سه روز سلول‌های بنیادی عصبی در محل ضایعه به صورت مستقیم پیوند شدند. سه هفته بعد از پیوند، میزان ترمیم میلین در نخاع توسط رنگ‌آمیزی لوکسال فست بلو ارزیابی شد.

نتایج: سلول‌های استرومایی مغز استخوان پس از پاساژ سوم پروتئین فیبرونکتین را به میزان $2/65 \pm 94/7$ بیان کردند و پس از تمایز آن‌ها به سلول‌های بنیادی عصبی این سلول‌ها نسبت به نشانگرهای نوروفیلانمنت ۶۸ ($0/94 \pm 84/55$) و نستین ($0/64 \pm 86/15$) واکنش مثبت نشان دادند در حالی که بیان فیبرونکتین کاهش یافت. سه روز پس از تزریق اتیدیوم بروماید در نخاع موش صحرائی، برای ایجاد مدل تخریب میلین ضایعه‌ای به طول $39/43 \pm 1336/36$ میکرومتر ایجاد شد و ترمیم در میلین سه هفته پس از پیوند سلول‌های بنیادی عصبی مشهود بود.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی عصبی مشتق از سلول‌های استرومایی مغز استخوان پس از پیوند مستقیم در نخاع، قادرند تخریب میلین را در ستون خلفی ترمیم کنند؛ بنابراین این سلول‌ها در درمان بیماری‌های سیستم عصبی از قبیل ضایعات نخاعی مؤثر هستند.

کلیدواژگان: سلول‌های بنیادی عصبی، سلول‌های استرومایی مغز استخوان، تخریب میلین

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۵، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱، صفحات: ۲۳-۳۴

مقدمه

آثار مخربی دارد بنابراین در زندگی فرد مشکلات متعددی را

ایجاد می‌کند [۱]. بهبودی ضایعات سیستم عصبی همیشه مورد

توجه محققین بوده و به علت عدم بازسازی کامل سلول‌های از

ضایعات طناب نخاعی از شایع‌ترین آسیب‌های وارده به

سیستم عصبی محسوب می‌شود و از آنجایی که این ضایعات

ترمیم میلین در نخاع با استفاده از سلول‌های بنیادی عصبی

سال ۲۰۰۴ طی مطالعه‌ای که توسط سوزوکی و همکاران انجام شد آن‌ها توانستند سلول‌های استرومایی مغز استخوان را جداسازی کرده و به نوروسفر (Neurosphere) و سپس به سلول‌های بنیادی عصبی (Neural stem cell) تمایز دهند که سلول‌های بسیار مناسبی برای پیوند در ضایعات نخاعی محسوب می‌شوند [۵].

مطالعات به این نکته اشاره دارند که از سلول‌های بنیادی عصبی می‌توان برای درمان مناطق آسیب دیده در سیستم عصبی مرکزی استفاده نمود چرا که این سلول‌ها قادرند تکثیر شوند؛ همچنین می‌توانند به مناطق آسیب دیده مهاجرت نموده و به انواع سلول‌های عصبی و گلیالی تمایز یابند [۱۱]. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۶ توسط مارک (Mark) و همکاران انجام شد توسط اتیدیوم بروماید (Ethidium Bromide) ضایعه‌ای در میلین ساقه مغز نخاع موش صحرایی ایجاد و سپس به بررسی مدل تخریب میلین در ساقه مغز پرداخته شد [۱۲].

تخریب میلین از خصوصیات بارز در بیماری‌هایی مانند MS و ضایعات نخاعی است که به دنبال این ضایعه اختلالات حرکتی، حسی و حتی تنفسی در این بیماران مشکلات متعددی را ایجاد می‌کند [۱۳]. با توجه به این نکته که درمان مناسبی در این زمینه از قبیل دارو درمانی، استفاده از فاکتورهای رشد عصبی و غیره وجود ندارد [۱۴] در این تحقیق با ایجاد ضایعه نخاعی در غلاف میلین با استفاده از اتیدیوم بروماید در مدل آزمایشگاهی و ترمیم غلاف میلین با پیوند سلول‌های بنیادی عصبی مشتق از مغز استخوان به بررسی دقیق‌تر و کامل‌تر در این زمینه پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی سلول‌های استرومایی مغز استخوان

در این پژوهش از موش صحرایی بالغ نژاد اسپراگو-داولی (Sprague-Dawley) تهیه شده از مؤسسه پاستور با سن ۶ تا ۸ هفته استفاده شد. حیوانات در یک دوره روشنائی و تاریکی ۱۲ ساعته و در شرایط مطلوب و استاندارد نگهداری شدند و

دست رفته در سیستم عصبی این درمان به طور کامل انجام نمی‌شود و جایگزین کردن سلول‌ها و برقراری مجدد ارتباطات عصبی به عنوان یکی از مشکلات جدی در درمان ضایعات سیستم عصبی محسوب می‌شود [۲]. تخریب میلین در آکسون‌ها یک خصوصیت بارز در ضایعات نخاعی محسوب می‌شود و یکی از عوامل مهم و سهم در کاهش عملکرد در بسیاری از بیماری‌های سیستم عصبی مرکزی (Central Nervous System) مثل ضربه به نخاع، مولتیپل اسکلروزیس (Multiple Sclerosis: MS)، شوک و ضربه مغزی است [۳]. از جمله راه‌کارهای درمانی که برای میلین‌سازی مجدد مطرح شده عبارتست از پیوند سلول‌های پوششی بویایی [۴]، پیوند سلول‌های بنیادی جنینی [۳]، پیوند سلول‌های عصبی و گلیالی (Glial Cells) مشتق شده از سلول‌های بنیادی [۵] و نیز پیوند سلول‌های استرومایی مغز استخوان بالغ [۶].

سلول‌های بنیادی برای پیوند باید دارای خصوصیتی همچون رشد و تکثیر سریع، سهولت در دستیابی، بیان ژن‌های مربوط، قدرت زنده ماندن و سازگاری با بدن میزبان و کارایی مناسب در بافت باشند [۷].

مغز استخوان حاوی دو نوع سلول بنیادی است: (۱) سلول‌های بنیادی خونساز (Hematopoietic Stem Cells) [۸]، (۲) سلول‌های استرومایی مغز استخوان (Bone Marrow Stromal Cells: BMSCs) که یکی از انواع سلول‌های بنیادی بالغین است [۶].

سلول‌های بنیادی استرومایی استخراج شده از مغز استخوان از رده مزانشیمی بوده و سلول‌هایی چند توان هستند. تحقیقات نشان می‌دهد که این سلول‌ها قدرت تمایز به انواع رده سلولی مختلف از جمله استخوان‌ساز، چربی‌ساز، غضروف‌ساز، رشته‌های عضله مخطط، هپاتوسیت‌ها (Hepatocytes)، سلول‌های پوششی ریه و لوله گوارش را دارند [۹]. برخی از مطالعات به اهمیت سلول‌های بنیادی در درمان بیماری‌های سیستم عصبی اشاره دارد [۱۰]. همچنین در مطالعات اخیر ثابت شد که این سلول‌ها می‌توانند به بافت‌هایی با منشأ اکتودرمی از قبیل سلول‌های عصبی و گلیالی تبدیل شوند. در

تمامی قوانین کار با حیوانات آزمایشگاهی در حین کار با موش‌های صحرایی مطابق با موازین بین‌المللی اجرا شد. سپس محتوی مغز استخوان فمور (Femur) و تیبای (Tibia) موش صحرایی بالغ به روش استریل به کمک سرنگ پنج سی‌سی حاوی ۲ میلی‌لیتر از محیط DMEM/F12 (GIBCO، آمریکا)، ۱۰ درصد FBS (Fetal Bovine Serum) (GIBCO، آمریکا)، پنی‌سیلین (Penicillin) ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر و استرپتومایسین (Streptomycin) ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (GIBCO، آمریکا) توسط آسپیراسیون (Aspiration) تخلیه شد و سپس محتویات هر سرنگ به درون یک فلاسک ۲۵ سانتی‌متری تخلیه و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و میزان CO₂ ۵ درصد و شرایط رطوبت ۹۸ درصد برای مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد و پس از یک روز این محیط تعویض شد. بعد از ۳ پاساژ مکرر سلول‌های کاملاً یک‌دست در کف فلاسک باقی ماندند که آمادگی لازم را برای تبدیل به سلول‌های بنیادی عصبی داشتند.

تمایز سلول‌های استرومایی استخوان به سلول‌های بنیادی عصبی

سلول‌های استرومایی چسبیده به ته فلاسک به وسیله تریپسین (Trypsin) (۰/۲۵ درصد) (GIBCO، آمریکا) و EDTA (۰/۰۴ درصد) جدا شده و در فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربعی با غلظت ۱۰۰۰۰۰ سلول در هر سانتی‌متر مربع در محیط DMEM/F12 غنی شده با مواد زیر برای مدت یک هفته کشت داده شدند:

- B27: ۲ درصد (GIBCO، آمریکا)

- فاکتور رشد فیبروبلاست پایه (Basic Fibroblast Growth Factor: BFGF): ۲۰ نانوگرم در میلی‌لیتر (Millipore، آمریکا)

- فاکتور رشد اپی‌درمال (Epidermal Growth Factor: EGF): ۲۰ نانوگرم در میلی‌لیتر (Sigma، آمریکا)

- ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میلی‌گرم در

میلی‌لیتر استرپتومایسین

این محیط و فاکتورهای رشد ۲ بار تعویض شد و طی این هفته رشد ساختارهای شبیه نوروسفر دیده شد، سپس نوروسفرها برای ۵ روز با محیطی از FBS، DMEM/F12 ۱۰ درصد که حاوی فاکتورهای رشد اشاره شده در بالا بود، کشت داده شدند. در ابتدای تمایز نوروسفرها به صورت شناور مشاهده شدند ولی بعد از ۵ روز سلول‌های بنیادی عصبی به صورت چسبیده به کف ظرف مشاهده شدند. پس از آن سلول‌ها برای تزریق درون نخاعی آماده شدند.

بررسی ایمونوسیتوشیمی

تعدادی از سلول‌های استخراج شده از مغز استخوان و تعدادی از سلول‌های بنیادی عصبی طی مطالعه ایمونوسیتوشیمی به روش زیر بررسی شدند: سلول‌ها به توسط پارافرمالدهید ۴ درصد در دمای اتاق و برای نیم ساعت تثبیت شد و پس از تثبیت، سلول‌ها توسط PBS (Phosphate Buffered Saline) (GIBCO، آمریکا) شسته شد و توسط تریتون PBS/۱۰۰X (Invitrogen، آمریکا) نفوذپذیر و برای مدت یک ساعت با ۱۰ درصد سرم ضد بز در PBS انکوبه شدند. پس از شستشو، سلول‌ها توسط آنتی‌بادی‌های اولیه که با PBS رقیق شدند شامل ضد فیبرونکتین (Anti Fibronectin): (۱:۱۰۰)، CD31: (۱:۲۰۰)، نستین (Nestin): (۱:۱۰۰) و NF-68 (Neurofilament-68): (۱:۱۰۰) انکوبه شدند، سپس هر کدام از آنتی‌بادی‌ها روی سلول‌های یک پلیت به صورت جداگانه در طول شب در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و روی آن با پارافیلیم پوشانده شد. سپس در روز بعد با آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه به FITC (Isothiocyanide) (Fluorescein) که با PBS به میزان (۱:۵۰) رقیق شد (تمام آنتی‌بادی‌ها از Abcam آمریکا تهیه شد) به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه و سپس دوباره با PBS شستشو داده شدند و بعد توسط میکروسکوپ فلورسانس اینورت (Inverted Fluorescence Microscopy) (Olympus IX71) (ژاپن) با

ارزیابی‌های بافتی

برای این منظور طی تزریق وریدی از طریق بطن چپ قلب، به منظور تثبیت اولیه تزریق پارافرمالدهید ۴ درصد انجام شد و نخاع موش‌ها خارج شد. سپس در پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پساژ بافتی (مطابق با کار معمول آزمایشگاهی) بعد از گذشت ۲۴ ساعت از مرحله تثبیت اولیه انجام شد. سپس برش ۷ میکرومتری از ناحیه نخاع تهیه و با رنگ آمیزی لوکسال فست بلو (Luxol Fast Blue) برای ارزیابی میلین بررسی شد. برای این منظور ۳ گروه در نظر گرفته شد: گروه شاهد، گروه ضایعه دیده و گروه درمان شده با سلول‌های بنیادی عصبی (گروهی که ۷۲ ساعت بعد از ایجاد ضایعه، سلول دریافت کرده بودند).

بررسی ابعاد ضایعه

حجم نخاع در مقطع به صورت حجم استوانه محاسبه شد که این محاسبه براساس فرمول زیر بود:

حجم استوانه: مساحت قاعده $\times$ ارتفاع

مساحت قاعده: $\pi \times$ شعاع به توان ۲

حجم ضایعه براساس حجم بیضی محاسبه شد که این محاسبه براساس فرمول زیر بود:

حجم بیضی: $\frac{4}{3} \times \pi \times abc$

c: قطر بزرگ: تعداد برش‌های حاوی ضایعه $\times$ ضخامت برش‌ها (۷ میکرون)

a, b: قطر کوچک و بزرگ ضایعه در مرکز ضایعه

تجزیه و تحلیل آماری

تمام مقادیر بر حسب میانگین $\pm$ انحراف معیار (Mean $\pm$ SEM) ارائه شده است. روش آماری تجزیه و تحلیل داده‌ها واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون تکمیلی توکی (Tukey) بود. سطح معنی‌داری $P \leq 0/05$ در نظر گرفته شد.

لنز ۲۰X سلول‌ها مشاهده شدند. از محلول اتیدیوم بروماید ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به مدت یک دقیقه برای مشخص شدن هسته سلول‌ها هنگام شمارش استفاده شد.

گروه‌های مورد آزمایش

۳۰ سر موش صحرایی نر بالغ با وزن ۲۵۰-۳۰۰ گرم، نژاد اسپراگو-داولی به صورت تصادفی انتخاب و به سه گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند: (۱) گروه لامینکتومی (Laminectomy): گروه شاهد، (۲) گروه ضایعه دیده که عمل لامینکتومی در آنها انجام شد و اتیدیوم بروماید در سمت چپ ستون خلفی نخاع در قطعه T13 تزریق شد و سه روز بعد حیوانات قربانی شدند. (۳) گروه درمان شده (۱۰ سر) که در این گروه سه روز بعد از لامینکتومی و تزریق اتیدیوم بروماید، سلول‌های بنیادی عصبی به صورت مستقیم (داخل نخاعی) پیوند شدند.

تزریق اتیدیوم بروماید در نخاع

بلافاصله پس از لامینکتومی در سمت چپ ستون خلفی در یک نقطه از قطعه T13 نخاع، اتیدیوم بروماید ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در سالیان با استفاده از سرنگ همیلتون [Microliter Syringes (Hamilton)] که به دستگاه استریوتاکس (Quintessential Stereotaxic Injector) وصل شد در عمق ۰/۴ میلی‌متر و در زمان ۱ دقیقه تزریق شد.

پیوند سلول در نخاع

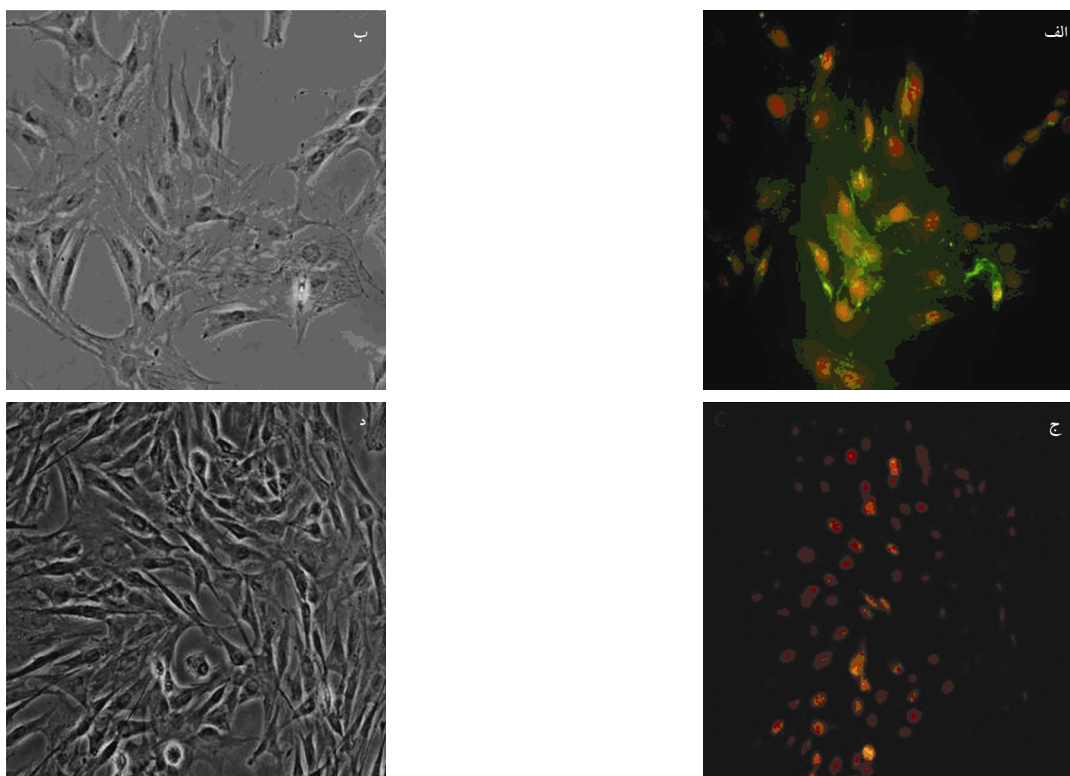
سه روز پس از تزریق اتیدیوم بروماید، 3×10^6 سلول بنیادی عصبی توسط یک سرنگ همیلتون ۵ میکرولیتری متصل به سر سوزن ۳۰ G در مدت زمان یک دقیقه در سمت چپ ستون خلفی در یک نقطه از قطعه T13 نخاع در منطقه ضایعه دیده در عمق ۰/۴ میلی‌متر با استفاده از دستگاه استریوتاکس تزریق شد.

نتایج

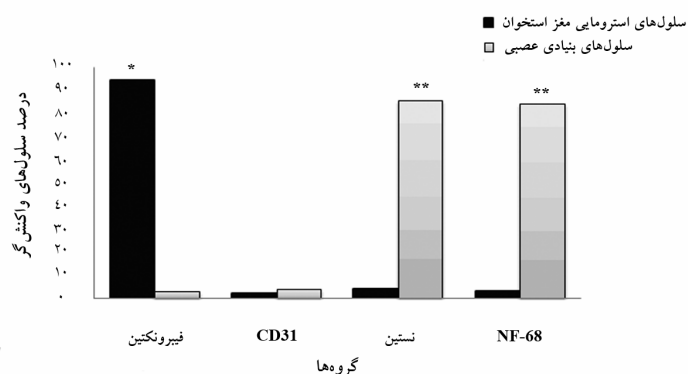
جداسازی سلول‌های استرومایی مغز استخوان

سلول‌های استرومایی مغز استخوان در محیط کشت پس از

سه پاساژ از لحاظ ریخت‌شناسی نسبتاً یکدست و یکنواخت بودند. سلول‌ها در محیط کشت اغلب به دو شکل دیده شدند؛ تعدادی از سلول‌ها ظاهری کروی و کوچک داشتند و اکثر سلول‌ها به شکل دوکی بودند (شکل ۱).



شکل ۱ ایمونوسیتوشیمی سلول‌های استرومایی مغز استخوان؛ الف) سلول‌های استرومایی استخراج شده از مغز استخوان بعد از پاساژ سوم است. رنگ سبز نشانگر واکنش مثبت نسبت به آنتی فیبرونکتین است و رنگ نارنجی هسته‌ها را به دنبال رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید نشان می‌دهد. ج) عدم واکنش مثبت نسبت به آنتی CD31 است. تصویر ب فاز کنتراست تصویر الف و تصویر د فاز کنتراست تصویر ج با همان بزرگنمایی و میدان دید است (بزرگنمایی همه تصاویر $20\times$ است).

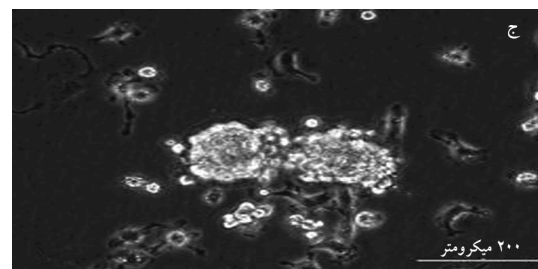
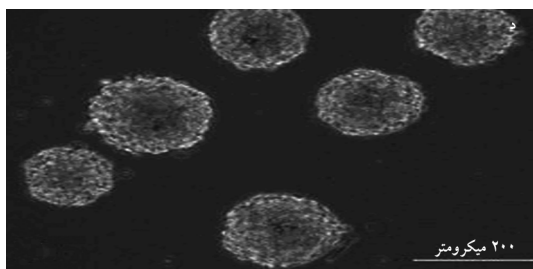
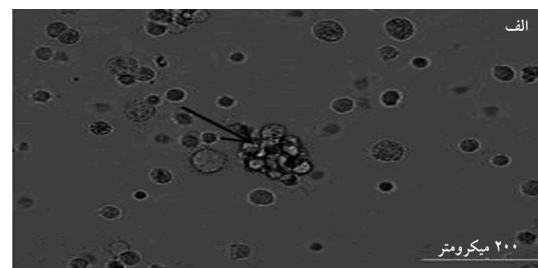
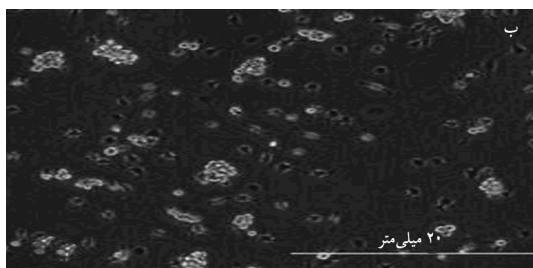


نمودار ۱ مقایسه درصد واکنش مثبت نسبت به آنتی‌بادی‌ها در سلول‌های استرومایی مغز استخوان و سلول‌های بنیادی عصبی؛ #: اختلاف معنی‌دار هر ژن در گروه مغز استخوان در مقایسه با سلول بنیادی عصبی ($P \leq 0.05$)، **: اختلاف معنی‌دار هر ژن در گروه سلول بنیادی عصبی در مقایسه با گروه مغز استخوان ($P \leq 0.05$)

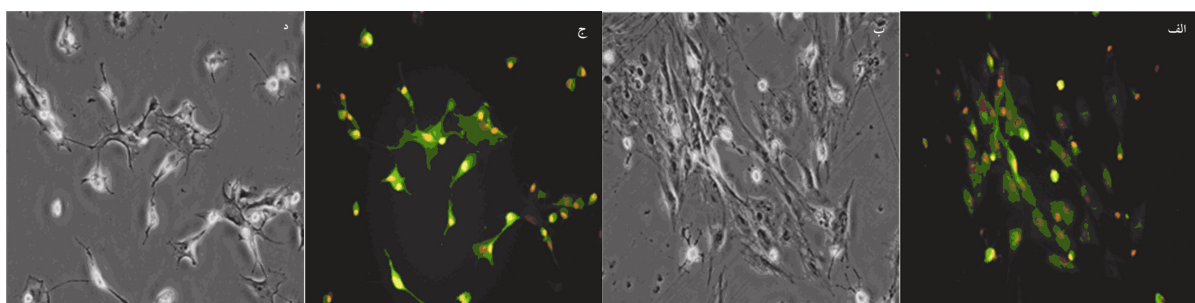
ترمیم میلین در نخاع با استفاده از سلول‌های بنیادی عصبی

فیبرونکتین، رشته‌های سبز رنگ در سیتوپلاسم سلول‌ها نشانگر وجود فیبرونکتین است (شکل ۱). در این مرحله آنتی‌بادی CD31 که خاص سلول‌های اندوتلیالی است کنترل شد که واکنش آن در سلول‌ها منفی بود (شکل ۱)، همچنین این سلول‌ها واکنشی نسبت به آنتی‌بادی نستین و NF-68 نشان ندادند (نمودار ۱).

برای اثبات استرومایی بودن سلول‌های BMSCs بعد از پاساژ سوم از آنتی‌بادی‌های CD31، فیبرونکتین، نستین، NF-68 استفاده شد. سلول‌ها در برابر آنتی‌بادی فیبرونکتین واکنش مثبت نشان دادند که درصد بیان این آنتی‌بادی $94/7 \pm 2/65$ بود. هسته سلول‌ها نیز توسط اتیدیوم بروماید قرمز رنگ شد (شکل ۱). در تصاویر مربوط به آنتی‌بادی

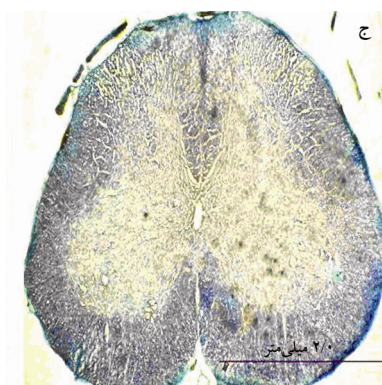
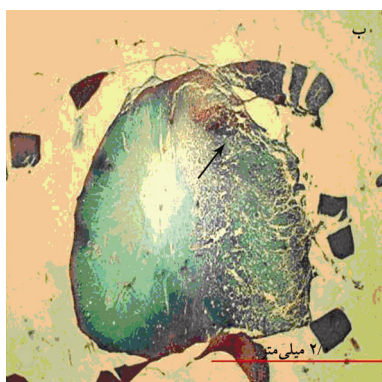
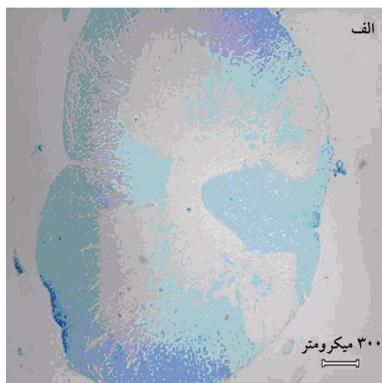


شکل ۲ روند تشکیل نوروسفر؛ الف) یک ساعت پس از قرارگیری BMSCs در محیط القایی (بزرگنمایی $20\times$)، ب) یک روز پس از قرارگیری BMSCs در محیط القایی (بزرگنمایی $20\times$)، ج) سه روز پس از قرارگیری BMSCs در محیط القایی (بزرگنمایی $4\times$)، د) شش روز پس از قرارگیری BMSCs در محیط القایی (بزرگنمایی $20\times$).



شکل ۳ ایمونوسیتوشیمی سلول‌های بنیادی عصبی؛ الف) آنتی NF-68 و ج) آنتی نستین است. رنگ سبز نشانگر واکنش مثبت به دلیل استفاده از FITC است و رنگ نارنجی هسته‌ها را به دنبال رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید نشان می‌دهد. تصویرب فاز کنتراست تصویر الف و تصویر د فاز کنتراست تصویر ج با همان بزرگنمایی و میدان دید است (بزرگنمایی همه تصاویر $20\times$ است).

نستین $0.76 \pm 86/15$ ارزیابی شد (شکل ۳). همچنین این سلول‌ها واکنشی نسبت به آنتی‌بادی فیبرونکتین و CD31 نشان ندادند (نمودار ۱).



شکل ۴ ارزیابی گروه‌های آزمایش؛ (الف) رنگ‌آمیزی لوکسال فست بلو و نوترال رد در گروه لامینکتومی، (ب) رنگ‌آمیزی لوکسال فست بلو و نوترال رد در گروه ضایعه دیده و (ج) رنگ‌آمیزی لوکسال فست بلو و نوترال رد در گروه ترمیم شده نشان می‌دهد. رنگ آبی میلین موجود در نخاع را به دلیل استفاده از رنگ لوکسال فست بلو نشان می‌دهد. رنگ قرمز به دلیل استفاده از نوترال رد هسته‌ها را در تمام تصاویر و منطقه ضایعه را در گروه ضایعه دیده نشان می‌دهد.

تمایز سلول‌های استرومائی مغز استخوان به نوروسفر

BMSCs با قرار گرفتن در محیط القایی مناسب به صورت شناور در محیط درآمدند و این سلول‌های تک تک با گذشت زمان کم کم در کنار هم قرار گرفته و با گذشت یک ساعت سلول‌ها تبدیل به کلونی‌های کوچک و نامنظمی شدند که به صورت شناور در محیط قابل مشاهده بود ولی هنوز بسیاری از سلول‌ها به صورت تک تک قرار گرفته بودند ولی تعدادی از سلول‌ها با هم متحد شده و یک کلونی را تشکیل دادند (شکل ۲). حتی یک روز پس از قرار گرفتن سلول‌ها در محیط القایی نیز هنوز تعداد زیادی از سلول‌ها به صورت تک تک مشاهده شد و تا حدودی نیز به کف پلیت چسبیده بودند (شکل ۲). پس از گذشت سه روز سلول‌ها به کلونی‌ها پیوستند همچنین احتمال پیوستن چند کلونی با هم نیز وجود داشت (شکل ۲). کلونی‌های نوروسفر بعد از شش روز به صورت کره‌های کاملاً واضح با حاشیه کاملاً منظم تشکیل شدند که به صورت معلق در محیط قرار گرفته بودند؛ همچنین تعداد سلول‌های تک تک و چسبیده به کف پلیت خیلی کم شد (شکل ۲).

میزان خلوص سلول‌های بنیادی عصبی به روش

ایمونوسیتوشیمی

سلول‌های بنیادی عصبی به صورت کشیده و دوکی شکل و دارای زواید سیتوپلاسمی به صورت چسبیده به کف پلیت دیده شدند. این سلول‌ها دارای قدرت تکثیر بودند که برای اثبات عصبی بودن سلول‌های بنیادی عصبی و تعیین خلوصشان از آنتی‌بادی‌های NF-68، نستین استفاده شد. سلول‌هایی که نسبت به آنتی‌بادی مربوط واکنش مثبت نشان دادند به دلیل استفاده از آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه به FITC سیتوپلاسمشان به رنگ سبز دیده شدند. برای تعیین درصد سلول‌های مثبت، هسته سلول‌ها توسط اتیديوم بروماید قرمز رنگ شد. درصد سلول‌های مثبت برای پروتئین NF-68 $0.94 \pm 86/55$ و درصد سلول‌های مثبت با روش ایمونوسیتوشیمی برای پروتئین

ترمیم میلین در نخاع با استفاده از سلول‌های بنیادی عصبی

که متوسط طول ضایعه 0.39 ± 1.33 میلی‌متر، متوسط حجم ضایعه ایجاد شده 0.11 ± 1.16 میلی‌متر، متوسط حجم نخاع در طول ضایعه ایجاد شده 0.23 ± 0.57 میلی‌متر و درصد حجم ضایعه در نخاع نسبت به حجم نخاع در طول ضایعه ایجاد شده 2.71 ± 23.45 درصد بود (نمودار ۲).

بحث

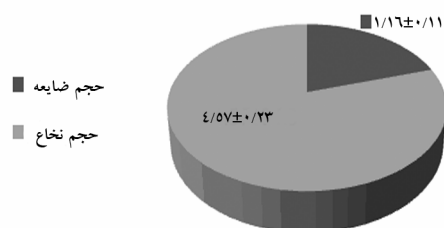
در این مطالعه با توجه به خصوصیات BMSCs که در مقدمه توضیح داده شد، این رده سلولی به سلول‌های بنیادی عصبی تحت شرایط القایی مناسب تمایز داده شد و پس از پیوند این سلول‌ها به نخاع ضایعه دیده ترمیم قابل ملاحظه‌ای ایجاد شد.

با توجه به پیشرفت‌های علمی و روش‌های نوین جراحی، ضایعه نخاعی همچنان به عنوان یک مسئله پیچیده در بالین مطرح می‌شود. سلول درمانی به عنوان یکی از راهکارهای درمانی برای ترمیم و درمان ضایعه نخاعی در سال‌های اخیر معرفی شده است. انتخاب نوع سلول و روش پیوند یکی از مهم‌ترین موضوعات مطرح در استراتژی سلول درمانی است [۶، ۱۵].

در تحقیق حاضر با استفاده از روش ایمونوسیتوشیمی هویت استرومایی سلول‌های BMSCs به اثبات رسید که این نتایج نشان داد که سلول‌های BMSCs نسبت به آنتی‌بادی‌های فیبرونکتین مثبت است ولی نسبت به آنتی‌بادی CD31 واکنش مثبتی نشان نمی‌دهند. همچنین در این مرحله این سلول‌ها واکنشی نسبت به نشانگر نستین و NF-68 نشان ندادند. در مطالعات قبلی از آنتی‌بادی‌های فیبرونکتین (به عنوان نشانگر استرومایی) [۱۶] CD31 (به عنوان نشانگر سلول‌های اندوتلیالی) [۱۷] نستین، NF-68 (به عنوان نشانگر سلول‌های عصبی نابالغ) [۱۸] استفاده شده است که نتایج به دست آمده در این مرحله با نتایج سایر محققین مطابقت دارد. این در حالی بود که پس از تبدیل سلول‌ها به سلول‌های بنیادی عصبی میزان واکنش مثبت نسبت به فیبرونکتین کاهش یافت و میزان واکنش مثبت نسبت به نشانگر

رنگ‌آمیزی لوکسال فست بلو و نوترال رد

در راستای بررسی ضایعه احتمالی در گروه اول در اثر لامینکتومی در این منطقه نخاع بررسی و سپس رنگ‌آمیزی لوکسال فست بلو و نوترال رد انجام و به خصوص ستون خلفی نخاع بررسی شد. هیچ ضایعه‌ای در نخاع به خصوص ستون خلفی و مسیر گراسیلیس (Gracilis) و مسیر کونه‌آتوس (Conatus) دیده نشد (شکل ۴ الف). در گروه دوم در ماده سفید ضایعه ایجاد شد و با استفاده از رنگ‌آمیزی لوکسال فست بلو ابعاد ضایعه بررسی شد که در شکل ۴ ب رنگ قرمز نشان دهنده ایجاد ضایعه در نقطه تزریق اتیدیوم بروماید است که به دلیل تخریب میلین لوکسال فست بلو رنگ نگرفته است و رنگ قرمز نشان دهنده نوترال رد و رنگ آبی لوکسال فست بلو را نشان می‌دهد. پس از رنگ‌آمیزی مقطع ضایعه دیده در نخاع ارزیابی شد که متوسط طول ضایعه 39.43 ± 1336.36 میکرومتر بود (نمودار ۲).



نمودار ۲ متوسط حجم ضایعه نسبت به حجم نخاع در طول ضایعه ایجاد شده (اعداد براساس میلی‌متر است)؛ رنگ تیره حجم ضایعه ایجاد شده در نخاع و رنگ روشن حجم نخاع را در مقطع ضایعه نشان می‌دهد.

سه هفته پس از پیوند سلول در گروه سوم میزان ترمیم میلین توسط رنگ‌آمیزی لوکسال فست بلو و نوترال رد بررسی شد؛ همان‌طور که در شکل ۴ ج پیداست ترمیم در ماده سفید نخاع مشهود است.

ابعاد ضایعه ایجاد شده در نخاع

پس از رنگ‌آمیزی مقطع ضایعه دیده در نخاع ارزیابی شد

نستین و NF-68 افزایش یافت که این نتایج نشان می‌دهد که احتمالاً میزان خاصیت استرومایی این سلول‌ها کم شده و این سلول‌ها به سمت رده عصبی تمایز یافته‌اند.

برای دستیابی به سلول‌های بنیادی عصبی در این مطالعه از محیط کشتی استفاده شد که فقط حاوی فاکتورهای رشد بود و فاقد هرگونه موادی بود که برای سلول سمی و کشنده محسوب می‌شوند. نتایج حاصل از ایمونوسیتوشیمی در مطالعه حاضر نشان داد که درصد قابل ملاحظه‌ای از سلول‌های BMSCs قادرند به سلول‌های بنیادی عصبی تبدیل شوند که این سلول‌ها کاربردی و مؤثر هستند. با توجه به مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۸ توسط کونین (Qin) و همکاران انجام شد، سعی بر آن شد تا برخلاف برخی از محققین که از مواد سمی و کشنده از قبیل بتامرکاپتواتانول (Bmercaptoethanol: BME)، دی متیل سولفوکساید (Dimethylsulfoxide: DMSO)، بوتیلات هیدروکسی نیزول (Butylatedhydroxyanisole: BHA) برای القای سلول‌ها به سمت رده عصبی استفاده کرده‌اند، از القا کننده‌هایی مانند فاکتورهای رشد (bFGF, EGF) و B27 استفاده کنند چرا که این مواد کمترین سمیت را برای سلول‌های در حال تمایز دارند [۱۸]. همچنین ثابت شده است که سلول‌هایی که با استفاده از القا کننده‌های دارای سمیت بالا به رده‌های عصبی یا گلیالی متمایز می‌شوند در اغلب موارد برای پیوند، مناسب و کاربردی نیستند [۱۱]. در بررسی حاضر نیز فقط از فاکتورهای رشد برای القای سلول‌ها استفاده شد، بنابراین نتایج حاصل کمترین مرگ و میر و بیشترین تمایز سلولی را نشان دادند. همچنین پس از پیوند مستقیم این سلول‌ها در نخاع ضایعه دیده بازسازی میلین و ترمیم ناحیه ضایعه دیده مشهود بود که به نظر می‌رسد این سلول در محیط درون‌بدنی (In Vivo) کاربردی باشند.

با توجه به مزیت پیوند مستقیم در مطالعه حاضر نیز از روش مستقیم استفاده شد چرا که سلول‌های بنیادی عصبی پیوند شده بعد از چند هفته از زمان پیوند قادرند غلاف میلین را در ناحیه ضایعه ترمیم کنند. نتایج به‌دست آمده در این تحقیق

مطابق با نتایج به‌دست آمده توسط دیگر محققین بود [۱۹]. محققین در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که پیوند سلول‌های بنیادی عصبی استخراج شده از سلول‌های هیپوکامپ (Hippocampus) جنین موش صحرایی تراریخت (Transgenic) با روش داخل بطنی، بعد از گذشت ۴ ماه از پیوند به رده آستروسیتی (Astrocyte) و بعد گذشت ۸ ماه به رده اولیگودندروسیت (Oligodendrocyte) متمایز می‌شوند و در نهایت منجر به ترمیم اطراف ناحیه ضایعه در مدل‌های ضایعه نخاعی می‌شوند [۲۰]. کوماگای (Kumagai) و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که پیوند سلول‌های بنیادی عصبی با روش مستقیم (داخل نخاعی) پس از گذشت چند هفته موجب ترمیم غلاف میلین می‌شود [۲۱].

در مطالعه حاضر با توجه به نژاد موش‌های صحرایی و وزن آن‌ها و ابعاد نخاع و هدف از ایجاد ضایعه که فقط تخریب ماده سفید نخاع و عدم تخریب ماده خاکستری بود، تزریق اتیدیوم بروماید تنها در عمق ۰/۴ میلی‌متری با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در قطعه T13 انجام شد. نتایج به‌دست آمده از مطالعات بافتی در این تحقیق نشان داد که بعد از ۳ روز از زمان تزریق، تخریب در غلاف میلین به طور متوسط ضایعه‌ای به طول یک میلی‌متر ایجاد می‌کند که پس از پیوند سلول ترمیم قابل ملاحظه‌ای ایجاد شد. در حالی که لانکفورد (Lankford) و همکارانش در سال ۲۰۰۲ در مطالعه‌ای نشان دادند که با تزریق اتیدیوم بروماید با غلظت ۰/۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در ۳ نقطه از قطعه T13 و در عمق ۰/۴ و ۰/۷ میلی‌متری می‌توان تخریبی در حدود ۶ میلی‌متر در غلاف میلین در ستون خلفی نخاع را پس از سه روز مشاهده نمود [۱۹]. این محققین نشان دادند که پیوند سلول‌های شوآن (Schwann Cells) و آستروسیت سه روز پس از تخریب غلاف میلین، می‌تواند به طور نسبی منطقه ضایعه را پس از سه هفته ترمیم نماید [۱۹]. با توجه به نتایج مطالعات قبلی میزان ترمیم حاصل پس از پیوند سلولی در مطالعه حاضر بهتر بود.

در این مطالعه با روش رنگ‌آمیزی لوکسال فست بلو وسعت

ترمیم میلین در نخاع با استفاده از سلول‌های بنیادی عصبی

اثر القا کننده‌های مناسب در محیط کشت قادرند به میزان قابل ملاحظه‌ای به سلول‌های بنیادی عصبی تمایز یابند و ضایعه تخریب میلین در نخاع را که توسط اتیدیوم بروماید ایجاد شد، ترمیم نمایند.

تشکر و قدردانی

از مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا در بیمارستان خاتم الانبیاء که امکان انجام این تحقیق را فراهم نمودند قدردانی و تشکر می‌نماییم.

ضایعه در منطقه تزریق و نواحی بالاتر و پایین‌تر از مکان تزریق بررسی شد. محققین نیز برای تشخیص وسعت ضایعه و تخریب در غلاف میلین به ویژه در بیماری MS از رنگ‌آمیزی لوکسال فست بلو استفاده کردند چرا که با استفاده از این رنگ‌آمیزی به خوبی غلاف میلین در نخاع قابل مشاهده است [۲۲].

در این مطالعه مشاهده شد که پس از گذشت سه هفته روند تشکیل میلین در آکسون‌ها انجام می‌شود. لانکفورد و همکارانش نیز نشان دادند که طی ۳ هفته بعد از پیوند سلولی ترمیم میلین در منطقه مشاهده می‌شود [۱۹].
نتایج به‌دست آمده نشان داد که سلول‌های BMSCs تحت

منابع

- [1] Bracken MB. Steroids for acute spinal cord injury. Cochrane Database Syst Rev 2002; (3): CD001046.
- [2] Lim PA, Tow AM. Recovery and regeneration after spinal cord injury: a review and summary of recent literature. Ann Acad Med Singapore 2007; 36(1): 49-57.
- [3] Keirstead HS, Nistor G, Bernal G, Totoiu M, Cloutier F, Sharp K, Steward O. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. J Neurosci 2005; 25(19): 4694-705.
- [4] Lakatos A, Smith PM, Barnett SC, Franklin RJ. Meningeal cells enhance limited CNS remyelination by transplanted olfactory ensheathing cells. Brain 2002; 126(Pt 3): 598-609.
- [5] Suzuki H, Taguchi T, Tanaka H, Kataoka H, Li Z, Muramatsu K, Gondo T, Kawai S. Neurospheres induced from bone marrow stromal cells are multipotent for differentiation into neuron, astrocyte, and oligodendrocyte phenotypes. Biochem Biophys Res Commun 2004; 322(3): 918-22.
- [6] Sasaki M, Honmou O, Akiyama Y, Uede T, Hashi K, Kocsis JD. Transplantation of an acutely isolated bone marrow fraction repairs demyelinated adult rat spinal cord axons. Glia 2001; 35(1): 26-34.
- [7] Brochner CB, Johansen JS, Larsen LA, Bak M, Mikkelsen HB, Byskov AG, Andersen CY, Møllgaard K. YKL-40 is differentially expressed in human embryonic stem cells and in cell progeny of the three germ layers. J Histochem Cytochem 2012; 60(3): 188-204.
- [8] Fujita Y, Inokuma D, Abe R, Sasaki M, Nakamura H, Shimizu T, Shimizu H. Conversion from human haematopoietic stem cells to keratinocytes requires keratinocyte secretory factors. Clin Exp Dermatol 2012. [Epub ahead of print]
- [9] Akiyama Y, Radtke C, Kocsis JD. Remyelination of the rat spinal cord by transplantation of identified bone marrow stromal cells. J Neurosci 2002; 22(15): 6623-30.
- [10] Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells for the

- treatment of neurological disorders. *Nature* 2006; 441(7097): 1094-6.
- [11] Mothe AJ, Tator CH. Transplanted neural stem/progenitor cells generate myelinating oligodendrocytes and Schwann cells in spinal cord demyelination and dysmyelination. *Exp Neurol* 2008; 213(1): 176-90.
- [12] Kotter MR, Li WW, Zhao C, Franklin RJ. Myelin impairs CNS remyelination by inhibiting oligodendrocyte precursor cell differentiation. *J Neurosci* 2006; 26(1): 328-32.
- [13] Burrell AM, Handel AE, Ramagopalan SV, Ebers GC, Morahan JM. Epigenetic mechanisms in multiple sclerosis and the major histocompatibility complex (MHC). *Discov Med* 2011; 11(58): 187-96.
- [14] Vermersch P, Benrabah R, Schmidt N, Zéphir H, Clavelou P, Vongsouthi C, Dubreuil P, Moussy A, Hermine O. Masitinib treatment in patients with progressive multiple sclerosis: a randomized pilot study. *BMC Neurol* 2012; 12(1): 36.
- [15] Ide C, Kitada M, Chakraborty S, Taketomi M, Matsumoto N, Kikukawa S, Mizoguchi A, Kawaguchi S, Endoh K, Suzuki Y. Grafting of choroid plexus ependymal cells promotes the growth of regenerating axons in the dorsal funiculus of rat spinal cord: a preliminary report. *Exp Neurol* 2001; 167(2): 242-51.
- [16] Wehner R, Taubert C, Mende T, Gaebler C, de Andrade AV, Bornhäuser M, Werner C, Tonn T, Schäkel K, Bachmann M, Schmitz M. Engineered extracellular matrix components do not alter the immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells in vitro. *J Tissue Eng Regen Med* 2012. [Epub ahead of print]
- [17] Izadpanah R, Joswig T, Tsien F, Dufour J, Kirijan JC, Bunnell BA. Characterization of multipotent mesenchymal stem cells from the bone marrow of rhesus macaques. *Stem Cells Dev* 2005; 14(4): 440-51.
- [18] Yang Q, Mu J, Li Q, Li A, Zeng Z, Yang J, Zhang X, Tang J, Xie P. A simple and efficient method for deriving neurospheres from bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 372(4): 520-4.
- [19] Lankford KL, Imaizumi T, Honmou O, Kocsis JD. A quantitative morphometric analysis of rat spinal cord remyelination following transplantation of allogenic Schwann cells. *J Comp Neurol* 2002; 443(3): 259-74.
- [20] Wu S, Suzuki Y, Noda T, Bai H, Kitada M, Kataoka K, Nishimura Y, Ide C. Immunohistochemical and electron microscopic study of invasion and differentiation in spinal cord lesion of neural stem cells grafted through cerebrospinal fluid in rat. *J Neurosci Res* 2002; 69(6): 940-5.
- [21] Kumagai G, Okada Y, Yamane J, Nagoshi N, Kitamura K, Mukaino M, Tsuji O, Fujiyoshi K, Katoh H, Okada S, Shibata S, Matsuzaki Y, Toh S, Toyama, Nakamura M, Okano H. Roles of ES cell-derived gliogenic neural stem/progenitor cells in functional recovery after spinal cord injury. *PLoS One* 2009; 4(11): e7706.
- [22] Steinbrecher A, Weber T, Neuberger T, Mueller AM, Pedré X, Giegerich G, Bogdahn U, Jakob P, Haase A, Faber C. Experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat spinal cord: lesion detection with high-resolution MR microscopy at 17.6 T. *AJNR Am J Neuroradiol* 2005; 26(1): 19-25.