Transplantation of bone marrow stem cell-derived neuroprogenitor into demyelinated rat corpus callosum

M. Nazm Bojnordi[1], Z Bagheri-Hosseinabadi[2], N Rezaie [1], E. Akbari [3].
1. Department of Anatomy & Cell Biology, Immunogenetics Research Center, Faculty of Medicine,Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran,Tel:011-33543080 (2429), E-mail: bojnordi@modares.ac.ir
2. Department of clinical Biochemistry, School of medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran.
3.Department of Physiology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari , Iran

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 14:54 +0430 on Monday May 6th 2019

ABSTRACT

Background and Aim: Bone marrow stem cells (BMSCs) are recognized as appropriate source for cell therapy in neurodegenerative disorders. In this exprimental study, neuroprogenitor cells (NPC)-derived from BMSCs were transplanted into an animal demyelination model.

Material and Methods: BMSCs were isolated from femur bones of the rats and cultured in DMEM medium containing FBS. BMSCs were differentiated into NPC by inducers such as; RA, bFGF and EGF. Specific neuroprogenitor markers, e.g.:Nestin and NF68 were detected by using immunocytochemistry technique. Demyelination model was induced via injection of gliotoxin lysolecithin (LPC) into the corpus callosum. After one week, Dil labled NPCs were transplanted into the rat brains. The extention of demyelination and cell homing were measured 2 weeks later by histological and immunohistochemical staining.

Result: BMSCs were appeared with neurologic morphology and differentiation of the cells into NPC after exposure to neural inducers was confirmed by immunocytochemistry staining. Histological and immunohistochemical evaluation showed significant decrease in demyelination in the experimental group.

Conclotion: The results of this study demonstrated that transplantation of NPC-derived BMSCs led to significant remyelination in demylinted corpous callosum.

Keywords: Bone marrow stem cells, Demyelination model, Neuroprogenitor cells, Inducer, Transplantation

Received: Apr 3, 2018 **Accepted:** July 11, 2018

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و سوم / مهر و آبان ۱۳۹۷/۴۵-۳۵

بررسی پیوند سلول های پیش ساز عصبی مشتق از سلولهای بنیادی مغز استخوان به کورپوس کالوزوم دمیلینه شده بر بهبود میلین سازی در موش صحرایی

مریم نظم بجنوردی [۱] زهرا باقری حسین آبادی [۲]، نورالله رضایی [۱]، اسماعیل اکبری [۳]

۱. گروه آناتومی و بیولوژی سلولی، مرکز تحقیقات ایمنوژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران ، تلفن ثابت: ۳۳۵۴۳۰۸۰-۰۱۱داخلی ۲۴۲۹، Email:bojnordi@modares.ac.ir

۲. گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان،ایران

۳.گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی مازندردان، ساری، ایران

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 14:54 +0430 on Monday May 6th 2019

چکیده

زمینه و هدف: سلول های بنیادی مغز استخوان به عنوان منبع مناسبی برای سلول درمانی و ترمیم بیماریهای نورودژنراتیو هستند. در این مطالعه تجربی سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش به سلول‌های پیش ساز عصبی تمایز یافته و بهبود میلین سازی پس از پیوند آنها به موش صحرایی مدل دمیلینیشن ارزیابی شد.

روش بررسی: سلول های بنیادی مزانشیمی با روش فلاشینگ از مغز استخوان فمور رت استخراج شدند. سلول های بنیادی مزانشیمی در محیط کشت DMEM حاوی FBS کشت داده شدند. جهت القا پری کاسور شبه عصبی از القاگرهای رتینوئیک اسید و EGF وbFGF استفاده شد. مارکرهای سلول های پیش ساز عصبی یعنی NF68، Nestin با روش ایمونوسیتوشیمی پس از مرحله تمایز بررسی شدند. درمرحله in vivo به منظور القا مدل دمیلینیشن گلیوتوکسین لیزولیسیتین به کورپوس کالوزوم توسط تزریق استریوتاکسیک انجام شد. یک هفته بعد پیوند سلول‌های پیش ساز عصبی نشاندارشده با DiI به صورت درجا به موش انجام شد. ارزیابی تغییرات وسعت دمیلینیشن وجایگزینی سلول‌های پیوندی توسط بررسی‌های هیستولوژی وایمونوهیستوشیمی حدودا ۲هفته پس از پیوند سلول انجام شد.

یافته‌ها: تغییرات مورفولوژیکی عصبی در گروه‌های تیمار قابل مشاهده بودند. بیان مارکرهای خاص عصبی NF68 ، Nestin با روش ایمونوسیتوشیمی تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان درپایان مرحله القا تایید کرد. یافته‌های هیستولوژی و ایمونوهیستوشیمی نشان دهنده کاهش معنادار وسعت دمیلیناسیون در گروه پیوند سلول نسبت به گروه کنترل بود.

نتیجه گیری: سلول‌های بنیادی مغز استخوان قابلیت تمایز عصبی درشرایط کشت را با استفاده از القاگرهای عصبی دارند و باعث بهبود میلین سازی پس از پیوند به موش صحرایی مدل دمیلینیشن می شود.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی مغز استخوان ، دمیلینیشن، نوروپروژنیتور، میلین سازی.

وصول مقاله:۹۷/۱/۱۴ اصلاحیه نهایی:۹۷/۳/۲۰ پذیرش:۹۷/۴/۲۰

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 14:54 +0430 on Monday May 6th 2019

مقدمه

تخریب غلاف میلین الیاف عصبی در سیستم اعصاب مرکزی منجر به بروز مشکلات نورولوژیکی متعددی نظیر نقایص حسی وحرکتی و ناتوانی های گسترده ای می شوند بنابراین ترمیم میلین یکی از اهداف استراتژی های درمانی در طب ترمیمی می باشد. امروزه مدل های آزمایشگاهی و ایجاد سلول درمانی اختصاصی برای درمان ضایعات مختلف ازجمله ضایعات نورودژنراتیو در حال شکل گیری است(۳-۱). امروزه استفاده از سلول های بنیادی به عنوان یک منبع میلین ساز در بیماری های تخریبی میلین رویکرد مناسبی جهت ارتقا ترمیم میلین است و در کانون توجه قرار گرفته است(۴).منابع سلول های بنیادی باید به اسانی به دست آمده وهمچنین بتوانند تحت القا سلول های پروژنیتور میلین ساز را ایجاد کرده که پس از پیوند سبب بهبودی و میلین سازی مجدد شوند(۷-۵).ترمیم نواحی دمیلینه شده با استفاده از سلول های میلین ساز پیوندی یا برونزاد توسط ایجاد مدل های دارای ضایعه دمیلینیشن و پیوند سلول های مختلف مانندالیگودندروسیتها یا پیش سازهایشان، محقق می باشد(۱۰-۸).ازسوی دیگر به منظور بررسی ترمیم و بازسازی میلین در فیبرهای عصبی آسیب دیده از مدل های حیوانی مختلفی استفاده می شود(۱۱). یکی از این مدلها توسط تزریق مستقیم گلیوتوکسین به ماده سفید به منظور از بین بردن الیگودندروسیت ایجاد می شوند(۱۴-۱۲).در واقع یکی از متداول ترین مدل ها جهت بررسی ظرفیت ترمیمی مغز در دمیلیناسیون مدلهای توکسینی است. گلیوتوکسین هایی مانند لیزولسیتین سبب از بین بردن گلیاهای میلین ساز و ایجاد فقدان میلین در ماده سفید می شوند. یکی از مزایای این روش ایجاد یک ناحیه با محدوده مشخص می باشد(۱۶و۱۵).

علاوه بر این تولید سلول های گلیالی مرحله کلیدی در سلول درمانی بیماری های دمیلینیشن اعصاب است. منابع سلولی متنوعی به منظور ارتقا ترمیم میلین در این میان معرفی شده اند از بین منابع مختلف سلولی که به منظور ترمیم میلین در مدل های دمیلیناسیون استفاده می شود می توان به سلول های بنیادی مغز استخوان اشاره کرد. در واقع سلول های بنیادی مغز استخوان می‌توانند به عنوان منبع کافی ومناسبی برای سلول درمانی و ترمیم بیماری ها از جمله بیماری های نورودژنراتیو مانند دمیلینیشن اعصاب باشند. باتوجه به ویژگی های چند توانی که دارند می توانند به عنوان منبع کافی ومناسبی برای ترمیم بیماریهای نورودژنراتیو باشند(۱۸و۱۷).

سلول های بنیادی مغز استخوان متعلق به سلول‌های بنیادی بالغ بوده و دارای قابلیت تمایز به انواع مختلفی از بافتهای مزانشیمی مانند تاندون، غضروف، استخوان، چربی، عضله و همچنین سلول‌هایی با منشاء غیر مزودرمی مانند نورون، ونوروگلیا می‌باشند (۲۱-۱۹). خاصیت مولتی پوتنسی سلول های بنیادی مغز استخوان و قابلیت تمایز آنها به سلول های مختلف از جمله الیگودندروسیت ، کار برد این سلول ها را جهت استفاده ترمیمی و بازسازی میلین در فیبرهای عصبی آسیب دیده پیشنهاد می‌دهد بنابراین استفاده ازآنها جهت درمان بیماری ها وضایعات سیستم عصبی مانند تخریب میلین و بازسازی مجدد آن امری انکار ناپذیر است و تحقیقات در این زمینه در حال گسترش می باشد.

در خصوص تمایز سلول های بنیادی مغز استخوان به سلول های میلین ساز تاکنون تحقیقات مختلفی صورت گرفته است. به طور مثال بعضی محققین توانسته اند تا حدودی روند تمایز سلول های میلین ساز نظیر الیگودندروسیت وشوان از سلول های بنیادی مغز استخوان را با استفاده از القاگرهای مختلف در شرایط محیط کشت پیاده کنندبه طوریکه سلول های بنیادی مغز استخوان در حضور فاکتورهای رشدی و القاگرهای مختلفی نظیرbFGF , EGF, PDGF, RA bFGF , به رده های نورونی

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 14:54 +0430 on Monday May 6th 2019

وگلیالی تمایز می یابند. بعضی مطالعات توانایی تمایز سلول های بنیادی مغز استخوان را به سلولهای میلین ساز نظیر الیگودندروسیت و توانایی بازسازی میلین توسط آنها را تایید کردند(۲۴-۲۲).

با توجه به وجود مطالعات محدود در زمینه تمایز سلول های بنیادی مغز استخوان به سلولهای پیش ساز عصبی در شرایط محیط کشت و همچنین پیوند این سلول ها به نواحی دمیلینه شده مغزی و توانایی این سلولها در ترمیم میلین لذا هدف از این مطالعه تجربی, تمایز سلول های بنیادی سلول های بنیادی مغز استخوان موش به سلول های پیش ساز عصبی و پیوند به موش صحرایی مدل دمیلینیشن به منظورارزیابی قدرت عملکرد آنها بررسی می شود.

روش بررسی

دراین تحقیق سلول های بنیادی مغز استخوان با روش فلاشینگ از مغز استخوان فمور ۴۰راس موش صحرایی استخراج شدند. پس از جداسازی سلول های بنیادی مغز استخوان این سلول ها در محیط حاوی DMEM ، FBS ۱۵ درصد، اسید های آمینه غیر ضروری ۱درصد ، و پنی سیلین/ استرپتومایسین درصد کشت اولیه داده شدند. پس از اینکه سلول ها ی مذکور کف پلیت را پرنمودند، پلیت ها با PBS شستشو داده شده و با استفاده از Trypsin-EDTA سلول ها مجزا گشته و در نهایت با سانتریفوژ و دورریختن سوپ رویی، سلولها ی حاصله به فلاسک های کشت منتقل شدند(۲۰).

- کشت سلول‌های بنیادی مغز استخوان :

کشت سلول‌های بنیادی مغز استخوان در محیط کشت DMEM با ترکیب ذکر شده فوق بوده که پس از بررسی سلول‌ها در زیر میکروسکوپ، درصورت نیاز تعویض محیط کشت انجام شد(۱۹).

- تمایز سلول های بنیادی مغز استخوان به سلول های پیش ساز عصبی:

جهت تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان به سلول‌های پیش ساز عصبی از یک پروتکل تمایزی استفاده شد. سلول‌های بنیادی مغز استخوان در حضور رتینوئیک اسید و سپس در محیط نوروبازال حاوی PDGF 10 ng/ml, EGF 10 ng/ml، bFGF 20ng/ml به مدت ۸-۱۲ روز کشت داده شد(۲۰و۱۹).

- بررسی ایمونوسایتوشیمی تمایز به سلول‌های پیش ساز عصبی:

پس از پایان مرحله تمایز، قابلیت بیان مارکرهای پیش ساز عصبی، NF68 و Nestin با روش ایمونوسیتوشیمی بررسی شد.

- روش کار ایمونوسیتوشیمی:

سلول ها در PBS سه مرتبه و هر بار ۵ دقیقه شستشو و در PFA ۴ ٪ در دمای اتاق فیکس شدند. پس از شستشو با محلول PBS / Tween درمحلول مهار کننده سرم ۱۰ ٪ به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند. سپس به مدت یک شب در دمای ۴ º C توسط آنتی بادی‌های اولیه شامل: آنتی بادی پلی کلونال ضد Nestin و NF68 به رقت ۵۰۰/۱ اینکوبه شده و پس از شستشو آنتی بادی ثانویه شامل آنتی بادی ثانویه کونژوگه با (FICT) ، (Goat anti Rabbit IgGبه رقت ۱/ ۱۰۰۰ و نهایتا جهت رنگ آمیزی هسته‌ها از DAPI استفاده شد.

ارزیابی درصد زنده بودن:

ابتدا سلولها با افزودن تریپسین- EDTA و پیپتاژ، سلول های منفردی تهیه گردید. برای انجام این بررسی یک حجم سوسپانسیون سلولی و یک حجم مساوی از رنگ تریپان بلو مخلوط و شمارش سلولی با استفاده از لام نیوبار در زیر میکروسکوپ اینورت انجام شد.

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 14:54 +0430 on Monday May 6th 2019

- القا دمیلیناسیون توسط لیزولسیتین:

در این بخش از ۱۵ راس موش صحرایی ماده نژاد Sprague-Dawley با وزن ۲۰۰-۱۸۰ گرم استفاده شد. تزریق توسط سوزن متصل به سرنگ هامیلتون که حاوی ۲ میکرولیتر محلول لیزولسیتین (LPC) ۱٪ (تهیه شده از شرکت سیگما) حل شده در نرمال سالین بود انجام شد.

پس از ۱ هفته بررسی‌های بافتی به منظورتایید دمیلیناسیون انجام شد. سکشنهای بافتی توسط رنگ امیزی لوگزول فست بلو رنگ شد. جهت کمی کردن وسعت دمیلیناسیون و شدت رمیلیناسیون از نرم افزار ImagJ استفاده شد. مجموعا در این بخش سه گروه در نظر گرفته شد. گروه اول یا کنترل (Control), که فقط لیزولیسیتین دریافت کردند. گروه دوم یا (vehicle), که یک هفته پس از دریافت لیزولیسیتین, مدیوم بدون سلول دریافت کردند. گروه سوم یا تجربی (Experimental) , که یک هفته پس از دریافت لیزولیسیتین, سلول به همراه مدیوم دریافت کردند. در هر گروه از تعداد ۵ راس موش صحرایی استفاده شد.

مطالعات بافت شناسی:

رنگ آمیزی دوگانه اختصاصی میلین توسط لوگزول فست بلو (LFB) و سافرانین:

لام‌های تهیه شده از نمونه‌ها به این روش و بر اساس پروتوکل لوگزول فست بلو رنگ آمیزی شدند. جهت کمی کردن وسعت دمیلیناسیون از نرم افزار ImageJ استفاده شد.

- پیوند سلولها به موش مدل دمیلینیشن:

پس از یک هفته از ایجاد مدل دمیلینیشن سلولها ی نشاندارشده به موش پیوند گردید.

- بررسی تغییرات بافتی پس ازانجام پیوند سلول:

بررسی های بافتی به منظور بررسی تغییرات دمیلیناسیون پس از ۲ و۴ هفته از انجام پیوند سلول انجام شد.

- بررسی ایمونوهیستوشیمی

- تعیین تمایز سلول‌های نشان دار شده به سلول‌های میلین ساز:

جهت بررسی تمایز سلول های جایگزین شده در بخش آسیب دیده مغز از تکنیک ایمنوفلورسنت استفاده شد.

- تجزیه و تحلیل آماری:

اطلاعات به دست آمده با روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون TUKEY مورد مقایسه قرار گرفت.کلیه ازمایشات سه بار تکرار شد. سطح معنی‌داری ($p \leq ۰/۰۵$) در نظر گرفته شد.

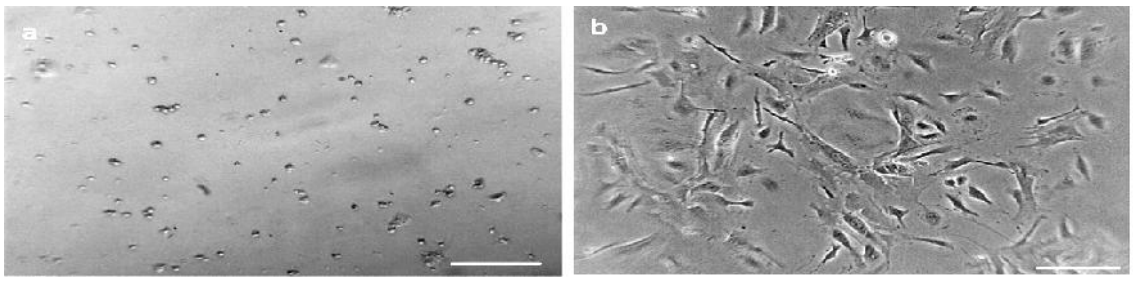
یافته ها

یافته های in vitro:

مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان

در مطالعه حاضر مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان ، ارزیابی و مورد تایید قرار گرفته شد شکل ۱.

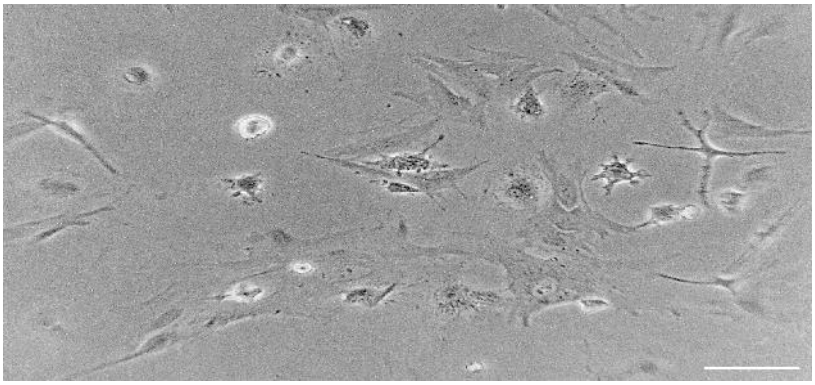
شکل a:۱ مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان استخراج شده را در محیط کشت پس از ۴ ساعت نشان می دهد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان دارای قدرت تکثیری وچسبندگی فراوان با ظاهر دوکی شکل و فیبروبلاستیک بودند. (شکل b:۱).



شکل۱- تصویر میکروسکوپ معکوس از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان a مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان را پس از چهار ساعت کشت نشان می دهد. b: ظاهر دوکی شکل و فیبروبلاستیک سلولها پس از پاساژ چهارم. Scale bar = ۱۰۰ µm

- تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلولهای پیش ساز عصبی

اسید رتینوئیک باعث القا سلول‌هایی با فنوتیپ سلولهای پیش ساز عصبی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی شد. این سلول‌ها از حالت دوکی خارج شده و دارای زواید منشعب و استطاله‌های سلولی شدند (شکل۲).



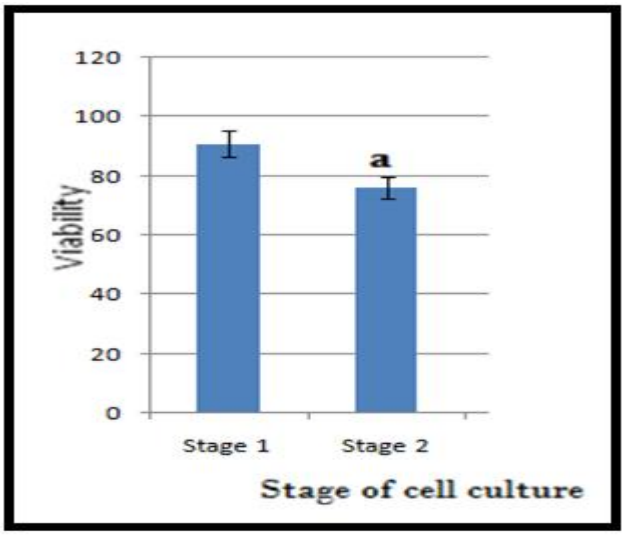
شکل ۲- فنوتیپ سلولهای پیش ساز عصبی پس از پایان مرحله القا

Scale bar =۱۰۰µm

میزان حیات سلول‌ها با تریپان بلو بر اساس میزان حیات درصد سلول‌های بنیادی مزانشیمی زنده بیش از ۸۰ درصد بود که به صورت معنی‌داری بیشتر از سلولهای تیمار شده بود (نمودار۱).

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 14:54 +0430 on Monday May 6th 2019

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 14:54 +0430 on Monday May 6th 2019



نمودار ۱- نمودار مقایسه میانگین درصد سلول‌های زنده به کل سلولها در سلول‌های القا نشده و گروههای تمایز یافته در پایان مرحله تمایز رانشان می‌دهد.

Stage ۱: سلول های القا نشده بنیادی مزانشیمی

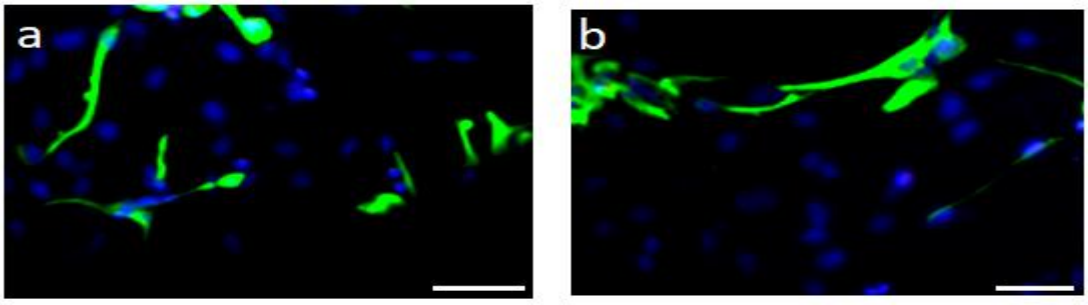
Stage ۲: سلول های تمایز یافته درپایان مرحله تمایز.

a: اختلاف معنی دار با Stage ۱

ارزیابی ایمونوسایتوشیمی

ماهیت سلول‌های پیش ساز عصبی ایجاد شده پس از تمایز با القاگرها از رنگ آمیزی فلورسنت برای آنتی بادی‌های Nestin، NF68 انجام شد (شکل۳).

درصد سلول‌های ایمونوپوزیتیو نسبت به مارکرهای پیش ساز عصبی از شمارش سلولی استفاده شد . در گروه تحت تیمار با RA بیان مارکرهای Nestin و NF68 افزایش معنی‌داری درصد سلول‌های پیش ساز عصبی را درمقایسه با گروه کنترل نشان داد ($p\leq ۰/۰۵$).



شکل ۳- رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی و فلوسایتومتری Nestin و NF68 درسلولهای تمایز یافته پس از مرحله تیمار.

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 14:54 +0430 on Monday May 6th 2019

- یافته‌های In vivo

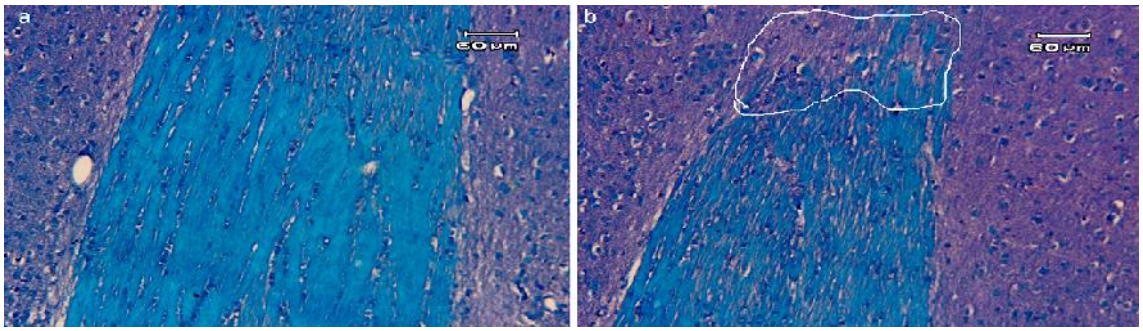
- ارزیابی هیستولوژیک دمیلیناسیون القا شده توسط لیزولسیتین

ارزیابی هیستولوژیک بافت ۱هفته بعد از تزریق لیزولستین نشان دهنده آتروفی بافتی و تخریب میلین پس از تزریق گلیوتوکسین لیزولسیتین درمقایسه با سالین بود.

- اندازه‌گیری وسعت و شدت دمیلیناسیون پس از پیوند سلول

میانگین وسعت دمیلیناسیون ۱ هفته پس از تزریق لیزولستین ۰/۲۸mm2 بود که نسبت به گروه سالین اختلاف معناداری را از لحاظ آماری نشان داد (p<۰/۰۵).

میانگین وسعت نواحی آسیب دیده در گروه‌های سلول درمانی شده در زمان دو هفته پس از پیوند سلول محاسبه و با گروه های سلول درمانی نشده در همین زمان مقایسه شد که نتایج آن در شکل ۴و۵ نشان داده شده است.

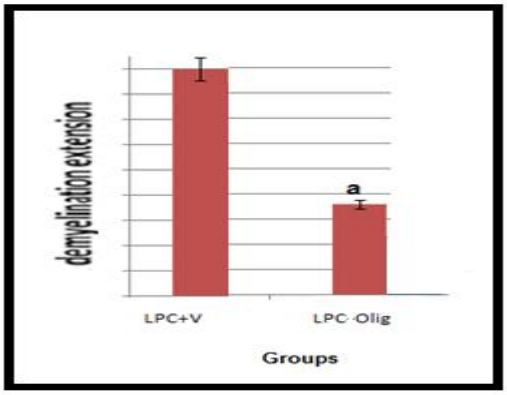


شکل۴- مقاطع کرونال از کورپوس کالوزوم رنگ آمیزی شده توسط لوگزول فست بلو و سافرانین.

(a): گروه سلول درمانی شده, ۲ هفته پس از پیوند سلول

(b): گروه vehicle,۲ هفته پس از تزریق مدیوم

Scale bar = ۶۰ µm همانطور که در نمودار ۲ ملاحظه می‌شود اندازه وسعت ناحیه دمیلینه شده در گروه های سلول درمانی شده درمقایسه با گروه هایی که سلول دریافت نکرده‌اند کاهش معناداری را ازلحاظ آماری نشان داد (p<۰/۰۵).



نمودار۲- مقایسه میانگین وسعت نواحی آسیب دیده در گروه‌های سلول درمانی شده در زمان دو هفته پس از پیوند سلول با گروه سلول درمانی نشده در همین زمان.

همانطور که مشاهده می‌شود اندازه وسعت ناحیه دمیلینه شده در گروه سلول درمانی شده درمقایسه با گروهی که سلول دریافت نکرده‌اند کاهش معناداری راازلحاظ آماری نشان می‌دهد.

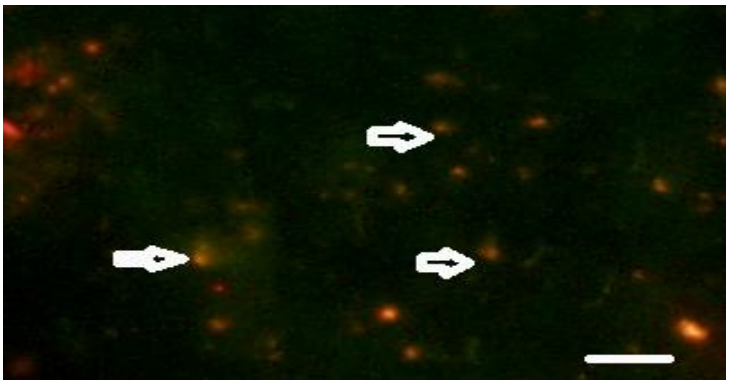
Lysophosphatidylcholine: LPC
Vehicle :V

a: اختلاف معنی دار با گروه LPC+V دو هفته پس از

پیوند سلول

- ردیابی سلول‌های تزریق شده

در پایان هفته دوم با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت حضور سلول‌های نشان دار شده پیوندی با DiI در نواحی تزریق مورد بررسی و تایید قرار گرفت (شکل۷).



شکل ۵- تصویر میکروسکوپ فلوروسانت برش انجمادی بافت مغز جهت ردیابی سلول‌های پیوندی نشاندار شده با DiI دو هفته پس از پیوند.

تمایز سلول‌های پیوندی جایگزین شده توسط بیان آنتی بادی PLP (پیکان‌ها) را نشان می‌دهد. Scale bar = ۲۰µm

بحث

در تحقیق حاضر سلول های بنیادی مغز استخوان را به عنوان منبع سلولی برای سلولهای میلین ساز الیگودندروسیت انتخاب شد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان پس از استخراج وکشت درشرایط محیط کشت ازسرعت تکثیر بالایی برخوردار هستند.

در مرحله بعد به منظور تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلول های پیش ساز عصبی از یک پروتکل تمایزی عصبی استفاده شد. در مرحله تمایز القاگر اسید رتینوئیک, فاکتورهای رشد EGF, bFGF به منظور القای سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان استفاده شد. تایید ماهیت سلولهای نوروپروژنیتور از طریق مورفولوژی انها و ایمونوپوزیتیو بودن آنها نسبت به مارکرهای Nestin و NF68 تایید شد. در واقع عوامل مختلفی نظیر فاکتورهای رشد سایتوکاینها وRA باعث القا عصبی در شرایط محیط کشت می شود.

پیشرفت های جدید در سلول درمانی منجر به بروز روش های نوین علمی در درمان بسیاری از بیماری های نورودژنراتیو شده است (۲۷-۲۵). امروزه استراتژی های سلول درمانی متعددی برای درمان این بیماریها با استفاده از منابع مختلف مانند سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان، دندان و سلول های بنیادی شبه جنینی در دست بررسی ومطالعه اند (31-۲۸).علاوه بر این تولید سلول های گلیالی مرحله کلیدی در سلول درمانی بیماری های دمیلینیشن اعصاب است. از بین منابع مختلف سلولی که به

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 14:54 +0430 on Monday May 6th 2019

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 14:54 +0430 on Monday May 6th 2019

منظور ترمیم میلین در مدل های دمیلیناسیون استفاده می شود می توان به سلول های بنیادی مغز استخوان اشاره کرد. در واقع سلول های بنیادی مغز استخوان می‌توانند به عنوان منبع کافی ومناسبی برای سلول درمانی و ترمیم بیماری ها از جمله بیماری های نورودژنراتیو مانند دمیلینیشن اعصاب باشند. باتوجه به ویژگی های چند توانی که دارند می توانند به عنوان منبع کافی ومناسبی برای ترمیم بیماریهای نورودژنراتیو باشند(۱۸و۱۷).

سلول های بنیادی مغز استخوان دارای قابلیت تمایز به نورون، ونوروگلیا می‌باشند(۲۱-۱۹). خاصیت مولتی پوتنسی سلول های بنیادی مغز استخوان و قابلیت تمایز آنها به سلول های مختلف از جمله الیگودندروسیت ، کار برد این سلول ها را جهت استفاده ترمیمی و بازسازی میلین در فیبرهای عصبی آسیب دیده پیشنهاد می‌دهد. بنابراین استفاده ازآنها جهت درمان بیماری ها وضایعات سیستم عصبی مانند تخریب میلین و بازسازی مجدد آن امری انکار ناپذیر است و تحقیقات در این زمینه در حال گسترش می باشد.

ازسوی دیگر به منظور بررسی روندهای ترمیمی و بازسازی میلین در فیبرهای عصبی آسیب دیده از مدل های حیوانی مختلفی استفاده می شود(۲۵و32).

انواع مختلفی از مدل های دمیلیناسیون وجود دارد که به طور متداول مورد استفاده قرار می گیرد. یکی از متداول ترین مدل ها جهت بررسی ظرفیت ترمیمی مغز در دمیلیناسیون مدلهای توکسینی است. گلیوتوکسین هایی مانند لیزولسیتین یا اتیدیوم بروماید سبب از بین بردن گلیاهای میلین ساز و ایجاد فقدان میلین در ماده سفید می شوند. یکی از مزایای این روش ایجاد یک ناحیه با محدوده مشخص می باشد(۱۸و۱۴) لیزولسیتین یک دتر جنت است که با اثر اختصاصی بر الیگودندروسیت ها سبب حل کردن لیپیدها می شود اما سبب القا دژنراسیون و قطع اکسونی نمی شود .

نتیجه گیری

تحقیق حاضر نشان داد که تزریق موضعی ۲ میکرولیتر لیزولسیتین سبب ایجاد یک ناحیه موضعی دمیلینه می شود.

به منظور اندازه گیری میزان دمیلیناسیون از رنگ آمیزی اختصاصی میلین استفاده شد و وسعت ناحیه دمیلینه محاسبه شد. نتایج حاصل از ارزیابی وسعت و شدت دمیلیناسیون نشان داد که ۱ هفته پس از تزریق لیزولستین میانگین وسعت دمیلیناسیون نسبت به گروه سالین افزایش معنادار را از لحاظ آماری نشان داد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله بدینوسیله از ستاد سلولهای بنیادی ریاست جمهوری جهت گرنت مالی این طرح وکارشناس محترم آزمایشگاه گروه فیزیولوژی سرکار خانم احسانی تقدیر و تشکر می نمایند.

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 14:54 +0430 on Monday May 6th 2019

References

1.Christoph H, Axel Z, Roland M. Stem cell transplantationin multiple sclerosis. J Neurol 2008; 255: 43–7.
2.Karussis D, Kassis I. The potential use of stem cells in multiple sclerosis: An overview of the preclinical experience. Clin Neurol Neurosurg 2008; 110: 889–96.
3.Bojnordi MN, Azizi H, Skutella T, Movahedin M, Pourabdolhossein F, Shojaei A, et al. Differentiation of spermatogonia stem cells into functional mature neurons characterized with differential gene expression. Mol Neurobiol 2017; 54: 5676-82.
4.Miller R H, Mi S. Dissecting demyelination. Nat Neurosci 2007; 10: 1351-4
5.Dubois-Dalcq M. Development and regeneration of oligodendrocytes: therapeutic perspectives in demyelinating diseases.. Bull Mem Acad R Med Belg 2005; 160: 407-15.
6.Dubois-Dalcq M, Williams A, Stadelmann C, Stankoff B, Zalc B, Lubetzki C. From fish to man: understanding endogenous remyelination in central nervous system demyelinating diseases. Brain 2008; 131: 1686-700.
7.Dubois-Dalcq M, French-Constant C, Franklin R J. Enhancing central nervous system remyelination in multiple sclerosis. Neuron 2005; 48: 9-12.
8.Stangel M, Hartung H P. Remyelinating strategies for the treatment of multiple sclerosis. Prog Neurobiol 2002; 68: 361-76.
9.Levine JM, Reynolds R. Activation and proliferation of endogenous oligodendrocyte precursor cells during ethidium bromide-induced demyelination. Experimental Neurobiol 1999; 160: 333–47.
10.Nait-Oumesmar, B, Picard-Riera N, Kerninon C, Baron-Van Evercooren A. The role of SVZ-derived neural precursors in demyelinating diseases: from animal models to multiple sclerosis. J Neuro Sci 2008; 265: 26–31.
11.Surani M A, Ancelin K, Hajkova P, Lange U C, Payer B, Western P, Saitou M. Mechanism of mouse germ cell specification: a genetic program regulating epigenetic reprogramming. Symp Biol 2004; 69: 1–9.
12.Zhang SC. Neural subtype specification from embryonic stem cells. Brain Pathol 2006; 16: 132–42.
13.Domańska-Janik K. Stem cells potential therapeutic use in neurological diseases. Neurol Neurochir Pol 2002; 36: 107-17.
14.Draper J S, Andrews P W. Embryonic stem cells: advances toward potential therapeutic use. Curr Opin Obstet Gynecol 2002; 14: 309-15.
15.Hug K. Sources of human embryos for stem cell research: ethical problems and their possible solutions. Medicina 2005; 41: 1002-10.
16. Kuehnle I, Goodell MA. The therapeutic potential of stem cells from adults. BMJ 2002; 325: 372–6.
17.Oodell MA, Jackson KA, Majka SM, Mi T, Wang H, Pocius J, et al. Stem cell plasticity in muscle and bone marrow. Ann N Y Acad Sci 2001; 938: 208-18.
18.Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders. Nature 2006; 441: 1094 –6.
19.Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. Blood 2003; 15: 3483-93.

20.Bae KS, Park JB, Kim HS, Kim DS, Park DJ, Kang SJ. Neuron-like differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Yonsei Med J 2011; 52: 401-12.
21.Kim BJ, Seo JH, Bubien JK, Oh YS. Differentiation of adult bone marrow stem cells into neuroprogenitor cells in vitro. Neuroreport 2002; 13: 1185- 8.
22.Croft AP, Przyborski SA. Mesenchymal stem cells expressing neural antigens instruct a neurogenic cell fate on neural stem cells. Exp Neurol 2009; 216: 329-41.
23.Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. Physiol Rev 2001; 81: 871-927.
24.Butt AM, Bay V. Axon-glial interactions in the central nervous system. J Anat 2011; 219: 1.
25.Aldskogius H, Kozlova EN. Central neuron-glial and glial-glial interactions following axon injury. Prog Neurobiol 1998; 55: 1-26.
26. Nazm Bojnordi M, Ebrahimi-Barough S, Vojoudi E, Ghasemi HH. Silk Nanofibrous Electrospun Scaffold Enhances Differentiation of Embryonic Stem like Cells derived from Testis in to mature neuron. J Biomed Mater Res A 2018. [Epub ahead of print].
27.Nazm Bojnordi M, Movahedin M, Tiraihi T, Javan M, Ghasemi Hamidabadi H. Oligoprogenitor cells derived from spermatogonia stem cells improve remyelination in demyelination model. Mol Biotechnol 2014; 56: 387–93.
28. Haratizadeh S, Bojnordi MN, Niapour A, Bakhtiari M, Hamidabadi HG. Improvement of neuroglial differentiation from human dental pulp stem cells using CSF. J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26: 1-14. [In Persian]
29. Nazm Bojnordi M, Movahedin M, Tiraihi T. Genetic changes during differentiation of spermatogonial stem cells into oligoprogenitor cells. JBUMS 2017; 19: 35-41. [In Persian]
30. Ghasemi Hamidabadi H, Pasbakhsh P, Amidi F, Soleimani M, Forouzandeh M, Sobhani A. Functional Concentrations of BMP4 on Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells to Primordial Germ Cells. Int J Fertil Steril, 2011; 5(2): 104–109.
31. Haratizadeh S, Bojnordi MN, Darabi S, Karimi N, Naghikhani M, Hamidabadi HG. et al. Condition medium of cerebrospinal fluid and retinoic acid induces the transdifferentiation of human dental pulp stem cells into neuroglia and neural like cells. Anat Cell Biol 2017; 50: 107–14.
32. Mozafari S, Sherafat MA, Javan M, Mirnajafi Zadeh J, Tiraihi T. Visual evoked potentials and MBP gene expression imply endogenous myelin repair in adult rat optic nerve and chiasma following local lysolecithin induced demyelination. Brain Res 2010; 1351: 50–6.

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 14:54 +0430 on Monday May 6th 2019