

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

M. Nazm Bojnordi¹, Z Bagheri-Hosseinabadi², N Rezaei¹, E. Akbari³.

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

ABSTRACT

Background and Aim: Bone marrow stem cells (BMSCs) are recognized as appropriate source for cell therapy in neurodegenerative disorders. In this experimental 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 labeled NPCs were transplanted into the rat brains. The extension 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.

Conclusion: The results of this study demonstrated that transplantation of NPC-derived BMSCs led to significant remyelination in demyelinated corpus callosum.

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

Received: Apr 3, 2018

Accepted: July 11, 2018

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 یجنوردی^۱، زهرا باقری حسین آبادی^۱، نورالله رضایی^۱، اسماعیل اکبری^۳

۱. گروه آناتومی و بیولوژی سلولی، مرکز تحقیقات ایمونونئیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران، تلفن ثابت: ۰۱۱-۳۳۵۴۳۰۸۰ داخلی

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 مازندران، ساری، ایران

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 سلول های بنیادی مغز استخوان موش به سلول های 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 و bFGF استفاده شد. مارکرهای سلول های پیش ساز عصبی یعنی NF68، Nestin با روش ایمونوسیتوشیمی پس از مرحله تمایز بررسی شدند. در مرحله *in vivo* به منظور القا مدل دمیلینیشن گلیوتوکسین لیزولیسیتین به کورپوس کالوزوم توسط تزریق استریوتاکسیک انجام شد. یک هفته بعد پیوند سلول های پیش ساز عصبی نشاندار شده با DiI به صورت درجا به موش انجام شد. ارزیابی تغییرات وسعت دمیلینیشن و جایگزینی سلول های پیوندی توسط بررسی های هیستولوژی و ایمونوهیستوشیمی حدوداً ۲ هفته پس از پیوند سلول انجام شد.

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

نتیجه گیری: سلول های بنیادی مغز استخوان قابلیت تمایز عصبی در شرایط 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: سلول های بنیادی مغز استخوان، دمیلینیشن، نوروپروژنیور، میلین سازی.

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

مقدمه

تخریب غلاف میلین الیاف عصبی در سیستم اعصاب مرکزی منجر به بروز مشکلات نورولوژیکی متعددی نظیر نقایص حسی و حرکتی 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 از جمله 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 آسانی به دست آمده و همچنین بتوانند تحت القا سلول های پروژنیاتور 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 مانند الیگودندروسیتها یا پیش سازهایشان، محقق می باشد (۱۰-۸). از سوی 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 مدل های توکسینی است. گلیوتوکسین هایی مانند لیزولستین 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 (۱۶ و ۱۵).

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 می توانند به عنوان منبع کافی و مناسبی برای سلول درمانی و ترمیم بیماری ها از جمله بیماری های نورودژنراتیو مانند دمیلینیشن اعصاب باشند. با توجه به ویژگی های چند توانی که دارند می توانند به عنوان منبع کافی و مناسبی برای ترمیم بیماریهای نورودژنراتیو باشند (۱۷ و ۱۸).

سلول های بنیادی مغز استخوان متعلق به سلول های بنیادی بالغ بوده و دارای قابلیت تمایز به انواع مختلفی از بافتهای مزانشیمی مانند تاندون، غضروف، استخوان، چربی، عضله و همچنین سلول هایی با منشاء غیر مزودرمی مانند نورون، ونوروگلیا می باشند (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 می دهد بنابراین استفاده از آنها جهت درمان بیماری ها و ضایعات 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 کنند به طوریکه سلول های بنیادی مغز استخوان در حضور فاکتورهای رشدی و القاگرهای مختلفی نظیر bFGF, EGF, PDGF, RA به رده های نورونی

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

جهت تمایز سلول های بنیادی مغز استخوان به سلول های پیش ساز عصبی از یک پروتکل تمایزی استفاده شد. سلول های بنیادی مغز استخوان در حضور رتینوئیک اسید و سپس در محیط نوروبازال حاوی PDGF 10 ng/ml, bFGF 20ng/ml, EGF 10 ng/ml به مدت ۸-۱۲ روز کشت داده شد (۱۹۲۰).

- بررسی ایمونوسایتوشیمی تمایز به سلول های 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 ۴٪ PFA در دمای اتاق فیکس شدند. پس از شستشو با محلول PBS / Tween در محلول مهار کننده سرم ۱۰٪ به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند. سپس به مدت یک شب در دمای ۴°C توسط آنتی بادی های اولیه شامل آنتی بادی پلی کلونال ضد Nestin و NF68 به رقت ۱/۵۰۰۰ اینکوبه شده و پس از شستشو آنتی بادی ثانویه شامل آنتی بادی ثانویه کونژوگه با (FICT)، (Goat anti Rabbit IgG به رقت ۱/۱۰۰۰ و نهایتاً جهت رنگ آمیزی هسته ها از DAPI استفاده شد.

ارزیابی درصد زنده بودن:

ابتدا سلول ها 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.

و گلیالی تمایز می یابند. بعضی مطالعات توانایی تمایز سلول های بنیادی مغز استخوان را به سلول های 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 سلول های پیش ساز عصبی در شرایط محیط کشت و همچنین پیوند این سلول ها به نواحی دمیلینه شده مغزی و توانایی این سلول ها 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 منظور ارزیابی قدرت عملکرد آنها بررسی می شود.

روش بررسی

در این تحقیق سلول های بنیادی مغز استخوان با روش فلاشینگ از مغز استخوان فمور ۴۰ راس 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 ۱ درصد، و پنی سیلین / استرپتومایسین درصد کشت اولیه داده شدند. پس از اینکه سلول ها ی مذکور کف پلیت را پر نمودند، 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، سلول های حاصله به فلاسک های کشت منتقل شدند (۲۰).

- کشت سلول های بنیادی مغز استخوان:

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

- القا دمیلیناسیون توسط لیزولسیتین:

در این بخش از ۱۵ راس موش صحرایی ماده نژاد Sprague-Dawley با وزن ۱۸۰-۲۰۰ گرم استفاده شد. تزریق توسط سوزن متصل به سرنگ هاملتون 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 بررسی های بافتی به منظور تایید دمیلیناسیون انجام شد. سکشنهای بافتی توسط رنگ آمیزی لوگزول فست بلو رنگ شد. جهت کمی کردن وسعت دمیلیناسیون و شدت رمیلیناسیون از نرم افزار ImageJ استفاده شد. مجموعاً در این بخش سه گروه در نظر گرفته شد. گروه اول یا کنترل (Control)، که فقط لیزولسیتین دریافت کردند. گروه دوم یا (vehicle)، که یک هفته پس از دریافت لیزولسیتین، مدیوم بدون سلول دریافت کردند. گروه سوم یا تجربی (Experimental)، که یک هفته پس از دریافت لیزولسیتین، 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:

لام های تهیه شده از نمونه ها به این روش و بر اساس پروتکل 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 نشاندار شده به موش پیوند گردید.

- بررسی تغییرات بافتی پس از انجام پیوند سلول:

بررسی های بافتی به منظور بررسی تغییرات دمیلیناسیون پس از ۲ و ۴ هفته از انجام پیوند سلول انجام شد.

- بررسی ایمونوهیستوشیمی

- تعیین تمایز سلول های نشان دار شده به سلول های میلین ساز:

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

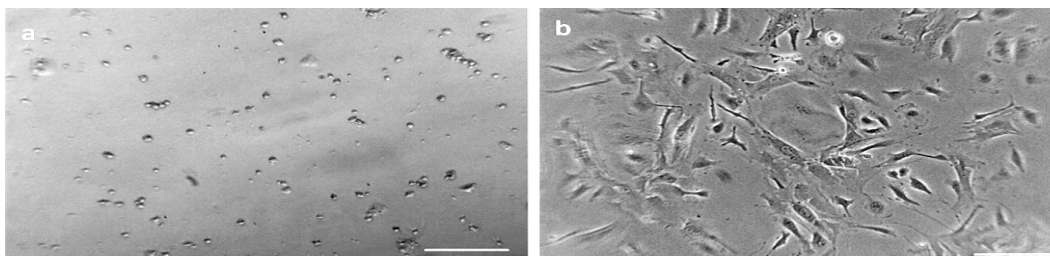
- تجزیه و تحلیل آماری:

اطلاعات به دست آمده با روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون TUKEY مورد مقایسه قرار گرفت. کلیه آزمایشات سه بار تکرار شد. سطح معنی داری ($p \leq 0.05$) در نظر گرفته شد.

یافته ها

یافته های in vitro:

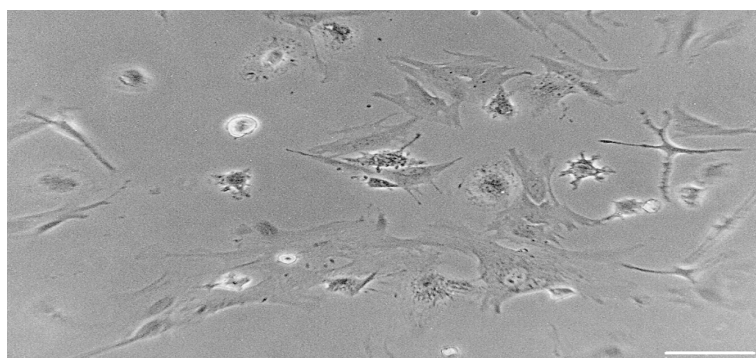
مورفولوژی سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در مطالعه حاضر مورفولوژی سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، ارزیابی و مورد تایید قرار گرفته شد شکل ۱. شکل ۱: a: مورفولوژی سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان استخراج شده را در محیط کشت پس از ۴ ساعت نشان می دهد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان دارای قدرت تکثیری و چسبندگی فراوان با ظاهر دوکی شکل و فیروپلاستیک بودند. (شکل ۱: b).



شکل ۱- تصویر میکروسکوپ معکوس از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان a مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان را پس از چهار ساعت کشت نشان می‌دهد. b: ظاهر دوکی شکل و فیروپلاستیک سلول‌ها پس از پاساژ چهارم. Scale bar = ۱۰۰ μ m

- تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های پیش ساز
عصبی
و استطاله‌های سلولی شدند (شکل ۲).

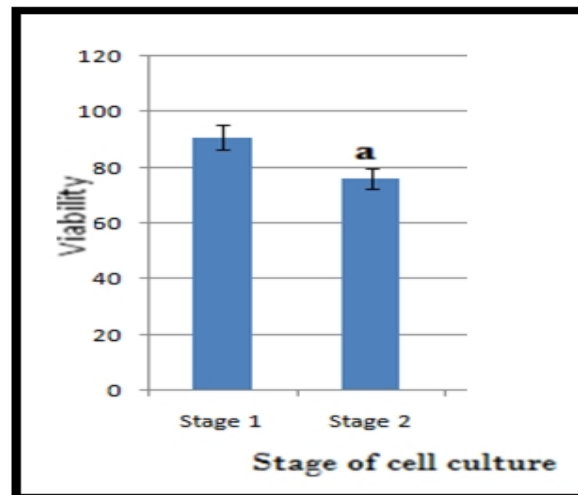
اسید رتینوئیک باعث القا سلول‌هایی با فنوتیپ سلول‌های
پیش ساز عصبی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی شد. این



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

Scale bar = ۱۰۰ μ m

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 (نمودار ۱).



نمودار ۱- نمودار مقایسه میانگین درصد سلول های زنده به کل سلولها در سلول های القا نشده و گروه های تمایز یافته در پایان مرحله تمایز را نشان می دهد.

Stage ۱: سلول های القا نشده بنیادی مزانشیمی

Stage ۲: سلول های تمایز یافته در پایان مرحله تمایز.

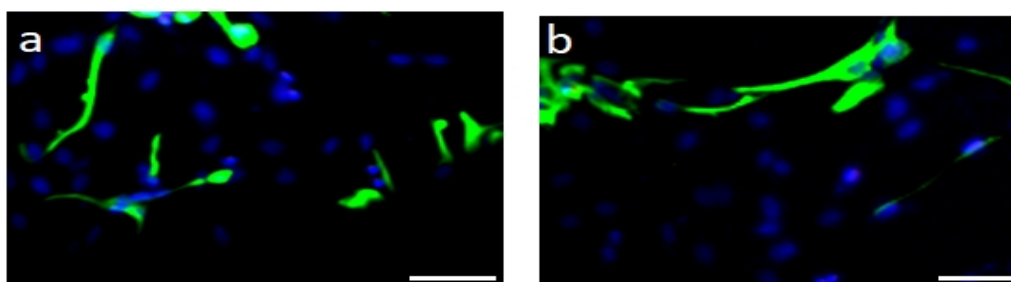
a: اختلاف معنی دار با Stage ۱

ساز عصبی از شمارش سلولی استفاده شد. در گروه تحت تیمار با RA بیان مارکرهای Nestin و NF68 افزایش معنی داری درصد سلول های پیش ساز عصبی را درمقایسه با گروه کنترل نشان داد ($p < 0.05$).

ارزیابی ایمونوسایتوشیمی

ماهیت سلول های پیش ساز عصبی ایجاد شده پس از تمایز با القاگرها از رنگ آمیزی فلورسنت برای آنتی بادی های Nestin، NF68 انجام شد (شکل ۳).

درصد سلول های ایمونوپوزیتیو نسبت به مارکرهای پیش



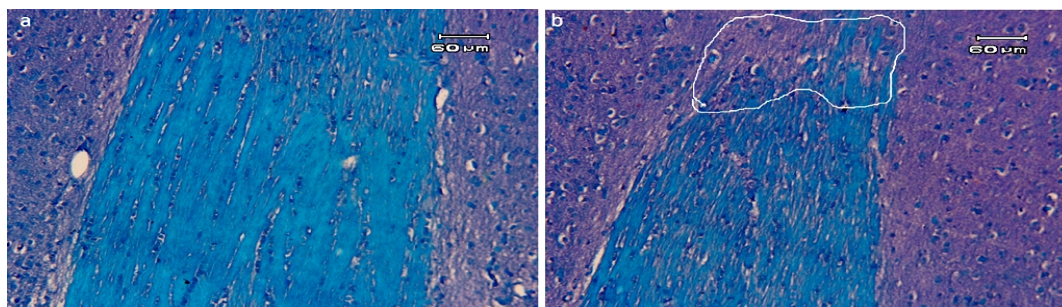
شکل ۳- رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی و فلوسایتمتری Nestin و NF68 در سلول های تمایز یافته پس از مرحله تیمار.

In vivo های یافته‌ها

را از لحاظ آماری نشان داد ($p < 0.05$). 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 ۴ و ۵ نشان داده شده است.

- ارزیابی هیستولوژیک دمیالیناسیون القا شده توسط لیزولستین
ارزیابی هیستولوژیک بافت ۱ هفته بعد از تزریق لیزولستین نشان دهنده آتروفی بافتی و تخریب میلین پس از تزریق گلیوتوکسین لیزولستین درمقایسه با سالین بود.
- اندازه‌گیری وسعت و شدت دمیالیناسیون پس از پیوند سلول

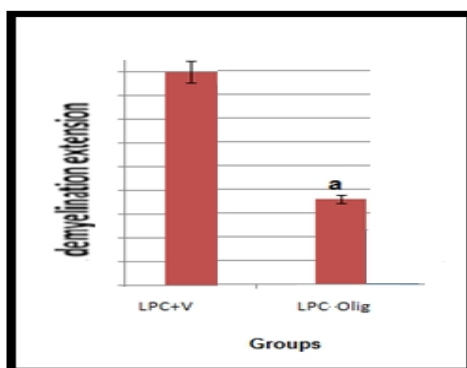
میانگین وسعت دمیالیناسیون ۱ هفته پس از تزریق لیزولستین 2.48 ± 0.2 بود که نسبت به گروه سالین اختلاف معناداری



شکل ۴- مقاطع کروئال از کورپوس کالوزوم رنگ آمیزی شده توسط لوگزول فست بلو و سافرانین.

درمانی شده درمقایسه با گروه هایی که سلول دریافت نکرده‌اند کاهش معناداری را از لحاظ آماری نشان داد ($p < 0.05$).

(a): گروه سلول درمانی شده، ۲ هفته پس از پیوند سلول
(b): گروه vehicle، ۲ هفته پس از تزریق مدیوم
Scale bar = $60 \mu m$ همانطور که در نمودار ۲ ملاحظه می‌شود اندازه وسعت ناحیه دمیالینه شده در گروه های سلول



نمودار ۲- 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 می شود اندازه وسعت ناحیه دمیلینه شده در گروه سلول درمانی شده درمقایسه با گروهی که سلول دریافت نکرده اند کاهش معناداری را از لحاظ آماری نشان می دهد.

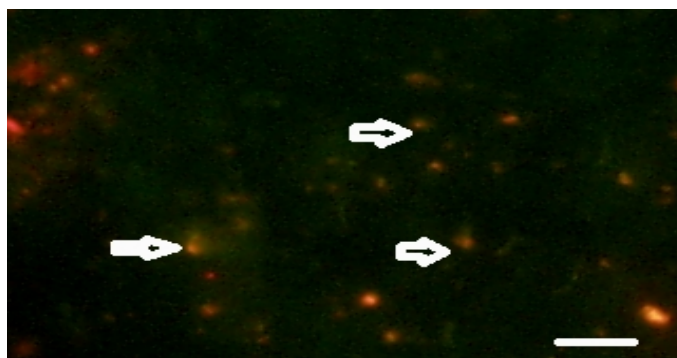
Lysophosphatidylcholine: LPC
Vehicle: V

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

پیوند سلول

- ردیابی سلول های تزریق شده

در پایان هفته دوم با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت حضور سلول های نشان دار شده پیوندی با DiI در نواحی تزریق مورد بررسی و تایید قرار گرفت (شکل ۷).



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

تمایز سلول های پیوندی جایگزین شده توسط بیان آنتی بادی PLP (پیکان ها) را نشان می دهد. $20\mu m$ Scale bar =

بحث

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

در مرحله بعد به منظور تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلول های پیش ساز عصبی از یک پروتکل تمایزی عصبی استفاده شد. در مرحله تمایز القاگر اسید ریتینوئیک، فاکتورهای رشد EGF, bFGF به منظور القای

سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان استفاده شد. تایید ماهیت سلول های نوروپروژنیتر از طریق مورفولوژی آنها و ایمونوپوزیتیو بودن آنها نسبت به مارکرهای Nestin و NF68 تایید شد. در واقع عوامل مختلفی نظیر فاکتورهای رشد سائتوکاینها و RA 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 و مطالعه اند (۳۱-۲۸). علاوه بر این تولید سلول های گلیالی مرحله کلیدی در سلول درمانی بیماری های دمیلینیشن اعصاب است. از بین منابع مختلف سلولی که به

نتیجه گیری

تحقیق حاضر نشان داد که تزریق موضعی ۲ میکرولیتر لیزولستین 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 و کارشناس محترم آزمایشگاه گروه فیزیولوژی سرکار خانم احسانی تقدیر و تشکر می نمایند.

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 می توانند به عنوان منبع کافی و مناسبی 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 و مناسبی برای ترمیم بیماریهای نورودژنراتیو باشند (۱۷ و ۱۸).

سلول های بنیادی مغز استخوان دارای قابلیت تمایز به نورون، و نوروگلیا می باشند (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 می دهد. بنابراین استفاده از آنها جهت درمان بیماری ها و ضایعات 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 (۲۵ و ۳۲).

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 مدل های توکسینی است. گلیوتوکسین هایی مانند لیزولستین 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 (۱۸ و ۱۴) لیزولستین یک دتر جنت است که با اثر اختصاصی بر الیگودندروسیت ها سبب حل کردن لپیدها می شود اما سبب القا دژنراسیون و قطع اکسونی نمی شود.

References

- 1.Christoph H, Axel Z, Roland M. Stem cell transplantation in 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.