مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۶۶/هفته دوم اسفند ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۷/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۲۵

بهبود ویژگی‌های ساختار فوق میکروسکوپی میلین، بعد از پیوند سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی انسان در موش صحرایی مدل بیماری Multiple sclerosis (MS)

دکتر ناظم قاسمی[۱]، دکتر شهناز رضوی[۲]، دکتر حسین صالحی[۱]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: بیماری Multiple sclerosis (MS) از انواع بیماری‌های مزمن Neurodegenerative در سیستم عصبی مرکزی می‌باشد که به طور معمول با ناتوانی عصبی در بالغین جوان همراه است. در این مطالعه، تأثیر پیوند سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی انسان در بافت عصبی دمیلینه شده توسط لیزولسیتین و توانایی این سلول‌ها در پیشبرد فرایند بازسازی میلین، مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: ۴۰ سر موش صحرایی به صورت تصادفی در چهار گروه شامل گروه شاهد، لیزولسیتین، لیزولسیتین و محیط کشت (گروه حامل) و گروه لیزولسیتین و پیوند سلول‌های بنیادی قرار داده شدند و بعد از لامینکتومی، دمیلینیشن موضعی در ستون طرفی نخاع و با استفاده از لیزولسیتین ایجاد شد. یک هفته بعد از تزریق لیزولسیتین، محل لامینکتومی دوباره باز شد و برای گروه حامل، ۱۰ میکرولیتر محیط کشت و برای گروه پیوند ۱۰ میکرولیتر محیط کشت محتوی $۱۰^{۶} \times ۱$ سلول بنیادی نشان‌دار شده با رنگ Hoechst در محل ضایعه پیوند گردید. در گروه‌های شاهد و لیزولسیتین، محل جراحی قبلی باز و بدون هیچ گونه مداخله‌ای بار دیگر بسته شد. چهار هفته بعد از پیوند سلولی، به منظور ارزیابی حضور سلول‌های بنیادی در مناطق پیوند و بررسی نواحی دمیلینه و مناطق دوباره میلینه شده، از روش‌های ایمونوهیستوشیمی و میکروسکوپ الکترونی استفاده شد.

یافته‌ها: بررسی تصاویر ایمونوهیستوشیمی، حضور سلول‌های بنیادی را چهار هفته بعد از پیوند در محل ضایعه نشان داد. همچنین، نتایج میکروسکوپ الکترونی، نشانگر افزایش بیشتر سنتز میلین در گروه پیوند سلولی نسبت به سایر گروه‌ها بود.

نتیجه‌گیری: پیوند سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی انسان، ممکن است روشی مناسب برای سلول درمانی در بیماری‌های نورودژنراتیو مانند بیماری MS باشد.

واژگان کلیدی: Multiple sclerosis، سلول‌های بنیادی، لیزولسیتین، پیوند سلولی

ارجاع: قاسمی ناظم، رضوی شهناز، صالحی حسین. **بهبود ویژگی‌های ساختار فوق میکروسکوپی میلین، بعد از پیوند سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی انسان در موش صحرایی مدل بیماری Multiple sclerosis (MS).** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۶۶): ۲۳۴۰-۲۳۳۳

مقدمه

یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مزمن Neurodegenerative در سیستم عصبی مرکزی، بیماری Multiple sclerosis (MS) است که برای اولین بار در سال ۱۸۶۸ میلادی توسط Charct پدر علم نورولوژی شناخته شد (۱). در طی این بیماری، غلاف میلین موجود در اطراف رشته‌های عصبی میلین‌دار، تخریب می‌شود و اختلال در هدایت پیام‌های عصبی، منجر به پیدایش مجموعه علایمی شامل اختلالات حسی- حرکتی، سردرد، سرگیجه، اختلالات بینایی و شنوایی، اختلالات گفتاری، لرزش، اختلالات بلعی، مشکلات سیستم روده‌ای- مثانه‌ای، خستگی و تغییر در توانایی‌های شناختی فرد می‌شود (۳-۲).

بیماری MS، بارزترین علت نورولوژیک ناتوانی در بالغین جوان است که ۲-۱/۳ میلیون نفر از جمعیت انسانی را تحت تأثیر قرار داده است (۴). در ایران، نزدیک به حدود ۷۰۰۰۰ نفر به بیماری MS مبتلا هستند. شیوع این بیماری در سنین ۴۰-۲۰ سال و در زنان ۳-۲ برابر بیشتر نسبت به مردان است (۵). علت اصلی بیماری MS شناخته شده نیست. اغلب محققین، بر این عقیده‌اند که بیماری MS از گروه بیماری‌های خود ایمنی می‌باشد که در طی آن، سیستم ایمنی بدن بر علیه غلاف میلین آنتی‌بادی تولید می‌کند و تخریب شدن میلین به وقوع می‌پیوندد.

۱- - استادیار، گروه علوم تشریحی و بیولوژی ملکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استاد، گروه علوم تشریحی و بیولوژی ملکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر شهناز رضوی
Email: razavi@med.mui.ac.ir

بر اساس مدارک موجود، در پیدایش این بیماری، عوامل محیطی (عفونت‌های میکروبی و ویروسی) و ژنتیک نقش عمده‌ای دارند (۷-۶). همچنین، عفونت‌های ویروسی به عنوان مکانیسم بالقوه‌ای در شروع دمیلینه شدن شناخته شده است. افزایش ۶ برابری شیوع این بیماری در دو قلوهای تک تخمی نسبت به دو قلوهای دو تخمی، نقش ژنتیک را در بروز این بیماری برجسته می‌کند. تماس با فلزات سنگین با آسیب سیستم عصبی و افزایش احتمال ابتلا به بیماری MS همراه است (۸). مجموعه‌ی عوامل محیطی نظیر کمبود ویتامین D، تابش اشعه‌ی ماورای بنفش با طول موج کوتاه، افزایش سن و مکان‌های با عرض جغرافیای بالا نیز در همه‌گیر شدن این بیماری نقش عمده‌ای ایفا می‌کنند (۹).

التهاب سیستم عصبی مرکزی، اولین علت آسیب‌های ایجاد شده در طی بیماری MS می‌باشد. اتصال عوامل ملکولی موجود در پاتوژن‌ها به گیرنده‌های Toll like که بر روی سلول‌های دندریتیک واقع شده‌اند، فرایند بلوغ این سلول‌ها را رقم می‌زند (۱۰). سلول‌های دندریتیک بالغ، باعث تمایز سلول‌های T لنفوسیت +CD4 به فنوتیپ‌های Th1 (T helper1) و Th17 می‌شوند. با ترشح طیف وسیعی از سیتوکاین‌های پیش التهابی توسط این سلول، التهاب در Central nervous system (CNS) ایجاد می‌شود. علاوه بر التهاب، فرایند میلین‌سازی مجدد هم در بیماران MS دچار اختلال می‌شود. با اتصال Fas لیگاند سنتز شده توسط لنفوسیت‌ها به گیرنده‌ی Fas موجود بر روی سلول‌های الیگودندروسیت، برنامه‌ی مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی این سلول‌ها رقم می‌خورد و جمعیت این سلول‌ها، کاهش می‌یابد و در نتیجه، میلین‌سازی مجدد با اشکال مواجه خواهد شد. در بسیاری از موارد، بعد از تخریب میلین، میلین‌سازی مجدد اتفاق می‌افتد که این فرایند، یک فرایند ترمیمی خودبه‌خودی و آهسته است که طی آن، میلین جدید ساخته می‌شود. در بیشتر موارد، این فرایند پیشرفت ندارد و دمیلینیزاسیون مداوم و به دنبال آن، از بین رفتن آکسون منجر به نقایص پیش‌رونده و غیر قابل برگشت می‌شود (۱۱).

از آن جایی که بیماری MS از گروه بیماری‌های خود ایمنی می‌باشد، بسیاری از درمان‌ها با هدف کاهش التهاب در سیستم عصبی انجام می‌گیرد و مصرف داروهای مهار کننده‌ی ایمنی و کورتیکواستروئیدها در درمان آن شیوع زیادی دارد، اما این داروها، قادر به توقف فرایند Neurodegeneration نمی‌باشند (۱۲). به تازگی، پیشرفت‌هایی در زمینه‌ی درمان MS با استفاده از پیوند سلول‌های بنیادی رخ داده است (۱۳). مطالعات نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های بنیادی عصبی جنینی و بالغین، سلول‌های پیش‌ساز عصبی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی و پیش‌ساز اولیگودندروسیت، سلول‌هایی مناسب برای ترمیم میلین محسوب می‌شوند (۱۵-۱۴).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی، یک جمعیت مشخص از سلول‌های بنیادی می‌باشند که توانایی تمایز به انواع سلول‌ها، به ویژه سلول‌های عصبی را دارند. این سلول‌ها به دنبال القای تمایز، نشانگرهای عصبی را به روش ایمونوهیستوشیمی و مورفولوژی بیان می‌کنند و درصد بالایی از این سلول‌ها به سلول‌های عصبی تمایز می‌یابند. Schipper و همکاران در بررسی سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی زیر جلدی ناحیه ی شکم به این نتیجه رسیدند که این سلول‌ها نسبت به مرگ برنامه‌ریزی شده مقاوم هستند (۱۶).

نتایج تحقیقات انجام شده توسط Kalbermatten و همکاران برای بررسی فعالیت نوروتروفیک سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، نشان داد که سلول های بنیادی موجود در این بافت، عوامل رشد عصبی نظیر Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)، Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)، Nerve growth factor (NGF) و همه‌ی نشانگرهای سلول‌های بنیادی چند توانه را بیان می‌کنند (۱۷). نتایج مطالعه‌ی Kingham و همکاران حاکی از آن بود که سلول‌های بنیادی موجود در بافت چربی قادرند به سلول های شوان تمایز یابند و در محیط آزمایشگاهی رشد عصب را القا (۱۸) و در محیط درونی بدن ترمیم عصب را تسریع نمایند (۱۹). توانایی سلول‌های Adipose-derived stromal/stem cells (ASCs) در تحریک رشد جوانه‌های عصبی در ایسکمی‌های میوکاردی توسط Cai و همکاران به اثبات رسیده است (۲۰).

سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، از طریق افزایش سرعت رشد عروق خونی و فیبرهای عصبی، قادر به ترمیم بافت می‌باشند. با این حال، مکانیسمی که به واسطه‌ی آن سلول‌های ASCs باعث افزایش رشد فیبر عصبی می‌شوند، به طور کامل مشخص نشده است. استفاده‌ی بالینی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان، یک روش تهاجمی همراه با درد است و سلول‌های بنیادی به دست آمده در این روش، به نسبت اندک می‌باشد (۲۱). این محدودیت‌ها، منجر به تحقیق در زمینه‌ی یافتن منابع جایگزین دیگر برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی گردید. بافت چربی مانند مغز استخوان، از سلول‌های مزانشیم مشتق می‌شود و حاوی استرومایی است که به آسانی از آن جدا می‌گردد.

سلول‌های بنیادی مزانشیمی، به طور سریع در محیط کشت و برای مدت طولانی تکثیر می‌شوند و همچنین، بافت چربی زیر پوستی در انسان بیشتر است و به آسانی با روش لیپوساکشن جمع‌آوری می‌شود. از طرفی، میزان سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی نسبت به مغز استخوان بیشتر است (۲۱). از این رو، در پژوهش حاضر، از سلول‌های بنیادی موجود در بافت چربی، جهت پیوند در طناب نخاعی موش صحرایی دمیلینه شده با استفاده از لیزولسیتین استفاده گردید و توانایی این سلول‌ها در پیشبرد فرایند میلین‌سازی مجدد، بررسی شد.

روش‌ها

جداسازی و کشت سلول های بنیادی از بافت چربی: پس از اخذ رضایت از افرادی که برای عمل سزارین به بیمارستان عیسی بن مریم (ع) اصفهان مراجعه کرده بودند، بافت چربی زیر جلدی ناحیه‌ی شکم برداشته و پس از شستشو با Phosphate-buffered saline (PBS)، بافت به صورت مکانیکی خرد شد. در ادامه، آنزیم کلاژناز I با غلظت ۰/۰۷۵ درصد به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد.

سپس، عملکرد کلاژناز با محیط کشت حاوی ۱۰ درصد Fetal bovine serum (FBS) خنثی گردید. با انجام سانتریفیوژ و تخلیه‌ی محیط رویی، رسوب سلولی حاصل با استفاده از محیط کشت Dulbecco's modified eagle medium-Low glucose (DMEM-Low glucose) حل شد و سوسپانسیون سلولی در فلاسک‌های T25 و در شرایط استاندارد شامل CO_2 ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد کشت شد و پس از ۴۸ ساعت محیط کشت تعویض گردید.

نشان‌دار کردن سلول‌ها با رنگ Hoechst: قبل از پیوند، سلول‌های بنیادی با استفاده از رنگ فلورسنت Hoechst نشان‌دار شد. به این منظور، $10^6 \times 1$ سلول در یک تیوب مخروطی محتوی ۳ میلی‌لیتر محیط DMEM با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و pH مساوی ۷/۴ قرار گرفت. سپس، ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر رنگ Hoechst به آن اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. بعد از طی زمان مورد نظر، شستشو با استفاده از محیط کشت به منظور حذف رنگ اضافی انجام شد. در پایان، سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند.

ایجاد مدل MS: در این تحقیق، از ۴۰ سر موش صحرایی با وزن تقریبی ۲۵۰–۲۰۰ گرم استفاده شد. موش‌های صحرایی به صورت تصادفی به ۴ گروه ده‌تایی شامل گروه لیزولسیتین، لیزولسیتین و محیط کشت (گروه حامل) و گروه لیزولسیتین و پیوند سلول‌های بنیادی تقسیم شدند و در ۳ گروه آخر، ضایعه‌ی مدل MS ایجاد گردید. به این منظور، حیوانات ابتدا با تزریق داخل صفاقی ۱۰۰ میلی‌گرم/۱۰۰۰ گرم کتامین و ۱۰ میلی‌گرم/۱۰۰۰ گرم Xylazine بیهوش شدند.

پس از لامینکتومی، با استفاده از لیزولسیتین ۱ درصد به میزان ۲ میکرولیتر در قطعات T8-T10 ماده‌ی سفید نخاع دمیلینیزاسیون کانونی به صورت یک طرفه ایجاد شد. برای اطمینان از عمل دمیلینیزاسیون، یک هفته بعد از ایجاد ضایعه، از نخاع مقاطع کرایو تهیه شد و رنگ‌آمیزی Luxol fast blue (LFB) جهت اثبات دمیلینیزاسیون انجام گردید.

پیوند سلول‌ها در ناحیه‌ی دمیلینیزه‌ی طناب نخاعی: ۷ روز بعد از ایجاد مدل MS، به منظور عمل پیوند سلولی، موش‌های صحرایی بیهوش شدند و محل لامینکتومی دوباره باز شد. سپس، برای گروه پیوند، ۱۰ میکرولیتر محیط کشت محتوی $10^6 \times 1$ سلول بنیادی مشتق از چربی از پاساژ سوم و برای گروه حامل، ۱۰ میکرولیتر محیط کشت با استفاده از لوله‌های موئینه‌ی مدرج متصل به سرنگ انسولین در محل ضایعه پیوند گردید (۲۲). لازم به ذکر است که موش‌های صحرایی در گروه پیوند سلولی، یک روز قبل از پیوند سلول و در طی دوره‌ی مطالعه، به صورت روزانه ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم سیکلوسپورین A (داخل صفاقی) جهت تضعیف سیستم ایمنی دریافت کردند.

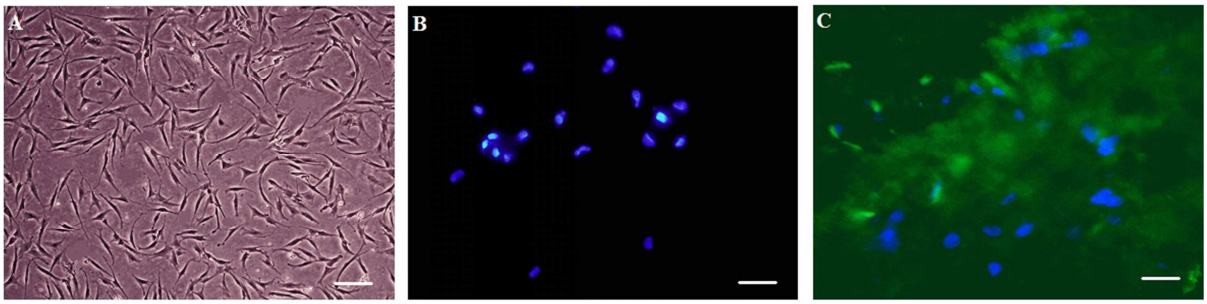
مطالعه‌ی نخاع پس از پیوند: جهت بررسی وجود سلول‌های نشان‌دار (Hoechst مثبت) در ناحیه‌ی پیوند، ۴ هفته بعد از پیوند سلولی، موش‌های صحرایی با استفاده از دز کشنده‌ی ۲۰۰ میلی‌گرم/۱۰۰۰ گرم کتامین و ۲۰ میلی‌گرم/۱۰۰۰ گرم Xylazine بیهوش شدند و نخاع آن‌ها به روش Cardiac perfusion تثبیت گردید. بعد از لامینکتومی، بخشی از نخاع شامل منطقه‌ی لامینکتومی شده و مهره‌ی بالا و پایین‌تر برداشته شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، درون پارافرمالدئید ۴ درصد دوباره تثبیت گردید.

سپس، بافت در PBS ۰/۱ مولار و سوکروز ۳۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت و در نهایت، ۱ سانتی‌متر از طناب نخاعی که حاوی ناحیه‌ی پیوندی بود، برداشته شد و مقاطع کرایو به صورت مقاطع سریال با ضخامت ۱۰ میکرومتر روی اسلاید قرار گرفت؛ آن گاه، با روش ایمونوهیستوشیمی و با استفاده از آنتی‌بادی اولیه‌ی Anti-myelin basic protein (Anti MBP) و آنتی‌بادی ثانویه و مطابق با شیوه‌نامه‌ی قبلی (۲۳)، حضور سلول‌های نشان‌دار (Hoechst مثبت) در ناحیه‌ی پیوند سلولی مورد بررسی قرار گرفت.

تکنیک میکروسکوپ الکترونی: برای انجام این روش، موش های صحرایی با استفاده از دز کشنده‌ی ۲۰۰ میلی‌گرم/۱۰۰۰ گرم کتامین و ۲۰ میلی‌گرم/۱۰۰۰ گرم Xylazine بیهوش شدند و بافت‌ها، با استفاده از گلوتارآلدهید ۲ درصد و پارافرمالدهید ۴ درصد در بافر سدیم کاکودیلات ۰/۱ مولار با pH برابر ۷/۴ تثبیت گردید. در ادامه، بخشی از طناب نخاعی که حاوی ناحیه‌ی پیوندی بود،

به قطعات ۱ میلی‌متری بریده شد و در تتراکسید اسمیوم ۱ درصد در بافر کاکودیلات ۰/۱ مولار به مدت ۱ ساعت قرار داده شد. پس از آب‌گیری و قالب‌گیری، با استفاده از اولترا میکروتوم مقاطع ۱ میکرومتری تهیه شد و بعد از رنگ‌آمیزی، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی بررسی گردید.

آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) و آزمون One-way ANOVA انجام شد. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد و $P < ۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.



شکل ۱. تصاویر میکروسکوپ فاز کنتراست و فلوئورسانس از سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی انسان. A) سلول‌های بنیادی قبل از پیوند، B) سلول‌های بنیادی نشان‌دار شده با Hoechst قبل از پیوند، C) چهار هفته بعد از پیوند سلولی، میلین به رنگ سبز و هسته‌ی سلول‌های بنیادی به رنگ آبی. (شاخص مقایسه در A برابر ۲۰۰ میکرومتر و در B و C برابر ۱۰۰ میکرومتر می‌باشد).

یافته‌ها

جداسازی، کشت و نشان‌دار کردن سلول‌های بنیادی از بافت چربی

سلول‌های جداسازی شده از بافت چربی، حدود ۶ ساعت بعد از کشت اولیه با ظاهری گرد به ته فلاسک اتصال پیدا کردند. با گذشت زمان، این سلول‌ها ظاهری دوکی شکل مشابه با سلول‌های فیبروبلاست پیدا کردند (شکل ۱-A). جهت نشان‌دار کردن و پیوند سلولی، از سلول‌های پاساژ سوم به لحاظ داشتن ظاهری به نسبت یکنواخت استفاده شد. بیش از ۹۵ درصد این سلول‌ها، با رنگ Hoechst نشان‌دار شده بودند (شکل ۱-B).

یافته‌های ایمونوهیستوشیمی نواحی دمیلینه- رمیلینه شده

۴ هفته بعد از پیوند سلولی، به منظور تعیین وجود سلول‌های نشاندار (Hoechst مثبت)، مقاطع طولی از بافت نخاع تهیه شد و با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی مشخص گردید که سلول‌های نشان‌دار تا پایان زمان مطالعه در ناحیه‌ی پیوند حضور داشتند (شکل ۱-C).

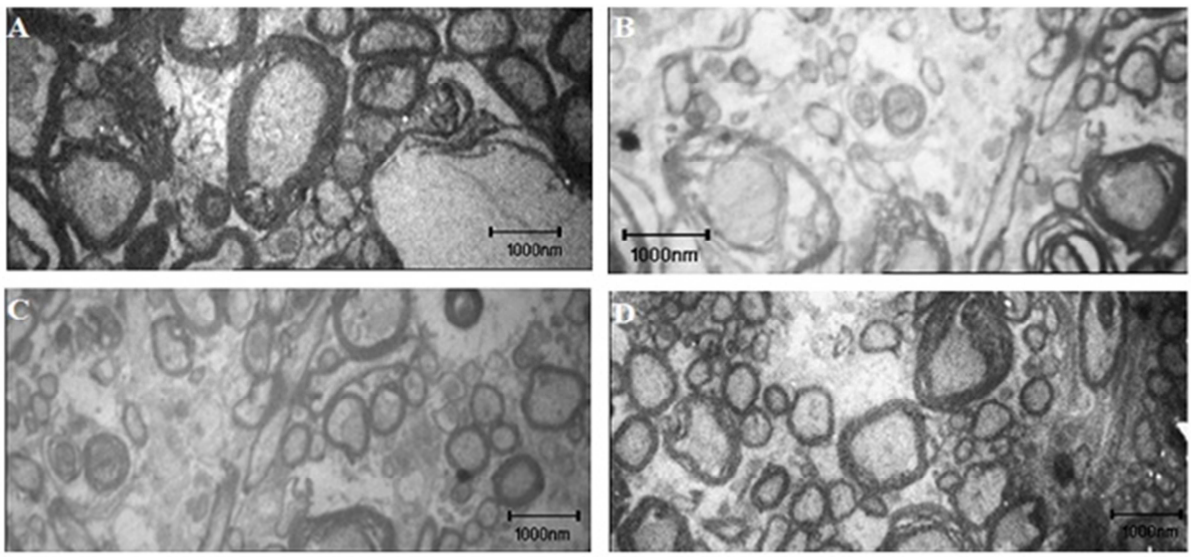
یافته‌های میکروسکوپ الکترونی

جهت بررسی وجود میلین سنتز شده در ناحیه‌ی ضایعه، از هر گروه دو مقطع برای مشاهده و بررسی با میکروسکوپ الکترونی، آماده‌سازی و مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲).

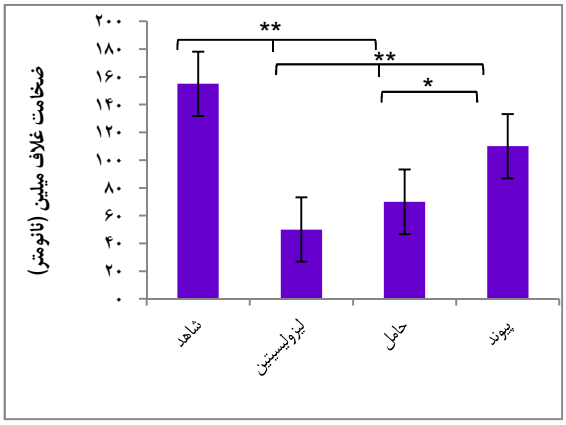
در ادامه، با استفاده از نرم‌افزار Image j و در ۴ اسلاید انتخاب شده به صورت تصادفی، ضخامت غلاف میلین در اطراف ۱۰۰ آکسون میلین‌دار اندازه‌گیری شد.

میانگین ضخامت غلاف میلین در گروه شاهد ۱۴/۳۴ ± ۱۵۳/۲۶، گروه لیزولسیتین ۷/۳۱ ± ۵۴/۷۳، گروه حامل ۴/۲۴ ± ۶۹/۲ و گروه پیوند ۱۶/۵۰ ± ۱۱۱/۲۶ نانومتر بود.

مقایسه‌ی میانگین‌ها نشان داد که ضخامت غلاف میلین در گروه پیوند سلولی نسبت به گروه‌های لیزولسیتین و حامل، به طور قابل توجهی افزایش پیدا کرده است ($P < ۰/۰۵$) (شکل ۳).



شکل ۲. تصاویر میکروسکوپ الکترونی از طناب نخاعی ۴ هفته بعد از پیوند سلولی در گروه‌های مختلف. A) گروه شاهد، B) گروه لیزولسیتین، C) گروه حامل و D) گروه پیوند سلولی

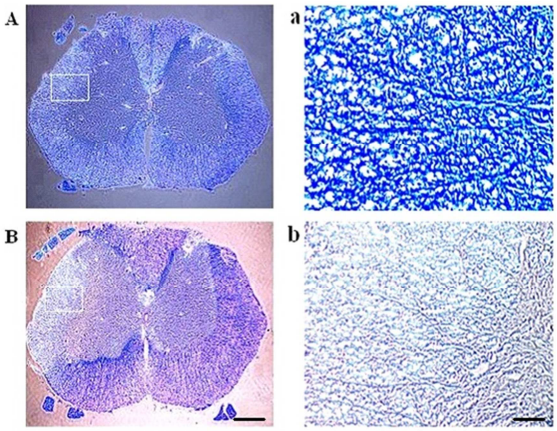


شکل ۳. مقایسه‌ی میانگین ضخامت غلاف میلین ۴ هفته بعد از پیوند سلولی در گروه‌های مختلف

(** نمایانگر P < ۰/۰۰۱ و * نمایانگر P < ۰/۰۵۰ است).

یافته‌های بافت‌شناسی نواحی دمیلینه شده

نتایج رنگ‌آمیزی LFB از نواحی دمیلینه، یک هفته بعد از ایجاد مدل MS نشان داد که تزریق لیزولسیتین باعث تخریب میلین می‌شود و این مناطق، نسبت به مناطق مجاور رنگ کمتری به خود می‌گیرند (شکل ۴).



شکل ۴. تصاویر میکروسکوپ نوری از مقاطع عرضی نخاع قبل (A, a) و بعد از تزریق لیزولسیتین با بزرگنمایی ۴۰ x (A, B) و ۲۰۰x (a,b)

بحث

بیماری MS نوعی بیماری مزمن و از گروه بیماری‌های خود ایمنی می‌باشد که به طور معمول در بالغین جوان و به نسبت بیشتر در خانم ها دیده می‌شود (۵). مبتلایان به این بیماری، به علت آسیب‌های پیش رونده‌ی سیستم عصبی مرکزی، از ناتوانی‌های شناختی و فیزیکی رنج می‌برند (۲۰). تخریب پیش رونده‌ی میلین، به دلیل مرگ برنامه ریزی شده‌ی سلول های الیگودندروسیت که به دنبال التهابات موضعی در سیستم عصبی ایجاد می‌شود، از جمله مکانیسم های اصلی در ایجاد این ناتوانی‌ها می‌باشد. علاوه بر این، اختلالات عروقی، تجمع آهن، اختلال در عملکرد صحیح میتوکندری‌ها، تغییر در نفوذپذیری غشای سلولی و کانال‌های سدیمی و اختلال در پتانسیل عمل و هدایت عصبی، از مکانیسم‌های دیگر در ایجاد ناتوانی‌ها می‌باشند (۲۴، ۱۰).

علت اصلی بروز این بیماری به طور کامل مشخص نیست، اما سوابق ژنتیکی فرد (۲۵)، به همراه عوامل پاتولوژیک محیطی (۲۷-۲۶)، در ایجاد این بیماری مؤثر می‌باشند. در حال حاضر، درمان‌های اصلاح کننده‌ای که برای بیماری MS وجود دارد، بر اساس استفاده از داروهای تعدیل کننده و سرکوب کننده‌ی سیستم ایمنی مانند اینترفرون آلفا (IFN-α یا Interferon-α) می‌باشند (۲۸). مکانیسم اصلی عملکرد این داروها، به طور کامل مشخص نیست، اما مطالعات انجام شده در این زمینه، نشان داده است که این داروها می‌توانند از طریق بهبود ستز میلین (۲۹)، رهایی Transforming growth factor-beta (TGF-β) (۳۰)، مهار مهاجرت سلول‌های لنفوسیت B و T از سد خونی- مغزی (۳۱)، افزایش سطح سیتوکاین‌ها (IL-10 یا Interleukin-10، TNF-α یا Tumor necrosis factor-alpha و IL-4) (۳۲) و کاهش فعالیت‌های متالوپروتئازهای ماتریکسی (۳۳) تا حدودی از پیشرفت بیماری MS جلوگیری کنند.

با این حال، این روش‌های درمانی قادر نیستند که پیشرفت بیماری MS را به طور کامل متوقف سازند. بنا بر این، راهبرد درمانی مؤثرتری مورد نیاز است. استفاده از سلول‌های بنیادی، به دلیل داشتن پتانسیل تعدیل کنندگی ایمنی، راهبرد امیدوار کننده‌ای را در درمان بیماری‌های نورودژنراتیو به وجود آورده است. شواهد موجود نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی، قادر به تولید مجموعه‌ای از سیتوکاین‌ها مانند IL-6 و TGF-β می‌باشند (۳۴) که به طور مؤثر می‌توانند تکثیر و عملکرد لنفوسیت T تنظیم کننده را تعدیل بخشند (۳۵).

در مطالعات آزمایشگاهی، توانایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در تولید و ترشح عوامل نوروتروفیک تأیید شده است (۳۷-۳۶). به تازگی، بافت چربی به عنوان یک منبع مناسب از سلول های بنیادی برای درمان مبتنی بر سلول‌های بنیادی مورد توجه قرار گرفته است؛ چرا که سلول های بنیادی موجود در این بافت را می‌توان به مقدار کافی و با حداقل دستکاری‌های جراحی جداسازی کرد (۳۸).

نتایج مطالعه‌ی رضوی و همکاران (۳۹) نشان داد که القای سلول‌های Human adipose-derived stromal/stem cells (hADSCs) در شرایط آزمایشگاهی، منجر به تولید و ترشح عوامل نوروتروفینی می‌گردد. بنا بر این، با توجه به پتانسیل این سلول‌ها در تعدیل پاسخ‌های ایمنی و تحریک نوروژنز، می‌توان از این سلول‌ها در درمان بیماری‌های نورودژنراتیو بهره برد.

اگر چه مکانیسم‌های دقیق مسؤول اثرات درمانی این سلول‌ها به طور کامل مشخص نیست، اما به نظر می‌رسد قابلیت مهاجرتی این

سلول‌ها و ترشح عوامل نوروتروفیک توسط آن‌ها، در کارایی این سلول‌ها دخیل باشد. در راستای این فرضیه، Sadan و همکاران توانایی مهاجرت سلول‌های ترشح کننده‌ی عوامل نوروتروفیک به سمت ضایعات عصبی را به اثبات رساندند (۴۰).

در مطالعه‌ی حاضر، سلول‌های hADSC برای پیوند در مدل بیماری MS استفاده شد. بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی از نواحی پیوند سلولی، نشان داد که در گروه پیوند سلولی، نواحی دمیلینه کاهش و مناطق دارای میلین‌سازی مجدد افزایش یافته است. برای توجیه این مسأله، می‌توان احتمال داد که سلول‌های hADSCs با سنتز طیف وسیعی از عوامل نوروتروفیک، قادرند که بر روی سلول‌های بنیادی مجاور تأثیر بگذارند و تمایز این سلول‌ها را به سمت سلول‌های اولیگودندروسیت پیش ببرند. حضور میلین و سلول‌های الیگودندروسیت با استفاده از رنگ‌آمیزی LFB و روش ایمونوهیستوشیمی در مطالعه‌ی دیگری اثبات شد که با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر، همسو می‌باشد (۲۳).

نتایج مطالعه‌ی Lopatina و همکاران با نتایج مطالعه‌ی حاضر همسو می‌باشند. در این مطالعه، سلول‌های ADSCs جهت ترمیم فیبرهای عصبی محیطی پیوند شدند. بهبودی اعصاب محیطی در این مطالعه، به بیان ژن‌های ویژه‌ی نوروتروفینی و بیان ژن‌های مربوط به پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی مورد نیاز برای رشد نورون و سنتز میلین، نسبت داده شد (۴۱).

در مجموع، با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه، می‌توان گفت که سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، از طریق سنتز سطح بالایی از عوامل نوروتروفیک، می‌توانند باعث پیشبرد فرایند تمایز سلول‌های الیگودندروسیت شوند. به علاوه، این سلول‌ها با پیشبرد فرایند میلین‌سازی مجدد و بهبود انتقال پتانسیل عمل، می‌توانند علایم بیماری MS را بهبود بخشند. بنا بر این، سلول‌های hADSCs را می‌توان به عنوان یک منبع سلولی مناسب در زمینه‌ی سلول‌درمانی بیماری MS مورد توجه خاص قرار داد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از طرح تحقیقاتی شماره‌ی ۱۸۹۰۶۷ می‌باشد که با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شده است. بدین وسیله از مقامات این دانشگاه و همچنین ستاد فن‌آوری سلول‌های بنیادی سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Charct JM. Histologie de la scle´rose en plaques. Paris, France: Imprimerie L. Poupart- davyl; 1868.
2. Lynch SG, Kroencke DC, Denney DR. The relationship between disability and depression in multiple sclerosis: the role of uncertainty, coping, and hope. Mult Scler 2001; 7(6): 411-6.
3. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. Lancet 2008; 372(9648): 1502-17.
4. Connick P, Kolappan M, Patani R, Scott MA, Crawley C, He XL, et al. The mesenchymal stem cells in multiple sclerosis (MSCIMS) trial protocol and baseline cohort characteristics: an open-label pre-test: post-test study with blinded outcome assessments. Trials 2011; 12: 62.
5. Khan F, Turner-Stokes L, Ng L, Kilpatrick T. Multidisciplinary rehabilitation for adults with multiple sclerosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2008; 79(2): 114.
6. Steinman L. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. Cell 1996; 85(3): 299-302.
7. Ebers GC, Sadovnick AD, Risch NJ. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. Nature 1995; 377(6545): 150-1.
8. Fulgenzi A, Zanella SG, Mariani MM, Vietti D, Ferrero ME. A case of multiple sclerosis improvement following removal of heavy metal intoxication: lessons learnt from Matteo's case. Biometals 2012; 25(3): 569-76.
9. Ascherio A, Munger K. Epidemiology of multiple sclerosis: from risk factors to prevention. Semin Neurol 2008; 28(1): 17-28.
10. Gandhi R, Laroni A, Weiner HL. Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. J Neuroimmunol 2010; 221(1-2): 7-14.
11. Mi S, Miller RH, Tang W, Lee X, Hu B, Wu W, et al. Promotion of central nervous system remyelination by induced differentiation of oligodendrocyte precursor cells. Ann Neurol 2009; 65(3): 304-15.
12. Rizvi SA, Agius MA. Current approved options for treating patients with multiple sclerosis. Neurology 2004; 63(12 Suppl 6): S8-14.
13. Ben-Hur T, Goldman SA. Prospects of cell therapy for disorders of myelin. Ann N Y Acad Sci 2008; 1142: 218-49.
14. Yang J, Rostami A, Zhang GX. Cellular remyelinating therapy in multiple sclerosis. J Neurol Sci 2009; 276(1-2): 1-5.
15. Razavi S, Mardani M, Kazemi M, Esfandiari E, Narimani M, Esmaeili A, et al. Effect of leukemia inhibitory factor on the myelinogenic ability of Schwann-like cells induced from human adipose-derived stem cells.Cell Mol Neurobiol 2013; 33(2): 283-9.
16. Schipper BM, Marra KG, Zhang W, Donnenberg AD, Rubin JP. Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells. Ann Plast Surg 2008; 60(5): 538-44.
17. Kalbermatten DF, Schaakxs D, Kingham PJ, Wiberg M. Neurotrophic activity of human adipose stem cells isolated from deep and superficial layers of abdominal fat. Cell Tissue Res 2011; 344(2): 251-60.

18. Kingham PJ, Kalbermatten DF, Mahay D, Armstrong SJ, Wiberg M, Terenghi G. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. Exp Neurol 2007; 207(2): 267-74.
19. di Summa PG, Kingham PJ, Raffoul W, Wiberg M, Terenghi G, Kalbermatten DF. Adipose-derived stem cells enhance peripheral nerve regeneration. J Plast Reconstr Aesthet Surg 2010; 63(9): 1544-52.
20. Cai L, Johnstone BH, Cook TG, Tan J, Fishbein MC, Chen PS, et al. IFATS collection: Human adipose tissue-derived stem cells induce angiogenesis and nerve sprouting following myocardial infarction, in conjunction with potent preservation of cardiac function. Stem Cells 2009; 27(1): 230-7.
21. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. Trends Biotechnol 2006; 24(4): 150-4.
22. Boido M, Garbossa D, Vercelli A. Early graft of neural precursors in spinal cord compression reduces glial cyst and improves function. J Neurosurg Spine 2011; 15(1): 97-106.
23. Ghasemi N, Razavi S, Mardani M, Esfandiari E, Salehi H, Zarkesh Esfahani SH. Transplantation of human adipose-derived stem cells enhances remyelination in lysolecithin-induced focal demyelination of rat spinal cord. Mol Biotechnol 2014; 56(5): 470-8.
24. Hasan KM, Walimuni IS, Abid H, Datta S, Wolinsky JS, Narayana PA. Human brain atlas-based multimodal MRI analysis of volumetry, diffusimetry, relaxometry and lesion distribution in multiple sclerosis patients and healthy adult controls: implications for understanding the pathogenesis of multiple sclerosis and consolidation of quantitative MRI results in MS. J Neurol Sci 2012; 313(1-2): 99-109.
25. Barcellos LF, Oksenberg JR, Begovich AB, Martin ER, Schmidt S, Vittinghoff E, et al. HLA-DR2 dose effect on susceptibility to multiple sclerosis and influence on disease course. Am J Hum Genet 2003; 72(3): 710-6.
26. Brown RC, Lockwood AH, Sonawane BR. Neurodegenerative diseases: an overview of environmental risk factors. Environ Health Perspect 2005; 113(9): 1250-6.
27. Fujinami RS, von Herrath MG, Christen U, Whitton JL. Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease. Clin Microbiol Rev 2006; 19(1): 80-94.
28. Hemmer B, Nessler S, Zhou D, Kieseier B, Hartung HP. Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. Nat Clin Pract Neurol 2006; 2(4): 201-11.
29. Loma I, Heyman R. Multiple sclerosis: pathogenesis and treatment. Curr Neuropharmacol 2011; 9(3): 409-16.
30. Preiningerova J. Oral laquinimod therapy in relapsing multiple sclerosis. Expert Opin Investig Drugs 2009; 18(7): 985-9.
31. Vollmer T, Stewart T, Baxter N. Mitoxantrone and cytotoxic drugs' mechanisms of action. Neurology 2010; 74(Suppl 1): S41-S46.
32. Racke MK, Lovett-Racke AE, Karandikar NJ. The mechanism of action of glatiramer acetate treatment in multiple sclerosis. Neurology 2010; 74(Suppl 1): S25-S30.
33. Dhib-Jalbut S, Marks S. Interferon-beta mechanisms of action in multiple sclerosis. Neurology 2010; 74(Suppl 1): S17-S24.
34. Svobodova E, Krulova M, Zajicova A, Pokorna K, Prochazkova J, Trosan P, et al. The role of mouse mesenchymal stem cells in differentiation of naive T-cells into anti-inflammatory regulatory T-cell or proinflammatory helper T-cell 17 population. Stem Cells Dev 2012; 21(6): 901-10.
35. Bettini M, Vignali DA. Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity. Curr Opin Immunol 2009; 21(6): 612-8.
36. Pisati F, Bossolasco P, Meregalli M, Cova L, Belicchi M, Gavina M, et al. Induction of neurotrophin expression via human adult mesenchymal stem cells: implication for cell therapy in neurodegenerative diseases. Cell Transplant 2007; 16(1): 41-55.
37. Razavi S, Razavi MR, Zarkesh EH, Kazemi M, Mostafavi FS. Comparing brain-derived neurotrophic factor and ciliary neurotrophic factor secretion of induced neurotrophic factor secreting cells from human adipose and bone marrow-derived stem cells. Dev Growth Differ 2013; 55(6): 648-55.
38. Sen A, Lea-Currie YR, Sujkowska D, Franklin DM, Wilkison WO, Halvorsen YD, et al. Adipogenic potential of human adipose derived stromal cells from multiple donors is heterogeneous. J Cell Biochem 2001; 81(2): 312-9.
39. Razavi S, Razavi MR, Kheirollahi-Kouhestani M, Mardani M, Mostafavi FS. Co-culture with neurotrophic factor secreting cells induced from adipose-derived stem cells: promotes neurogenic differentiation. Biochem Biophys Res Commun 2013; 440(3): 381-7.
40. Sadan O, Melamed E, Offen D. Intrastriatal transplantation of neurotrophic factor-secreting human mesenchymal stem cells improves motor function and extends survival in R6/2 transgenic mouse model for Huntington's disease. PLoS Curr 2012; 4: e4f7f6dc013d4e.
41. Lopatina T, Kalinina N, Karagyaur M, Stambolsky D, Rubina K, Revischin A, et al. Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth de novo. PLoS One 2011; 6(3): e17899.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 16.10.2015
Vol. 33, No. 366, 2nd Week, March 2016
Accepted: 14.02.2016

Improvement of Myelin Ultrastructure after Transplantation of Human Adipose Tissue-Derived Stem Cell in Rat Multiple Sclerosis Model

Nazem Ghasemi PhD[1], Shahnaz Razavi PhD[2], Hosein Salehi PhD[1]

Original Article

Abstract

Background: Multiple sclerosis (MS) is a kind of the chronic neurodegenerative diseases of central nervous system (CNS) which usually is associated with neurological disability. In this study, human adipose-derived stromal/stem cells (hADSCs) were transplanted into a rat model of multiple sclerosis (MS) and the efficiency of these cells in remyelination process was determined.

Methods: Forty adult rats were randomly divided into control, lysolecithin, lysolecithin with medium (vehicle), and lysolecithin with human adipose-derived stromal/stem cells transplantation groups; then, focal demyelination was induced via lysolecithin injection into lateral column of spinal cord. One week after the lysolecithin injection, laminectomy site was re-exposed and for vehicle group, 10 µl of medium and for the transplantation group 10 µl of medium containing 1×10^6 stem cells was transplanted. For the control and lysolecithin groups, just laminectomy site was re-exposed and closed again without intervention. Four weeks after the cell transplantation, immunohistochemistry technique was used for assessment of the presence of stem cells in damaged spinal cord and to assess the extent of demyelination and remyelination, transmission electron microscope was used.

Findings: Immunohistochemistry study four weeks after cell transplantation showed that the stem cell transplant existed in the lesion site. In addition, the electron microscope micrographs showed that myelin synthesis increased more in the cell transplantation group compared to the other groups.

Conclusion: Human adipose tissue-derived stem cell transplantation may be an appropriate method for cell therapy in neurodegenerative diseases such as multiple sclerosis.

Keywords: Multiple sclerosis, Stem cell, Lysolecithin, Cell transplantation

Citation: Ghasemi N, Razavi Sh, Salehi H. **Improvement of Myelin Ultrastructure after Transplantation of Human Adipose Tissue-Derived Stem Cell in Rat Multiple Sclerosis Model.** J Isfahan Med Sch 2016; 33(366): 2333-40

1- Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Professor, Department of Anatomical Sciences and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Shahnaz Razavi PhD, Email: razavi@med.mui.ac.ir