مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و یکم/شماره ۲۴۹/هفته سوم مهر ماه ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۲/۱۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۵/۲۰

بررسی تأثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی ترانسفکت‌شده با اینترلوکین ۲۷ بر برخی از شاخص‌های هیستولوژیکی و ایمونولوژیکی در مدل موشی انسفالومیلیت خودایمن تجربی

دکتر محمد شفیع مجددی[۱]، دکتر رحیم گل‌محمدی[۲]، دکتر حسین خان‌احمد[۳]، دکتر امید غلامی[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سلول‌های بنیادی مزانشیمی با داشتن خواص ایمونومدولاتور و نوروپروتکشن، می‌توانند کاندیدای مناسبی برای درمان بیماری‌های التهابی و نورودژنراتیو باشند. به علاوه، با دستکاری‌های ژنتیکی می‌توان خواص درمانی این سلول‌ها را ارتقا داد. هدف از انجام این تحقیق، بررسی تأثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی ترانسفکت‌شده با ژن سیتوکین ضد التهابی IL-27 (Interleukin 27) در مدل موشی انسفالومیلیت خودایمن تجربی (Experimental autoimmune encephalomyelitis یا EAE) بود.

روش‌ها: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، از مغز استخوان موش‌های C57BL/6 جدا شدند و با بهره‌گیری از وکتور لنتی‌ویروسی، ژن IL-27 به آن‌ها منتقل شد. در ادامه، تعداد یک میلیون از این سلول‌ها در روزهای ۱۵ و ۲۲ از شروع القای بیماری EAE، به موش‌های بیمار تزریق شد. در پایان، موش‌ها کشته شدند و آزمایشات هیستولوژیکی و ایمونولوژیکی، به ترتیب جهت بررسی وضعیت سلامت میلین و ارتشاح سلول‌های التهابی در بافت مغزی و سنجش برخی سیتوکین‌ها انجام گرفت.

یافته‌ها: سلول‌های مزانشیمی ترانسفکت شده با IL-27 توانستند شدت علایم EAE را در موش‌های تحت تیمار کاهش دهند. همچنین ارتشاح سلول‌های التهابی را به بافت عصبی کم نمودند و از تخریب بیشتر میلین جلوگیری کردند. به علاوه، آن‌ها توانستند باعث القای افزایش تولید سیتوکین‌های ضد التهابی IL-4 و IL-10 و کاهش تولید سیتوکین التهابی IL-17 از سلول‌های طحالی موش‌های تحت تیمار شوند.

نتیجه‌گیری: سلول‌های مزانشیمی ترانسفکت‌شده با IL-27 می‌توانند کاندیدای مناسبی در درمان بیماری‌های التهابی نظیر مولتیپل اسکلروز باشند. با این حال، اتخاذ پروتکل‌های درمانی دیگری نظیر تغییر دوز و مسیر تزریق سلول‌ها برای کسب نتایج مطلوب‌تر پیشنهاد می‌شود.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، اینترلوکین ۲۷، بیماری انسفالومیلیت خودایمن تجربی، وکتور لنتی‌ویروسی، التهاب

ارجاع: شفیع مجددی محمد، گل‌محمدی رحیم، خان‌احمد حسین، غلامی امید. **بررسی تأثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی ترانسفکت‌شده با اینترلوکین ۲۷ بر برخی از شاخص‌های هیستولوژیکی و ایمونولوژیکی در مدل موشی انسفالومیلیت خودایمن تجربی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۴۹): ۱۲۸۴-۱۲۷۰

۱- استادیار، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، پژوهشکده‌ی نوروفارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
۲- دانشیار، گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران
۳- استادیار، گروه آناتومی و ژنتیک، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- استادیار، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر محمد شفیع مجددی
Email: msh_mojadadi@kmu.ac.ir

مقدمه

مولتیپل اسکلروزیس (Multiple sclerosis یا MS) بیماری مزمن التهابی سیستم عصبی مرکزی (Central nervous system یا CNS) می‌باشد. در سراسر جهان، نزدیک به ۲/۵ میلیون نفر به این بیماری مبتلا هستند و متأسفانه درمان قطعی هم برای آن وجود ندارد (۱). اگر چه هنوز علت اصلی بیماری MS مشخص نیست، اما سلول‌های ایمنی نظیر سلول‌های TCD4+ (T helper یا T cluster of differentiation 4+) و TCD8+ (T cytotoxic یا T cluster of differentiation 8+) با ارتشاح به داخل CNS، نقش عمده‌ای در پاتوژنز این بیماری و تخریب میلین بر عهده دارند (۲). به همین دلیل، محدود کردن پاسخ‌های التهابی و ترمیم آسیب‌های وارده به CNS، می‌تواند راهکارهای مناسبی در درمان و یا تخفیف علایم بیماری MS باشد. بیماری انسفالومیلیت خودایمن تجربی (Experimental autoimmune encephalomyelitis یا EAE) در جوندگان، به علت داشتن ویژگی‌های پاتولوژیکی و هیستولوژیکی فراوان با بیماری MS در انسان‌ها، سال‌هاست که به منظور تحقیق در زمینه‌ی مکانیسم‌های دخیل در بیماری MS و همچنین کشف راه‌های جدید درمانی، مورد استفاده پژوهشگران قرار می‌گیرد (۳).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌های خود تجدیدشونده و چند توانه می‌باشند و می‌توان آن‌ها را به طور عمده از مغز استخوان و یا از بافت‌های دیگری نظیر بافت چربی، اپیدرم و خون بند ناف جدا کرد. سلول‌های مزانشیمی این قابلیت را دارند تا به انواع مختلفی از سلول‌ها از جمله سلول‌های استخوان، غضروف، چربی، کبد، ماهیچه‌ی قلب و عصبی تبدیل شوند (۴). مطالعات نشان می‌دهند که سلول‌های مزانشیمی می‌توانند عملکرد انواع سلول‌های ایمنی را تحت تأثیر قرار دهند. به عنوان مثال، سلول‌های مزانشیمی از فعالیت سلول‌های TCD4+ و TCD8+ در پاسخ به آلوآنتی‌ژن‌ها و میتوژن‌ها ممانعت به عمل می‌آورند (۵)؛ عملکرد سلول‌های NK (Natural killer) و سلول‌های T سیتوتوکسیک را مهار می‌کنند و از شکل‌گیری سلول‌های Th1 (T helper 1) و Th17 جلوگیری می‌کنند (۶). علاوه بر ویژگی‌های ایمونومدولاتوری، سلول‌های مزانشیمی با تولید عوامل مختلفی نظیر BDNF (Brain-derived neurotrophic factor)، NGF (Nerve growth factor)، VEGF (Vascular endothelial growth factor)، CNT (Carbon nanotube) و FGF-2 (Fibroblast growth factor-2) باعث افزایش الیگودندروژنز (۷)، تحریک تکثیر، مهاجرت و تمایز سلول‌های بنیادی عصبی اندوژن (۸)، بقای نورون‌ها (۹)، رشد آکسون‌ها (۱۰) و همچنین حفاظت از نورون‌ها در برابر استرس‌های اکسیداتیو می‌شوند (۱۱). همچنین، سلول‌های مزانشیمی با افزایش روند رگ‌زایی و تشکیل رگ‌های جدید، در پروسه‌ی ترمیم بافت عصبی مرکزی مشارکت می‌کنند (۱۲).

امروزه با عمل انتقال ژن به سلول‌های مزانشیمی، می‌توان ویژگی‌ها و کاربردهای درمانی این سلول‌ها را ارتقا بخشید. در این صورت، می‌توان از این سلول‌ها به منظور تحویل ژن به نقاط آسیب‌دیده‌ی بدن استفاده کرد تا ضمن بروز پروتئین مورد نظر، روند مبارزه با بیماری و یا ترمیم آسیب تسریع شود. به

عنوان مثال در مطالعه‌ای که توسط Nakamura و همکاران انجام گرفت، اثرات ضد توموری سلول‌های مزانشیمی، با انتقال ژن IL-2 (Interlukin) به آن‌ها افزایش یافت و توانست باعث بقای بیشتر رت‌های مبتلا به گلیوما شود (۱۳). در مطالعه‌ی دیگری، انتقال ژن Akt1 (رمزدهنده‌ی پروتئین عامل بقای Akt) به سلول‌های مزانشیمی و پیوند این سلول‌ها به رت‌های دچار ایسکمی میوکارد، توانست باعث بهبود عملکرد قلب شود (۱۴).

IL-27، به عنوان یک سیتوکین ضد التهابی می‌تواند گزینه‌ی مناسبی جهت محدود کردن پاسخ‌های التهابی آسیب‌رسان، در بیماری‌های التهابی نظیر MS و مدل حیوانی آن، بیماری EAE، باشد. مطالعات انجام‌گرفته در مدل EAE نشان داده است که IL-27 می‌تواند سبب محدود کردن پاسخ‌های التهابی ناشی از سلول‌های Th17 در CNS شود (۱۵). همچنین، این سیتوکین می‌تواند با تغییر الگوی پاسخ‌های ایمنی از پاسخ‌های التهابی Th1 و Th17 به سمت پاسخ‌های ضد التهابی Th2، شدت بیماری EAE را در موش‌ها کاهش دهد و با ایجاد یک حالت مقاومت (Tolerance) در سلول‌های ایمنی، مانع از پاسخ‌دهی بیش از حد آن‌ها به آنتی‌ژن میلین در شرایط Ex vivo شود (۱۶).

با توجه به مطالب فوق، هدف از انجام این مطالعه این بود که آیا انتقال ژن IL-27 به سلول‌های بنیادی مزانشیمی و تزریق این سلول‌ها به موش‌های مبتلا به EAE، می‌تواند باعث بهبودی شرایط در آن‌ها شود. به منظور دستیابی به این هدف، متعاقب تزریق سلول‌های بنیادی مزانشیمی ترانسفکت‌شده با IL-27 به موش‌های EAE، برخی پارامترهای هیستولوژیکی و ایمونولوژیکی در آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

جداسازی و تأیید هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان

در این تحقیق، کار بر روی موش‌ها بر اساس دستور کار کمیته‌ی اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی کرمان انجام گرفت. سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر اساس خاصیت چسبندگی خود به کف پلیت کشت سلول و بر طبق پروتکل اشارهشده توسط مجددی و همکاران (۱۷)، از مغز استخوان موش‌های نر C56BL/6 ۶ تا ۸ هفته‌ای (انیستیتو پاستور، تهران) جدا شدند و سپس تأیید هویت شدند. به طور خلاصه، مغز استخوان‌های فمور و تیبیای سه سر موش نر نژاد C57BL/6 (انستیتو پاستور تهران) ۶ تا ۸ هفته‌ای، در شرایط استریل و با تزریق محیط DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium) حاوی ۱۰ درصد FBS (Fetal bovine serum)، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین (تمامی مواد از شرکت GIBCO/BRL) در داخل دو عدد فلاسک کشت سلول T75 تخلیه شد. فلاسک‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و CO_2 (Carbon dioxide) پنج درصد قرار داده شدند. سلول‌های غیر چسبنده، با عمل تعویض محیط کشت دور ریخته شدند. به منظور تأیید هویت، سلول‌های چسبیده به کف پلیت هم از نظر توانایی تمایز به سلول‌های چربی و سلول‌های استخوانی و هم از نظر مارکرهای سطح سلولی CD24، CD29، CD44، CD45 و CD11b (با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال کونژوگه با

فلوروکرم از شرکت eBioscience)، با بهره‌گیری از تکنیک فلوسایتومتری، مورد بررسی قرار گرفتند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از تأیید هویت، برای مرحله‌ی بعدی کار مورد استفاده قرار گرفتند.

Transfection سلول‌های بنیادی مزانشیمی با ژن IL-27

پلاسمید حاوی ژن IL-27 موشی تحت عنوان pORF-mIL27 (Plasmid for open reading frames-murine IL-27)، از شرکت Invivogen خریداری شد. به منظور انتقال ژن mIL-27 به سلول‌های مزانشیمی از وکتور لنتی‌ویروس (Lentivirus) نسل دوم استفاده شد. پلاسمیدهای رمزدهنده‌ی این نوع وکتور شامل پلاسمید p240 که پلاسمید حاوی توالی‌های (Long terminal repeat) LTR ویروس لنتی و همچنین ژن کدکننده‌ی پروتئین فلوئورسنت سبز (Cignal lenti positive controls) CFP است، psPAX2 که پلاسمید کدکننده‌ی پروتئین‌های ساختاری ویروس لنتی است و pMD2G که پلاسمید کدکننده‌ی گلیکوپروتئین G ویروس VSV (Vesicular stomatitis virus) است، از شرکت Addgene، از آقای دکتر یوسف قیصری (شرکت سبز، تهران) هدیه گرفته شد. در ابتدا با استفاده از آنزیم‌های Xma1 و BamH1 (هر دو از شرکت فرمنتاز) ژن mIL-27 از پلاسمید pORF-mIL27 بیرون کشیده شد و به کمک همین آنزیم‌ها در پلاسمید p240 ساب‌کلون شد. نتیجه‌ی کار تولید پلاسمید نوترکیب p240-mIL27 بود که علاوه بر ژن mIL-27، مارکر فلورسنت GFP (Green fluorescent protein) را نیز رمزدهی کرد. وجود ژن GFP در پلاسمید p240، این امکان را فراهم می‌آورد تا در موارد انتقال ژن به سلول‌ها، به آسانی انتقال ژن را با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری و یا میکروسکوپ فلورسانس ردیابی کرد. در ادامه، پس از تأیید تولید mIL-27 از پلاسمید p240-mIL27 (از طریق ترانسفکشن سلول‌های 293T با پلاسمید مذکور و تعیین حضور mIL-27 در محیط کشت رویی سلول‌ها با روش ELISA)، این پلاسمید برای تهیه‌ی وکتور لنتی‌ویروسی نوترکیب (حاوی ژن mIL-27 و GFP) مورد استفاده قرار گرفت (۱۷).

پس از تولید ذرات لنتی‌ویروسی نوترکیب، این ذرات جهت آلوده کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی با نسبت ۵۰ ذره‌ی ویروس به ۱ سلول مزانشیمی (MOI = ۵۰) و مطابق پروتکل شرح داده شده توسط مجددی و همکاران (۱۷) مورد استفاده قرار گرفتند. در پایان، درصد سلول‌های مزانشیمی که با استفاده از این پروتکل، ژن GFP و ژن mIL-27 را دریافت کرده بودند، با تکنیک فلوسایتومتری تعیین گردید.

القای بیماری EAE در موش‌ها و تزریق سلول‌های مزانشیمی ترانسفکت‌شده با mIL-27

القای بیماری EAE در موش‌های ماده‌ی C57BL/6 با سن ۸ تا ۱۰ هفته (انیستیتو پاستور، تهران)، مطابق پروتکل شرح داده شده توسط مجددی و همکاران (۱۷) صورت گرفت. پس از ظهور علایم EAE که حدود ۱۲ تا ۱۴ روز پس از تزریق آنتی‌ژن MOG (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein) (شرکت Alexis) اتفاق افتاد، موش‌های مبتلا به EAE که از نظر میانگین علایم بیماری و تا حد امکان وزن یکسان بودند، در چهار گروه جداگانه (هر گروه ۱۰ سر موش) قرار گرفتند. سپس در دو نوبت (روزهای ۱۵ و ۲۲ از زمان شروع القای بیماری EAE)، به

موش‌های گروه ۱: یک میلیون سلول مزانشیمی ترانسفکت‌شده با mIL-27 به صورت داخل رگی، گروه ۲: یک میلیون سلول مزانشیمی طبیعی به صورت داخل رگی، گروه ۳: ۱۰۰ میکروگرم پلاسمید p240-mIL27 به صورت داخل عضلانی و گروه ۴: بافر فسفات سالین (Phosphate buffered saline یا PBS) استریل تزریق شد. موش‌ها تا زمان کشته شدن، روزانه از نظر شدت علایم بالینی بررسی و بر اساس معیارهای استاندارد نمره دهی و میانگین نمره برای هر کدام از گروه‌ها محاسبه شد نمره‌دهی بر اساس علایم شامل نمره‌ی صفر: فاقد هر گونه علایم بالینی، نمره‌ی ۱: افتادن دم (شل شدن دم)، نمره‌ی ۲: بی حسی و یا فلج نسبی اندام پشتی، نمره‌ی ۳: فلج کامل اندام پشتی، نمره‌ی ۴: فلج کامل اندام پشتی و جلویی، و نمره‌ی ۵: مرگ حیوان، بود (۱۷). یک هفته پس از آخرین تزریق، همه‌ی موش‌ها به منظور انجام آزمایش‌های ایمونولوژی و هیستوپاتولوژی کشته شدند.

اندازه‌گیری سیتوکین‌های IL-4، IL-10 و IL-17

پبه منظور اندازه‌گیری میزان تولید سیتوکین‌های IL-4، IL-10 و IL-17، ابتدا طحال هر کدام از موش‌های گروه‌های چهار گانه، در شرایط استریل جدا شد و سوسپانسیون سلول‌های طحالی تهیه شد. سپس تعداد سه میلیون سلول طحالی (بیش از ۹۵ درصد سلول‌های زنده) از هر کدام از موش‌های گروه‌های چهار گانه در مجاورت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از پپتید MOG در محیط RPMI-1640 (شرکت GIBCO) حاوی ۱۰ درصد FBS (شرکت GIBCO)، و در چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای به مدت ۷۲ ساعت کشت داده شد. پس از مدت زمان مذکور، اندازه‌گیری سیتوکین‌های IL-4، IL-10 و IL-17 در محیط کشت رویی سلول‌ها، با استفاده از کیت‌های ELISA اختصاصی هر کدام از سیتوکین‌ها (همگی از شرکت eBioscience) و بر طبق پروتکل شرکت سازنده، انجام گرفت. در پایان، مقدار هر کدام از سیتوکین‌ها برحسب پیکوگرم در میلی‌لیتر، از روی رسم نمودار استاندارد مربوط به هر سیتوکین محاسبه شد.

آزمایشات هیستوپاتولوژی

یک هفته پس از آخرین تیمار، به منظور بررسی میزان ارتشاح سلول‌های ایمنی به بافت عصبی مرکزی و همچنین بررسی وضعیت سلامت میلین، تمامی موش‌ها کشته‌شده و ساقه‌ی مغز هر کدام از آن‌ها جدا شد و پس از قرار گرفتن در فرمالین ۱۰ درصد، به آزمایشگاه پاتولوژی فرستاده شد. در آزمایشگاه پاتولوژی پس از تهیه‌ی حداقل پنج برش ۱۰ میکرومتری به ازای هر نمونه‌ی مغزی، رنگ‌آمیزی‌های H&E (Hematoxylin and eosin) و LFB (Luxol fast blue) انجام شد و نمونه‌ها به ترتیب از نظر ارتشاح سلول‌های ایمنی و وضعیت سلامت میلین توسط پاتولوژیستی که از نوع تیمارهای صورت‌گرفته به طور کامل بی اطلاع بود، مورد بررسی قرار گرفت.

در لام‌های رنگ‌آمیزی‌شده با H&E، مقدار ارتشاح سلول‌های ایمنی در حداقل ۱۰ شان میکروسکوپی برای هر برش بافتی و با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ شمرده شد و به صورت میانگین سلول‌های ایمنی ارتشاح‌یافته در واحد سطح برای آن نمونه و در پایان به صورت میانگین هر گروه گزارش شد. از طرفی، در لام‌های رنگ‌آمیزی شده با LFB، میزان و وسعت تخریب میلین در مقایسه با نمونه‌ی بافت

عصبی مرکزی موش سالم به صورت ۰ تا ۳ (۰: عدم تخریب میلین، ۱: تخریب کم میلین، ۲: تخریب متوسط میلین و ۳: تخریب زیاد میلین) توسط پاتولوژیست به صورت میانگین برای هر گروه گزارش شد.

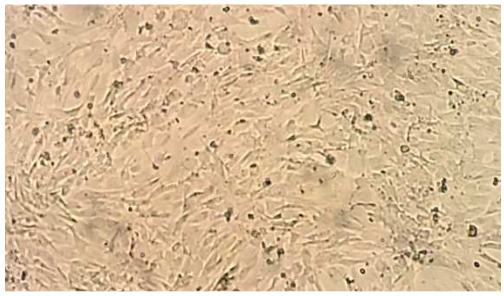
تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها، به وسیله‌ی نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) و با استفاده از آزمون‌های آماری Kruskal-Wallis، Mann-Whitney U و One way ANOVA صورت گرفت. در تمامی موارد $P < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

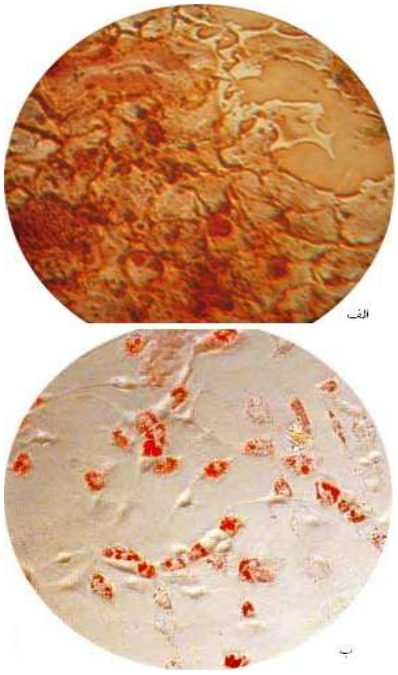
جداسازی و تأیید هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداشده از مغز استخوان

روند جداسازی سلول‌های مزانشیمی تا به دست آوردن سلول‌های کمابیش همگن، حدود ۵۳ روز طول کشید (شکل ۱).



شکل ۱. سلول‌های مزانشیمی جداشده از مغز استخوان موش

سلول‌های مزانشیمی حاصل از پاساژ ۲، که در معرض محیط‌های کشت تمایزی استخوانی و چربی (شرکت ایده زیست نوترکیب، تهران) قرار گرفته بودند، توانستند در این محیط‌ها به ترتیب به فنوتیپ سلول‌های استخوانی و سلول‌های چربی تمایز یابند (شکل ۲).



شکل ۲. تمایز سلول‌های مزانشیمی موشی. سلول‌های مزانشیمی پس از قرار گرفتن در معرض محیط‌های کشت تمایزی اختصاصی استئوسیتی و آدیپوسیتی به ترتیب به سلول‌های استخوانی (الف) و سلول‌های چربی (ب) تمایز یافتند.

بررسی ایمونوفنوتیپی سلول‌ها با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری و آنالیز داده‌ها با نرم‌افزار WinMDI نسخه‌ی ۲/۹ نشان داد که این سلول‌ها واجد شاخص‌های سلول‌های مزانشیمی یعنی CD24، CD29 و CD44 بودند و از نظر شاخص‌های آنتی‌ژنی مختص سلول‌های خون‌ساز، یعنی CD45 و CD11b، منفی بودند (شکل ۳).

Transfection سلول‌های مزانشیمی با بهره‌گیری از وکتور لنتی‌ویروسی

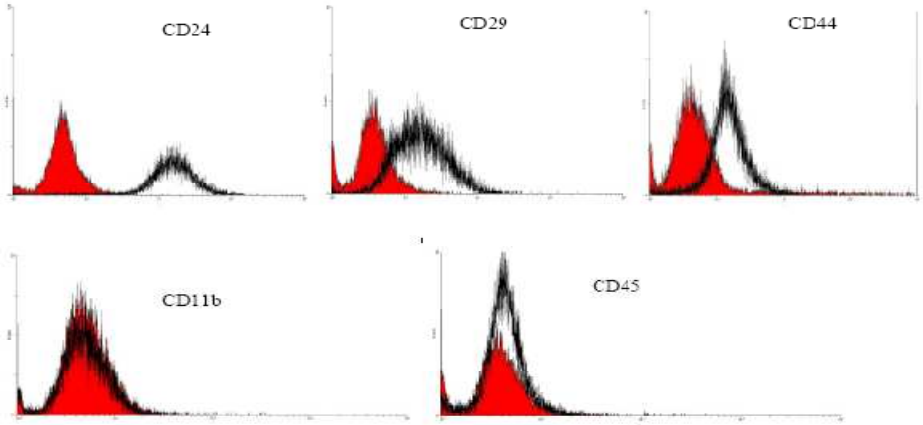
آنالیزهای فلوسایتومتری به منظور تعیین درصد سلول‌های مزانشیمی دریافت‌کننده‌ی ژن‌های GFP و mIL-27، نشان داد که ۹۳/۱۴ درصد سلول‌های مزانشیمی، ژن GFP و ژن mIL-27 را متعاقب فرایند

Transfection دریافت کرده بودند (شکل ۴).

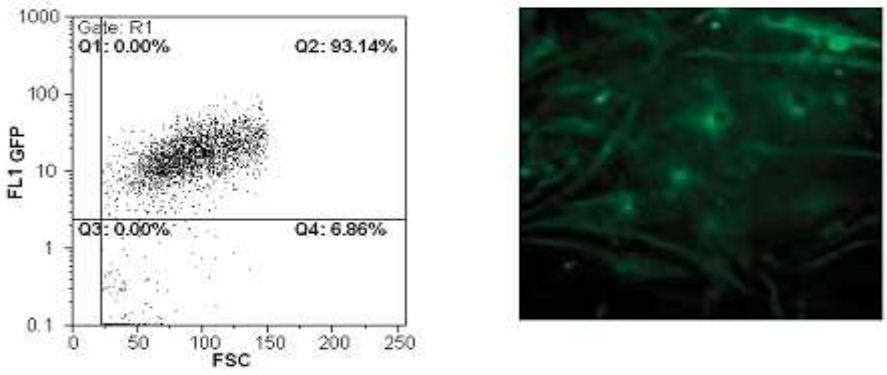
وضعیت بیماری EAE در موش‌های گروه‌های مختلف

حدود ۱۲ تا ۱۴ روز پس از تزریق آنتی‌ژن MOG به موش‌ها، علایم بیماری EAE در آن‌ها ظاهر شد. موش‌ها پس از قرار گرفتن در چهار گروه تیمار شدند و روزانه از نظر علایم بالینی بررسی و نمره‌گذاری شدند (شکل ۵).

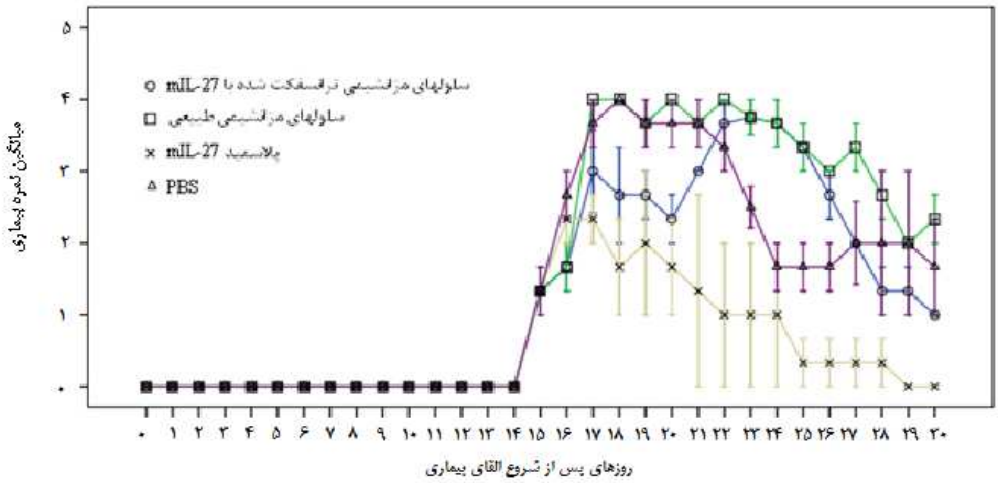
نتایج حاصل از آنالیزهای آماری بر روی میانگین کل نمرات بیماری EAE گروه‌های چهارگانه در پایان دوره‌ی تیمار، نشان داد که سلول‌های مزانشیمی ترانسفکت شده با IL-27، توانستند شدت بیماری EAE را در موش‌های گروه ۱ کاهش دهند (P = ۰/۰۰۲ در مقایسه با گروه ۴ دریافت‌کننده‌ی PBS). در این میان، تزریق پلاسمید p240-mIL27 (گروه ۳) توانست در مقایسه با سایر گروه‌ها، به میزان قابل ملاحظه‌تری از شدت بیماری EAE در موش‌ها بکاهد (P < ۰/۰۰۱).



شکل ۳. بررسی ایمونوفنوتایپینگ سلول‌های مزانشیمی موشی. سلول‌های مزانشیمی در آنالیزهای فلوسایتومتری واجد شاخص‌های آنتی‌ژنی CD24، CD29 و CD44 و فاقد شاخص‌های آنتی‌ژنی CD45 و CD11b بودند.



شکل ۴. سلول‌های مزانشیمی ترانسفکت‌شده با لنتی‌ویروس حاوی ژن mIL-27. سلول‌های مزانشیمی موشی با نسبت ۵۰ به ۱ ذره‌ی لنتی‌ویروس حاوی ژن mIL-27 و ژن GFP به سلول مزانشیمی ترانسفکت شد (تصویر سمت راست) و سپس با دستگاه فلوسایتومتری از نظر بروز پروتئین GFP آنالیز شد (تصویر سمت چپ). نتایج آنالیز فلوسایتومتری نشان داد که حدود ۹۳ درصد سلول‌های مزانشیمی، ژن GFP و بنابراین ژن mIL-27 را دریافت کرده بودند (منطقه‌ی Q2 شکل سمت چپ).



شکل ۵. میانگین روزانه نمرات شدت بیماری EAE (Experimental autoimmune encephalomyelitis) در موش‌های گروههای مختلف

از طرفی، سلول‌های مزانشیمی طبیعی نتوانستند شدت بیماری را در موش‌های EAE گروه ۲ کاهش دهند، به طوری که از نظر آماری تفاوتی بین میانگین نمره‌ی شدت بیماری در گروه ۲ با گروه ۴ که فقط PBS دریافت کرده بودند، وجود نداشت ($P = ۰/۴$).

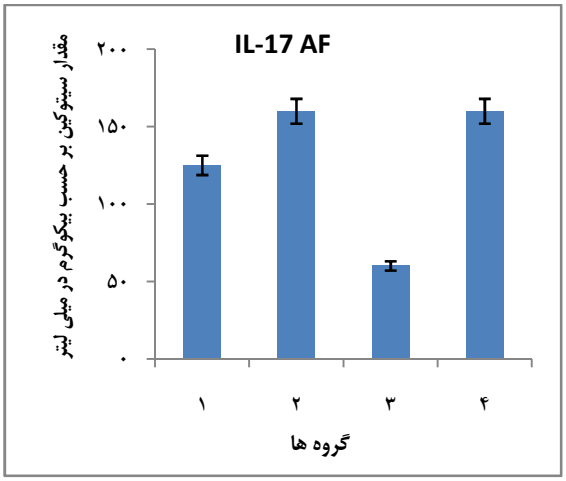
سنجش سیتوکین‌های IL-4، IL-10 و IL-17

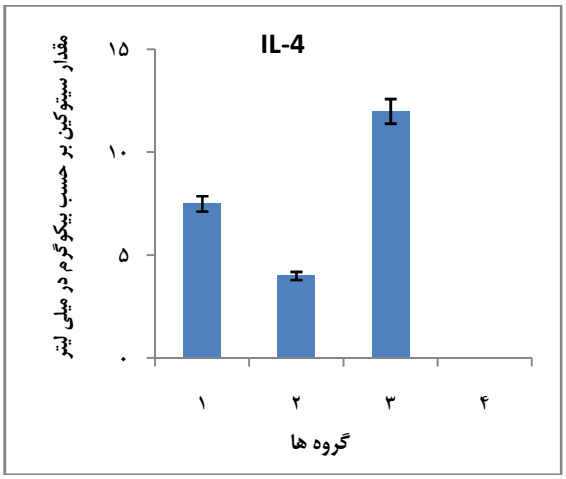
در این تحقیق، با استفاده از کیت‌های ELISA اختصاصی، میزان تولید برخی از سیتوکین‌های مهم یعنی IL-4 (نماینده‌ی پاسخ سلول‌های Th2)، IL-17AF (نماینده‌ی پاسخ سلول‌های التهابی Th17) و IL-10 (سیتوکینی با خواص ضد التهابی)، از سلول‌های طحالی سنجیده شد. (شکل ۶).

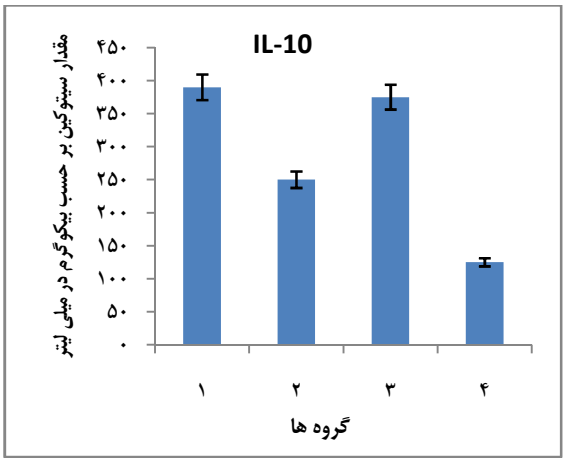
داده‌های حاصل با استفاده از آزمون آماری ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey آنالیز و با یکدیگر مقایسه شد. نتایج حاصل از آنالیزهای آماری نشان داد که میزان تولید سیتوکین IL-4 از سلول‌های طحالی موش‌های گروه ۳، به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر از سایر گروه‌ها بود ($P < ۰/۰۵$). از طرفی، مقدار تولید این سیتوکین در گروه ۱ کمتر از گروه ۳، اما بیشتر از گروه‌های ۲ و ۴ بود ($P < ۰/۰۵$). در مورد IL-10، آنالیزهای آماری بیانگر تولید زیاد و کمابیش یکسان این سیتوکین از سلول‌های طحالی موش‌های گروه‌های ۱ و ۳، در مقایسه با گروه‌های ۲ و ۴ بود ($P < ۰/۰۵$). از طرفی، تولید IL-17 از سلول‌های طحالی موش‌های گروه ۱ و به ویژه گروه ۳، به طور قابل ملاحظه‌ای کمتر از گروه‌های ۲ و ۴ بود ($P < ۰/۰۵$). همچنین از نظر آماری، میزان کاهش تولید این سیتوکین در گروه ۳، قابل ملاحظه‌تر از گروه ۱ بود ($P < ۰/۰۵$).

آزمایش‌های هیستوپاتولوژی

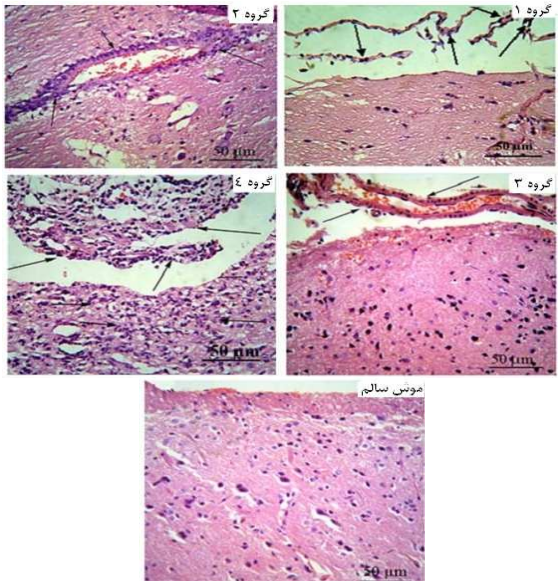
بررسی‌های صورت‌گرفته توسط پاتولوژیست بر روی نمونه‌های رنگ‌آمیزی‌شده با H&E (شکل ۷)، نشان داد که تعداد سلول‌های ایمنی ارتشاح‌یافته به بافت عصبی موش‌های گروه‌های ۱ (۱۰ ± ۳۰ سلول در میلی‌متر مربع) و ۳ (۱۲ ± ۵۰ سلول در میلی‌متر مربع)، به صورت معنی‌داری کمتر از سایر گروه‌ها بود ($P < ۰/۰۵$ در مقایسه با گروه‌های ۴ و ۲).





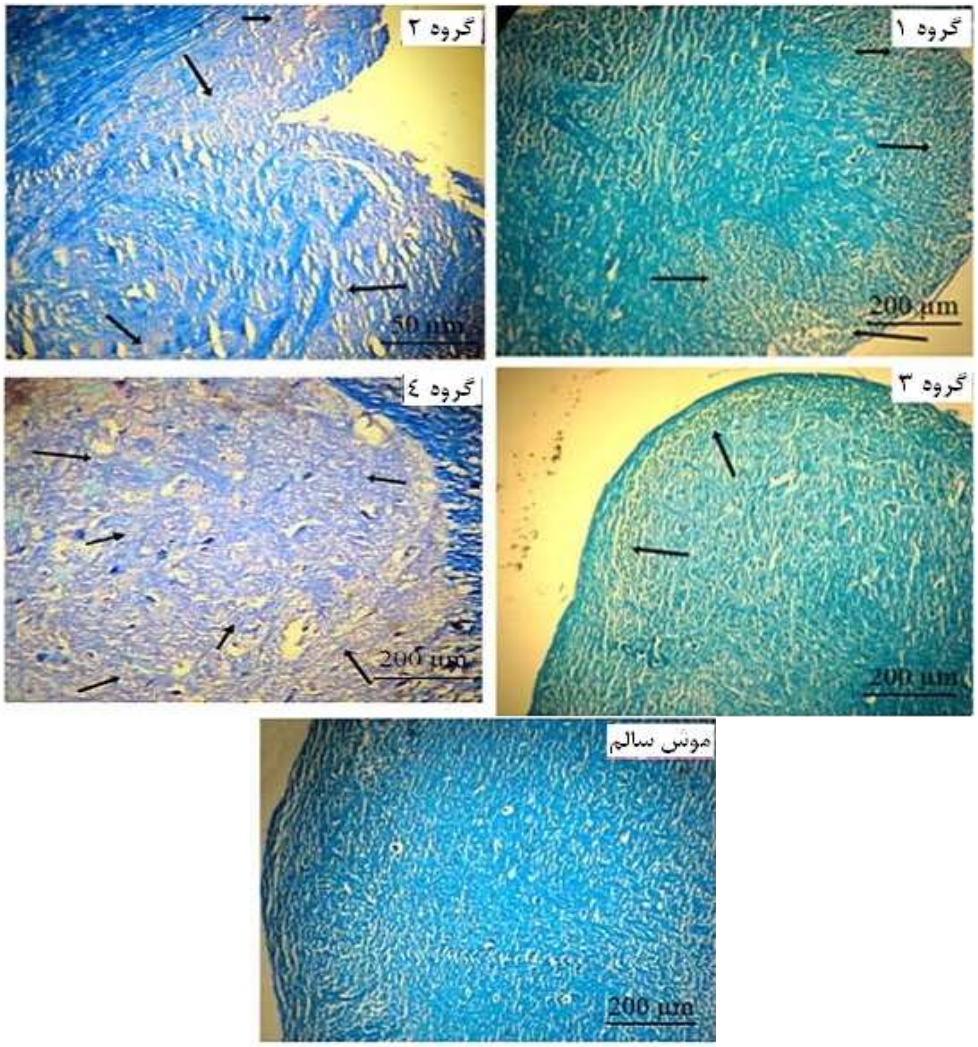


شکل ۶. سنجش برخی از سیتوکین‌های تولیدی از سلول‌های طحالی موش‌های گروه‌های مختلف. گروه ۱: موش‌های تیمارشده با سلول‌های مزانشیمی ترانسفکت‌شده با IL-27 (Interleukin 27)؛ گروه ۲: موش‌های تیما شده با سلول‌های مزانشیمی طبیعی؛ گروه ۳: موش‌های تیمارشده با پلاسمید p240-mIL-27؛ و گروه ۴: موش‌های تیمارشده با Phosphate buffered saline (PBS)



شکل ۷. وضعیت ارتشاح سلول‌های ایمنی به بافت عصبی مرکزی موش‌های EAE (Experimental autoimmune encephalomyelitis) رنگ‌آمیزی H&E (Hematoxylin and eosin). گروه ۱: موش‌های تیمارشده با سلول‌های مزانشیمی ترانسفکت‌شده با IL-27 (Interleukin 27)؛ گروه ۲: موش‌های تیمارشده با سلول‌های مزانشیمی طبیعی؛ گروه ۳: موش‌های تیمارشده با پلاسمید p240-mIL-27 و گروه ۴: موش‌های تیمارشده با PBS (Phosphate buffered saline)

در حالی که در نمونه‌های مربوط به موش‌های گروه ۲ (۳۵ ± ۱۰۳۰ سلول در میلی‌متر مربع) و به ویژه گروه ۴ (۴۰ ± ۱۲۷۰ سلول در میلی‌متر مربع)، جمعیت زیادی از سلول‌های ایمنی در اطراف عروق خونی بافت عصبی و حتی پارانشیم آن قابل مشاهده بودند. به علاوه، بررسی‌های انجام‌گرفته بر روی نمونه‌های رنگ‌آمیزی‌شده با LFB (شکل ۸)، حکایت از تحلیل شدید میلین در نمونه‌های عصبی مربوط به گروه‌های ۴ (۰/۵ ± ۲/۸) و ۲ (۰/۴ ± ۲/۴) داشت؛ در حالی که تحلیل میلین در نمونه‌های عصبی موش‌های گروه‌های ۳ (۰/۵۴ ± ۱/۴) و ۱ (۰/۴ ± ۱/۱)، مختصر بود ($P < ۰/۰۵$).



شکل ۸. وضعیت سلامت میلین بافت عصبی مرکزی موش‌های Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) رنگ آمیزی LFB (Luxol fast blue). گروه ۱: موش‌های تیمارشده با سلول‌های مزانشیمی ترانسفکت‌شده با IL-27؛ گروه ۲: موش‌های تیمارشده با سلول‌های مزانشیمی طبیعی؛ گروه ۳: موش‌های تیمارشده با پلاسمید p240-mIL-27 و گروه ۴: موش‌های تیمارشده با PBS (Phosphate buffered saline)

بحث

در این تحقیق، تأثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی ترانسفکت‌شده با IL-27، در کنار گروه‌های شاهد مناسب، در مدل موشی EAE مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل از تحقیق ما نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی ترانسفکت‌شده با IL-27، می‌توانند باعث بهبودی بیماری EAE در موش‌ها شوند. در واقع این یافته‌ها نشان می‌دهند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی ترانسفکت‌شده با IL-27، از طریق کاستن از روند ارتشاح سلول‌های ایمنی به بافت CNS و در نتیجه جلوگیری از تخریب بیشتر میلین و همچنین سرکوب پاسخ‌های التهابی آسیب‌رسان، از طریق القای افزایش تولید سیتوکین‌های ایمونوساپرسیو IL-10 و IL-4 و کاهش تولید سیتوکین پیش التهابی IL-17، اثرات مطلوب خود را در تنظیم پاسخ‌های ایمنی در مدل EAE و

بهبود وضعیت بیماری اعمال می‌نمایند.

ما در مطالعه‌ی قبلی نشان دادیم که IL-27 می‌تواند با تغییر الگوی پاسخ‌های ایمنی از پاسخ‌های التهابی Th1 و Th17 به سمت پاسخ‌های ضد التهابی Th2، شدت بیماری EAE را در موش‌ها کاهش دهد و با ایجاد یک حالت مقاومت (Tolerance) در سلول‌های ایمنی، مانع از پاسخ‌دهی بیش از حد آن‌ها به آنتی‌ژن میلین شود. از این رو در این تحقیق، ژن سیتوکین IL-27 به سلول‌های مزانشیمی منتقل شد به این امید که بتوان هم‌زمان از خاصیت ضد التهابی سیتوکین مذکور در کنار خاصیت حفاظت از سیستم عصبی (Neuroprotection) سلول‌های مزانشیمی، جهت بهبود وضعیت بیماری در مدل EAE بهره برد. به طور غیر منتظره‌ای، مقایسه‌ی نتایج به دست آمده از موش‌های EAE دریافت‌کننده‌ی سلول‌های مزانشیمی ترانسفکت‌شده با IL-27 (گروه ۱) با موش‌هایی که فقط پلاسمید p240-mIL27 را دریافت کرده بودند (گروه ۳)، نشان داد که اثرات مطلوب مشاهده‌شده در گروه ۳ قابل ملاحظه‌تر از گروه ۱ می‌باشد. همچنین بر خلاف انتظار، تزریق تنهایی سلول‌های مزانشیمی (گروه ۲) نیز نتوانست اثرات درمانی مطلوبی را که در برخی مطالعات به آن اشاره شده بود، تکرار نماید؛ به طوری که میزان سلول‌های ایمنی ارتشاح‌یافته به بافت عصبی موش‌ها در این گروه، با موش‌های گروه ۴ که فقط PBS دریافت کرده بودند، تفاوت چندانی نداشت و در سطح بالایی بود. به علاوه در نمونه‌های مغزی موش‌های این گروه، تخریب متوسط تا شدید میلین را می‌شود ملاحظه کرد. از نظر تولید سیتوکین‌های پیش التهابی (IL-17) و ضد التهابی (IL-4 و IL-10) نیز همین وضعیت حاکم بود.

ممکن است علت نتایج مطلوب ثبت‌شده در گروه ۳ نسبت به گروه ۱ بود این باشد که در گروه ۱ از سلول‌های مزانشیمی ترانسفکت‌شده با IL-27 استفاده شد. طبیعی است که دوز تحویلی سیتوکین IL-27 به موش‌های این گروه در مقایسه با گروه ۳ که در آن هر یک از موش‌ها حدود ۱۰۰ میکروگرم پلاسمید p240-IL-27 دریافت کرده بودند، بسیار کمتر بود. به علاوه با توجه به عدم توفیق سلول‌های مزانشیمی طبیعی در بهبود وضعیت بیماری EAE در موش‌های گروه ۲ می‌توان این گونه استنباط کرد که نتایج مثبت دیده‌شده در موش‌های گروه ۱ نیز به طور عمده به سبب اثرات درمانی IL-27 بود تا سلول‌های مزانشیمی. با عنایت به نکته‌ی اول مورد اشاره، تفاوت‌های ملاحظه‌شده بین گروه‌های ۱ و ۳ قابل توجیه خواهد بود.

از نتایج دیگر این تحقیق که باید مورد توجه قرار گیرد، عدم توفیق سلول‌های مزانشیمی طبیعی در بهبود وضعیت بیماری EAE در موش‌های گروه ۲ بود. در توافق با این یافته و این که سلول‌های مزانشیمی به خصوص در شرایط In vivo ممکن است رفتارهای دو گانه و متناقضی از خود نشان دهند. Zappia و همکاران گزارش کرده‌اند که تزریق داخل رگی سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در روزهای ۳ و ۸ پس از شروع القای EAE، بدون آن که تأثیری بر زمان شروع علایم EAE داشته باشد؛ می‌تواند از شدت علایم بیماری در موش‌ها بکاهد، تخریب میلین را کاهش دهد و همچنین ارتشاح لکوسیتی را به CNS کم کند. در حالی که در بخش دیگری از همین مطالعه، تزریق

سلول‌های مزانشیمی در روز ۲۴ پس از القای EAE، تأثیر مثبتی بر کاهش علایم بیماری نداشته است (۱۸). در مطالعه‌ی دیگری که توسط Constantin و همکاران انجام گرفت، تزریق داخل رگی سلول‌های مزانشیمی مشتق از بافت چربی، در روزهای ۲۳ و ۲۸ پس از القای EAE توانست شدت علایم بیماری EAE را در موش‌ها کاهش دهد، که این کاهش علایم، به تغییر الگوی سیتوکینی و تحریک میلین‌سازی مجدد ربط داده شده است (۱۹). بنابراین بر اساس این گزارش‌ها و با در نظر گرفتن نتایج حاصل از مطالعه‌ی ما، می‌توان چنین استنباط کرد که شاید سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان، فقط زمانی می‌توانند بر بهبود علایم بیماری EAE مؤثر باشند که قبل از شروع علایم بیماری، به موش‌ها تزریق شوند و در مواردی که بیماری EAE در موش‌ها استقرار یافته است و یا مزمن شده است، از کارایی مناسبی برخوردار نیستند؛ در صورتی که سلول‌های مزانشیمی مشتق از بافت چربی این قابلیت را دارند تا حتی در موارد مزمن بیماری EAE نیز مؤثر عمل نمایند.

نتایج مطالعات بالینی بر روی استفاده‌های درمانی از سلول‌های مزانشیمی در بیماری‌های التهابی مختلف، که بر پایه‌ی نتایج حاصل از مطالعات حیوانی، انجام شده‌اند اگر چه بی خطری تزریق سلول‌های مزانشیمی در افراد گیرنده را نشان داده‌اند اما در برخی از موارد نتوانسته‌اند نتایج امیدوارکننده‌ی قبلی را تکرار نمایند (۲۳-۲۰). به عنوان مثال در یکی از این مطالعات، تزریق سلول‌های مزانشیمی اتولوگ به ۱۰ بیمار مبتلا به MS، توانست تنها در یکی از بیماران علایم بیماری را بهبود دهد؛ در ۴ نفر از بیماران هیچ گونه بهبودی مشاهده نشد و در ۵ بیمار دیگر علایم بیماری شدت یافت. همچنین در ارزیابی‌های MRI، در ۷ نفر از این بیماران هیچ تغییری در اندازه و تعداد پلاک‌های مغزی مشاهده نشد و فقط در یکی از بیماران تعداد پلاک‌ها کاهش یافت، در حالی که در بقیه‌ی بیماران تعداد پلاک‌ها افزایش یافته بود (۲۱).

به هر حال، به نظر می‌رسد مواردی همچون منبع سلول‌های مزانشیمی مورد استفاده (مغز استخوان یا بافت چربی) (۱۹-۱۸)، تفاوت فیلوژنی سلول‌های مزانشیمی مورد استفاده (زنوژن، آلوژن و سینژن) (۲۶-۲۴، ۱۸)، زمان‌بندی تزریق سلول‌های مزانشیمی (تزریق قبل و یا درست در هنگام شروع علایم EAE و یا تزریق پس از شروع علایم و ایجاد بیماری EAE)، (۲۶، ۱۸)، تعداد سلول‌های مزانشیمی تزریق‌شده (دو میلیون سلول، یک میلیون سلول یا پانصد هزار سلول) (۲۶) و گیر افتادن و تخریب سلول‌های مزانشیمی در عروق باریک اندام‌هایی نظیر کبد، طحال و به خصوص ریه (۲۷) از جمله عوامل دخیل در ایجاد این گونه رفتارهای دو گانه‌ی سلول‌های مزانشیمی در شرایط In vivo، می‌باشند.

نتیجه‌گیری

به طور خلاصه نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که انتقال ژن IL-27 به سلول‌های مزانشیمی می‌تواند راهکار مناسبی در درمان بیماری‌های التهابی نظیر EAE و MS باشد. باید مطالعات بیشتری در رابطه با چگونگی رفتار سلول‌های مزانشیمی در داخل بدن (متعاقب تزریق) انجام گیرد تا از این رهگذر بتوان از طریق تغییر دوز و مسیر تزریق سلول‌های

مزانشیمی، به نتایج مطلوب‌تری دست یافت.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی کرمان به دلیل حمایت مالی از این تحقیق اعلام می‌دارند. همچنین از جناب آقای دکتر یوسف قیصری بابت هدیه‌ی پلاسمیدهای وکتور لنتی‌ویروسی قدردانی می‌گردد.

References

1. Holmoy T, Vartdal F. The immunological basis for treatment of multiple sclerosis. Scand J Immunol 2007; 66(4): 374-82.
2. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. Annu Rev Immunol 2005; 23: 683-747.
3. Rao P, Segal BM. Experimental autoimmune encephalomyelitis. Methods Mol Med 2004; 102: 363-75.
4. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. Stem Cells 2007; 25(11): 2739-49.
5. Maccario R, Podesta M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. Haematologica 2005; 90(4): 516-25.
6. Rafei M, Campeau PM, Aguilar-Mahecha A, Buchanan M, Williams P, Birman E, et al. Mesenchymal stromal cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting CD4 Th17 T cells in a CC chemokine ligand 2-dependent manner. J Immunol 2009; 182(10): 5994-6002.
7. Rivera FJ, Couillard-Despres S, Pedre X, Ploetz S, Caioni M, Lois C, et al. Mesenchymal stem cells instruct oligodendrogenic fate decision on adult neural stem cells. Stem Cells 2006; 24(10): 2209-19.
8. Munoz JR, Stoutenger BR, Robinson AP, Spees JL, Prockop DJ. Human stem/progenitor cells from bone marrow promote neurogenesis of endogenous neural stem cells in the hippocampus of mice. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102(50): 18171-6.
9. Kemp K, Hares K, Mallam E, Heesom KJ, Scolding N, Wilkins A. Mesenchymal stem cell-secreted superoxide dismutase promotes cerebellar neuronal survival. J Neurochem 2010; 114(6): 1569-80.
10. Crigler L, Robey RC, Asawachaicharn A, Gaupp D, Phinney DG. Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neuritogenesis. Exp Neurol 2006; 198(1): 54-64.
11. Valle-Prieto A, Conget PA. Human mesenchymal stem cells efficiently manage oxidative stress. Stem Cells Dev 2010; 19(12): 1885-93.
12. Quevedo HC, Hatzistergos KE, Oskouei BN, Feigenbaum GS, Rodriguez JE, Valdes D, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy via trilineage differentiating capacity. Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106(33): 14022-7.
13. Nakamura K, Ito Y, Kawano Y, Kurozumi K, Kobune M, Tsuda H, et al. Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. Gene Ther 2004; 11(14): 1155-64.
14. Mangi AA, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall JS, et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. Nat Med 2003; 9(9): 1195-201.
15. Fitzgerald DC, Zhang GX, El-Behi M, Fonseca-Kelly Z, Li H, Yu S, et al. Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells. Nat Immunol 2007; 8(12): 1372-9.
16. Mojadadi MS, Ebtekar M, Golkar M, Khanahmad H. Effect of interleukin-27 on recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. Feyz 2012; 16(3): 219-28. [In Persian].
17. Mojadadi M, Sh,, Ebtekar M, Golkar M, Khanahmad H, Azadmanesh K. Comparative evaluation of viral and nonviral methods of gene delivery to mouse mesenchymal stem cells. Urmia Med J 2013; 24(2): 79-89. [In Persian].
18. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, et al. Mesenchymal

stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. Blood 2005; 106(5): 1755-61.
19. Constantin G, Marconi S, Rossi B, Angiari S, Calderan L, Anghileri E, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. Stem Cells 2009; 27(10): 2624-35.
20. Ankrum J, Karp JM. Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back. Trends Mol Med 2010; 16(5): 203-9.
21. Mohyeddin BM, Yazdanbakhsh S, Lotfi J, Alimoghaddom K, Talebian F, Hooshmand F, et al. Does mesenchymal stem cell therapy help multiple sclerosis patients? Report of a pilot study. Iran J Immunol 2007; 4(1): 50-7.
22. 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.
23. Yamout B, Hourani R, Salti H, Barada W, El-Hajj T, Al-Kutoubi A, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis: a pilot study. J Neuroimmunol 2010; 227(1-2): 185-9.
24. Bai L, Lennon DP, Eaton V, Maier K, Caplan AI, Miller SD, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis. Glia 2009; 57(11): 1192-203.
25. Rafei M, Birman E, Forner K, Galipeau J. Allogeneic mesenchymal stem cells for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. Mol Ther 2009; 17(10): 1799-803.
26. Zhang J, Li Y, Chen J, Cui Y, Lu M, Elias SB, et al. Human bone marrow stromal cell treatment improves neurological functional recovery in EAE mice. Exp Neurol 2005; 195(1): 16-26.
27. Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. Cell Stem Cell 2009; 5(1): 54-63.

Journal of Isfahan Medical School Received: 01.05.2013

Vol. 31, No. 249, 3rd Week, October 2013 Accepted: 11.08.2013

Evaluating the Effect of IL-27-Transfected Mesenchymal Stem Cells on Certain Histological and Immunological Parameters in a Mouse Model of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

Mohammad-Shafi Mojadadi PhD[1], Rahim Golmohammadi PhD[2], Hossein Khanahmad PhD[3], Omid Gholami PhD[4]

Original Article

Abstract

Background: Mesenchymal stem cells (MSCs) by having immunomodulatory and neuroprotectivity properties could be a suitable candidate for the treatment of inflammatory and neurodegenerative diseases. Furthermore, by genetical manipulation, it is possible to potentiate the therapeutic characteristics of these cells. The aim of this study was to investigate the effect of IL-27-transfected MSCs in a mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).

Methods: MSCs were isolated from the bone marrow of C57BL/6 mice and were trnasfected with mouse IL-27 gene by using a lentiviral vector system. On days 15 and 22 post EAE induction, one million of these cells were injected to EAE-affected mice. Finally, all the mice were sacrificed; and histological and immunological assays were performed to investigate the myelin status and infiltration rate of immune cells into the central nervous system (CNS) tissues and measure certain cytokines, respectively.

Findings: IL-27-transfected MSCs could ameliorate disease in the EAE-affected mice. Besides, they could diminish the infiltration rate of immune cells into the CNS, and inhibited the myelin destruction. Moreover, IL-27- transfected MSCs could enhance IL-4 and IL-10, and reduce IL-17 production from the EAE mice splenocytes.

Conclusion: IL-27-transfected MSCs could be considered as a therapeutic tool for the treatment of inflammatory diseases including multiple sclerosis (MS). Changing dose and rout of administration, however, would be suggested to achieve better results.

Keywords: Mesenchymal stem cells, IL-27, Experimental autoimmune encephalomyelitis, Lentiviral vector, Inflammation

Citation: Mojadadi MSh, Golmohammadi R, Khanahmad H, Gholami O. **Evaluating the Effect of IL-27-Transfected Mesenchymal Stem Cells on Certain Histological and Immunological Parameters in a Mouse Model of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.** J Isfahan Med Sch 2013; 31(249): 1270-84

1- Assistant Professor, Neuroscience Research Center, Institute of Neuropharmacology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
2- Associate Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran
3- Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences and Genetics, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Assistant Professor, Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran
Corresponding Author: Mohammad-Shafi Mojadadi PhD, Email: msh_mojadadi@kmu.ac.ir