

Therapeutic Potential of Syngeneic Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells in Established form of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

Mohammad Shafi Mojadadi¹,
Mohammad Mohammad-zadeh²,
Rahim Golmohammadi³,
Najmeh Mahmoodabadi⁴

¹ Assistant Professor, Department of Microbiology and Immunology, Iranian Research Center on Healthy Aging, Faculty of Medicine, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran

² Assistant Professor, Department of Physiology and Pharmacology, Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran

³ Associate Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran

⁴ MSc. in Speech Therapy, Iranian Research Center on Healthy Aging, Faculty of Medicine, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran

(Received December 18, 2013 ; Accepted May 17, 2014)

Abstract

Background and purpose: Using allogeneic and xenogeneic mesenchymal stem cells (MSCs) has had some successful results in the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). But the use of its syngeneic counterparts in treatment of EAE, especially established EAE, has had some paradoxical results. This study aimed to evaluate the therapeutic potential of syngeneic bone marrow-derived MSCs (SBM-MSCs) in a mouse model of EAE.

Material and methods: In this experimental-interventional study, one million SBM-MSCs were injected to EAE-affected C57BL/6 mice in two different times. The clinical symptoms of treated mice were evaluated daily and scored according to a standard scale. A week after the last injection all EAE mice were sacrificed for cytokine and histopathological assays.

Results: SBM-MSCs could not ameliorate clinical course of EAE mice. Although SBM-MSCs could attenuate the production of pro-inflammatory cytokine IFN- γ from the splenocytes of EAE mice, but they had no effect on the production of IL-17. Nonetheless, the production of anti-inflammatory cytokines, IL-4 and IL-10, had increased due to SBM-MSCs treatment. Finally, SBM-MSCs had no positive effect on immune cells infiltration and myelin destruction rate in the central nervous system of EAE mice.

Conclusion: SBM-MSCs had probably no ameliorative effect on established form of EAE.

Keywords: Experimental autoimmune encephalomyelitis, syngeneic, bone marrow

بررسی اثر درمانی سلول های بنیادی مزانشیمی سینژن مشتق از مغز استخوان در فرم استقرار یافته بیماری انسفالومیلیت خود ایمن تجربی

محمد شفیع مجددی^۱محمد محمدزاده^۲رحیم گل محمدی^۳نجمه محمودآبادی^۴

چکیده

سابقه و هدف: استفاده از سلول های بنیادی مزانشیمی آلوزن و زنوزن در درمان بیماری انسفالومیلیت خودایمن تجربی (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis)، نتایج مطلوبی در پی داشته است. اما استفاده از نوع سینژنیک این سلول ها، به خصوص در فرم استقرار یافته EAE، در برخی موارد با نتایج متناقضی همراه بوده است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر درمانی سلول های مزانشیمی سینژن مشتق از مغز استخوان، در مدل موشی بیماری EAE بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی - مداخله ای، به موش های ۶ C57BL/6 مبتلا به EAE، در دو نوبت یک میلیون سلول مزانشیمی تزریق شد. شدت علائم بالینی در موش ها روزانه بررسی و طبق معیارهای استاندارد نمره دهی شد. یک هفته پس از آخرین تزریق، تمامی موش ها به منظور انجام آزمایش های سنجش سایتوکاینی و هیستوپاتولوژی کشته شدند.

یافته ها: سلول های مزانشیمی نتوانستند شدت بیماری EAE را در موش ها کاهش دهند. اگر چه سلول های مزانشیمی توانسته بودند تولید سایتوکاین پیش التهابی اینترفرون گاما را از سلول های طحالی موش های EAE کاهش دهند، اما تأثیری بر میزان تولید سایتوکاین پیش التهابی اینترفرون گاما، با این حال، میزان تولید سایتوکاین های ضد التهابی اینترفرون گاما ۱ و ۴، تحت تأثیر سلول های مزانشیمی تزریقی، افزایش قابل ملاحظه ای یافته بود. در نهایت سلول های مزانشیمی، تأثیری بر میزان سلول های ایمنی ارتشاح یافته به بافت عصبی مرکزی و یا وسعت تخریب میلین در این بافت نداشتند.

استنتاج: به نظر می رسد سلول های مزانشیمی سینژنیک مشتق از مغز استخوان، اثر التیام بخشی در فرم استقرار یافته بیماری EAE ندارند.

واژه های کلیدی: انسفالومیلیت خود ایمن تجربی، سلول های بنیادی مزانشیمی، سینژن

مقدمه

بیماری مولتیپل اسکلروزیس (Multiple sclerosis)، بیماری نورودژنراتیو، چند علتی و پیچیده بافت عصبی مرکزی است، که علت یا علل آغاز کننده آن به خوبی مشخص نیست. با این حال،

E-mail: mojadadi@medsab.ac.ir

موفق مسئول: محمد شفیع مجددی - سبزوار: کیلومتر ۵ جاده تهران، ساختمان شماره ۲ دانشگاه علوم پزشکی سبزوار

۱. استادیار، گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، مرکز تحقیقات سلامت سالمندان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران

۲. استادیار، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران

۳. دانشیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران

۴. کارشناس ارشد گفتار درمانی، مرکز تحقیقات سلامت سالمندان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۹/۲۷ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۲/۱۱/۹ تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۲/۲۷

عقیده غالب دانشمندان آن است که MS یک بیماری خود ایمن با منشاء سلول های Th1 و Th17 می باشد. این سلول ها با تولید سایتوکاین ها و کموکاین های التهابی در پارانشیم بافت عصبی مرکزی، باعث ارتشاح ماکروفاژها، ماست سل ها، نوتروفیل ها، سلول های TCD8⁺ و سلول های B به بافت عصبی مرکزی می شود، که منجر به تخریب غلاف میلین و آسیب آکسون ها می شود (۱). از آن جا که مشخصه اصلی بیماری MS، پاسخ های ایمنی بیش از حد و نابه جا می باشد، راه کارهای درمانی این بیماری نیز به طور عمده روی سرکوب پاسخ های التهابی متمرکز شده است تا از این طریق، از آسیب های بیش تر به بافت عصبی مرکزی جلوگیری شود.

سلول های بنیادی مزانشیمی، سلول هایی خود تجدید شونده و چند توانه می باشند. این سلول ها را می توان به طور عمده از مغز استخوان و یا از بافت های دیگری نظیر بافت چربی، اپیدرم و خون بندناف جدا کرد. سلول های مزانشیمی این قابلیت را دارند تا به انواع مختلفی از سلول ها از جمله سلول های استخوان، غضروف، چربی، کبد، ماهیچه قلب و عصبی تبدیل شوند (۲). اخیراً، سلول های مزانشیمی به علت داشتن خواص ایمونومودولاتوری، امیدهای زیادی را در درمان بیماری های التهابی مختلف ایجاد کرده اند. مطالعات نشان داده اند که تزریق داخل رگی سلول های مزانشیمی، باعث افزایش بقای پیوندهای پوستی آلوگرافت می شود (۳). هم چنین، سلول های مزانشیمی شانس بقا را در پیوند سلول های خون ساز آلورژن، در مدل موشی افزایش داده و پیوند هم زمان آن ها با سلول های خونساز، از شدت بیماری پیوند علیه میزبان کاسته و سطح سرمی اینترفرون گاما را کاهش می دهد (۴).

سال ها است که بیماری انسفالومیلیت خودایمن تجربی (Experimental Autoimmune Encephalitis) در جوندگان به علت داشتن ویژگی های پاتولوژیکی و هیستولوژیکی فراوان با بیماری MS در انسان ها به منظور

تحقیق در زمینه مکانیسم های دخیل در بیماری MS و هم چنین کشف راه های جدید درمانی مورد استفاده پژوهشگران قرار می گیرد (۵). در حالی که اکثر مطالعات انجام شده در مدل EAE، حکایت از مفید بودن استفاده درمانی از سلول های مزانشیمی آلورژن (۶) یا زنونژن (۷) مشتق از مغز استخوان (۸) یا بافت چربی (۹) دارد؛ تحقیقات انجام شده در زمینه استفاده درمانی از سلول های بنیادی مزانشیمی سینژن در مدل EAE و بیماری MS، در برخی موارد با نتایج متناقضی همراه بوده است. در مطالعه ای، تزریق داخل رگی سلول های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در روزهای سوم و هشتم پس از شروع القای EAE، بدون آن که تأثیری بر زمان شروع علائم EAE داشته باشد؛ توانسته از شدت علائم بیماری در موش ها بکاهد؛ تخریب میلین را کاهش دهد و هم چنین ارتشاح لکوسیته را به بافت عصبی مرکزی کم کند. در حالی که در بخش دیگری از همین مطالعه، تزریق سلول های مزانشیمی در روز ۲۴ پس از القای EAE، تأثیر مثبتی بر کاهش علائم بیماری نداشته است (۸). در مطالعه ای دیگر، تزریق سلول های بنیادی مزانشیمی اتولوگ به ده بیمار مبتلا به MS، توانست تنها در یکی از بیماران علائم بیماری را بهبود بخشد؛ در چهار بیمار، هیچ گونه بهبودی مشاهده نشده و در پنج بیمار دیگر علائم بیماری شدت یافت. هم چنین در ارزیابی های ام.آر.آی. مشخص شد که فقط در یکی از بیماران تعداد پلاک ها کاهش یافته بود، در حالی که در هفت بیمار دیگر هیچ تغییری در اندازه و تعداد پلاک های مغزی مشاهده نشد و در دو بیمار باقی مانده نیز تعداد پلاک ها افزایش یافته بود (۱۰).

نظر به وجود برخی تناقضات در حوزه استفاده درمانی از سلول های بنیادی مزانشیمی در مدل EAE و MS، و هم چنین بحث امنیت و خطراتی که ممکن است استفاده از سلول های مزانشیمی آلورژن و یا زنونژن در پی داشته باشد (انتقال عفونت ها و یا احیانا پاسخ های سیستم ایمنی میزبان به سلول پیوندی)، ضرورت تحقیقات

بیش تر در این زمینه احساس می شود. به خصوص از این منظر که در اکثر مطالعات، اثرات مثبت درمانی سلول های مزانشیمی در مدل EAE، بیش تر زمانی مشاهده شده است که تزریق سلول های مزانشیمی، قبل یا درست در زمان بروز علائم EAE صورت گرفته باشد و نه پس از استقرار علائم بیماری (۸). از این رو، این تحقیق با هدف بررسی اثرات درمانی سلول های بنیادی مزانشیمی سینژنیک مشتق از مغز استخوان، در فرم استقرار یافته و مزمن بیماری EAE انجام گرفت. نتایج این تحقیق می تواند پاسخی به این پرسش باشد که آیا سلول های مزانشیمی سینژنیک هم می توانند همانند هم تایان آلورن و یا زنوژن خویش، وضعیت بیماری EAE را در فرم استقرار یافته و مزمن آن بهبود بخشند. بدین منظور در این تحقیق، پس از تیمار موش های EAE با سلول های مزانشیمی سینژنیک مشتق از مغز استخوان، برخی پارامترهای نشانه شناسی، ایمونولوژیکی و هیستوپاتولوژیکی در آن ها مورد مطالعه و تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

مواد و روش ها

جداسازی سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان

موش های C57BL/6 مورد استفاده در این مطالعه تجربی - مداخله ای، از انیستیتو پاستور کرج خریداری شدند. به منظور سازگاری با محیط، موش ها به مدت یک هفته پیش از شروع مطالعه در شرایط کاملاً بهداشتی و با دسترسی آزاد به آب و غذای کافی و یک چرخه ۱۲ ساعته نور/تاریکی، در حیوان خانه نگهداری شدند. در این تحقیق، کار روی موش ها بر اساس دستور کار "نحوه نگهداری و کار با حیوانات" انیستیتو پاستور تهران انجام گرفت. سلول های مزانشیمی، بر اساس خاصیت چسبندگی آن ها به کف پلیت کشت سلول، از بقیه سلول های موجود در مغز استخوان جدا شده و به منظور تأیید هویت از نظر قابلیت تمایز به سلول های استخوانی و چربی، و نیز از نظر آنتی ژن های سطح

سلولی ویژه سلول های بنیادی مزانشیمی مورد بررسی قرار گرفتند (۱۱). القای بیماری EAE در موش ها و تزریق سلول های مزانشیمی القای بیماری EAE در موش های ماده C57BL/6 هشت تا ده هفته، مطابق روش شرح داده شده توسط مجددی و همکاران (۱۲) صورت گرفت. پس از ظهور علائم بیماری، موش های مبتلا به EAE به طوری که از نظر میانگین علائم بیماری و تا حد امکان میانگین وزنی یکسان باشند، در دو گروه جداگانه آزمایش و کنترل (هر گروه ۱۰ سر موش) قرار گرفتند. سپس به هر یک از موش های گروه های آزمایش و کنترل در دو نوبت (روزهای ۱۵ و ۲۲ از زمان شروع القای بیماری EAE) به ترتیب یک میلیون سلول مزانشیمی (به صورت داخل رگی) و بافر فسفات سالین (PBS) استریل تزریق شد. موش ها تا زمان کشته شدن، روزانه از نظر شدت علائم بالینی بررسی و بر اساس معیارهای استاندارد (نمره صفر: فاقد هرگونه علائم بالینی، نمره یک: افتادن دم (شل شدن دم)، نمره دو: بی حسی و یا فلج نسبی اندام پشتی، نمره سه: فلج کامل اندام پشتی، نمره چهار: فلج کامل اندام پشتی و جلویی، و نمره پنج: مرگ حیوان) نمره دهی شدند و میانگین نمره برای هر کدام از گروه ها محاسبه شد (۱۲). یک هفته پس از آخرین تزریق، همه موش ها به منظور انجام آزمایشات ایمونولوژی و هیستوپاتولوژی کشته شدند.

اندازه گیری سایتوکاین های γ -IFN، IL-4، IL-10 و IL-17

به منظور اندازه گیری میزان تولید سایتوکاین های γ -IFN، IL-4، IL-10 و IL-17، ابتدا طحال هر کدام از موش های گروه های آزمایش و کنترل، در شرایط استریل جدا و سوسپانسیون سلول های طحالی تهیه شد. سپس تعداد سه میلیون سلول طحالی (میزان سلول های زنده بالای ۹۵ درصد) از هر کدام از موش های دو گروه در مجاورت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر از پپتید MOG₃₅₋₅₅ (شرکت Alexis) در محیط RPMI-1640 (شرکت

۳: تخریب زیاد میلین) توسط پاتولوژیست به صورت میانگین برای هر گروه گزارش شد.

آنالیزهای آماری

تجزیه و تحلیل داده ها، به وسیله نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و با استفاده از آزمون های آماری کروسکال-والیس (Kruskal-Wallis)، من-ویتنی یو (Mann-Whitney U) و آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) صورت گرفت. در تمامی موارد سطح معنی داری داده ها، ۹۵ درصد در نظر گرفته شد.

یافته ها

جداسازی و تأیید هویت سلول های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان

روند جداسازی سلول های مزانشیمی از مغز استخوان تا به دست آوردن سلول های تقریباً همگن، حدود ۵۳ روز طول کشید (تصویر شماره ۱). سلول های مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان توانستند در محیط های کشت تمایزی استخوانی و چربی به ترتیب به فئوپ سلول های استخوانی و سلول های چربی تمایز یابند (تصویر شماره ۲).

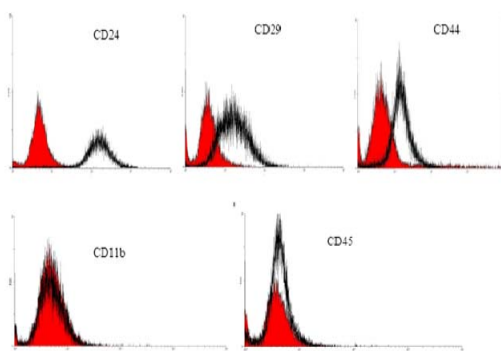
بررسی ایمونوفنوتایپی سلول های مذکور با استفاده از تکنیک فلو سایتمتری و آنالیز داده ها با نرم افزار Win MDI ۲/۹ نشان داد که سلول های مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان، واجد آنتی ژن های سطح سلولی ویژه سلول های مزانشیمی (CD24، CD29 و CD44) و فاقد آنتی ژن های سطح سلولی ویژه سلول های خون ساز (CD45 و CD11b) می باشند (تصویر شماره ۳).

وضعیت بیماری EAE در موش های گروه های مختلف حدود ۱۲ تا ۱۴ روز پس از تزریق آنتی ژن MOG به موش ها، علائم بیماری EAE ظاهر شد. میانگین روزانه نمرات شدت بیماری EAE در نمودار شماره ۱ به تصویر کشیده شده است.

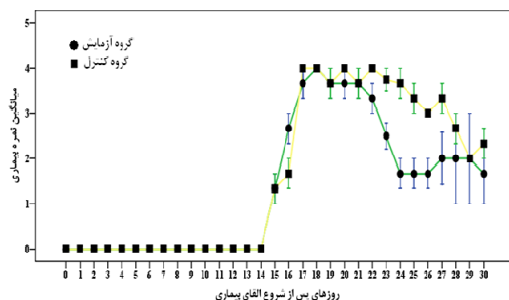
GIBCO حاوی ۱۰ درصد FBS (شرکت GIBCO) و در چاهک های پلیت ۲۴ خانه ای به مدت ۷۲ ساعت کشت داده شد. پس از مدت زمان مذکور، اندازه گیری سایتوکاین های IL-4، IL-10، IFN- γ و IL-17 در محیط کشت رویی سلول ها، با استفاده از کیت های الایزای اختصاصی هر کدام از سایتوکاین ها (همگی از شرکت Bioscience) و بر طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. در پایان مقدار هر کدام از سایتوکاین ها بر حسب پیکوگرم در میلی لیتر از روی رسم نمودار استاندارد مربوط به هر سایتوکاین محاسبه شد.

آزمایشات هیستوپاتولوژی

به منظور بررسی میزان ارتشاح سلول های ایمنی به بافت عصبی مرکزی و همچنین بررسی وضعیت سلامت میلین تمامی موش ها یک هفته پس از آخرین تیمار کشته شدند. سپس ساقه مغز هر کدام از آن ها جدا و در فرمالین ۱۰ درصد به آزمایشگاه پاتولوژی فرستاده شد. در آزمایشگاه پاتولوژی پس از تهیه حداقل پنج برش ۱۰ میکرومتری به ازای هر نمونه مغزی، رنگ آمیزی های هماتوکسیلین-ئوزین (H&E) و لوکسول فست بلو (LFB) انجام شد و نمونه ها به ترتیب از نظر ارتشاح سلول های ایمنی و وضعیت سلامت میلین توسط پاتولوژیستی که از نظر نوع تیمارهای صورت گرفته کاملاً بی اطلاع بود، مورد بررسی قرار گرفت. به این ترتیب که در لام های رنگ آمیزی شده با H&E، مقدار ارتشاح سلول های ایمنی در حداقل ۱۰ شان میکروسکوپی برای هر برش بافتی و با بزرگ نمایی ۴۰۰ شمرده شده و به صورت میانگین سلول های ایمنی ارتشاح یافته در واحد سطح برای آن نمونه و در پایان به صورت میانگین برای هر گروه گزارش شد. از طرفی، در لام های رنگ آمیزی شده با LFB، میزان و وسعت تخریب میلین در مقایسه با نمونه بافت عصبی مرکزی موش سالم به صورت صفر تا ۳ (صفر: عدم تخریب میلین، ۱: تخریب کم میلین، ۲: تخریب متوسط میلین و



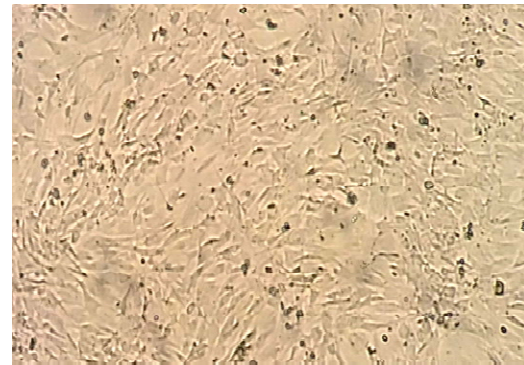
تصویر شماره ۳: بررسی ایمونوفلوئورسینسلولهای مزانشیمی موشی. سلولهای مزانشیمی در آنالیزهای فلوسایتومتری، واجد شاخصهای آنتی ژنی ویژه سلولهای مزانشیمی (CD24، CD29 و CD44)، و فاقد شاخصهای آنتی ژنی ویژه سلولهای خون ساز (CD45 و CD11b) بودند.



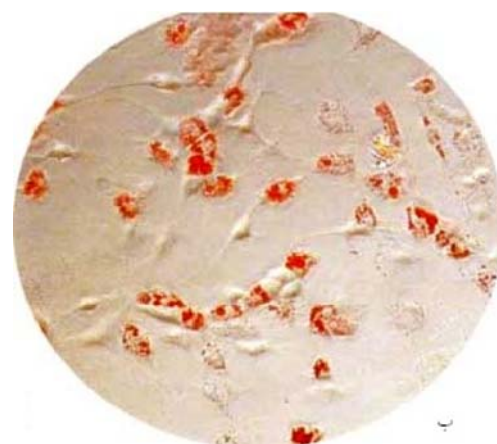
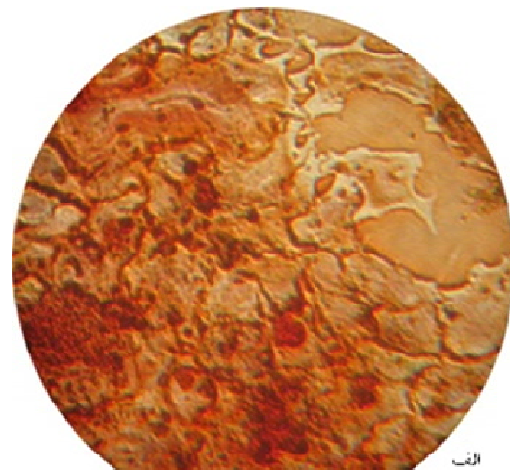
نمودار شماره ۱: میانگین روزانه نمرات شدت بیماری EAE در موشهای گروههای آزمایش و کنترل. موشهای EAE تحت تیمار با سلولهای مزانشیمی سیژن (گروه آزمایش)، از نظر شدت بیماری، تفاوت قابل ملاحظه‌ای با گروه کنترل نداشتند.

نتایج حاصل از آنالیزهای آماری (آزمون آماری من-ویتنی) روی میانگین کل نمرات بیماری EAE دو گروه در پایان دوره تیمار نشان داد که سلولهای مزانشیمی نتوانستند شدت بیماری EAE را در موشهای گروه آزمایش کاهش دهند به طوری که از نظر آماری تفاوتی بین میانگین نمره شدت بیماری EAE در گروه آزمایش ($2/9 \pm 0/97$) با گروه کنترل ($2/73 \pm 0/9$)، که فقط PBS دریافت کرده بود، مشاهده نشد ($p = 0/4$).

اندازه‌گیری سیتوکاینهای $IL-17$ ، $IL-10$ ، $IL-4$ و $IFN-\gamma$
در این تحقیق با استفاده از کیت‌های الایزای



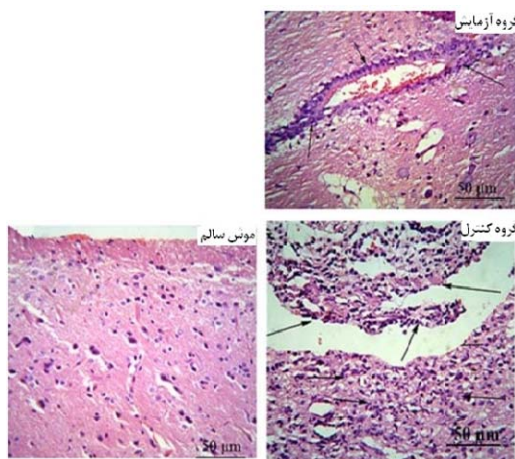
تصویر شماره ۱: سلولهای مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان موش (روز ۵۳)



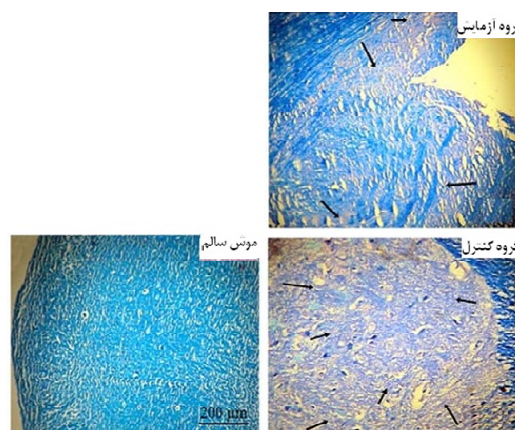
تصویر شماره ۲: تمایز سلولهای مزانشیمی موشی. سلولهای مزانشیمی پس از قرار گرفتن در معرض محیط‌های کشت تمایزی اختصاصی استئوسیتی و آدیپوسیتی به ترتیب به سلولهای استخوانی (الف) و سلولهای چربی (ب) تمایز یافتند.

آزمایشات هیستوپاتولوژی

بررسی های صورت گرفته توسط پاتولوژیست روی نمونه های رنگ آمیزی شده با H&E (تصویر شماره ۵)، نشان داد که تعداد سلول های ایمنی ارتشاح یافته به بافت عصبی موش های گروه آزمایش (1030 ± 35 سلول در میلی متر مربع) کم تر از گروه کنترل (1270 ± 40 سلول در میلی متر مربع) بود؛ اما این اختلاف از نظر آماری معنی دار نبود ($p > 0.05$). بررسی های انجام گرفته روی نمونه های رنگ آمیزی شده با LFB (تصویر شماره ۶) نیز حکایت از تحلیل شدید میلین در نمونه بافت های مغزی هر دو گروه داشت (گروه آزمایش: $2/4 \pm 0/4$ و گروه کنترل: $2/8 \pm 0/5$).

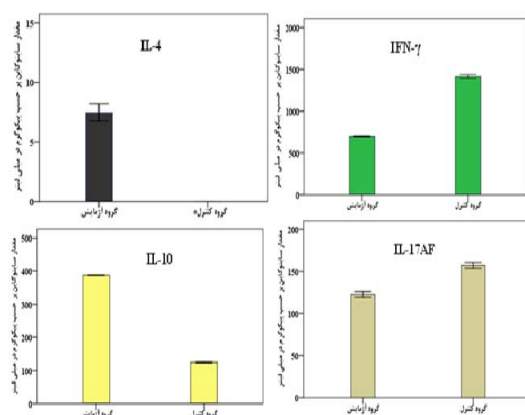


تصویر شماره ۵: وضعیت ارتشاح سلول های ایمنی به بافت عصبی مرکزی موش های EAE گروه های آزمایش و کنترل؛ رنگ آمیزی هماتوکسیلین - اتوزین (H&E).



تصویر شماره ۶: وضعیت سلامت میلین بافت عصبی مرکزی موش های EAE گروه های آزمایش و کنترل. (مناطق که رنگ آبی کم تری

اختصاصی میزان تولید برخی از سایتوکاین های مهم از سلول های طحالی سنجیده شد $\text{IFN-}\gamma$ (نماینده پاسخ سلول های Th1)، IL-4 (نماینده پاسخ سلول های Th2)، IL-10 (سایتوکاینی با خواص ضد التهابی) و IL-17 (نماینده پاسخ سلول های التهابی Th17) (تصویر شماره ۴).



تصویر شماره ۴: سنجش برخی از سایتوکاین های تولیدی از سلول های طحالی موش های گروه های آزمایش و کنترل. موش های EAE گروه آزمایش، متعاقب تیمار با سلول های مزانشیمی سینژن، سایتوکاین های ضد التهابی (IL-10 و IL-4) بیش تری تولید کردند. هم چنین در این گروه، تولید سایتوکاین پیش التهابی $\text{IFN-}\gamma$ ، کم تر از گروه کنترل (دریافت کننده PBS) بود، اما دو گروه از نظر تولید IL-17 ، تفاوت قابل ملاحظه ای نداشتند.

مقدار IL-4 در گروه کنترل، کم تر از حساسیت کیت الایزای مورد استفاده بود (حساسیت کیت: کم تر از ۴ پیکوگرم در میلی لیتر بود). داده های 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 سایتوکاین های ضد التهابی IL-4 و IL-10 به طور قابل ملاحظه ای در گروه آزمایش بیش تر از گروه کنترل بود (به ترتیب $p = 0.006$ و $p < 0.001$). هم چنین تولید سایتوکاین پیش التهابی $\text{IFN-}\gamma$ در گروه آزمایش کم تر از گروه کنترل بود ($p < 0.05$)، اما دو گروه از نظر تولید سایتوکاین پیش التهابی IL-17 با یکدیگر تفاوتی نداشتند.

به خود گرفته اند، شدت تحلیل میلین را در آن مناطق نشان می دهند).
موش های گروه های آزمایش و کنترل، از نظر شدت تحلیل میلین در
بافت عصبی مرکزی، تفاوت قابل ملاحظه ای نداشتند.

بحث

این تحقیق با هدف بررسی اثرات درمانی سلول های
بنیادی مزانشیمی سینژنیک مشتق از مغز استخوان در
مدل EAE (مدل حیوانی بیماری MS انسان) انجام شد.
نتایج مطالعه ما نشان داد که سلول های مزانشیمی
سینژنیک جدا شده از مغز استخوان، علی رغم تحت
تأثیر قرار دادن پاسخ های ایمنی التهابی در موش های
مبتلا به EAE (از طریق کاهش سطح سایتوکاین
ضد التهابی $IFN-\gamma$ و افزایش سطح سایتوکاین های
ضد التهابی $IL-4$ و $IL-10$) نتوانستند وضعیت بیماری را
در آن ها بهبود بخشند. به طوری که هیچ گونه تفاوت
قابل ملاحظه ای از نظر شدت بیماری، ارتشاح سلول های
ایمنی به بافت عصبی مرکزی و هم چنین وضعیت
سلامت میلین، در موش های EAE تیمار شده با
سلول های مزانشیمی سینژنیک مشتق از مغز استخوان، با
گروه کنترل دریافت کننده PBS مشاهده نشد. در
گذشته بسیاری از محققین بیماری EAE را یک بیماری
التهابی مرتبط با سلول های $Th1$ می دانستند اما اخیراً با
کشف جمعیت جدیدی از سلول های التهابی، تحت
عنوان سلول های $Th17$ ، این سلول ها در کانون توجه
بسیاری از محققان حوزه بیماری EAE و MS قرار
گرفته است. سلول های $Th17$ به علت تولید
سایتوکاین های $IL-17A$ و $IL-17F$ به این نام خوانده
می شوند. با این حال، این سلول ها فاکتورهای دیگری را
که فعالانه در پاسخ های التهابی مشارکت دارند، تولید
می کنند، که از آن جمله می توان به $TNF-\alpha$ ، $IL-6$ ، $IL-21$ ،
 $IL-23$ و $GM-CSF$ اشاره کرد (۱۳). مطالعات نشان
داده اند که سلول های تولید کننده $IL-17$ در هر دو
مرحله فعال و مزمن بیماری MS حضور دارند (۱۴).
علاوه بر این شمار زیادی از سلول های $Th17$ خود

واکنش گر را می توان در ارگان های لنفاوی محیطی، قبل
از شروع علائم بالینی EAE مشاهده کرد. حال آن که در
EAE حاد، جمعیت زیادی از این سلول ها در بافت
عصبی مرکزی حضور داشته و با بهبودی علائم اگر چه
آن ها را نمی توان در بافت عصبی مرکزی مشاهده کرد،
ولی هم چنان در اندام های محیطی یافت می شوند (۳۲).
هم چنین مطالعات انجام شده روی مایع مغزی-نخاعی
بیماران مبتلا به MS که در مرحله عود بیماری قرار
داشته اند، نشان داده است که جمعیت سلول های $Th17$
در مایع مغزی-نخاعی این افراد، به کرات بیش تر از
افراد مبتلا به MS در فاز بهبودی و یا بیماران مبتلا به
دیگر بیماری های نورولوژیکی غیر التهابی می باشد (۱۵).
در مدل حیوانی MS، یعنی EAE، نیز نقش مرکزی
سلول های $Th17$ در ایجاد و پیشرفت بیماری به خوبی
مشخص شده است. مطالعات نشان داده که در موش های
فاقد $IL-17$ ، زمان شروع علائم EAE، بسیار با تأخیر
اتفاق می افتد. به علاوه شدت علائم و نیز تغییرات
هیستولوژیکی در این گونه موش ها بسیار کم تر از
موش های طبیعی می باشد (۱۶). هم چنین در مطالعه
دیگری گزارش شده است که خنثی سازی $IL-17$ توسط
آنتی بادی مونوکلونال ضد آن یا استفاده از فیوژن
پروتئین گیرنده Fc ، اثرات مفید قابل ملاحظه ای در
بیماری EAE دارد (۱۷). با توجه به مطالعات ذکر شده در
بالا می توان چنین استنباط کرد که در مطالعه ما یکی از
علل عدم توفیق سلول های مزانشیمی سینژنیک در
کاهش علائم فرم استقرار یافته بیماری EAE (علی رغم
تضعیف پاسخ های التهابی $Th1$)، عدم تأثیر آن روی
جمعیت سلول های التهابی $Th17$ می باشد. زیرا در این
تحقیق هیچ تفاوت قابل ملاحظه ای در تولید $IL-17$ از
سلول های طحالی موش های گروه های آزمایش و
کنترل مشاهده نشد. به علاوه بررسی های
هیستوپاتولوژیکی نیز حکایت از ارتشاح وسیع سلولی در
پارانشیم بافت عصبی مرکزی هر دو گروه از موش ها
داشت. این موضوع بیانگر آن است که احتمالاً

سلول های مزانشیمی سینژنیک، نتوانسته اند از شکل گیری سلول های التهابی در اندام های محیطی و مهاجرت آن ها به سمت پارانشیم بافت عصبی ممانعت به عمل آورند. از همین رو تعداد زیادی از سلول های Th17 اختصاصی میلین نتوانسته اند با گذر از سد خونی - مغزی، در بافت عصبی تجمع یافته و با تولید سایتوکاین ها و کموکاین های التهابی باعث ارتشاح هر چه بیش تر سلول های التهابی از جمله ماکروفاژها، ماست سل ها، نوتروفیل ها، سلول های TCD8⁺ و سلول های B به بافت عصبی مرکزی شوند. نتیجه این ارتشاح وسیع سلولی، تخریب هر چه بیش تر غلاف میلین و آسیب آکسون ها می باشد (۱).

در توافق با یافته مطالعه حاضر در مطالعه ای تزریق سلول های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در روز ۲۴ پس از القای EAE (زمانی که بیماری EAE در موش ها استقرار یافته و به شکل مزمن درآمده است)، تأثیر مثبتی بر کاهش علائم بیماری نداشته است. در حالی که در بخش دیگری از همین مطالعه، تزریق سلول های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در روزهای سوم و هشتم پس از شروع القای EAE (قبل از این که علائم بیماری EAE در موش ها نمایان شود)، بدون آن که تأثیری بر زمان شروع علائم EAE داشته باشد، نتوانسته از شدت علائم بیماری در موش ها بکاهد، تخریب میلین را کاهش دهد و هم چنین ارتشاح لکوسیته را به بافت عصبی مرکزی کم کند (۸). از این رو به نظر می رسد که حداقل در مورد سلول های مزانشیمی سینژنیک مشتق از مغز استخوان، می توان چنین استنباط کرد که این سلول ها احتمالاً زمانی می توانند در بهبود علائم EAE موثر واقع شوند که تزریق آن ها قبل از نمایان شدن علائم بیماری در موش ها (یعنی حداکثر تا روز هشتم بعد از شروع القای EAE) صورت گیرد. دلیل علمی این موضوع از منظر علم ایمونولوژی، این می تواند باشد که از زمان تزریق آنتی ژن میلین به موش ها (به منظور القای بیماری EAE) تا فعال شدن و ایجاد پاسخ توسط

سلول های B، سلول های Th1 و به خصوص سلول های Th17 اختصاصی میلین حدود یک هفته وقت نیاز است. لذا تزریق سلول های مزانشیمی در این فاصله زمانی از طریق تولید فاکتورهای ایمونومدولاتوری و ضد التهابی مختلف می تواند مؤثرتر از هر زمان دیگری، جلوی فعال شدن و ایجاد پاسخ توسط سلول های B، Th1 و Th17 اختصاصی میلین را بگیرد. اما به تعویق انداختن تزریق سلول های مزانشیمی به پس از ایجاد علائم EAE و استقرار بیماری در موش ها، به این علت که دیگر، سلول های B، Th1 و Th17 اختصاصی میلین به تعداد بسیار زیادی در بافت های لنفاوی محیطی فعال شده و با گذر از سد خونی - مغزی به بافت عصبی مرکزی مهاجرت کرده اند، دیگر نمی تواند در جلوگیری از پیشرفت بیماری EAE مؤثر واقع شود. البته بهره گیری از سلول های مزانشیمی جهت پیشگیری از بیماری EAE و یا MS، تنها زمانی توجیه منطقی خواهد داشت که دانش ما به خصوص در مورد بیماری MS به جایی برسد که با روش های تشخیصی و غربالگری بتوانیم با احتمال بسیار بالایی، شانس ابتلای یک شخص را به بیماری MS در آینده تخمین بزنیم. لازم به ذکر است که یکی از محدودیت های این مطالعه نبود امکانات آزمایشگاهی پیشرفته (نظیر سکوتسینگ)، جهت اطمینان از سینژنیک بودن موش های C57BL/6 خریداری شده از انستیتو پاستور تهران بود؛ اگر چه بر اساس مطالب مندرج در وب سایت موسسه مذکور، موش های نژاد C57BL/6 تولیدی در این مرکز، هم خون بوده و از طریق آمیزش های خواهری و برادری برای مدت ۲۰ نسل، تکثیر و تولید می شوند (۱۸)؛ که در این صورت موش های تولیدی در ۹۹ درصد لوکوس های ژنی، از جمله لوکوس ژنی H-2، خالص بوده و سینژن می باشند (۱۹).

به طور خلاصه نتایج تحقیق ما نشان می دهد که استفاده درمانی از سلول های مزانشیمی سینژنیک مشتق از مغز استخوان، در فرم استقرار یافته بیماری EAE، علی رغم این که تا حدود بسیار زیادی سبب تضعیف

Th17، نمی‌تواند مانع پیشرفت علایم EAE و بهبود بیماری گردد.

پاسخ‌های التهابی ناشی از سلول‌های Th1 می‌شود، اما به علت عدم تأثیر بر پاسخ‌های التهابی ناشی از سلول‌های

References

1. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1998; 338(5): 278-285.
2. 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): 2739-2749.
3. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 2002; 30(1): 42-48.
4. Chung NG, Jeong DC, Park SJ, Choi BO, Cho B, Kim HK, et al. Cotransplantation of marrow stromal cells may prevent lethal graft-versus-host disease in major histocompatibility complex mismatched murine hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol* 2004; 80(4): 370-376.
5. Rao P, Segal BM. Experimental autoimmune encephalomyelitis. In: Autoimmunity. Perl A. New York: Humana Press; 2004. P. 363-375.
6. Rafei M, Birman E, Forner K, Galipeau J. Allogeneic mesenchymal stem cells for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol Ther.* 2009; 17(10): 1799-1803.
7. 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): 1192-1203.
8. 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): 1755-1761.
9. 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): 2624-2635.
10. Bonab MM, 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): 50-57.
11. Mojadadi MS, 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.
12. Mojadadi MS, Ebtekar M, Golkar M, Khanahmad H. Effect of interleukin-27 on recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *KAUMS Journal (FEYZ)* 2012; 16(3): 219-228.
13. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, et al. Development, cytokine profile and function

- of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 2007; 8(9): 950-957.
14. Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 2008; 172(1): 146-155.
15. Brucklacher-Waldert V, Stuermer K, Kolster M, Wolthausen J, Tolosa E. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain* 2009; 132(12): 3329-3341.
16. Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2006; 177(1): 566.
17. Hofstetter HH, Ibrahim SM, Koczan D, Kruse N, Weishaupt A, Toyka KV, et al. Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol* 2005; 237(2): 123-130.
18. Owen JA, Punt J, Stranford SA, Jones PP. Kuby Immunology. 7th ed. New York: W.H. Freeman and Company; 2013.