View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Sabzevar University of Medical Sciences Electronic Publications

ORIGINAL ARTICLE

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

Mohammad Shafi Mojadadi[1],
Mohammad Mohammad-zadeh[2],
Rahim Golmohammadi[3],
Najmeh Mahmoodabadi[4]

[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

J Mazandaran Univ Med Sci 2014; 24(113): 55-64 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۱۳ خرداد سال ۱۳۹۳ (۶۴-۵۵)

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

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

چکیده

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

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی- مداخله‌ای، به موش‌های C57BL/ ۶ مبتلا به EAE، در دو نوبت یک‌میلیون سلول مزانشیمی تزریق شد. شدت علایم بالینی در موش‌ها روزانه بررسی و طبق معیارهای استاندارد نمره‌دهی شد. یک هفته پس از آخرین تزریق، تمامی موش‌ها به منظور انجام آزمایش‌های سنجش سایتوکاینی و هیستوپاتولوژی کشته شدند.

یافته ها: سلول‌های مزانشیمی نتوانستند شدت بیماری EAE را در موش‌ها کاهش دهند. اگر چه سلول‌های مزانشیمی توانسته بودند تولید سایتوکاین پیش التهابی اینترفرون گاما را از سلول‌های طحالی موش‌های EAE کاهش دهند، اما تأثیری بر میزان تولید سایتوکاین پیش التهابی اینترلوکین ۱۷، نداشتند. با این حال، میزان تولید سایتوکاین‌های ضد التهابی اینترلوکین ۱۰ و ۴، تحت تأثیر سلول‌های مزانشیمی تزریقی، افزایش قابل ملاحظه‌ای یافته بود. در نهایت سلول‌های مزانشیمی، تأثیری بر میزان سلول‌های ایمنی ارتشاح یافته به بافت عصبی مرکزی و یا وسعت تخریب میلین در این بافت نداشتند.

استنتاج: به نظر می‌رسد سلول‌های مزانشیمی سینژنیک مشتق از مغز استخوان، اثر التیام بخشی در فرم استقرار یافته بیماری EAE ندارند.

واژه های کلیدی: انسفالومیلیت خود ایمن تجربی، سلول‌های 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 به‌خوبی مشخص نیست. با این حال،

مولف مسئول: محمد شفیع مجددی- سبزوار: کیلومتر ۵ جاده تهران، ساختمان شماره ۲ دانشگاه علوم پزشکی سبزوار E-mail:mojadadi@medsab.ac.ir
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 سلول‌های Th1 و Th ۱۷ می‌باشد. این سلول‌ها با تولید سایتوکاین‌ها و کموکاین‌های التهابی در پارانشیم بافت عصبی مرکزی، باعث ارتشاح ماکروفاژها، ماست سل‌ها، نوتروفیل‌ها، سلول‌های $TCD8^+$ و سلول‌های B به بافت عصبی مرکزی می شود، که منجر به تخریب غلاف میلین و آسیب آکسون‌ها می شود(۱). از آن‌جا که مشخصه اصلی بیماری MS، پاسخ‌های ایمنی بیش از حد و نابه‌جا می‌باشد، راه‌کارهای درمانی این بیماری نیز به طور عمده روی سرکوب پاسخ‌های التهابی متمرکز شده است تا از این طریق، از آسیب‌های بیش‌تر به بافت عصبی مرکزی جلوگیری شود.

سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌هایی خود تجدید شونده و چند توانه می‌باشند. این سلول‌ها را می‌توان به طور عمده از مغز استخوان و یا از بافت‌های دیگری نظیر بافت چربی، اپیدرم و خون بندناف جدا کرد. سلول‌های مزانشیمی این قابلیت را دارند تا به انواع مختلفی از سلول‌ها از جمله سلول‌های استخوان، غضروف، چربی، کبد، ماهیچه قلب و عصبی تبدیل شوند(۲). اخیراً، سلول‌های مزانشیمی به علت داشتن خواص ایمونومدولاتوری، امیدهای زیادی را در درمان بیماری‌های التهابی مختلف ایجادکرده‌اند. مطالعات نشان داده‌اند که تزریق داخل رگی سلول‌های مزانشیمی، باعث افزایش بقای پیوندهای پوستی آلوگرافت می‌شود(۳). هم‌چنین، سلول‌های مزانشیمی شانس بقا را در پیوند سلول‌های خون‌ساز آلوژن، در مدل موشی افزایش داده و پیوند هم زمان آن‌ها با سلول‌های خونساز، از شدت بیماری پیوند علیه میزبان کاسته و سطح سرمی اینترفرون گاما را کاهش می‌دهد(۴).

سال ها است که بیماری انسفالومیلیت خودایمن تجربی (Experimental AutoimmureEncephangelitis) در جوندگان به علت داشتن ویژگی‌های پاتولوژیکی و هیستولوژیکی فراوان با بیماری MS در انسان‌ها به منظور تحقیق در زمینه مکانیسم‌های دخیل در بیماری MS و هم‌چنین کشف راه‌های جدید درمانی مورد استفاده پژوهشگران قرار می‌گیرد(۵). در حالی که اکثر مطالعات انجام شده در مدل EAE، حکایت از مفید بودن استفاده درمانی از سلول های مزانشیمی آلوژن(۶) یا زنوژن(۷) مشتق از مغز استخوان (۸) یا بافت چربی(۹) دارد؛ تحقیقات انجام شده در زمینه استفاده درمانی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی سینژن در مدل EAE و بیماری MS، در برخی موارد با نتایج متناقضی همراه بوده است. در مطالعه‌ای، تزریق داخل رگی سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در روزهای سوم و هشتم پس از شروع القای EAE، بدون آن که تأثیری بر زمان شروع علایم EAE داشته باشد؛ توانسته از شدت علائم بیماری در موش‌ها بکاهد؛ تخریب میلین را کاهش دهد و هم‌چنین ارتشاح لکوسیتی را به بافت عصبی مرکزی کم کند. در حالی‌که در بخش دیگری از همین مطالعه، تزریق سلول‌های مزانشیمی در روز ۲۴ پس از القای EAE، تأثیر مثبتی بر کاهش علایم بیماری نداشته است(۸). در مطالعه‌ای دیگر، تزریق سلول‌های بنیادی مزانشیمی اتولوگ به ده بیمار مبتلا به MS، توانست تنها در یکی از بیماران علایم بیماری را بهبود بخشد؛ در چهار بیمار، هیچ‌گونه بهبودی مشاهده نشده و در پنج بیمار دیگر علایم بیماری شدت یافت. هم‌چنین در ارزیابی‌های ام.آر.آی. مشخص شد که فقط در یکی از بیماران تعداد پلاک‌ها کاهش یافته بود، در حالی که در هفت بیمار دیگر هیچ تغییری در اندازه و تعداد پلاک‌های مغزی مشاهده نشد و در دو بیمار باقی‌مانده نیز تعداد پلاک‌ها افزایش یافته بود(۱۰).

نظر به وجود برخی تناقضات در حوزه استفاده درمانی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مدل EAE و MS، و هم‌چنین بحث امنیت و خطراتی که ممکن است استفاده از سلول‌های مزانشیمی آلوژن و یا زنوژن در پی داشته باشد (انتقال عفونت‌ها و یا احیانا پاسخ‌های سیستم ایمنی میزبان به سلول پیوندی)، ضرورت تحقیقات

بیش‌تر در این زمینه احساس می‌شود. به خصوص از این منظر که در اکثر مطالعات، اثرات مثبت درمانی سلول‌های مزانشیمی در مدل EAE، بیش‌تر زمانی مشاهده شده است که تزریق سلول‌های مزانشیمی، قبل یا درست در زمان بروز علایم EAE صورت گرفته باشد و نه پس از استقرار علایم بیماری(۸). از این‌رو، این تحقیق با هدف بررسی اثرات درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی سینژنیک مشتق از مغز استخوان، در فرم استقرار یافته و مزمن بیماری EAE انجام گرفت. نتایج این تحقیق می‌تواند پاسخی به این پرسش باشد که آیا سلول‌های مزانشیمی سینژنیک هم می‌توانند همانند همتایان آلوژن 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 موش‌های 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 روش‌ها

جداسازی سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان

موش‌های C57BL/6 مورد استفاده در این مطالعه تجربی- مداخله ای، از انیستیتو پاستور کرج خریداری شدند. به منظور سازگاری با محیط، موش هابه مدت یک هفته پیش از شروع مطالعه در شرایط کاملاً بهداشتی و با دسترسی آزار به آب و غذای کافی و یک چرخه ۱۲ ساعته نور/تاریکی، در حیوان خانه نگهداری شدند. دراین 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 آن‌ها به کف پلیت کشت سلول، از بقیه سلول‌های موجود در مغز استخوان جدا شده و به منظور تأیید هویت از نظر قابلیت تمایز به سلول‌های استخوانی و چربی، و نیز از نظر آنتی ژن‌های سطح سلولی ویژه سلول‌های بنیادی مزانشیمی مورد بررسی قرار گرفتند(۱۱). القای بیماری EAE در موش‌ها و تزریق سلول‌های مزانشیمی القای بیماری EAE در موش‌های ماده C57BL/6 هشت تا ده هفته، مطابق روش شرح داده شده توسط مجددی و همکاران(۱۲) صورت گرفت. پس از ظهور علایم بیماری، موش‌های مبتلا به EAE به طوری که از نظر میانگین علایم 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 موش‌های گروه‌های 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. موش‌ها تا زمان کشته شدن، روزانه از نظر شدت علایم بالینی بررسی و بر اساس معیارهای استاندارد (نمره صفر: فاقد هرگونه علایم 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) نمره‌دهی شدند و میانگین نمره برای هرکدام از گروه ها محاسبه شد(۱۲). یک هفته پس از آخرین تزریق، همه موش‌ها به منظور انجام آزمایشات ایمونولوژی و هیستوپاتولوژی کشته شدند.

اندازه‌گیری سایتوکاین های IFN-γ، IL-4، IL-10 و IL-17

به منظور اندازه‌گیری میزان تولید سایتوکاین‌های IFN-γ،IL-4،IL-10 و IL-17، ابتدا طحال هرکدام از موش‌های گروه‌های آزمایش و کنترل، در شرایط استریل جدا و سوسپانسیون سلول‌های طحالی تهیه شد. سپس تعداد سه میلیون سلول طحالی (میزان سلول‌های زنده بالای ۹۵ درصد) از هر کدام از موش‌های دوگروه در مجاورت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از پپتید MOG_{35-55} (شرکت Alexis) 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 سایتوکاین‌های IL-4،IFN-γ،IL-10 و IL-17 در محیط کشت‌رویی سلول‌ها، با استفاده از کیت‌های الایزای اختصاصی هر کدام از سایتوکاین‌ها (همگی از شرکت Bioscience) و بر طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. در پایان مقدار هر کدام از سایتوکاین‌ها برحسب پیکوگرم در میلی لیتر از روی رسم نمودار استاندارد مربوط به هر سایتوکاین محاسبه شد.

آزمایشات هیستوپاتولوژی

به منظور بررسی میزان ارتشاح سلول‌های ایمنی به بافت عصبی مرکزی و هم‌چنین بررسی وضعیت سلامت میلین تمامی موش‌ها یک هفته پس از آخرین تیمار کشته شدند. سپس ساقه مغز هر کدام از آن‌ها 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 آمیزی‌های هماتوکسیلین- ائوزین (H&E) و لوکسول فست بلو (LFB) انجام شد و نمونه‌ها به ترتیب از نظر ارتشاح سلول‌های 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 لام‌های رنگ آمیزی شده با H&E، مقدار ارتشاح سلول های ایمنی در حداقل ۱۰ شان میکروسکوپی برای هر برش بافتی و با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ شمرده شده و به صورت میانگین سلول‌های ایمنی ارتشاح یافته در واحد سطح برای آن نمونه و در پایان به صورت میانگین برای هر گروه گزارش شد.از طرفی، در لام‌های 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 ۳: تخریب زیاد میلین) توسط پاتولوژیست به صورت میانگین برای هر گروه گزارش شد.

آنالیزهای آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها، به وسیله نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و با استفاده از آزمون‌های آماری کروسکال- والیس (Kruskal-Wallis)، من- ویتنی یو (Mann-Whitney U) وآنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) صورت گرفت. در تمامی موارد سطح معنی‌داری داده‌ها، ۹۵ درصد در نظر گرفته شد.

یافته ها

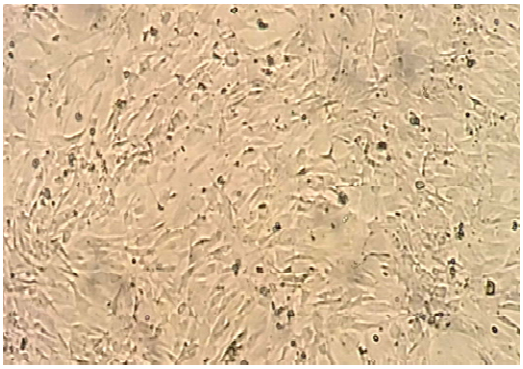
جداسازی و تأیید هویت سلول های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان

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

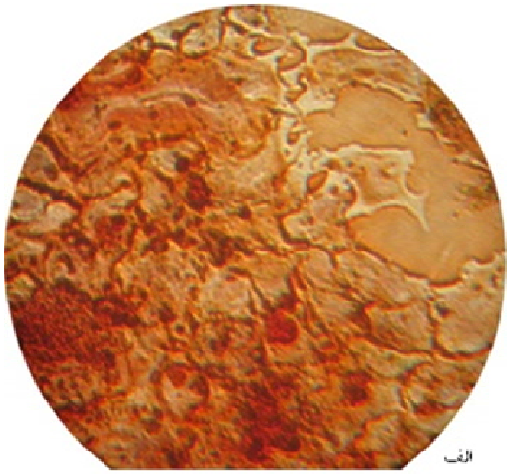
بررسی ایمونوفنوتایپی سلول های مذکور با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری و آنالیز داده ها با نرم افزار Win MDI ۲/۹ نشان داد که سلول‌های مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان، واجد آنتی ژن های سطح سلولی ویژه سلول‌های مزانشیمی (CD24، CD29 و CD44) و فاقد آنتی‌ژن‌های سطح سلولی ویژه سلول‌های خون‌ساز (CD45 و CD11b)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

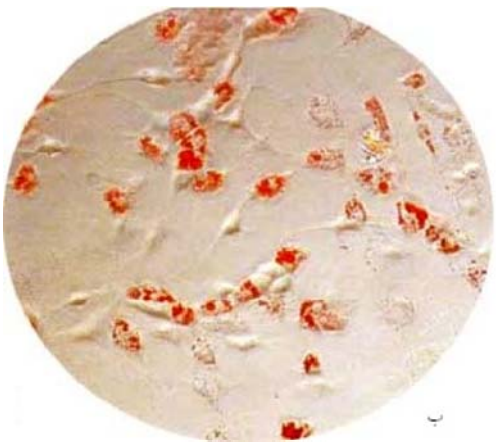
وضعیت بیماری EAE در موش های گروه های مختلف

حدود ۱۲ تا ۱۴ روز پس از تزریق آنتی ژن MOG به موش‌ها، علایم بیماری EAE ظاهر شد. میانگین روزانه نمرات شدت بیماری EAE در نمودار شماره ۱ به تصویر کشیده شده است.

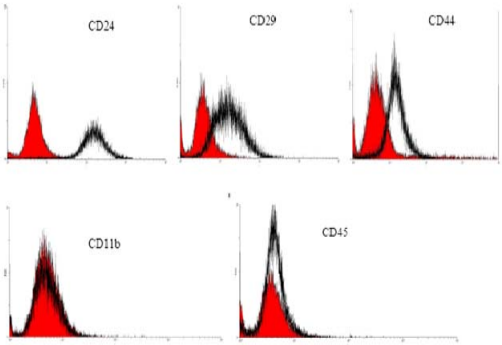


تصویر شماره ۱: سلول های مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان موش (روز ۵۳)

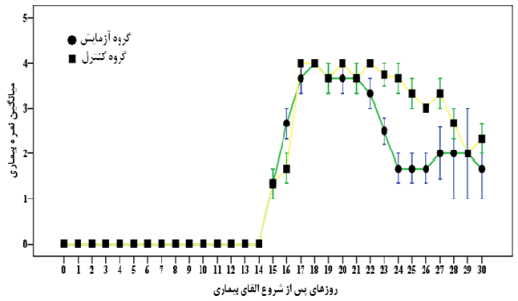




تصویر شماره ۲: تمایز سلول های مزانشیمی موشی. سلول های مزانشیمی پس از قرار گرفتن در معرض محیط های کشت تمایزی اختصاصی استئوسیتی و آدیپوسیتی به ترتیب به سلول های استخوانی (الف) و سلول های چربی (ب) تمایز یافتند.



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



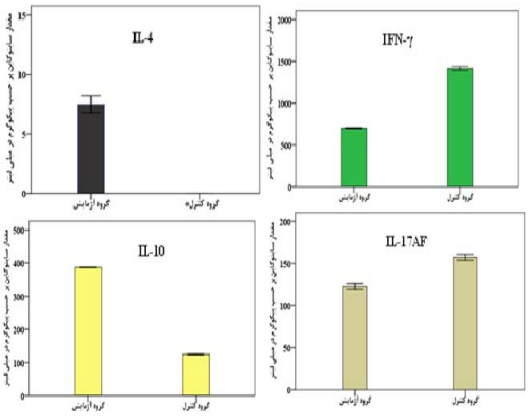
نمودار شماره ۱: میانگین روزانه نمرات شدت بیماری EAE در موش های گروه های آزمایش وکنترل. موش های EAE تحت تیمار با سلول های مزانشیمی سینژن (گروه آزمایش)، از نظر شدت بیماری، تفاوت قابل ملاحظه ای با گروه کنترل نداشتند.

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 به‌طوری که از نظر آماری تفاوتی بین میانگین نمره شدت بیماری EAE در گروه آزمایش(۰/۹۷ ± ۲/۹) با گروه کنترل(۰/۹ ± ۲/۷۳)، که فقط PBS دریافت کرده بود، مشاهده نشد (p =۰/۴).

اندازه گیری سایتوکاین‌های IFN-γ، IL-4، IL-10 و IL-17

در این تحقیق با استفاده از کیت‌های الایزای

اختصاصی میزان تولید برخی از سایتوکاین‌های مهم از سلول‌های طحالی سنجیده شد IFN-γ (نماینده پاسخ سلول‌های Th1)، IL-4 (نماینده پاسخ سلول‌های Th2)، IL-10 (سایتوکاینی با خواص ضد التهابی) و IL-17 (نماینده پاسخ سلول‌های التهابی Th17) (تصویر شماره ۴).

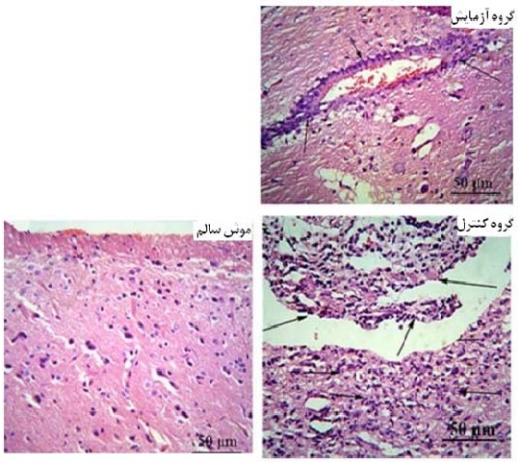


تصویر شماره ۴: سنجش برخی از سایتوکاین های تولیدی از سلول‌های طحالی موش های گروه های آزمایش و کنترل. موش‌های EAE گروه آزمایش، متعاقب تیمار با سلول های مزانشیمی سینژن، سایتوکاین های ضد التهابی (IL-4 و IL-10) بیش تری تولید کردند. هم چنین در این گروه، تولید سایتوکاین پیش التهابی IFN-γ، کم تر از گروه کنترل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

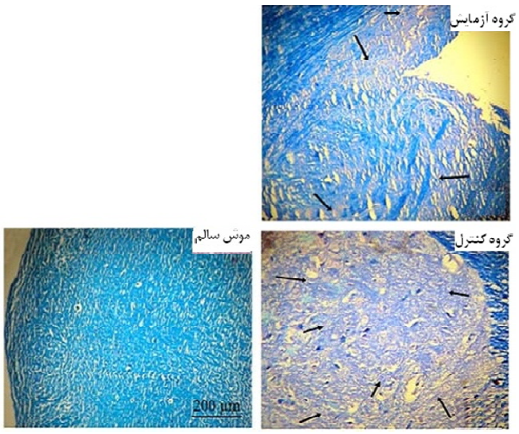
مقدار IL-4 در گروه کنترل، کم تر از حساسیت کیت الایزای مورد استفاده بود (حساسیت کیت: کم تر از ۴ پیکوگرم در میلی لیتر بود). داده‌های حاصل با استفاده از آزمون آماری ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey آنالیز و با یکدیگر مقایسه شد. نتایج حاصل از آنالیزهای آماری نشان داد که میزان تولید سایتوکاین‌های ضد التهابی IL-4 و IL-10 به طور قابل ملاحظه‌ای در گروه آزمایش بیش‌تر از گروه کنترل بود (به ترتیب $p=۰/۰۰۶$ و $p<۰/۰۰۱$). هم‌چنین تولید سایتوکاین پیش التهابی IFN-γ در گروه آزمایش کم‌تر از گروه کنترل بود ($p<۰/۰۵$)، اما دو گروه از نظر تولید سایتوکاین پیش التهابی IL-17 با یکدیگر تفاوتی نداشتند.

آزمایشات هیستوپاتولوژی

بررسی‌های صورت گرفته توسط پاتولوژیست روی نمونه‌های رنگ آمیزی شده با H&E (تصویر شماره ۵)، نشان داد که تعداد سلول‌های ایمنی ارتشاح یافته به بافت عصبی موش‌های گروه آزمایش (۳۵±۱۰۳۰ سلول در میلی‌متر مربع) کم‌تر از گروه کنترل (۴۰±۱۲۷۰۰ سلول در میلی متر مربع) بود؛ اما این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p>۰/۰۵$). بررسی‌های انجام گرفته روی نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده با LFB (تصویر شماره ۶) نیز حکایت از تحلیل شدید میلین در نمونه بافت‌های مغزی هر دو گروه داشت (گروه آزمایش: ۰/۴ ± ۲/۴ و گروه کنترل: ۰/۵ ± ۲/۸.



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



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

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

بحث

این تحقیق با هدف بررسی اثرات درمانی سلول‌های 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 دان پاسخ های ایمنی التهابی در موش‌های مبتلا به EAE (از طریق کاهش سطح سایتوکاین ضدالتهابی IFN-γ، و افزایش سطح سایتوکاین های ضدالتهابی IL-4 و IL-10) نتوانستند وضعیت بیماری را در آن‌ها بهبود بخشند. به طوری که هیچ‌گونه تفاوت قابل ملاحظه‌ای از نظر شدت بیماری، ارتشاح سلول‌های ایمنی به بافت عصبی مرکزی و هم‌چنین وضعیت سلامت میلین، در موش‌های EAE تیمار شده با سلول‌های 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 سلول‌های Th1 می‌دانستند اما اخیراً با کشف جمعیت جدیدی از سلول‌های التهابی، تحت عنوان سلول‌های Th17، این سلول‌ها در کانون توجه بسیاری از محققان حوزه بیماری EAE و MS قرار گرفته است. سلول‌های Th17به علت تولید سایتوکاین‌های IL-17A و IL-17F به این نام خوانده می‌شوند. با این حال، این سلول‌ها فاکتورهای دیگری را که فعالانه در پاسخ‌های التهابی مشارکت دارند، تولید می‌کنند، که از آن‌جمله می‌توان به TNF-α، IL-6، IL-21، IL-23 و GM-CSF اشاره کرد(۱۳). مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های تولیدکننده IL-17 در هر دو مرحله فعال و مزمن بیماری MS حضور دارند(۱۴). علاوه بر این شمار زیادی از سلول‌های Th17 خود واکنش‌گر را می‌توان در ارگان‌های لنفاوی محیطی، قبل از شروع علایم بالینی EAE مشاهده کرد. حال آن‌که در EAE حاد، جمعیت زیادی از این سلول‌ها در بافت عصبی مرکزی حضور داشته و با بهبودی علایم اگر چه آن‌ها را نمی‌توان در بافت عصبی مرکزی مشاهده کرد، ولی هم‌چنان در اندام‌های محیطی یافت می‌شوند(۳۲). هم‌چنین مطالعات انجام شده روی مایع مغزی-نخاعی بیماران مبتلا به MS که در مرحله عود بیماری قرار داشته اند، نشان داده است که جمعیت سلول‌های Th17 در مایع مغزی- نخاعی این افراد، به کرات ببیش‌تر از افراد مبتلا به MS در فاز بهبودی و یا بیماران مبتلا به دیگر بیماری‌های نورولوژیکی غیر التهابی می‌باشد(۱۵). در مدل حیوانی MS، یعنی EAE، نیز نقش مرکزی سلول‌های Th17 در ایجاد و پیشرفت بیماری به‌خوبی مشخص شده است. مطالعات نشان داده که در موش‌های فاقد IL-17، زمان شروع علایم EAE، بسیار با تأخیر اتفاق می‌افتد. به علاوه شدت علایم و نیز تغییرات هیستولوژیکی در این‌گونه موش‌ها بسیار کم‌تر از موش‌های طبیعی می‌باشد(۱۶). هم‌چنین در مطالعه دیگری گزارش شده است که خنثی‌سازی IL-17 توسط آنتی‌بادی مونوکلونال ضد آن یا استفاده از فیوژن پروتئین گیرنده Fc، اثرات مفید قابل ملاحظه‌ای در بیماری EAE دارد(۱۷). با توجه به مطالعات ذکر شده در بالا می‌توان چنین استنباط کرد که در مطالعه ما یکی از علل عدم توفیق سلول‌های مزانشیمی سینژنیک در کاهش علایم فرم استقرار یافته بیماری EAE (علی‌رغم تضعیف پاسخ‌های التهابی Th1)، عدم تأثیر آن روی جمعیت سلول‌های التهابی Th17 می‌باشد. زیرا در این تحقیق هیچ تفاوت قابل ملاحظه‌ای در تولید IL-17 از سلول های طحالی موش‌های گروه‌های آزمایش و کنترل مشاهده نشد. به علاوه بررسی‌های هیستوپاتولوژیکی نیز حکایت از ارتشاح وسیع سلولی در پارانشیم بافت عصبی مرکزی هر دو گروه از موش‌ها داشت. این موضوع بیانگر آن است که احتمالاً

سلول‌های مزانشیمی سینژنیک، نتوانسته‌اند از شکل‌گیری سلول‌های التهابی دراندام‌های محیطی و مهاجرت آن‌ها به سمت پارانشیم بافت عصبی ممانعت به عمل آورند. از همین رو تعداد زیادی از سلول‌های Th17 اختصاصی میلین توانسته‌اند با گذر از سد خونی- مغزی، در بافت عصبی تجمع یافته و با تولید سایتوکاین ها و کموکاین‌های التهابی باعث ارتشاح هر چه بیش‌تر سلول‌های التهابی از جمله ماکروفاژها، ماست سل‌ها، نوتروفیل‌ها، سلول‌های $TCD8^{+}$ و سلول‌های B به بافت عصبی مرکزی شوند. نتیجه این ارتشاح وسیع سلولی،تخریب هر چه بیش‌تر غلاف میلین و آسیب آکسون‌ها می‌باشد(۱).

در توافق با یافته مطالعه حاضر در مطالعه‌ای تزریق سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در روز ۲۴ پس از القای EAE (زمانی که بیماری EAE در موش‌ها استقرار یافته و به شکل مزمن درآمده است)، تأثیر مثبتی بر کاهش علایم بیماری نداشته است. در حالی که در بخش دیگری از همین مطالعه، تزریق سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در روزهای سوم و هشتم پس از شروع القای EAE (قبل از این که علایم بیماری EAE در موش‌ها نمایان شود)، بدون آن‌که تأثیری بر زمان شروع علایم EAE داشته باشد، توانسته از شدت علایم بیماری در موش‌ها بکاهد، تخریب میلین را کاهش دهد و هم‌چنین ارتشاح لکوسیتی را به بافت عصبی مرکزی کم کند(۸). از این‌رو به نظر می‌رسد که حداقل در مورد سلول‌های مزانشیمی سینژنیک مشتق از مغز استخوان، می‌توان چنین استنباط کرد که این سلول ها احتمالاً زمانی می‌توانند در بهبود علایم EAE موثر واقع شوند که تزریق آن‌ها قبل از نمایان شدن علایم بیماری در موش‌ها (یعنی حداکثر تا روز هشتم بعد از شروع القای EAE) صورت گیرد. دلیل علمی این موضوع از منظر علم ایمونولوژی، این می‌تواند باشد که از زمان تزریق آنتی ژن میلین به موش‌ها (به منظور القای بیماری EAE) تا فعال شدن و ایجاد پاسخ توسط سلول‌های B، سلول‌های Th1 و به‌خصوص سلول‌های Th17 اختصاصی میلین حدود یک هفته وقت نیاز است. لذا تزریق سلول‌های مزانشیمی در این فاصله زمانی از طریق تولید فاکتورهای ایمونومدولاتوری و ضد التهابی مختلف می‌تواند مؤثرتر از هر زمان دیگری، جلوی فعال شدن و ایجاد پاسخ توسط سلول هایB، Th1 و Th17 اختصاصی میلین را بگیرد. اما به تعویق انداختن تزریق سلول های مزانشیمی به پس از ایجاد علایم EAE و استقرار بیماری در موش ها، به این علت که دیگر، سلول‌های B، Th1 و Th17 اختصاصی میلین به تعداد بسیار زیادی در بافت‌های لنفاوی محیطی فعال شده و با گذر از سد خونی- مغزی به بافت عصبی مرکزی مهاجرت کرده‌اند، دیگر نمی‌تواند در جلوگیری از پیشرفت بیماری EAE مؤثر واقع شود. البته بهره‌گیری از سلول‌های 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 روش‌های تشخیصی و غربالگری بتوانیم با احتمال بسیار بالایی، شانس ابتلای یک شخص را به بیماریMS در آینده تخمین بزنیم. لازم به ذکر است که یکی از محدودیت‌های این مطالعه نبود امکانات آزمایشگاهی پیشرفته (نظیر سکوئنسینگ)، جهت اطمینان از سینژنیک بودن موش‌های C57BL/6 خریداری شده از انستیتو پاستور تهران بود؛ اگر چه بر اساس مطالب مندرج در وب سایت موسسه مذکور، موش‌های نژاد C57BL/6 تولیدی در این مرکز، هم‌خون بوده و از طریق آمیزش‌های خواهری و برادری برای مدت ۲۰ نسل، تکثیر و تولید می‌شوند(۱۸)؛ که در این صورت موش‌های تولیدی در ۹۹ درصد لوکوس‌های ژنی، از جمه لوکوس ژنی H-2، خالص بوده و سینژن می‌باشند(۱۹).

به طور خلاصه نتایج تحقیق ما نشان می‌دهد که استفاده درمانی از سلول‌های مزانشیمی سینژنیک مشتق از مغز استخوان، در فرم استقرار یافته بیماری EAE، علی‌رغم این‌که تا حدود بسیار زیادی سبب تضعیف

پاسخ‌های التهابی ناشی از سلول‌های Th1 می‌شود، اما به علت عدم تأثیر بر پاسخ‌های التهابی ناشی از سلول‌های Th17، نمی‌تواند مانع پیشرفت علایم EAE و بهبود بیماری گردد.

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 lymphocyteproliferation 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 ameliorateexperimental 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, Stuerner 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 Imunology. 7th ed. New York: W.H. Freeman and Company; 2013.