



Research Article

Transplantation of Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) into Cuprizone Model of Demyelination in Rat

Morteza Aminpour¹, Maryam Nazm Bojnordi^{2*}, Ehsan Enderami³, Hatef Ghasemi Hamidabadi⁴, Mansoureh Mirzaie⁵

¹ M.Sc Student, Department of Anatomy and Cell Biology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Assistant Professor, Department of Anatomy and Cell Biology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Assistant Professor, Department of Medical Biotechnology, School of Advanced Technologies in Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Associate Professor, Department of Anatomy and Cell Biology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Investigator, Department of Anatomy and Cell Biology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

*Corresponding author: Maryam NazmBojnordi, Department of Anatomy and Cell Biology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. E-mail: bojnordim@yahoo.com

DOI: [10.32592/nkums.15.1.43](https://doi.org/10.32592/nkums.15.1.43)

How to Cite this Article:

Aminpour M, Nazm Bojnordi M, Enderami S E, Ghasemi Hamidabadi H, Mirzaie M. Transplantation of Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) into Cuprizone Model of Demyelination in Rat. J North Khorasan Univ Med Sci. 2023;15(1):43-51. DOI: [10.32592/nkums.15.1.43](https://doi.org/10.32592/nkums.15.1.43)

Received: 05 November 2022

Accepted: 31 January 2023

Keywords:

Demyelination model
Induced pluripotent stem cells
Multiple sclerosis
Remyelination
Transplantation

Abstract

Introduction: Multiple Sclerosis (MS) is a neurodegenerative inflammatory disease with a wide range of axonal demyelination and sensory-motor disorders. Today, stem cell therapy is an appropriate choice for MS management. Induced Pluripotent Stem Cells (iPSC) are pluripotent stem cells that have neuroprotective effects with neuroglial differentiation potential. In this study, we used iPSCs to improve remyelination and behavioral function in model of cuprizone multiple sclerosis disease in rats.

Method: Human iPSCs were cultured and extended on a mouse embryonic fibroblast feeder cell layer inactivated with mitomycin-C in DMEM/F12 supplemented with 20% knockout serum replacement, 0.1 mmol/L nonessential amino acids, and 10 ng/mL of recombinant human basic fibroblast growth factor in a 5% CO₂ and 95% humidity. The demyelination model was induced using a 0.2 oral Cuprizone regime. Thereafter, iPSCs were transplanted after six weeks. Remyelination was investigated via histological assessments and immunocytochemistry following six-week post-transplantation. The functionality was evaluated using behavioral tests, BBB, and Footprint following six-week post-transplantation.

Results: The results of in vivo studies showed that after specific myelin tissue staining, the cuprizone diet led to the induction of demyelinated areas in the brain tissue six weeks after the cuprizone diet. Differentiation of transplanted cells was confirmed via the immunocytochemistry technique of PLP. The results of the Footprint test showed that the motor function of the paws of the animals improved compared to the control group. Moreover, BBB behavioral tests showed improved symptoms in the experimental groups that received the cells.

Conclusion: In total, iPSCs can improve remyelination and functional recovery following transplantation into the Cuprizone demyelination model in rats. Therefore, iPSC therapy could improve behavioral function in multiple sclerosis disease.



بررسی پیوند سلول‌های بنیادی پرتوان القایی بر بهبود میلین‌سازی در مدل تجربی مولتیپل اسکلروزیس القا شده با کوپریزون در موش صحرایی

مرتضی امین‌پور^۱ ID، مریم نظم‌بجنوردی^{۲*} ID، احسان اندرامی^۳ ID، هاتف قاسمی حمیدآبادی^۴ ID، منصوره میرزایی^۵ ID

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
^۲ استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
^۳ استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
^۴ دانشیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
^۵ کارشناس، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
^{*} نویسنده مسئول: مریم نظم‌بجنوردی، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران. ایمیل:

bojnordim@yahoo.com

DOI: 10.32592/nkums.15.1.43

چکیده	تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۰۱
مقدمه: مولتیپل اسکلروزیس با تخریب میلین آکسون‌ها و نقائص حسی و حرکتی همراه است. یکی از روش‌های جدید برای درمان این بیماری، پیوند سلول‌های بنیادی است. در تحقیق حاضر، سلول‌های بنیادی پرتوان القایی به موش صحرایی مدل ام‌اس پیوند شد و نقش آن‌ها در میلین‌سازی بررسی شد.	واژگان کلیدی: پیوند سلولی سلول‌های بنیادی پرتوان القایی مدل دمی‌لینیشن مولتیپل اسکلروزیس میلین‌سازی
روش کار: سلول‌های بنیادی پرتوان القایی (iPSCs) در محیط مناسب کشت داده شدند. در مرحله درون‌تنی، از ۲۴ رأس موش صحرایی نر در محدوده وزنی ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم استفاده شد. برای القای مدل دمی‌لیناسیون، رژیم خوراکی کوپریزون ۰/۲ درصد استفاده شد. ۶ هفته پس از ایجاد مدل دمی‌لینیشن، سلول‌های تمایز یافته به موش پیوند شد. ۶ هفته پس از پیوند سلول، بررسی‌های بافت‌شناسی در محل ضایعه انجام شد. همچنین، علائم بالینی با استفاده از تست‌های رفتاری BBB و Footprint بررسی شد.	
یافته‌ها: نتایج مطالعات درون‌تنی نشان داد که پس از رنگ‌آمیزی بافتی اختصاصی میلین، رژیم کوپریزون منجر به القای نواحی دمی‌لینه در بافت مغز، ۶ هفته بعد از رژیم کوپریزون شد. ارزیابی تمایز سلول‌های جایگزین‌شده در بخش آسیب‌دیده مغز، پس از پیوند، با بیان آنتی‌بادی PLP تأیید شد. نتایج تست Footprint نشان داد که عملکرد حرکتی پنجه‌های پای جانوران در مقایسه با گروه کنترل بهبود یافته است و تست‌های رفتاری BBB، بهبود علائم را در گروه‌های تجربی دریافت‌کننده سلول، نشان دادند.	
نتیجه‌گیری: پیوند سلول‌های بنیادی پرتوان القایی انسانی به موش صحرایی مدل دمی‌لینیشن، منجر به بهبود عملکرد حرکتی حیوان می‌شود.	

مقدمه

به دلیل وجود عوامل التهابی، ام‌اس به عنوان نوعی بیماری خودایمنی محسوب می‌شود. درمان این بیماری شامل تجویز عوامل تضعیف‌کننده سیستم ایمنی و کاهش‌دهنده التهابات سیستم عصبی است که عوارض خاص خود را دارد. با وجود به کارگیری داروهای متعدد، این بیماری درمان کافی و مؤثری ندارد [۴-۶]. با توجه به اینکه تخریب میلین سبب بلوک هدایتی و بروز علائم نورولوژیکی شدیدی می‌شود، هدف عمده درمان‌های ترمیمی، ارتقای ترمیم میلین، میلین‌سازی مجدد و جلوگیری از ایجاد آکسون‌های بدون میلین است [۷-۹]. یکی از راهکارهای ترمیمی، استفاده از سلول‌درمانی به منظور افزایش فرایند میلین‌سازی است [۱۰-۱۲]. لذا، یکی از عوامل مهم در انتخاب منبع

یکی از بیماری‌های شایع نورودژنراتیو، بیماری مولتیپل اسکلروزیس (Multiple Sclerosis: MS) است که با طیف وسیعی از تظاهرات بالینی از جمله، نقائص حسی و حرکتی و ناتوانی‌های گسترده شناخته می‌شود [۱]. این بیماری، از نوع بیماری‌های خودایمنی تخریب‌کننده غلاف میلین در دستگاه عصبی مرکزی است که عامل ایجادکننده آن، ناشناخته است [۲]. اختلال در عملکرد الیگودندروسیت‌ها که تحت شرایط پاتولوژیک رخ می‌دهد، منجر به این بیماری می‌شود. الیگودندروسیت‌ها نقش مهمی در ساخت و حفظ غلاف میلین آکسون‌های سیستم عصبی مرکزی دارند و در نتیجه، اختلال در عملکرد آن‌ها سبب اختلالات عصبی می‌شود [۳].

شدند. در نهایت، با انجام ساترپیوژ با دور ۱۲۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه و دورریختن سوپ رویی، سلول‌های حاصل به فلاسک‌های کشت منتقل شدند که لایه زمینه‌ای فیبروبلاست جنینی موش (MEFs) داشتند که با مایتومایسین C (سیگما، آلمان) غیرفعال شده بودند. پس از بررسی سلول‌ها با میکروسکوپ، در صورت نیاز، تعویض محیط کشت نیز انجام شد. پاساژ سلول‌ها عمدتاً هر ۳ روز یک‌بار انجام شد.

القای دمیپلیناسیون با کوپریزون

در این پژوهش، از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات در یک دوره روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته و در شرایط مطلوب و استاندارد، بدون محدودیت در دسترسی به آب و غذا نگهداری شدند. تمام آزمایش‌ها با رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی، مصوب کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران (IR.MAZUMS.REC.1400.8875) انجام شد. ۲۴ رأس موش صحرایی در گروه‌های مطالعه (۸ سر موش صحرایی در هر گروه) بررسی شدند. گروه کنترل فقط رژیم کوپریزون را به مدت ۶ هفته دریافت کردند. گروه ویکل بعد از رژیم کوپریزون به مدت ۶ هفته، تزریق محیط بدون سلول‌های بنیادی را دریافت کردند. گروه تجربی بعد از رژیم کوپریزون به مدت ۶ هفته، تزریق محیط محتوای سلول‌های بنیادی را دریافت کردند.

برای القای دمیپلیناسیون و ایجاد مدل بیماری ام‌اس، از کوپریزون استفاده شد. کوپریزون با نسبت وزنی ۰/۲ درصد، به پلت غذایی مخصوص جوندگان اضافه شد که به پودر تبدیل شده بود و به‌طور کامل مخلوط شد. بعد از اضافه کردن آب و تبدیل خمیر حاصل به پلت غذایی و خشک کردن آن‌ها در دمای محیط، به مدت ۶ هفته در رژیم غذایی جانوران استفاده شد. بعد از ۶ هفته، کوپریزون از رژیم غذایی حیوانات برداشته و با رژیم غذایی معمولی جایگزین شد. به‌منظور تأیید مدل دمیپلیناسیون، از روش‌های بافت‌شناسی و رنگ‌آمیزی اختصاصی میلین استفاده شد.

مطالعات بافت‌شناسی

به‌منظور تأیید مدل ام‌اس پس از ۶ هفته، حیوانات با تزریق داخل صفاقی کتامین و زایلازین به‌طور عمیق بیهوش شدند و عمل پرفیوژن از طریق بطن چپ قلب انجام شد. در ابتدا، ۱۰۰ میلی‌لیتر نرمال سالین ۰/۱ مولار بافرشده با فسفات از طریق بطن چپ وارد قلب حیوان شد. بعد از خارج شدن تمامی خون موجود در عروق از دهلیز راست، ۲۰۰ میلی‌لیتر پارافرمالدهید ۴ درصد به‌منظور تثبیت اولیه از طریق بطن چپ وارد دستگاه گردش خون حیوان شد. سپس، مغز حیوان از جمجمه خارج شد. برای بهتر فیکس شدن، بافت در فرمالین ۱۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از فیکس اولیه، فرمالین ظرف تعویض شد. پس از یک هفته، بافت مغز پردازش بافتی شد و پس از آب‌گیری با الکل و شفاف‌سازی با زایلول، در انتها، بلوک پارافینی از بافت مغز تهیه و برای برش‌گیری آماده شد.

سلولی، سلول‌هایی هستند که قادر به ارتقای تولید میلین پس از پیوند باشند [۱۳-۱۵]. بنابراین، روش‌های جدید با استراتژی جدید برای درمان بیماران ام‌اس مطرح شده‌اند که استفاده از سلول‌های بنیادی را برای ترمیم میلین پیشنهاد می‌دهند [۱۶].

سلول‌های بنیادی توانایی بسیاری برای تمایز به انواع سلول‌های تخصصی بدن دارند. این سلول‌ها توانایی خودسازی، تغییر و تمایز به انواع سلول‌ها را دارند. در این میان، می‌توان به سلول‌های بنیادی پرتوان القایی (Induced Pluripotent Stem Cells: iPSCs) اشاره کرد [۱۷، ۱۸]. قابلیت سلول‌های iPSCs انسانی تحت تأثیر دستکاری‌های ژنتیکی یا فاکتورهای القاگر، افزایش یافته است و از حالت چندتوان، به حالت پرتوان تبدیل می‌شوند. به‌همین علت، این دسته از سلول‌ها را پرتوان القایی می‌نامند [۱۲-۱۴].

از سوی دیگر، برای بررسی بیماری‌های مختلف، مدل‌های متناسب با آن طراحی می‌شوند تا بتوان قبل از انجام کارآزمایی‌های بالینی، میزان موفقیت و خطرات ناشی از روش‌های جدید را پیش‌بینی و برآورد کرد [۱۵، ۱۶]. یکی از این مدل‌ها، مدل‌های دمیپلینیشن کوپریزونی است. کوپریزون نوعی شلاتور مسی است که از سال ۱۹۶۶ به‌دلیل اثرات نوروتوکسیک در جوندگان شناخته شده است و به‌عنوان ابزار ارزشمندی برای بررسی دمیپلیناسیون در نظر گرفته می‌شود [۱۹]. کوپریزون سبب از بین رفتن میلین و مرگ الیگودندروسیت در کورپوس کالوزوم، مخچه و مغز [۱۷، ۱۸] می‌شود که شبیه به ضایعات حاصل از مراحل پیش‌رونده ام‌اس است [۱۹]. همچنین، کوپریزون موجب ایجاد تغییرات رفتاری و اختلال مهارت‌های حرکتی می‌شود و تأثیری منفی بر خلق‌وخو دارد [۱۹، ۲۰].

با توجه به افزایش روزافزون بیماری‌های نورودژنراتیو، نیاز مبرمی به استفاده از منابع کارآمدی از سلول‌های بنیادی برای ترمیم میلین وجود دارد که پس از پیوند به سلول‌های میلین‌ساز عملکردی تمایز یابند. لذا، در تحقیق حاضر، از سلول‌های iPSCs به‌عنوان یکی از جدیدترین منابع سلول‌های بنیادی پرتوان استفاده شد و به‌منظور ارزیابی توانایی آن‌ها در میلین‌سازی و همچنین، بهبود علائم حرکتی، این سلول‌ها به مدل دمیپلینیشن القا و با کوپریزون پیوند شدند.

روش کار

کشت سلول‌های بنیادی پرتوان القایی انسانی

سلول‌های بنیادی پرتوان القایی انسانی اهدایی از شرکت بن یاخته تهران در محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)، حاوی FBS (Fetal Bovine Serum) ۲۰ درصد (گیبکو، کانادا)، ۱ میلی‌لیتر اسید آمینه غیرضروری (گیبکو، کانادا) و پنی‌سیلین/استرپتومایسین (سیگما، آلمان) ۱ درصد کشت شدند. پس از آنکه کف پلیت از سلول‌ها پر شد، پلیت‌ها با PBS شست‌وشو داده شدند و با استفاده از Trypsin-EDTA (سیگما، آلمان)، سلول‌ها مجزا

آنتی‌بادی ثانویه کونژوگ به FITC به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق (در محفظه مرطوب و تاریک) انکوبه و شست‌وشو داده شدند. سپس، با بافر گلیسرول مانت و به کمک میکروسکوپ فلورسنت، ارزیابی شدند.

تست‌های رفتاری

تست BBB

تست BBB (Basso-Beattie-Bresnahan) یکی از تست‌های بررسی وضعیت حرکتی حیوانات آزمایشگاهی است [۲۱، ۲۲]. به منظور انجام این تست، پس از تزریق سلول به گروه‌های تحت درمان و شَم، طی ۴ هفته، هر هفته یک نوبت در هر مرحله، حیوان به مدت ۲ تا ۴ دقیقه در محوطه مدور به قطر ۹۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر قرار گرفت و براساس وضعیت حرکت اندام‌ها و تحرک حیوان، از عدد صفر تا ۲۱ نمره‌دهی انجام شد. این تست جدول نمره‌دهی صفر تا ۲۱ دارد. در نمره صفر، حیوان هیچ فعالیت حرکتی ندارد؛ در نمره ۲۱، حیوان حرکت نرمال با همکاری نرمال، به همراه جابه‌جایی موازی پاها دارد.

نمره صفر تا ۷ نشان‌دهنده برگشت عضلات فلج شده درمفصل، زانو و لگن است. نمره ۸ تا ۱۳ نشان‌دهنده برگشت حرکت و هماهنگی پنجه‌ها به همراه اندام فوقانی است. نمره ۱۴ تا ۲۱ نشان‌دهنده برگشت فاصله انگشت در طول راه رفتن، تسلط به نگه داشتن وضعیت انگشتان و پایداری در بالاتنه و وضعیت دم است. انجام و نمره‌بندی این تست، هفته‌ای یک‌بار بود و تا پایان هفته چهارم انجام شد [۲۳، ۲۴].

تست footprint

تست footprint به منظور بررسی وضعیت بهبود نحوه راه رفتن و قرار گرفتن انگشتان پای جانوران دچار ضایعات نورولوژیک به کار می‌رود. در این پژوهش، برای انجام این تست، یک هفته پس از دریافت سلول توسط گروه‌های تحت درمان و شَم، با مهار حیوان، پاهای آن با قلم رنگ‌آمیزی شد. سپس، حیوان در یک محفظه بسته به عرض ۲۵ سانتی‌متر و طول ۷۰ سانتی‌متر منتقل شد تا طی راه رفتن، ردپای حیوان ثبت شود. این تست به مدت ۴ هفته انجام شد تا کیفیت بهبود علائم حرکتی حیوان و مقایسه گروه‌های تحت درمان با گروه‌های کنترل انجام شود. پس از جمع‌آوری داده‌ها، نتایج به صورت کیفی بررسی و مقایسه شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

تمام مقادیر بر حسب $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ ارائه شده است. اطلاعات به دست‌آمده از بررسی زنده بودن سلول‌ها و شمارش سلولی با آزمون تی استیودنت و روش آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون توکی مقایسه شد. سطح معنی‌داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

ملاحظات اخلاقی

تمام آزمایش‌ها بر اساس پروتکل کدهای اخلاقی کار با حیوانات، مصوب

مراحل پردازش بافت مغز در هر کدام از گروه‌های آزمایشی به مدت ۱/۵ ساعت طول کشید که شامل آب‌گیری با الکل، شفاف‌سازی بافت با زایلول، پارافینه کردن بافت و تهیه بلوک‌های پارافینی بود. سپس، برش‌های سریالی به ضخامت ۵ میکرون از مغز کامل تهیه شد و پس از رنگ‌آمیزی، روی لام‌های از قبل آغشته‌شده به چسب پلی لایزین قرار داده شد.

نشان‌دار کردن سلول‌ها

بعد از القای مدل ام‌اس (۶ هفته پس از رژیم کوپریزون)، سلول‌های بنیادی به صورت تزریق ورید دمی به این جانوران پیوند شد. برای ردیابی سلول‌ها، پس از پیوند از نشانگر DiI استفاده شد که در غشا قرار می‌گیرد. بدین منظور، سلول‌ها در محلول DiI ۱ درصد، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سپس، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. برای بررسی رنگ شدن سلول‌ها، از میکروسکوپ فلورسنت (Olympus) (ژاپن) استفاده شد.

آماده کردن سلول‌ها و پیوند آن‌ها

در پایان مرحله نشان‌دار کردن، سلول‌ها با PBS شسته شدند. سپس، با محلول Trypsin/EDTA، از کف فلاسک جدا و سانتریفیوژ شدند. مایع رویی سلول‌ها کاملاً تخلیه شد و محتوای سلولی فلاسک با PBS مجدداً به صورت سوسپانسیون درآمد و شمارش شد. به منظور پیوند سلولی، تعداد 2×10^5 سلول با $2/5$ میکرولیتر محیط به حالت سوسپانسیون درآمد. سپس، سوسپانسیون همگن سلولی به دست‌آمده با یک سرنگ کشیده و تا هنگام تزریق، روی یخ نگهداری شد. ۶ هفته پس از ایجاد مدل دمی‌لینیشن، سوسپانسیون سلولی به آرامی از طریق وریدی دمی به موش تزریق شد.

بررسی ایمونوهیستوشیمی و ردیابی سلول‌های نشان‌دار

پیوندشده

۶ هفته پس از تزریق سلول به مدل القایی، حیوانات کشته شدند و از مغز، مقاطعی به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه شد. سپس، با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت، حضور سلول‌های پیوندی نشان‌دار شده با DiI در مقاطع تهیه‌شده فوق بررسی شد.

بررسی تمایز سلول‌های نشان‌دار شده به سلول‌های

میلین‌ساز

به منظور بررسی تمایز سلول‌های جایگزین شده در بخش آسیب‌دیده مغز به سلول‌های میلین‌ساز، از روش ایمونوهیستوشیمی استفاده شد. به این صورت که بیان آنتی‌بادی PLP در هر اسلاید و در سلول‌های علامت‌دار شده با DiI بررسی شد. به این منظور، نمونه‌ها با PBS شست‌وشو و با محلول بلاک‌کننده (سرم ۱۰ درصد) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (در محفظه مرطوب) انکوبه شدند. پس از شست‌وشوی مجدد با PBS، نمونه‌ها با آنتی‌بادی اولیه ضد PLP، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (در تاریکی و در محفظه مرطوب) انکوبه و مجدداً شست‌وشو داده شدند. سپس، با

کمیته منطقه‌ای اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی مازندران (با کد IR.MAZUMS..REC.1400.8875) انجام شد.

یافته‌ها

ارزیابی مورفولوژی سلول‌های بنیادی پرتوان القایی

سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی به‌طور روزانه با استفاده از میکروسکوپ نوری فاز کنتراست ارزیابی مورفولوژیکی شدند. ارزیابی مورفولوژیکی نشان داد که سلول‌ها پس از کشت، کلونی‌های سلولی تشکیل دادند که به‌تدریج در طول کشت، گسترش یافتند. نتایج تحقیق نشان داد که کلونی‌های سلول‌های بنیادی پرتوان القایی انسانی با حاشیه مشخص به‌شکل کروی، سلول‌های گرد کوچک و به‌هم فشرده داشتند که مؤید ماهیت سلول‌های بنیادی پرتوان القایی انسانی بود (شکل ۱).

ارزیابی هیستولوژیک دمی‌لیناسیون القاشده با کوپریزون

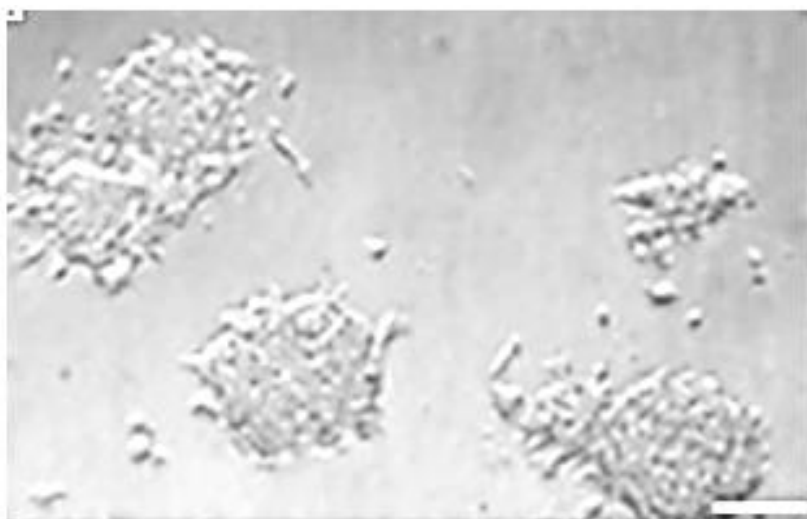
نتایج این تحقیق نشان داد که رژیم کوپریزون منجر به القای نواحی دمی‌لینه در مغز می‌شود. ارزیابی هیستولوژیک بافت مغز، ۶ هفته بعد از رژیم کوپریزون، نشان‌دهنده آتروفی بافتی و تخریب میلین بود (شکل ۲).

ردیابی سلول‌های تزریق‌شده

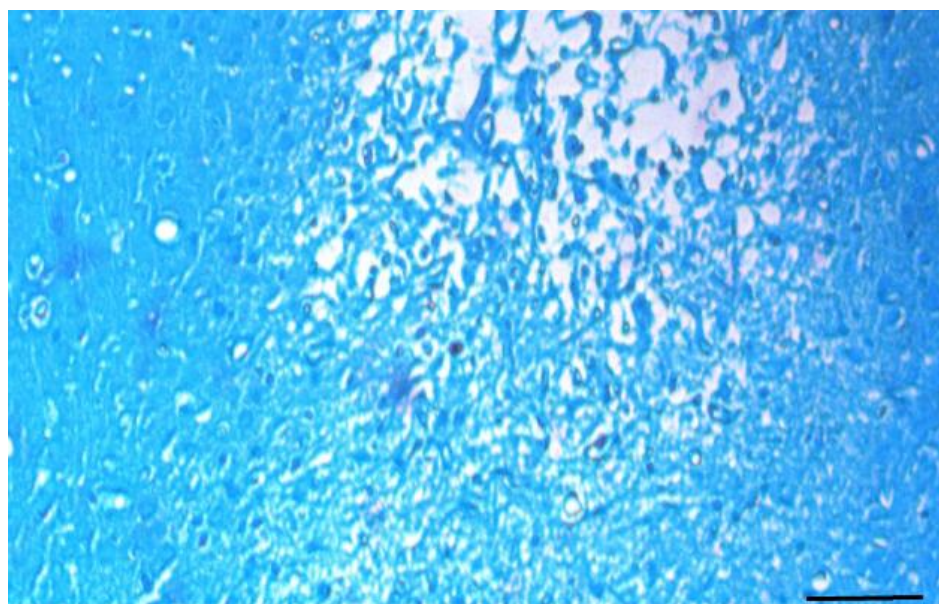
در پایان دوره درمان (هفته ۶)، از بافت آسیب‌دیده مغز، مقاطع انجمادی به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه شد. سپس، با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت، حضور سلول‌های پیوندی نشان‌دار شده با DiI در نواحی تزریق (نقاط قرمز) بررسی و تأیید شد (شکل ۳a).

بررسی تمایز سلول‌های تزریق‌شده

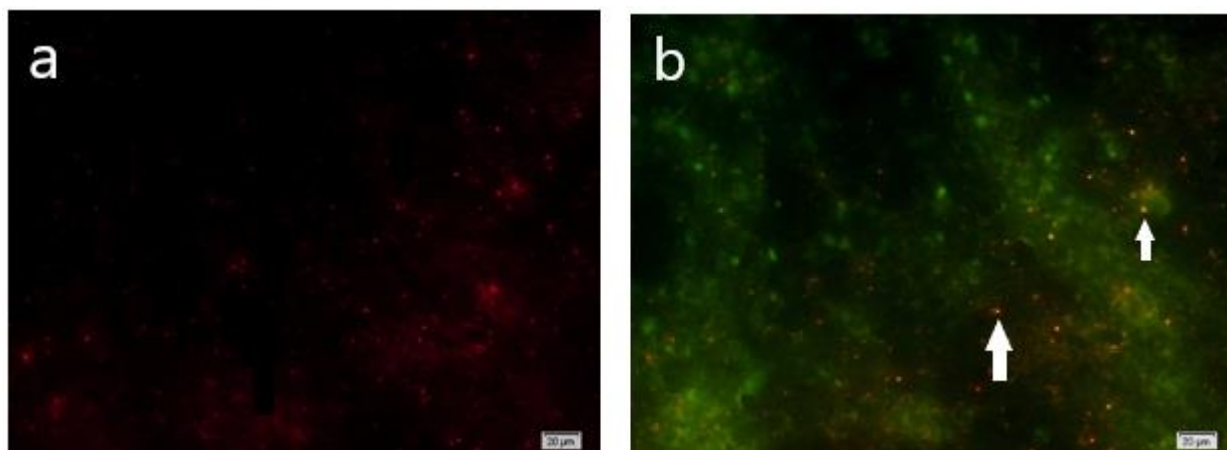
به‌منظور ارزیابی تمایز سلول‌های جایگزین‌شده در بخش آسیب‌دیده مغز، از روش ایمونوفلوروسانس استفاده شد. همچنین، تمایز سلول‌های جایگزین‌شده پس از پیوند، با بیان آنتی‌بادی PLP در سلول‌های علامت‌دار شده با DiI (نوک پیکان‌ها) تأیید شد (شکل ۳b).



شکل ۱. مورفولوژی کلونی‌های سلول‌های بنیادی پرتوان القایی (Scale bar = 50 μm)



شکل ۲. مقطع رنگ‌آمیزی شده با لوگزول فست بلو (رنگ‌آمیزی میلین) از مغز ۶ هفته پس از رژیم کوپریزون



شکل ۳. تصاویر میکروسکوپ فلورسنت برش انجمادی بافت مغز برای ردیابی سلول‌های پیوندی نشان‌دار شده با DiI ۶ هفته پس از پیوند (a) تعدادی از سلول‌های پیوندی جایگزین شده در بافت؛ (b) شکل انطباقی که پیکان‌ها تمایز سلول‌های پیوندی جایگزین شده با بیان آنتی‌بادی PLP را نشان می‌دهد (Scale bar = 20 μm)

نتایج تست‌های رفتاری

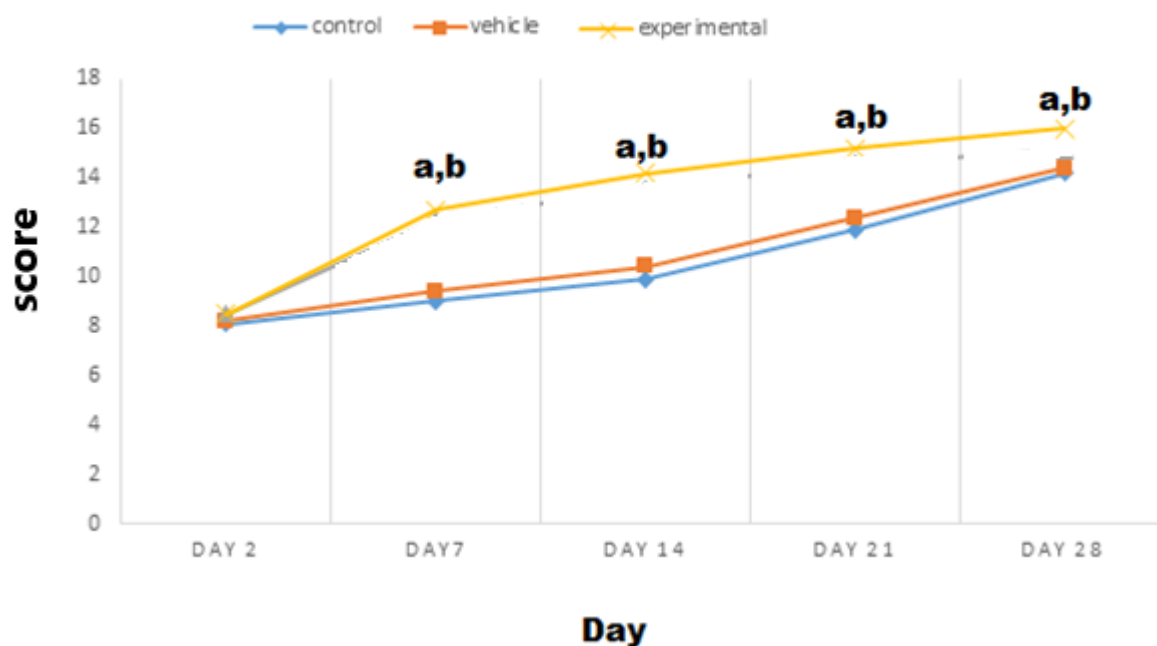
تست BBB

۲ روز پس از تزریق سلول، تست BBB آغاز شد تا به کمک آن، تأثیر تدریجی سلول درمانی در بهبود علائم حرکتی حیوان بررسی شود. طی این تست، مشاهده شد که بهبود علائم در گروه‌های تجربی که سلول را دریافت کردند، در مقایسه با دو گروه کنترل و ویکل، بسیار محسوس است. افزایش امتیاز تست BBB در گروه‌های کنترل و ویکل و بهبود علائم حرکتی آن‌ها از هفته سوم، با گذشت زمان و رفع تدریجی اثر دمیلینیشن کوپریزون، قابل توجیه است (شکل ۴).

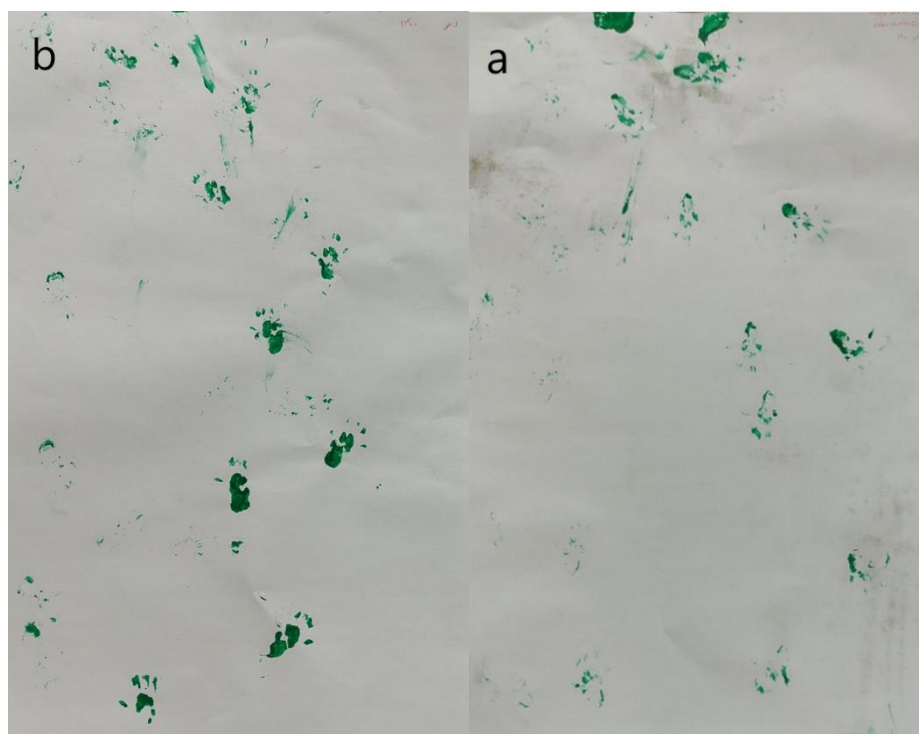
تست Footprint

این تست برای بررسی تعادل در راه رفتن و نحوه قرارگیری پای حیوان پس از دریافت درمان سلولی انجام شد. بررسی این تست به صورت کیفی بود و مشاهده شد که پس از دریافت سلول توسط گروه درمانی، نحوه قرارگیری پنجه‌ها در مقایسه با گروه کنترل (شکل a5) بهبود یافته و مقدار رنگ اثر پای حیوانات افزایش یافته است (شکل Δb). تفاوت بین دو گروه ویکل و کنترل محسوس نبود. در گروه کنترل، پنجه پای حیوان، کامل بر زمین قرار نگرفته و رد پای حیوان از نظر رنگ‌پذیری ضعیف‌تر است.

BBB TEST DIAGRAM



شکل ۴. نمودار امتیاز تست BBB طی ۴ هفته پس از انجام تزریق سلول برای بررسی بهبود علائم حرکتی حیوانات (a) اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل؛ (b) اختلاف معنی‌دار با گروه ویکل ($P < 0.05$)



شکل ۵. تست footprint

(a) نحوه قرارگیری پنجه پا و شدت اثر رد پای حیوان در گروه کنترل؛ (b) گروه سلول درمانی شده پس از پایان دوره درمانی

بحث

سلول‌های بنیادی پرتوان القایی با تمایز سلول‌های سوماتیک تولید می‌شوند که دچار برنامه‌ریزی مجدد به مرحله پرتوانی شده‌اند. پس از کشت سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی در محیط کشت، کلونی‌های شبه‌سلول‌های بنیادی جنینی ایجاد می‌شوند که قابلیت تولید هر سه نوع لایه زایای جنینی را دارند [۲۵، ۲۶]. سلول‌درمانی نوین در درمان بسیاری از بیماری‌ها بر پایه استفاده از منابع مختلف سلولی نظیر، سلول‌های بنیادی مزانشیمی و سلول‌های بنیادی جنینی در حال گسترش است. در همین زمینه، خاصیت پرتوانی سلول‌های بنیادی القایی انسانی و تکثیر گسترده، آن را به کاندید مناسبی در سلول‌درمانی بسیاری از بیماری‌ها و ضایعات ژنتیکی تبدیل کرده است. این ویژگی‌های سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی باعث شده است که استفاده از آن‌ها برای درمان‌های ترمیمی میسر شود [۲۷-۳۰]. نتایج مختلف نشان‌دهنده تمایز سلول‌های بنیادی پرتوان القایی انسانی به رده‌های سلولی مختلف نظیر سلول‌های عصبی، سلول‌های گلیال، سلول‌های عضلانی و قلبی-عروقی است [۳۰-۳۴].

در تحقیق حاضر، از سلول‌های بنیادی پرتوان القایی انسانی به‌عنوان منبع سلولی برای تولید سلول‌های میلین‌ساز الیگودندروسیت استفاده شد. نتایج این پژوهش نشان داد که سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی قابلیت تکثیر زیاد و ایجاد کلونی در شرایط محیط کشت دارند و همچنین، توانایی تمایز به سلول‌های میلین‌ساز پس از پیوند به مدل القایی ام‌اس دارند. امروزه، سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی به‌عنوان

منبع مناسبی برای ترمیم بیماری‌های نورودژنراتیو هستند و تحقیقات در این زمینه در حال گسترش است [۳۳]. ویژگی پرتوانی سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی و قدرت تمایز گلیالی آن‌ها، استفاده ترمیمی از آن‌ها را در بازسازی میلین پیشنهاد می‌دهد [۳۴]. در همین راستا، محققان در سال ۲۰۱۲، سلول‌های بنیادی مزانشیمی پالپ دندان را به سلول‌های عصبی و گلیالی متمایز و عملکرد میلین‌سازی آن‌ها را تأیید کردند [۳۵]. همچنین، در سال ۲۰۱۸، مطالعه‌ای به‌منظور بررسی اثر سلول‌های پیش‌ساز عصبی مشتق از سلول‌های پرتوان در مدل کوپریزونی القایی بر ترمیم ضایعه نخاعی انجام شد که حاکی از کاهش دمیالینیشن اعصاب و بهبود حرکتی بود [۳۶]. محققان کاربرد سلول‌های بنیادی پرتوان را در ترمیم بافت‌های آسیب‌دیده بررسی کرده‌اند و نتایج آن‌ها نشان‌دهنده افزایش رمیالینیشن اعصاب بود [۳۷]. گروه دیگری از محققان، روی تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به نورون و پیوند سلول‌های پیش‌ساز عصبی به موش‌های مبتلا به ضایعه نخاعی مطالعه‌ای انجام دادند و نشان دادند که ترمیم خودبه‌خودی به‌تنهایی قادر نیست بهبودی کامل را در حیوان ایجاد کند و وجود سلول‌های پیوندی موجب تسریع روند بهبودی خودبه‌خودی و بازگشت تقریباً ۱۰۰ درصد توانایی‌های حرکتی می‌شود [۳۶]. همچنین، در مطالعه‌ای، اثر سلول‌های پیش‌ساز عصبی مشتق از سلول‌های پرتوان القایی بر ترمیم ضایعه نخاعی بررسی شد و نتایج حاکی از کاهش حجم حفره ضایعه و بهبود حرکتی موش‌ها بود [۳۸]. امروزه، پیوند سلول‌های میلین‌ساز در راستای ترمیم نواحی دمیالینه‌شده مورد توجه قرار گرفته است و بدین منظور، ایجاد مدل‌های دمیالینیشن

پای حیوان پس از دریافت درمان سلولی انجام شد. بررسی این تست به صورت کیفی بود و مشاهده شد که پس از دریافت سلول توسط دو گروه درمان، نحوه قرارگیری پنجه‌ها بهبود یافت و مقدار رنگ پای حیوانات در مقایسه با دو گروه کنترل و ویکل، افزایش یافته است. تفاوت بین دو گروه ویکل و کنترل محسوس نبود. در هر دو گروه، پنجه پای حیوان کامل بر زمین قرار نگرفت و رد پای حیوان از نظر رنگ پذیری ضعیف تر بود. این نتایج هم راستا با نتایج تحقیق Pouya، مبنی بر افزایش شدت میزان میلین بافتی پس از سلول درمانی، در موش مدل دمیالینیشن است [۳۹].

نتیجه گیری

در مجموع، به نظر می رسد پیوند سلول های بنیادی پرتوان انسانی به موش مدل دمیالینیشن، سبب تمایز این سلول ها به سلول های میلین سازی عملکردی، بهبود توانایی میلین سازی و همچنین، بهبود توانایی حرکتی حیوان می شود.

سپاسگزاری

مقاله حاضر حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد و پروژه مصوب دانشگاه علوم پزشکی مازندران با کد IR.MAZUMS.REC.1400.8875 است. بدین وسیله نویسندگان از کارشناسان آزمایشگاه ایمونونوتیک دانشگاه علوم پزشکی مازندران تقدیر و تشکر می کنند.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله هیچ گونه تعارض منافع ندارند.

References

1. Pakpoor J, Wotton CJ, Schmierer K, Giovannoni G, Goldacre MJ. Gender identity disorders and multiple sclerosis risk: a national record-linkage study. *Mult Scler*. 2016;**22**(13):1759-1762. DOI: 10.1177/1352458515627205 PMID: 26857201
2. Karussis D, Kassir I. The potential use of stem cells in multiple sclerosis: an overview of the preclinical experience. *Clin Neurol Neurosurg*. 2008;**110**(9):889-896. DOI: 10.1016/j.clineuro.2008.02.008 PMID: 18375051
3. Karussis D, Karageorgiou C, Vaknin-Dembinsky A, Gowda-Kurkalli B, Gomori JM, Kassir I, et al. Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol*. 2010;**67**(10):1187-1194. DOI: 10.1001/archneurol.2010.248 PMID: 20937945
4. Wei W, Ma D, Li L, Zhang L. Progress in the Application of Drugs for the Treatment of Multiple Sclerosis. *Front Pharmacol*. 2021;**12**:724718. DOI: 10.3389/fphar.2021.724718 PMID: 34326775
5. Ghasemi N, Razavi S, Nikzad E. Multiple sclerosis: pathogenesis, symptoms, diagnoses and cell-based therapy. *Cell J*. 2017;**19**(1):1-10. DOI: 10.22074/cellj.2016.4867 PMID: 28367411
6. Razavi SR, Ghasemi N, Mardani M, Salehi H. Co-transplantation of human neurotrophic factor secreting cells and adipose-derived stem cells in rat model of multiple sclerosis. *Cell J*. 2018;**20**(1):46-52. DOI: 10.22074/cellj.2018.4777 PMID: 29308618
7. Razavi S, Ghasemi N, Mardani M, Salehi H. Remyelination improvement after neurotrophic factors secreting cells transplantation in rat spinal cord injury. *Iran J Basic Med Sci*. 2017;**20**(4):392-398. DOI: 10.22038/IJBMS.2017.8580 PMID: 28804608
8. Comabella M, Khoury SJ. Immunopathogenesis of multiple sclerosis.

و پیوند سلول های میلین ساز در حال بررسی است و از مدل های دمیالیناسیون حیوانی مختلفی نظیر مدل های توکسینی استفاده می شود که با حذف گلیاهای میلین ساز، منجر به فقدان میلین در ماده سفید می شوند [۲۴، ۲۵]. در این میان، کوپریزون سبب از دست دادن میلین و مرگ الیگودندروسیت در مغز و دمیالیناسیون می شود که شبیه به ضایعات حاصل از مراحل پیش رونده ام اس است [۲۵].

در این پژوهش، به منظور ارزیابی قدرت عملکردی سلول های بنیادی پرتوان انسانی در فرایند میلین سازی و ترمیم دمیالیناسیون، این سلول ها به موش مدل ام اس پیوند شد. تاکنون، پیوند سلول های بنیادی پرتوان انسانی به مدل حیوانی کوپریزون و ارزیابی عمل میلین سازی آن ها انجام نشده است که یکی از جنبه های نوآوری تحقیق حاضر محسوب می شود. در این تحقیق، از نشانگر DiI برای ردیابی سلول ها پس از پیوند استفاده شد. بررسی های بافتی، استقرار سلول های پیوندی را در بافت توسط بررسی های ایمونوهیستوشیمی تأیید کرد و تغییرات دمیالیناسیون نشان داده شد.

همچنین، در این تحقیق، تأثیر سلول درمانی در بهبود علائم حرکتی در مدل ام اس بررسی شد. نتایج تست BBB ۲ روز پس از تزریق سلول آغاز شد تا به کمک آن، تغییر تدریجی سلول درمانی در بهبود علائم حرکتی حیوان بررسی شود. طی این تست، مشاهده شد که بهبود علائم در گروه های تجربی که سلول دریافت کردند، در مقایسه با دو گروه کنترل و ویکل، بسیار محسوس بوده است و افزایش امتیاز تست BBB در گروه های کنترل و ویکل و بهبود علائم حرکتی آن ها از هفته سوم با گذشت زمان و رفع تدریجی اثر دمیالینیشن کوپریزون، قابل توجیه است.

تست Footprint نیز برای بررسی تعادل در راه رفتن و نحوه قرارگیری

- Clinic Immunol*. 2012;**142**(1):2-8. DOI: 10.1016/j.clim.2011.03.004 PMID: 21458377
9. Cudrici C, Niculescu T, Niculescu F, Shin ML, Rus H. Oligodendrocyte cell death in pathogenesis of multiple sclerosis: Protection of oligodendrocytes from apoptosis by complement. *J Rehabil Res Dev*. 2006;**43**(1):123-132. DOI: 10.1682/jrrd.2004.08.0111 PMID: 16847778
10. Bojnordi MN, Azizi H, Skutella T, Movahedin M, Pourabdolhossein F, Shojaei A, et al. Differentiation of spermatogonia stem cells into functional mature neurons characterized with differential gene expression. *Mol Neurobiol*. 2017;**54**(7):5676-5682. DOI: 10.1007/s12035-016-0097-7 PMID: 27644129
11. Miller RH, Mi S. Dissecting demyelination. *Nat Neurosci*. 2007;**10**(11):1351-1354. DOI: 10.1038/nn1995 PMID: 17965654
12. Qiao C, Xu W, Zhu W, Hu J, Qian H, Yin Q, et al. Human mesenchymal stem cells isolated from the umbilical cord. *Cell Biol Inter*. 2008;**32**(1):8-15. DOI: 10.1016/j.cellbi.2007.08.002 PMID: 17904875
13. Pera MF, Reubinoff B, Trounson A. Human embryonic stem cells. *J Cell Sci*. 2000;**113**(1):5-10. DOI: 10.1242/jcs.113.1.5 PMID: 10591620
14. Bobis S, Jarochoa D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol*. 2006;**44**(4):215-230. PMID: 17219716
15. Brunstein CG, Wagner JE. Umbilical cord blood transplantation and banking. *Annu Rev Med*. 2006;**57**:403-417. DOI: 10.1146/annurev.med.57.051804.123642 PMID: 16409157

16. Johe KK, Hazel TG, Muller T, Dugich-Djordjevic MM, McKay R. Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Gen Dev*. 1996;**10**(24):3129-3140. DOI: 10.1101/gad.10.24.3129 PMID: 8985182
17. Ohnuki M, Takahashi K. Present and future challenges of induced pluripotent stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2015;19:**370**(1680):20140367. DOI: 10.1098/rstb.2014.0367 PMID: 26416678
18. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;**131**(5):861-872. DOI: 10.1016/j.cell.2007.11.019 PMID: 18035408
19. Kipp M, Nyamoya S, Hochstrasser T, Amor S. Multiple sclerosis animal models: A clinical and histopathological perspective. *Brain Pathol*. 2017;**27**(2):123-137. DOI: 10.1111/bpa.12454 PMID: 27792289
20. Kipp M, Clarner T, Dang J, Copray S, Beyer C. The cuprizone animal model: New insights into an old story. *Acta Neuropathol*. 2009;**118**(6):723-736. DOI: 10.1007/s00401-009-0591-3 PMID: 19763593
21. Berghoff SA, Dukung T, Spieth L, Winchenbach J, Stumpf SK, Gerndt N, et al. Blood-brain barrier hyperpermeability precedes demyelination in the cuprizone model. *Acta Neuropathol Commun*. 2017;**5**:94. DOI: 10.1186/s40478-017-0497-6 PMID: 29195512
22. Gudi V, Gingele S, Skripuletz T, Stangel M. Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: Lessons learned. *Front Cell Neurosci*. 2014;**8**:73. DOI: 10.3389/fncel.2014.00073 PMID: 24659953
23. Praet J, Guglielmetti C, Berneman Z, Van der Linden A, Ponsaerts P. Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: Clinical relevance for multiple sclerosis. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014;**47**:485-505. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2014.10.004 PMID: 25445182
24. Shelestak J, Singhal N, Frankle L, Tomor R, Sternbach S, McDonough J, et al. Increased blood-brain barrier hyper-permeability coincides with mast cell activation early under cuprizone administration. *PLoS One*. 2020;**15**(6):e0234001. DOI: 10.1371/journal.pone.0234001 PMID: 32511268
25. Zirnigibl M, Assinck P, Sizov A, Caprariello AV, Plemel JR. Oligodendrocyte death and myelin loss in the cuprizone model: an updated overview of the intrinsic and extrinsic causes of cuprizone demyelination. *Mol Neurodegener*. 2022;**17**(1):34. DOI: 10.1186/s13024-022-00538-8 PMID: 35526004
26. Toomey LM, Papini M, Lins B, Wright AJ, Warnock A, McGonigle T, et al. Cuprizone feed formulation influences the extent of demyelinating disease pathology. *Sci Rep*. 2021;**11**(1):22594. DOI: 10.1038/s41598-021-01963-3 PMID: 34799634
27. Crawford AH, Stockley JH, Tripathi RB, Richardson WD, Franklin RJ. Oligodendrocyte progenitors: adult stem cells of the central nervous system. *Exp Neurol*. 2014;**260**:50-55. DOI: 10.1016/j.expneurol.2014.04.027 PMID: 24800913
28. Somersall AC. The amazing power of Stem Cell Nutrition. Kuala Lumpur: Natural Wellness Group; 2013.
29. Zhou X, Shi G, Fan B, Cheng X, Zhang X, Wang X, et al. Polycaprolactone electrospun fiber scaffold loaded with iPSCs-NSCs and ASCs as a novel tissue engineering scaffold for the treatment of spinal cord injury. *In J Nanomed*. 2018;**13**:6265-6277. DOI: 10.2147/IJN.S175914 PMID: 30349249
30. Sobhani A, Khanlarkhani N, Baazm M, Mohammadzadeh F, Najafi A, Mehdinejadiani S, et al. Multipotent stem cell and current application. *Acta Medica Iranica*. 2017;**55**(1):6-23. PMID: 28188938
31. Xue T, Cho H, Akar F, Tsang S, Jones S, Marbán E, et al. Functional integration of electrically active cardiac derivatives from genetically engineered human embryonic stem cells with quiescent recipient ventricular cardiomyocytes: insights into the development of cell based pacemakers. *Circulation*. 2005;**111**(1):11-20. DOI: 10.1161/01.CIR.0000151313.18547.A2 PMID: 15611367
32. Shah VK, Shalia KK. Stem cell therapy in acute myocardial infarction: a pot of gold or Pandora's box. *Stem Cell International*. 2011;**2011**:536758. DOI: 10.4061/2011/536758 PMID: 21804827
33. Young P, Vaughan DE, Hatzopoulos AK. Biologic properties of endothelial progenitor cells and their potential for cell therapy. *Prog Cardiovas Dis*. 2007;**49**(6):421-429. DOI: 10.1016/j.pcad.2007.02.004 PMID: 17498522
34. Ye N, Cruz J, Peng X, Ma J, Zhang A, Cheng X. Remyelination is enhanced by Astragalus polysaccharides through inducing the differentiation of oligodendrocytes from neural stem cells in cuprizone model of demyelination. *Brain Res*. 2021;**1763**:147459. DOI: 10.1016/j.brainres.2021.147459 PMID: 33794147
35. Ganji R, Razavi S, Ghasemi N, Mardani M. Improvement of remyelination in demyelinated corpus callosum using human adipose-derived stem cells (hADSCs) and pregnenolone in the cuprizone rat model of multiple sclerosis. *J Mol Neurosci*. 2020;**70**(7):1088-1099. DOI: 10.1007/s12031-020-01515-w PMID: 32314194
36. Tahmasebi F, Pasbakhsh P, Barati S, Madadi S, Kashani IR. The effect of microglial ablation and mesenchymal stem cell transplantation on a cuprizone-induced demyelination model. *J Cell Physiol*. 2021;**236**(5):3552-3564. DOI: 10.1002/jcp.30090 PMID: 32996165
37. Brousse B, Mercier O, Magalon K, Daian F, Durbec P, Cayre M. Endogenous neural stem cells modulate microglia and protect against demyelination. *Stem Cell Rep*. 2021;**16**(7):1792-1804. DOI: 10.1016/j.stemcr.2021.05.002
38. Barati S, Ragerdi Kashani I, Moradi F, Tahmasebi F, Mehrabi S, Barati M, et al. Mesenchymal stem cell mediated effects on microglial phenotype in cuprizone-induced demyelination model. *J Cell Biochem*. 2019;**120**(8):13952-13964. DOI: 10.1002/jcb.28670 PMID: 30963634
39. Gugliandolo A, Bramanti P, Mazzon E. Mesenchymal stem cells in multiple sclerosis: recent evidence from pre-clinical to clinical studies. *Int J Mol Sci*. 2020;**21**(22):8662. DOI: 10.3390/ijms21228662 PMID: 33212873