مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۱، شماره۷، مهر۱۳۹۵(شماره پی در پی۱۱۴)

اثر ترمیمی پیوند سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در مهارتهای حرکتی ضایعات نخاعی حاد در موش

نوشین گشمردی[۱و۲]، داود مهربانی[۳*]، سید ابراهیم حسینی[۱]، محمد امین عدالت منش[۱]، زهرا خدابنده جهرمی[۳]

[۱]گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران، [۲]گروه فیزیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شیراز، شیراز، ایران، [۳]مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و فناوری ترانسژنیک، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۵/۳/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۷/۱۷

چکیده

زمنیه و هدف: آسیب نخاعی حاد نوعی آسیب مخرب است که نقص‌های حرکتی و حسی فراوانی را به دنبال دارد و موجب کاهش کیفیت و امید به زندگی در بیماران می‌شود. پیوند سلول‌های بنیادی می‌تواند یکی از استراتژی‌های درمانی محسوب شود. مغز استخوان منبع غنی از سلول‌های بنیادی بوده که قادر به تمایز به انواع سلول‌ها می‌باشد. با توجه به آن که هزاران نفر در سراسر دنیا از ضایعات ناشی از قطع نخاع رنج می‌برند و تاکنون درمان مؤثری برای آنان یافت نشده است، لذا مطالعه حاضر، با هدف بررسی توان تمایزی و عملکرد حرکتی سلول‌های بنیادی مغز استخوان پیوند شده به موش‌های سوری دچار ضایعه نخاعی انجام گرفته است.

روش بررسی: دراین مطالعه تجربی، ابتدا سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان از استخوان‌های ران و درشت نی ۳ سر موش جداسازی و کشت گردید. ماهیت مزانشیمی بودن سلول‌ها بر اساس مورفولوژی، تمایز به سلول‌های چربی و نشانگرهای سطح سلول بررسی شد. سپس ۳۶ سر موش سوری نژاد بالب سی به طور تصادفی به سه گروه کنترل، شم و تجربی تقسیم شدند. موش‌های گروه کنترل تحت هیچ تیماری قرار نگرفتند. موش‌های گروه شم به وسیله مدل فشاری در ناحیه پشتی دچار آسیب نخاعی شدند و تیمار خاصی دریافت نداشتند. به حیوانات گروه تجربی نیز، یک روز پس از آسیب نخاعی، به میزان ۲۰۰.۰۰۰ سلول بنیادی مزانشیمی تهیه شده از مغز استخوان در پاساژ سوم به صورت داخل وریدی تزریق شد. سپس میزان بهبود رفتارهای حرکتی حیوان در میدان باز و با روش نمره‌دهی Toyama Mouse Score (TMS) در طول پنج هفته بعد از آسیب مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون‌های آماری تحلیل واریانس یک طرفه و تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند..

یافته‌ها: نمره TMS در هر دو گروه پیوند سلولی(تجربی) و ضایعه(شم) نسبت به گروه کنترل پایین‌تر بود، در حالی که در گروه تجربی نسبت به گروه شم بالاتر بود که در پایان هفته پنجم، این اختلاف در بین این دو گروه در سطح $p<۰/۰۱$ معنی‌دار بود.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی‌مغز استخوان به موش‌های دچار آسیب نخاعی حاد به بهبود عملکرد حرکتی آنها بعد از آسیب نخاعی کمک می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: مغز استخوان، سلول بنیادی مزانشیمی، مهارت حرکتی، آسیب نخاعی حاد

[*]**نویسنده مسئول: داود مهربانی**، شیراز، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، مرکز تحقیقات سلول های بنیادی و فناوری ترانسژنیک
Email: mehrabad@sums.ac.ir

مقدمه

آسیب نخاعی[1] به عنوان آسیبی با قطع کامل یا ناقص عملکردهای حرکتی، حسی و رفلکسی تعریف می‌شود(۱). علایم و نشانه های آسیب نخاعی عمدتاً به محل آسیب نخاع و ریشه‌های اعصاب آن بستگی دارد، به طوری که آسیب‌های بالای ناحیه گردنی موجب تتراپلژیای کامل یا ناقص(فلج چهار اندام) و آسیب‌های پایین‌تر موجب پاراپلژیا(فلج اندام‌های پایین بدن) می‌شود (۲). تقریباً بیش از ۱۳۰۰۰۰ نفر در هر سال دچار ضایعه نخاعی می‌شوند و بیش از ۲ میلیون نفر در جهان با ناتوانی ناشی از آسیب نخاعی زندگی می‌کنند(۳). شایع‌ترین علل ضایعه‌های نخاعی حوادث وسایل نقلیه موتوری، سقوط، رفتارهای خشونت‌آمیز و اتفاقات ورزشی است(۴).

از نظر پاتولوژی ضایعه نخاعی شامل؛ آسیب مکانیکی یا اولیه که با مرگ نورون‌ها، سلول‌های گلیایی، دژنراسیون اکسون و دمیلینه شدن فیبرها همراه است که باعث از دست دادن عملکرد سیستم‌های اتونوم، حسی و حرکتی می‌شود و با کاهش کیفیت و امید به زندگی افراد باعث تحمیل هزینه‌های سنگین اقتصادی بر بیماران، خانواده آنها و جامعه می‌گردد(۵). به دنبال آسیب به نخاع اختلالات عروق نخاعی و ایسکمی، اگزیتوکسیتی گلوتاماترژیک، استرس اکسیداتیو سلولی، پراکسیداسیون لیپیدی و التهاب مشاهده می‌شود(۶) که همگی به تنهایی و یا با هم می‌توانند آپوپتوز را آغاز نمایند. از آنجا که آپوپتوز ممکن است به شدت موجب فلج بیماران مبتلا به آسیب نخاعی شود(۷)، از این رو کاهش آپوپتوز می‌تواند دژنراسیون ثانویه و نقص عملکردی بعد از آسیب به نخاع را کاهش دهد(۸).

اگرچه مهم‌ترین هدف درمان‌های تجربی ضایعه نخاعی، بهبود عملکردی می‌باشد، اما با وجود روش‌های مختلف درمان آسیب نخاعی، معمولاً روند بهبود کند و ناکارآمد است(۱۰ و۹). امروزه یکی از روش‌های امیدوار کننده در درمان آسیب نخاعی، پیوند سلول‌های بنیادی است(۱۱). سلول‌های بنیادی، سلول‌هایی با توانایی خود تجدیدی و تمایز به سلول‌های مختلف می‌باشند(۱۲) و به دلیل این توانایی‌ها کاندیدای مناسبی برای درمان اختلالاتی نظیر ضایعات نخاعی محسوب می‌شوند(۱۳).

سلول‌های بنیادی علاوه بر منشأ جنینی در میان بافت‌های بالغ نیز وجود دارند. سلول‌های بنیادی بالغ سلول‌های تمایز نیافته‌ای هستند که از بافت‌های مختلفی همچون چربی(۱۴) بندناف(۱۵) پالپ دندان(۱۶) مغز استخوان (۱۷) خون قاعدگی (۱۸) و اندومتر(۱۹) جدا می‌شود. سلول‌های بنیادی مزانشیمی[2]، سلول‌هایی چند توان هستند که قادر به تکثیر و تمایز به انواعی از سلول‌های دیگر نظیر؛ استئوبلاست‌ها، کندروسیت‌ها، میوسیت‌ها و سلول‌های عصبی می‌باشند(۲۲ـ۲۰). نتایج برخی از تحقیق‌ها نشان داده است که استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در درمان آسیب‌های نخاعی مفید

1- Spinal Cord Injury (SCI)
2- Mesenchymal Stem Cells

می‌باشند، در همین راستا یافته دولامز و پلنت نشان داد که سلول‌های بنیادی قادر به ترشح فاکتورهای تروفیک و تعدیل ایمنی با حداقل خطر تومورزایی به دنبال آسیب نخاعی می‌باشند(۲۳). هم‌چنین مفید بودن سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان از طریق کاهش کاسپاز در آسیب‌های نخاعی نیز گزارش گردیده است(۲۴). در مطالعه‌هایی نیز از سلول‌های استرومایی مغز استخوان برای پر کردن حفرات ناشی از آسیب و هم‌چنین به عنوان سوبسترای اجازه دهنده رشد اکسونی در مدل‌های حیوانی استفاده شده است(۲۵)، از طرفی هم این سلول‌ها می‌توانند نقش‌های نوروتروفیک و تسهیل کنندگی رشد اکسون در آسیب‌های نخاعی داشته باشند(۲۶).

امرزوه صدها هزار نفر در سراسر دنیا از اختلالات ناشی از آسیب‌های نخاعی رنج می‌برند. آسیب‌های نخاعی مشکلات اجتماعی و اقتصادی زیادی را برای بیماران، خانواده‌های آنها و جامعه ایجاد می‌نماید. علی‌رغم پیشرفت‌های حاصله در مراقبت‌های پزشکی و جراحی، متاسفانه تاکنون روش درمانی مناسبی جهت درمان این بیماران گزارش نگردیده است و روش‌های درمانی رایج، معمولاً کارآیی ناکافی و تأخیری دارند و منجر به از دست دادن دائمی عملکرد عصبی و معلولیت در بیماران می‌شود. با توجه به اثرات مخرب آسیب‌های نخاعی، تلاش در جهت پیشرفت استراتژی‌های درمانی جدید برای فلج و بیماری‌های تخریب عصبی ضروری و برجسته به نظر می‌رسد، بدین جهت هدف از تحقیق حاضرنیز بررسی اثر پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بر مهارت‌های حرکتی موش‌های سوری نر بالغ با آسیب نخاعی حاد بود.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، از ۳۶ سر موش سوری نر بالغ از نژاد بالب سی با سن ۸ تا ۱۰ هفته و وزن تقریبی ۲۷ تا ۳۳ گرم، تهیه شده از خانه حیوانات مرکز پزشکی مقایسه‌ای و تجربی دانشگاه علوم پزشکی شیراز، استفاده شد. پروتکل این تحقیق براساس قوانین بین المللی در مورد حمایت از حیوانات آزمایشگاهی تنظیم و در کمیته اخلاق دانشگاه به تصویب رسید. در این بررسی به منظور ارزیابی مهارت‌های حرکتی، نمونه‌ها به ۳ گروه ۱۲تایی شامل؛ گروه‌های کنترل (با زیر گروه ۳ و ۵ هفته‌ای)، شم (با زیر گروه ۳ و ۵ هفته ای) و تجربی (با زیر گروه ۳ و ۵ هفته‌ای) تقسیم شدند. حیوانات گروه کنترل هیچ‌گونه ضایعه نخاعی نداشتند و سلولی نیز دریافت نکردند و حیوانات گروه شم نیز پس از ایجاد ضایعه نخاعی حاد تحت هیچ گونه تیماری قرار نگرفتند. به گروه تجربی در یک روز پس از ضایعه نخاعی حاد از طریق ورید دمی به تعداد ۲۰۰،۰۰۰ سلول بنیادی مزانشیمی مغز استخوان[1] تزریق شد(۲۷).

معیارهای ورود به مطالعه؛ موش‌های سوری باید قبل از عمل جراحی سالم و توانایی حرکت به طور

1- Bone Marrow Stem Cells

طبیعی را داشته باشند، هم جنس و هم وزن باشند و معیارهای خروج از مطالعه؛ مرگ حین و بعد از عمل جراحی، مرگ حیوانات گروه کنترل، مشاهده عدم تغییر دامنه حرکتی اندام‌های عقبی بعد از عمل جراحی و عدم همکاری موش جهت حرکت در میدان باز می‌باشد.

در این مطالعه برای جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان تعداد سه سر موش سوری نر بالغ از نژاد بالب سی از مرکز مذکور تهیه گردید. پس از مرگ بدون درد، از طریق جا به جایی مهره گردنی و ضد عفونی کردن حیوان با الکل، با استفاده از یک اسکالپل و قیچی استریل، ران ها و درشت نی‌ها جدا شده و سلول‌های مغز استخوان با روش فلاشینگ به وسیله محیط کشت پایه جمع‌آوری گردیدند و کشت سلولی صورت گرفت.

پاساژ نمونه‌ها پس از گذشت یک هفته انجام شد. بعد از گذشت ۱۰ روز از پاساژ دوم، فلاسک‌ها شمارش سلولی شده و ۲ فلاسک پس از شمارش سلولی تحت پاساژ سوم قرار گرفتند. مزانشیمی بودن سلول‌های بنیادی از طریق مورفولوژی، تمایز و بیان مارکرهای CD_{90}، CD_{34} و CD_{45} طی واکنش زنجیره پلیمراز نسخه‌برداری معکوس[۱] مورد ارزیابی قرار گرفت.

جهت بررسی توان تمایزی سلول های بنیادی به سلول های چربی، سلول های بنیادی مغز استخوان کشت داده شده با پرشدگی[۲] ۷۰ درصد را در محیط حاوی کشت پایه[۳] با گلوکز کم، ۱۰ درصد سرم جنین گاوی[۴]، ۰/۵ میلی‌مولار ایزوبوتیل متیل گزانتین (سیگما-آلدریچ)، ۱ میکرو مولار دکسامتازون، ۱۰ میکرو مولار انسولین و ۲۰۰ میکرو مولار ایندومتاسین(سیگما-آلدریچ) کشت داده شد. محیط کشت تقریباً هر سه الی چهار روز به مدت سه هفته تعویض گردید. در پایان دوره، سلول‌های فیکس شده با محلول فرمالین ۱۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه، با رنگ اختصاصی قطرات چربی (Oil Red O) (سیگما- آلدریچ) رنگ‌آمیزی شدند.

به منظور ارزیابی شاخص‌های سطحی سلول‌های بنیادی موش، ابتدا RNA را از سلول‌های پاساژ سوم طبق دستورالعمل شرکت سازنده با استفاده از بافر RNX-Plus(سیناژن، ایران) استخراج نموده و سپس غلظت RNA از طریق اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید. قبل از رونوشت‌برداری معکوس، نمونه‌های RNA در معرض DNA_{ase} قرار گرفتند. DNAی مکمل نمونه‌ها به وسیله کیت Accu Power Cycle Script RT PreMix (بیونر، کره) با توجه به دستورالعمل شرکت سنتز گردید. پرایمرهای ویژه بر اساس توالی‌های متناسب با نواحی CD_{90}، CD_{45} و CD_{34} موش طراحی شد. شرایط تکثیر شاخص‌ها به صورت زیر انجام گرفت، پس از باز شدن اولیه دو رشته DNA به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل شامل، دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه انجام شد. سپس اتصال پرایمر[۵] به

1-Reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)
2-Confluency
3-Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM)
4-Fetal Bovine Serum (FBS)
5- Annealing

ترتیب در دماهای ۶۴ ، ۶۲ و ۶۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، تکثیر ۲ در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و پلی‌مریزاسیون نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد در مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. در مرحله بعد، الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره پلیمراز با ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام شد و با کمک اشعه ماوراء بنفش مشاهده و عکس برداری گردیدند.

در این مطالعه جهت ایجاد ضایعه نخاعی حاد، پس از آماده‌سازی اتاق عمل، موش‌های گروه‌های ضایعه نخاعی با کتامین و گزیلازین بی هوش شده، آن‌ها را در وضعیت رو به شکم خوابانده، محل ضایعه تراشیده و با بتادین ضد عفونی گردید. سپس برش طولی ۲ سانتی‌متری در طول خط میانی مهره‌های پشتی ۷ تا ۱۱ ایجاد گردید، پوست و عضلات کنار نخاع لایه به لایه بریده و برآمدگی مربوط به ستون مهره‌های پشتی ۸ تا ۱۰ و صفحه مهره‌ای برداشته شد، در حالی که انسجام اندوکرانیوم حفظ گردید. طناب نخاعی به روش فشاری با استفاده از وزنه ۲۰ گرمی تحت فشار قرار گرفت. پس از آن محل برش با نخ بخیه ۰/۳ بخیه زده شد و پس از به هوش آمدن، حیوانات به قفس های نگهداری برگردانده شد(۲۸).

به منظور ارزیابی مهارت‌های حرکتی، قبل از شروع آزمایش، جهت آشنایی و کاهش استرس حیوانات به طور انفرادی و آزادانه به مدت یک هفته هر روز به مدت ۵ دقیقه، در محفظه‌ای پلاستیکی با ابعاد ۴۲ سانتی متر در ۴۸ سانتی‌متر به ارتفاع ۱۵ سانتی‌متر قرار داده شدند. در مرحله آزمایش، با تشویق حیوان به حرکت، حرکات موش‌ها به مدت ۵ هفته و در هر هفته به مدت ۴ دقیقه مورد مشاهده قرار گرفتند. هم‌چنین حرکات آنها در تمامی‌مراحل به وسیله دو دوربین دیجیتالی کَنُون ۶۰ دی ساخت کشور ژاپن از زوایای مختلف فیلم‌برداری گردید. بر اساس وضعیت حرکتی، نمره صفر تا ۳۰ مطابق با مقیاس Toyama Mouse Score (TMS) که ترکیبی از تست‌های رفتاری Basso Mouse Scale(BMS) و Body Support Scale (BSS) می‌باشد، داده شد(۲۹).

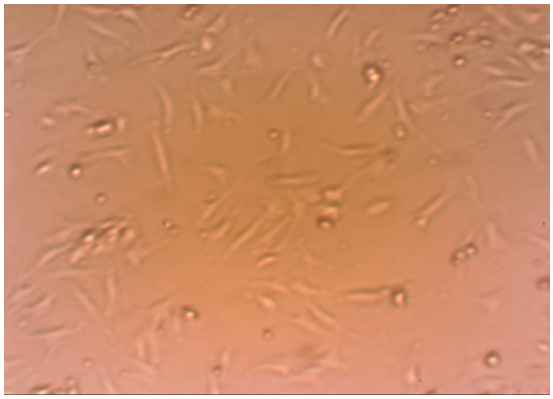
داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزارهای گراف پد و SPSS و آزمون‌های آماری کولموگروف ـ اسمیرونوف، آنالیز واریانس یک طرفه و تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

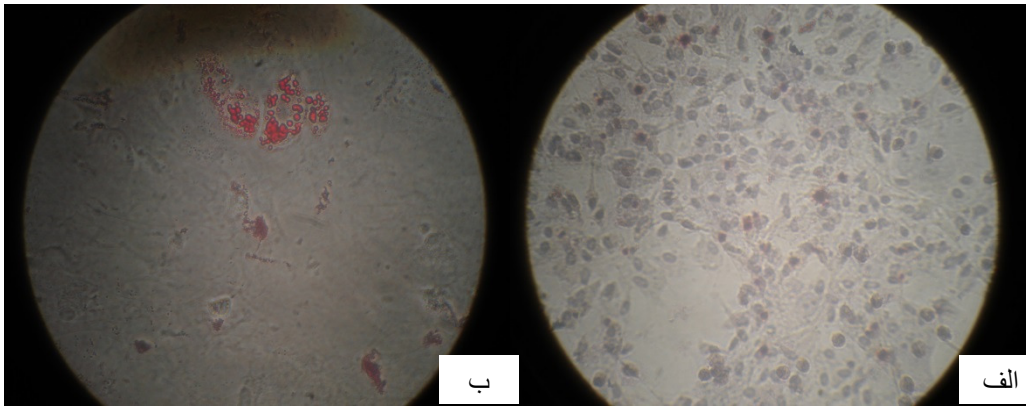
بررسی‌های موفولوژیکی نشان داد که سلول‌های بنیادی مذکور، شبه فیبروبلاستی(دوکی شکل) هستند(شکل ۱) و در طی فرآیند بررسی مزانشیمی بودن نیز به سلول‌های چربی تمایز یافتند(شکل ۲)، هم‌چنین بر اساس تکنیک واکنش زنجیره پلی‌مراز نسخه‌برداری معکوس، سلول‌های بنیادی مزانشیمی از نظر شاخص سطحی CD_{90} (شاخص مزانشیمی بودن)، مثبت و از نظر شاخص‌های سطحی CD_{34} و CD_{45} (شاخص هماتوپیتیک بودن)، منفی بودند(شکل۳).

نتایج حاصل از مشاهده در میدان باز در این مطالعه نشان داد که در هفته اول حیوانات گروه‌های تجربی(ضایعه همراه با پیوند سلولی) و شم (ضایعه) فلج بودند و پاهای خود را بر روی زمین می‌کشیدند در حالی که حیوانات گروه کنترل به راحتی حرکت کرده و نمره آنها کامل و برابر با ۳۰ بود. در پایان هفته سوم میزان بهبود عملکرد حرکتی در گروه تجربی نسبت به گروه شم بهتر بود(p=۰/۰۱) که این میزان برای گروه تجربی ۱/۷۸±۱۳/۲۵ و برای گروه شم ۱/۶۳±۷/۹۲ بود. نتایج حاصل از معاینه‌های نورولوژیکی در پایان هفته پنجم پس از پیوند سلول‌های بنیادی در گروه تجربی نسبت به گروه شم نشان از بهبود نسبی حیوانات داشت، به طوری که تحمل وزن و هماهنگی حرکتی بین اندام‌های جلویی و عقبی در هنگام قدم برداشتن قابل مشاهده بود و با گروه شم اختلاف معنی‌داری را در سطح p=۰/۰۱ نشان داد(جدول ۱ و نمودار ۱). همچنین نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های این مطالعه در هفته‌های سوم و پنجم پس از پیوند سلول‌های بنیادی درگروه تجربی نشان دهنده تأثیر معنی‌دار زمان بر مهارت حرکتی حیوانات در سطح p=۰/۰۱ می‌باشد(نمودار۲). در ضمن نتایج حاصل از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه نیز بیانگر تفاوت معنی‌داری بین نمره مهارت‌های حرکتی در بین گروه ها بود($F_{۵,۳۰}$ =۵۹۷/۱۳۵, p=۰/۰۱).

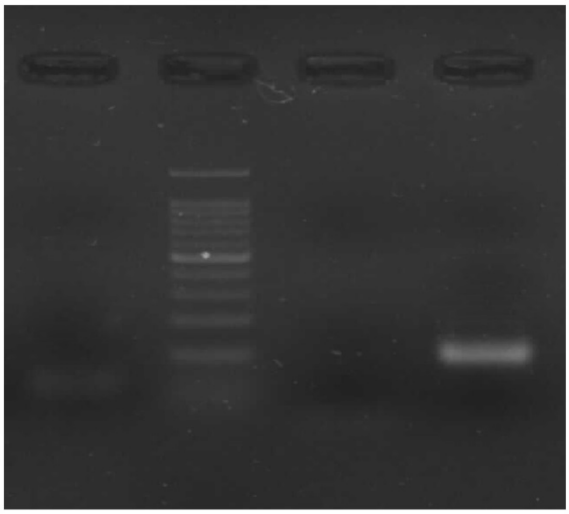
همچنین نتایج حاصل از آزمون تعقیبی توکی مندرج در جدول فوق نشان می‌دهد که اثر ترمیمی پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بر مهارت‌های حرکتی در گروه‌های تجربی (پنج هفته و سه هفته پس از پیوند سلولی) قابل مشاهده است.



شکل ۱: سلول های بنیادی شبه فیبروبلاستی مشتق از مغز استخوان موش در سومین پاساژ(۱۰x)



شکل ۲: تغییرات مورفولوژیک قبل (الف ۱۰ x) و بعد از تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به سلول های چربی با رنگ آمیزی Red O Oil(ب ۴۰ x)

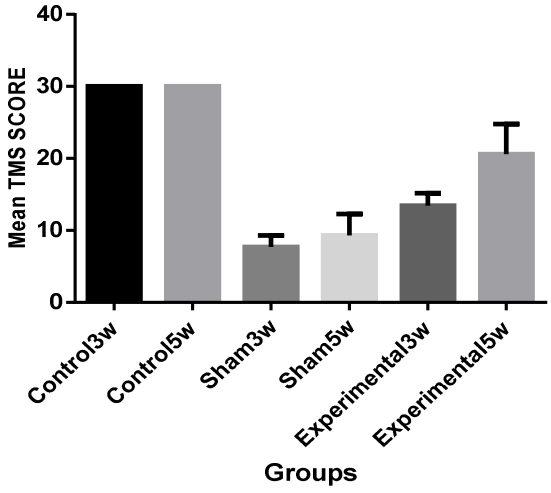


شکل ۳: بیان مثبت شاخص CD_{90} و منفی شاخص های CD_{34} و CD_{45} با RT-PCR به ترتیب از چپ به راست CD_{34}، مارکر ۱۰۰ جفت بازی، CD_{45} و CD_{90}

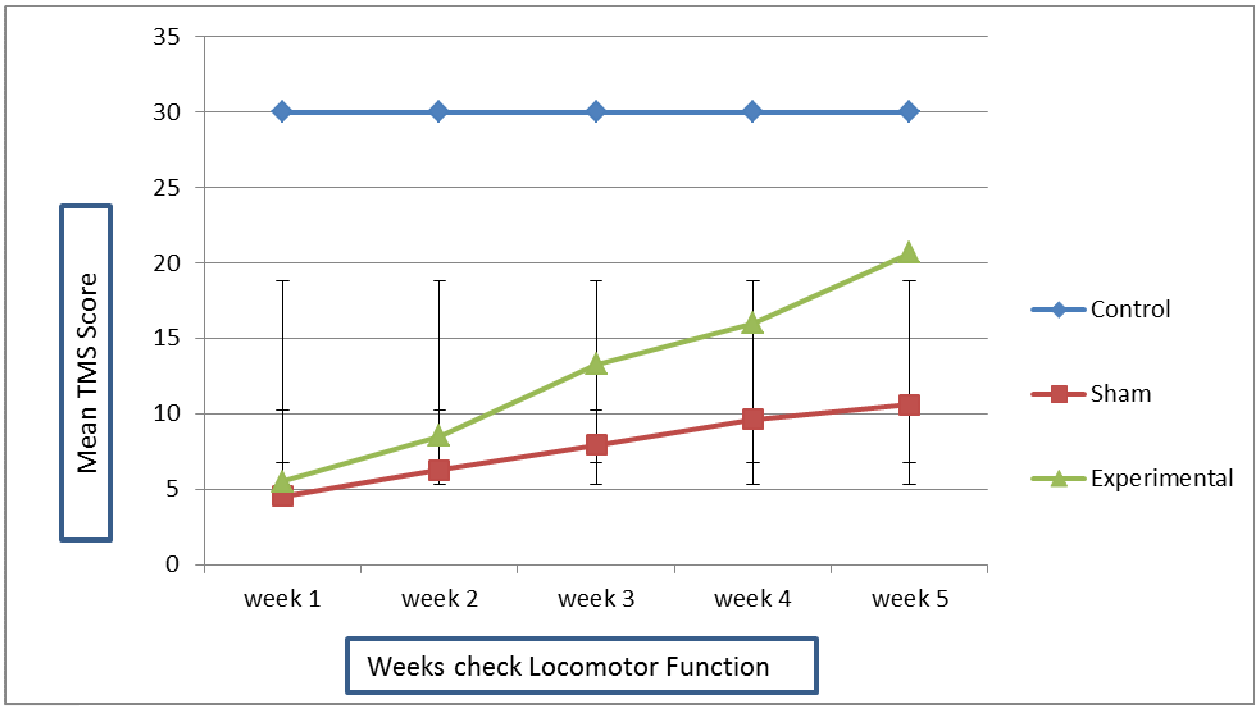
جدول ۱ : مقایسه دو به دو میانگین ها، بین گروه های کنترل، شم (ضایعه) و تجربی (پیوند سلول)

	گروه ها		تفاوت میانگین ها					
			۱	۲	۳	۴	۵	۶
۱	کنترل (پس از سه هفته)	(۳۰/۰۰±۰/۰۰)		۰	۲۲/۰۸**	۲۰/۴۲**	۱۶/۷۵**	۹/۳۳**
۲	کنترل (پس از پنج هفته)	(۳۰/۰۰±۰/۰۰)	۰		۲۲/۰۸**	۲۰/۴۲**	۱۶/۷۵**	۹/۳۳**
۳	**شم** (سه هفته پس از ضایعه)	(۷/۹۲±۱/۶۳)	-۲۲/۰۸**	-۲۲/۰۸**		-۱/۶۷	-۵/۳۳**	-۱۲/۷۵**
۴	**شم** (پنج هفته پس از ضایعه)	(۹/۵۸±۳/۰۱)	-۲۰/۴۲**	-۲۰/۴۲**	۱/۶۷		-۳/۶۷*	-۱۱/۰۸**
۵	**تجربی** (سه هفته پس از پیوند)	(۱۳/۲۵±۱/۷۸)	-۱۶/۷۵**	-۱۶/۷۵**	۵/۳۳**	۳/۶۷*		-۷/۴۲**
۶	**تجربی** (پنج هفته پس از پیوند)	(۲۰/۶۷±۳/۳۳)	-۹/۳۳**	-۹/۳۳**	۱۲/۷۵**	۱۱/۰۸**	۷/۴۲**	

(میانگین± انحراف استاندارد)؛ *نشان دهنده سطح معنی داری $p<۰/۰۵$ ؛ ** نشان دهنده سطح معنی داری $p<۰/۰۱$



نمودار ۱: میانگین نمره TMS در سه و پنج هفته بعد از آسیب به طور قابل ملاحظه ای در گروه های تجربی نسبت به گروه های شم بیشتر بود که نشان دهنده میزان بهبود مهارت حرکتی بعد از پیوند سلول است.



نمودار ۲: تغییر مهارت های حرکتی در طی پنج هفته در گروه های کنترل ، شم و تجربی. در گروه کنترل عدم تغییرمعنی‌دار بودن تغییر مهارت حرکتی در گروه تجربی نسبت به گروه شم

بحث

سلول درمانی با سلول‌های بنیادی از استراتژی‌های درمانی جدید محسوب می‌شود. این سلول‌ها توان تمایزی و جایگزینی سلول‌های آسیب دیده را دارند، به طوری که در درمان آسیب‌های نخاعی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند. نتایج حاصل

از این بررسی نشان داد کـه سـلول‌هـای بنیـادی مغـز استخوان بر اساس شکل دوکی و تمایز به سلول‌هـای چربی، مزانشیمی‌بودند(۲۱). این مطالعه، نشان داد کـه تجویز این سلول‌ها می‌تواند در موش‌های با ضـایعات نخاعی حاد سبب بهبـود مهـارت‌هـای حرکتـی در ایـن حیوانات شود و این اثر با افزایش مـدت زمـان تجـویز بیشتر مشاهده می‌شـود. بـا وجـود پیشـرفت‌هـایی در مراقبـت، مـدیریت پزشـکی و جراحـی و تکنیـک‌هـای توانبخشی، بسیاری از افراد با آسیب نخاعی هم‌چنـان از ناتوانی‌های نورولوژیکی رنج می‌برند(۵). به منظـور افزایش توان حسی و حرکتی بیماران با ضایعه نخاعی استراتژی‌های درمانی زیادی در نظر گرفته شده است، اما یافته‌های اخیر در ارتباط بـا بیولـوژی سـلول‌هـای بنیادی، جایگاه ویژه‌ای در پزشـکی ترمیمـی بـه خـود اختصاص داده است. سـلول‌هـای بنیـادی مزانشـیمی دسته‌ای از سلول‌های بنیادی هستند که در بافـت‌هـای مختلف از جمله مغز استخوان(۱۷) یافت مـی‌شـوند. از سـلول‌هـای بنیـادی در درمـان بیمـاری‌هـای سیسـتم عصبی هم‌چون؛ پارکینسون، آلزایمـر و سـکته مغـزی اسـتفاده مـی‌گـردد(۳۰). در مطالعـه‌ای کـه وانـگ و همکـاران انجـام دادنـد، نشـان داده شـد کـه پیونـد سلول‌های بنیادی پر توان القایی در آسیب‌های نخـاعی از طریق مکانیسم‌های تمـایز بـه سـلول‌هـای عصـبی، میلین‌سازی مجدد اکسون‌های دمیلینه شده بـه وسـیله الیگودندروسیت‌ها و ترشح فاکتورهای نوروتروفیـک، اثـرات درمـانی خـود را اعمـال مـی‌کننـد(۱۰). در ایـن مطالعه تأثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی بـر تغییـرات مهارت‌های حرکتی بعد از ضایعه نخاعی با روشTMS مورد بررسی قرار گرفت. روش TMS جایگزین مناسبی بـرای روش نمـره‌دهـی BBB کـه عمـدتاً بـرای رت‌هـا استفاده می‌شود، می‌باشـد. روش TMS بـرای ارزیـابی آسـان مـی‌باشـد و نتیجـه ارزیـابی بهتـر همـراه بـا حساسیت بالا و نوسان پایین‌تری را نشان می‌دهد کـه برای موش‌ها طراحی شده است(۱۷).

نتایج نشان داد که در پایان هفته پـنجم، بهبـود عملکرد حرکتی در گروه تجربی نسبت بـه گـروه شـم دیده شد و هم‌چنین مقایسه عملکرد حرکتی هفته سوم نسبت به پنجم در این گروه نشان داد کـه طـول زمـان می‌تواند تأثیر معنـی‌داری بـر مهـارت حرکتـی داشـته باشـد. مطالعـه‌هـای پیشـین نشـان داده‌انـد کـه پیونـد سـلول‌هـای بنیـادی مزانشـیمی مغـز اسـتخوان در آسـیب‌هـای نخـاعی نقـش‌هـای درمـانی ایفـا مـی‌کنـد (۳۲و۳۱). هم‌چنین مطالعـه ایـدی چیزوکـا و همکـاران نشان داد که پیونـد سـلول‌هـای بنیـادی مزانشـیمی از طریق اثـرات مفیـد بـر تـرمیم بافـت و رشـد اکسـونی موجـب بهبـود حرکتـی در رت‌هـای آسـیب نخـاعی می‌گردد(۳۳). این سلول‌ها قادر به تمایز به سلول‌هـای عصبی از جمله نـورون‌هـا و سـلول‌هـای نوروگلیـایی نظیر؛ آستروسیت‌ها، اولیگودندروسیت‌ها و سلول‌های شوان هستند کـه یکـی از مکانیسـم‌هـای احتمـالی ایـن سلول‌ها در ترمیم بافت‌های عصبی به حساب مـی‌آیـد. مکانیسم دیگر اینست که سلول‌های بنیادی مزانشـیمی قادر بـه ترشـح فاکتورهـای نوروتروفیـک مـی‌باشـند (۳۴و۲۵). از دلایل احتمالی دیگر بهبـود عملکـرد انـدام

عقبی، مکانیسم‌های انعطاف‌پذیری ذاتی نخاع است که اهمیت بسیار زیادی در برگشت عملکرد اندام‌های عقبی بعد از انواع مختلف ضایعات نخاعی دارد(۳۶و۳۵).

آسیب‌های نخاعی با دمیلینه شدن اکسون‌های سالم و از دست دادن نورون‌ها مشخص می‌شود و از این طریق نقص‌های عملکردی را افزایش می‌دهند (۲۶)، از آن جا که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان قادر به تمایز به سلول‌های اولیگودندروسیت می‌باشند، بنابراین یکی از مکانیسم‌های بهبود عملکرد حرکتی می‌تواند مربوط به تمایز این سلول‌ها به اولیگودندروسیت‌ها که در تولید میلین در دستگاه عصبی مرکزی نقش دارند، باشد(۳۷و۲). در یک مطالعه نشان داده شده است که تزریق سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان پس از دو هفته به رت‌ها باعث افزایش معنی داری در تست حرکتی BBB می‌شود(۳۳)، هم سو با نتایج این بررسی، در یک مطالعه دیگر نیز نشان داده شد که پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به موش‌های صحرایی با ضایعه نخاعی باعث بهبود عملکرد حرکتی حیوانات می‌گردد(۳۸).

این نتایج پیشنهاد می‌کند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بهبود عملکرد حرکتی را پس از آسیب نخاعی در موش‌ها بهبود می‌بخشد و به عنوان یک منبع در دسترس، قابل استفاده می‌باشد، اگر چه کاربرد کلینیکی این سلول‌ها به تحقیقات بیشتری نیاز دارد.

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان توان تمایزی به سلول‌های نخاعی را داشته و قادرند اختلالات حرکتی ناشی از آسیب حاد نخاعی را بهبود بخشند و امید می‌رود در آینده با انجام تحقیق‌های تکمیلی بیشتر، بتوان از این سلول‌ها در جهت درمان بیماران قطع نخاعی استفاده نمود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله بر خود واجب می‌دانند تا از مدیریت محترم مراکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و فناوری ترانسژنیک و پزشکی مقایسه ای و تجربی دانشگاه علوم پزشکی شیراز که در فراهم آوردن آمکانات مورد نیاز در جهت اجرای این پژوهش همکاری نموده اند، سپاسگزاری نمایند.

REFERENCES

1.Yang JY, Lee JK, Rhee KJ, Kim KC, Hong UP, Lee JB. A comparative study of behavioral and immunohistological changes after spinal cord injury between young and adult rats. J Korean Orthop Assoc 2004; 39(5): 522-30.
2.Raineteau O, Schwab ME. Plasticity of motor systems after incomplete spinal cord injury. Nat Rev Neurosci 2001; 2(4): 263–73.
3.Wyndaele M, Wyndaele JJ. Incidence, prevalence and epidemiology of spinal cord injury: what learns a worldwide literature survey? Spinal Cord 2006; 44(9): 523-9.
4.Devivo MJ. Epidemiology of traumatic spinal cord injury: trends and future implications. Spinal Cord 2012; 50(5): 365-72.
5.Vawda R, Fehlings MG. Mesenchymal cells in the treatment of spinal cord injury: current & future perspectives. Curr Stem Cell Res Ther 2013; 8(1): 25-38.
6.Nashmi R, Fehlings MG. Mechanisms of axonal dysfunction after spinal cord injury: with an emphasis on the role of voltage-gated potassium channels. Brain Res Brain Res Rev 2001; 38(1-2): 165-91.
7.Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. Nat Rev Mol Cell Biol 2000; 1(2): 120-9.
8.Ormond DR, Shannon C, Oppenheim J, Zeman R, Das K, Murali R, et al. stem cell therapy and curcumin synergistically enhance recovery from spinal cord injury. PLoS One 2014; 9(2): e88916.
9.Kubinová S, Syková E. Biomaterials combined with cell therapy for treatment of spinal cord injury. Regen Med 2012; 7(2): 207–24.
10.Wang H, Fang H, Dai J, Liu G, Xu ZJ. Induced pluripotent stem cells for spinal cord injury therapy: current status and perspective. Neurol Sci 2013; 34(1): 11-7.
11.Coutts M, Keirstead HS. Stem cells for the treatment of spinal cord injury. Exp Neurol 2008; 209(2): 368-77.
12.Sylvester KG, Longaker MT. Stem cells: review and update. Arch Surg 2004; 139(1): 93-9.
13.Kim N, Cho SG. Clinical applications of mesenchymal stem cells. Korean J Intern Med 2013; 28(4): 387–402.
14.Mehrabani D, Hassanshahi MA, Tamadon A, Zare S, Keshavarz S, Rahmanifar F, et al. Adipose tissue- derived mesenchymal stem cells repair germinal cells of seminiferous tubules of busulfan-induced azoospermic rats. J Hum Reprod Sci 2015; 8(2): 103-10.
15.Razeghian Jahromi I, Mehrabani D, Mohammadi A, Dianatpour M, Tamadon A, Zare S, et al. The effect of fetal rat brain extract on morphology of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Comp Clin Pathol 2016; 25(2): 343-9.
16.Homayounfar N, Verma P, Nosrat A, El Ayachi I, Yu Z, Romberg E, et al. Isolation, characterization, and differentiation of dental pulp stem cells in ferrets. J Endod 2016; 42(3): 418-24.
17.Tamadon A, Mehrabani D, Rahmanifar F, Jahromi AR, Panahi M, Zare S, et al. Induction of spermatogenesis by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in busulfan-induced azoospermia in hamster. Int J Stem Cells 2015; 8(2): 134-45.
18.Mehrabani D, Nazarabadi R, Kasraeian M, Tamadon A, Dianatpour M, Vahdati A, et al. Growth kinetics, characterization, and plasticity of human menstrual blood stem cells. Iran J Med Sci 2016; 41(2): 132–9.
19.Mehrabani D, Mojtahed Jaberi F, Zakerinia M, Hadianfard MJ, Jalli R, Tanideh N, et al . The healing effect of bone marrow-derived stem cells in knee osteoarthritis: a case report. World J Plast Surg 2016; 5(2): 168-74.
20.Ji KH, Xiong J, Fan LX, Hu KM, Liu HQ. Multilineage differentiation capability comparison between mesenchymal stem cells and multipotent adult progenitor cells. Adv Stud Biol 2009; 1(1): 25–35.
21.Galli D, Vitale M, Vaccarezza M. Bone marrow derived mesenchymal cell differentiation toward myogenic lineages: facts and perspectives. Biomed Res Int 2014; 2014: 762695.
22.Buenrostro D, Park SI, Sterling JA. Dissecting the role of bone marrow stromal cells on bone metastases. Biomed Res Int 2014; 2014: 875305.
23.Doulames VM, Plant GW. Induced pluripotent stem cell therapies for cervical spinal cord injury. Int J Mol Sci 2016;17(4): 530.
24.Liu W, Ding Y, Zhang X, Wang L. Bone marrow stromal cells inhibit caspase-12 expression in rats with spinal cord injury. Exp Ther Med 2013; 6(3): 671-4.

25.Chen Q, Long Y, Yuan X, Zou L, Sun J, Chen S, et al. Protective effects of bone marrow stromal cell transplantation in injured rodent brain: synthesis of neurotrophic factors. J Neurosci Res 2005; 80(5): 611–19.
26.Thuret S, Moon LD, Gage FH. Therapeutic interventions after spinal cord injury. Nat Rev Neurosci 2006; 7(8): 628-43.
27.Watanabe S, Uchida K, Nakajima H, Matsuo H, Sugita D. Early transplantation of mesenchymal stem cells after spinal cord injury relieves pain hypersensitivity throughsuppression of pain-related signaling cascades and reduced inflammatory cell recruitment. Stem Cells 2015; 33(6): 1902-14.
28.Rivlin AS, Tator CH. Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. Surg Neurol 1978; 10(1): 38-43.
29.Shigyo M, Tanabe N, Kuboyama T, Choi SH, Tohda C. New reliable scoring system, Toyama mouse score, to evaluate locomotor function following spinal cord injury in mice. BMC Res Notes 2014; 7(1): 332.
30.Körbling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair- a new therapeutic concept? N Engl J Med 2003; 349(6): 570-82.
31.Stewart R, Przyborski S. Non-neural adult stem cells: tools for brain repair?. Bioessays 2002; 24(8): 708-13.
32.Padovan CS, Jahn K, Birnbaum T, Reich P, Sostak P, Strupp M, et al. Expression of neuronal markers in differentiated marrow stromal cells and CD133+ stem - like cells. Cell Transplant 2003; 12(8): 839-48.
33.Ide C, Nakai Y, Nakano N, Seo TB, Yamada Y, Endo K, et al. Bone marrow stromal cell transplantation for treatment of sub-acute spinal cord injury in the rat. Brain Res 2010; 1332: 32-47.
34.Sahni V, Kessler JA. Stem cell therapies for spinal cord injury. Nat Rev Neurol 2010; 6(7): 363-72.
35.Rossignol S, Barriere G, Alluin O, Frigon A. Re-expression of Locomotor Function After Partial Spinal Cord Injury. Physiology (Bethesda) 2009; 24(2): 127–39.
36.Rossignol S. Frigon A. Recovery of locomotion after spinal cord injury: some facts and mechanisms. Annu Rev Neurosci 2011; 34: 413–40.
37.Ballermann M, Tse AD, Misiaszek JE, Fouad K. Adaptations in the walking pattern of spinal cord injured rats. J Neurotrauma 2006; 23(6): 897-907.
38.Alluin O, Karimi-Abdolrezaee S, Delivet-Mongrain H, Leblond H, Fehlings MG, Rossignol S. Kinematic study of locomotor recovery after spinal cord clip compression injury in rats. J Neurotrauma 2011: 28(9): 1963-81.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Healing Effect of Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells On Motor Skills In Acute Spinal Cord Injury, in Mice

Gashmardi N [1,2], Mehrabani D[3], Hosseini SE [2], Edalatmanesh MA[2], Khodabandeh Z[3]

[1]Department of Biology, Faculty of Sciences, Shiraz Branch,Islamic Azad University, Shiraz, Iran, [2]Department of Physiology, Collage of Sciences, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran, [3]Stem Cell and Transgenic Technology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Received: 12 Jun 2016 Accepted: 8 Oct 2016

Abstract

Background & aim: Acute spinal cord injury is a devastating damage that can cause a lot of motor and sensory deficits and reduce the quality of life and life expectancy of patients. Stem cell transplantation can be one of the promising therapeutic strategies. Bone marrow is a rich source of stem cells that is enable to differentiate into various cell types. Due to the fact that thousands of people around the world suffer from spinal cord injuries there has been not found effective treatment for them until now. Therefore, this study aimed to investigate the differentiation and function in bone marrow stem cells transplanted into mice with spinal cord injury has been done.

Methods: Bone marrow mesenchymal stem cells were Isolated from femurs and tibias of three mice and cultured. The mesenchymal properties of cells were investigated by morphology, differentiation into adipoblast and cell surface markers using RT-PCR. Thirty six Balb/c mice were randomly divided into 3 groups: the control, sham and experimental. Control group received no treatment. In sham group, mice were subjected to spinal cord compression in dorsal area and did not receive any treatment and In experimental group, one day after lesion, 3rd passage of bone marrow stem cells (2×10^5) were injected intravenously. Then assessment of locomotor function was done in open field by Toyama Mouse Score (TMS) durig 5 week post-injury. The collected data was analyzed using ANOVA and Tukey tests.

Results: TMS score in both experimental and sham groups was lower than the control group, while it significantly increased after 5th week in experimental group compared to the sham group ($p<.001$).

Conclusion: The results of this study showed that bone mesenchymal stem cell transplantation in rats with acute spinal cord injury can lead to improved motor function after injury.

Keywords: Bone marrow, Mesenchymal stem cells, locomotor function, Spinal cord injury, Toyama Mouse Score.

*Corresponding author: **Mehrabani D**, Stem Cell and Transgenic Technology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Email: mehrabad@sums.ac.ir

Please cite this article as follows:

Gashmardi N, Mehrabani D, Hosseini SE, Edalatmanesh MA, Khodabandeh Z. Healing Effect of Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells On Motor Skills In Acute Spinal Cord Injury, in Mice. Armaghane-danesh 2016; 21 (7): 669-681.