مجله دانشکده علوم پزشکی ساوه | مقاله پژوهشی

۱۴۰۴، دوره ۱، شماره ۴

بررسی تاثیر پیوند سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بر نقص Nrf2 و میلین سازی مجدد در مدل دمیلیناسیون القایی با کوپریزون

فاطمه طهماسبی، شیرین براتی[1*]

۱. گروه علوم تشریحی، دانشکده علوم پزشکی ساوه، ساوه، ایران

تاریخ دریافت :۱۴۰۵/۰۲/۰۶ تاریخ انتشار: ۱۴۰۵/۰۲/۲۳

چکیده

مقدمه: Multiple Sclerosis بیماری دمیلینه کننده التهابی مزمن سیستم عصبی مرکزی است که با تظاهرات خود ایمنی همراه است. سلول‌های پیوندی با تمایز به انواع سلول‌های بافت عصبی سبب بازسازی شبکه عملکردی شده و به عنوان منبع فاکتورهای نوروتروفیک در جهت حمایت از سایر سلول‌های باقیمانده در بافت عمل می‌نمایند. در این مطالعه ضمن تأکید بر اهمیت اولیگودندروسیت‌ها در مهار یا کاهش دمیلیناسیون در مدل تجربی MS، به تأثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان پیوند شده بر میزان میلین‌سازی مجدد با تکیه بر مکانیسم Nrf2 پرداخته شده است.

روش: در این مطالعه از موش‌های نر ۸ هفته‌ای C57BL/6 استفاده شد. به‌منظور القای مدل دمیلینه مزمن MS، موش‌های نژاد C57BL/6 رژیم غذایی حاوی ۰/۲ درصد کوپریزون به ازای هر کیلوگرم از غذا به مدت ۱۲ هفته دریافت کردند. پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان از طریق تزریق داخل بطنی به بطن طرفی راست موش‌ها تزریق شد. برای بررسی آسیب‌های رفتاری و میزان بهبود از تست رفتاری روتارود استفاده شد. دو هفته پس از تزریق سلول، میزان میلین‌سازی مجدد و ترمیم آکسون توسط رنگ‌آمیزی اختصاصی Luxol fast blue (LFB) مورد مطالعه قرار گرفت. میزان بیان ژن CX3CL1، TGF-β و Nrf2 با استفاده از روش Real time PCR ارزیابی شد. در نهایت آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون t-test و one way ANOVA انجام گرفت و Mean ±SEM برای توصیف داده‌ها استفاده شد و $P<0.05$ معنی‌دار تلقی گردید.

یافته‌ها: در این مطالعه ما دریافتیم که پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی باعث افزایش بیان ژن‌های TGF-β و CX3CL1 و Nrf2 همراه با بهبود عملکردی در مقایسه با سایر گروه‌ها گردید. به‌علاوه، پیوند سلولی به‌طور معنی‌داری منجر به بهبود میلین‌سازی و ترمیم آکسونی شد که توسط تصاویر LFB بررسی شد.

نتیجه گیری: یافته‌های این مطالعه نشان داد که تزریق داخل بطنی سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌تواند روش مفیدی برای بهبود دمیلینه‌شدن مزمن در بیماری‌های تخریب‌کننده عصبی از قبیل MS باشد. زیرا از یک طرف سلول درمانی با استفاده از فاکتورهایی که توسط سلول‌های موجود در محیط کشت ترشح می‌شود سبب کاهش استرس اکسیداتیو و التهاب می‌گردد و از طرف دیگر میزان میلین‌سازی و ترمیم آکسونی را افزایش می‌دهد. بنابراین پیوند سلول می‌تواند به‌عنوان یک روش مناسب برای تقویت میلین‌سازی و کاهش التهاب در بیماری‌هایی از قبیل MS در نظر گرفته شود.

کلید واژه: سلول بنیادی، مدل کوپریزون، Nrf2، ام اس.

[*]**نویسنده مسئول: شیرین براتی، ایمیل:** baratishirin7@gmail.com

ارجاع: براتی شیرین، طهماسبی فاطمه. بررسی تأثیر پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بر نقص Nrf2 و میلین‌سازی مجدد در مدل دمیلیناسیون القایی با کوپریزون. مجله دانشکده علوم پزشکی ساوه, ۱۴۰۴; ۱(۴): ۱-۱۳. doi: 10.22034/sumsj.2026.579617.1085

مقدمه

MS[۱] بیماری دمیلینه کننده التهابی مزمن سیستم عصبی مرکزی است که نوعی بیماری خودایمنی می‌باشد. در این بیماری سیستم ایمنی بدن به جای مورد هدف قرار دادن آنتی‌ژن‌های خارجی، آنتی‌ژن‌های میلین در سیستم عصبی مرکزی را شناسایی کرده و به آن‌ها حمله می‌کند و شیوع این بیماری در زنان ۲ تا ۳ برابر بیشتر از مردان می‌باشد و اغلب در سنین ۲۰ تا ۴۰ سالگی بروز می‌کند (۱). مهمترین علائم بالینی این بیماری شامل فلج حرکتی و تخریب حسی بویژه اختلالات بینایی و نقایص شناختی می‌باشد (۲). علل ایجاد بیماریMS، هنوز ناشناخته و مبهم است، ولی به نظر می‌رسد که دو عامل یعنی فاکتورهای ژنتیکی و محیطی در بروز این اختلال نقش مهمی را ایفا می‌کنند (۳). تاکنون درمان قطعی برای بیماری MS وجود نداشته و تنها برخی داروها جهت بهبود علایم و کندکردن سیر بیماری در دسترس است. دو هدف اصلی در درمان MS، ممانعت از پیشرفت بیماری و ترمیم آسیب‌های ایجاد شده با روش‌هایی مانند سلول درمانی می‌باشد. از میان انواع سلول‌ها، سلول‌های بنیادی از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند و باعث تحریک میلین-سازی و کاهش آسیب آکسونی می‌شوند (۴).

پاتولوژی MS توسط طیفی از تغییرات بافتی در CNS[۲] شامل پلاک‌های دمیلینه اولیه، کاهش الیگودندروسیت و دژنره‌شدن آکسونی تعیین می‌شود که با تشکیل اسکار آستروسیتی در ماده سفید و خاکستری مغز و طناب نخاعی و فعال‌شدن سلول‌های میکروگلیال همراه می‌باشد. سد خونی مغزی بصورت موضعی در برابر سلول‌های التهابی (لنفوسیت‌ها، ماکروفاژها و میکروگلی‌های فعال‌شده) شکسته می‌شود (۵). افزایش و فعال‌شدن وسیع میکروگلی[۳] و افزایش میزان آستروسیت[۴] در پارانشیم مغز بیماران مبتلا به MS همراه با مرگ نورونی دیده می‌شود (۵).

تحقیقات نشان می‌دهد که از بین‌رفتن آکسون‌ها، نورون‌ها و همچنین اختلال عملکرد سیناپس‌ها از عوامل مهم نقایص عصبی دائمی در بیماران مبتلا به MS است. آکسون‌های دمیلینه‌شده به‌علت فقدان حمایت‌های تغذیه‌ای توسط غلاف میلین و الیگودندروسیت‌ها تمایل زیادی به تخریب دارند. از این رو تحقیقات اخیر بر روی پیوند سلولی، دیدگاه‌های جدیدی را برای استفاده از الیگودندروسیت‌های مشتق از سلول‌های بنیادی در میلین‌سازی بر اساس سلول ایجاد می-کند تا هدایت پتانسیل عمل به حالت اولیه برگردد (۶).

استرس اکسیداتیو[۵] (Oxidative Stress) ناشی از عدم تعادل بین رادیکال‌های آزاد و آنتی‌اکسیدان‌ها در بدن می‌باشد. این وضعیت با آسیب به[۶] DNA، پروتئین‌ها و لیپیدهای سلولی، خطر بیماری‌های مزمن مانند سرطان، دیابت، بیماری‌های قلبی-عروقی، پیری زودرس و بیماری‌های تخریب‌کننده عصبی (مانند آلزایمر) را افزایش می‌دهد. علل و عوامل استرس اکسیداتیو شامل عوامل محیطی مثل آلودگی هوا، سیگار، اشعه UV[۷]، مصرف الکل، و سموم؛ عوامل داخلی مانند رژیم غذایی ناسالم؛ بیماری‌ها از جمله عفونت‌ها و التهاب‌های بافتی می‌باشد. یکی از روش‌های کنترل و کاهش استرس اکسیداتیو استفاده از رژیم غذایی غنی از آنتی‌اکسیدان‌ها مانند مصرف انواع میوه‌ها و سبزیجات رنگی (مانند توت‌ها، مرکبات، سبزیجات برگ‌سبز)، چای سبز، قهوه، آجیل، ماهی و زردچوبه به رژیم غذایی می‌باشد. عواقب طولانی‌مدت افزایش رادیکال‌های آزاد بدون مقابله کافی توسط آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند منجر به التهاب مزمن و آسیب‌های بافتی گسترده شود که زمینه را برای بیماری‌های جدی فراهم می‌کند (۷).

فاکتور Nrf2[۸] بعنوان تنظیم کننده اصلی پاسخ ضد استرس اکسیداتیو می‌باشد. جابجایی Nrf2 به هسته و باند شدن با عناصر پاسخ آنتی اکسیدانی ARE[۹] در ناحیه پیش برنده ژن-های متعدد برای پروتئین‌های محافظت‌کننده از سلول یافت شده است. فعالیت این آنزیم‌ها می‌تواند بطور موثری از مرگ

---

۱ Multiple Sclerosis
۲ Central Nervous System
۳ Microgliosis
۴ Astrogliosis
۵ Oxidative Stress
۶ Deoxyribonucleic Acid
۷ Ultraviolet radiation
۸ Nuclear Factor E2-related Factor 2
۹ Antioxidant Response Elements

سلولی و آپوپتوز اولیه وابسته به استرس اکسیداتیو جلوگیری کند (۸).

چندین مطالعه، درمان با استفاده از سلول بنیادی جنینی در مدل‌های حیوانی با بیماری‌های دمیلینه‌کننده و میلین سازی بعد از آسیب نخاعی را گزارش کرده‌اند. آن‌ها پیشنهاد می‌کنند که پیش‌سازهای الیگودندروسیتی مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی بصورت بالقوه رژنراسیون را القا می‌کنند و دژنراسیون ثانویه را با حفاظت از آکسون‌ها کاهش می‌دهند (۱۱-۹). بیماران مبتلا به MS که میلین‌سازی ناکافی دارند، وارد فاز پیش‌رونده این بیماری می‌شوند که با دژنراسیون ثانویه آکسون‌های دمیلینه همراه است. فاکتورهای ژنتیکی اولیه، نقص اولیه در سلول‌های پیش‌ساز، عدم توانایی بکارگیری سلول‌های پیش‌ساز و شکست در تمایز و مهاجرت سلول‌های پیش‌ساز منجر به عدم میلین‌سازی مؤثر می‌شود که گاهی همراه با حذف سلول‌های پیش‌ساز الیگودندروسیت و سلول‌های بنیادی عصبی در CNS است. بنابراین بررسی و حفظ جمعیت سلول‌های پیش‌ساز الیگودندروسیت و سلول‌های بنیادی برای بهبود میلین‌سازی در این بیماری امری حیاتی به حساب می‌آید (۱۲).

مطالعه پیکارد ریرا و همکاران هم نشان داد که در مناطقی مثل جسم پینه‌ای، سلول‌های مهاجرتی سرنوشت گلیال پیدا می‌کنند و منحصراً به اولیگودندروسیت‌ها متمایز می‌شوند. بنابراین اگرچه انواع آسیب‌ها باعث مهاجرت سلول‌ها می‌شوند ولی سرنوشت این سلول‌ها وابسته به سیگنال‌هایی است که از محل آسیب برمی‌خیزند (۱۳).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، جمعیتی از سلول‌های بنیادی، مستقر در بافت مغز استخوان هستند. اهمیت سلول‌های بنیادی مزانشیمی بدلیل چندتوانی بودن آن‌هاست و همچنین آن‌ها می‌توانند به سلول‌های رده مزانشیمی متمایز شوند که تحت شرایط محیطی ویژه، این سلول‌ها فنوتیپ سلول‌های رده اندودرمی و نورواکتودرمی را کسب می‌کنند. MSCs با مهاجرت به محل‌های التهابی، بافت‌های آسیب دیده شامل CNS را محافظت می‌نمایند (۱۴).

اطلاعات اخیر نشان می‌دهد که تجویز سلول‌های بنیادی مزانشیمی اگزوژن از طریق تعدیل ایمنی و ترشح فاکتورهای نوروتروفیک نسبت به جایگزینی و تمایز سلولی اثرات درمانی بیشتری دارد. این سلول‌ها، سیتوکین‌ها و فاکتورهای نوروتروفیک متفاوتی را برای ترمیم بافت و درمان بیماری‌ها ترشح می‌کنند که منجر به بهبود عملکرد عصبی توسط نوروژنز، آنژیوژنز و سیناپتوژنز می‌شود (۱۵). مطالعات انجام شده بر روی MSCs نشان می‌دهد که حاوی میزان زیادی از سیتوکین‌های مترشحه شامل آنژیوژنین، اینترلوکین ۶ و ۸، TGF-β، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی[۱۰] VEGF، CX3CL1، فاکتور رشد انسولینی ۱ [۱۱] IGF-1 و ماتریکس متالوپروتئیناز [۱۲] MMP می‌باشد (۱۶).

پیوند سلولی یک فرصت بالقوه جهت درمان برخی بیماری‌ها از جمله بیماری‌های دمیلینه کننده مانند مالتیپل اسکلروزیس را بوجود آورده است. سلول‌های پیوند شده با تمایز به انواع سلول‌های بافت عصبی سبب بازسازی شبکه عملکردی شده و به عنوان منبع فاکتورهای نوروتروفیک در جهت حمایت از سایر سلول‌های باقی‌مانده در بافت عمل می‌نمایند. از سوی دیگر میکروگلی‌ها به عنوان یکی از سلول‌های گلیال در پاسخ به آسیب از حالت استراحت به حالت فعال تبدیل شده و در اطراف محل ضایعه تجمع و شروع به ترشح مواد تسهیل کننده التهاب می‌نمایند. Nrf2 به عنوان یکی از فاکتورهای رونویسی، یک تنظیم کننده ضروری در مکانیسم دفاعی در مقابل استرس اکسیداتیو است. پروتئین Nrf2 تقریباً از ۶۰۵ اسید آمینه تشکیل شده است. Keap1 تا حد زیادی به عنوان یک تعدیل کننده اصلی Nrf2 مورد بررسی قرار گرفته است. در شرایط عادی، keap1 باعث ایجاد یوبیکوئیتیناسیون Nrf2 از طریق کمپلکس لیگاز E3 براساس کولین ۳ (Cul3) می‌شود که سپس باعث تجزیه آن توسط پروتئازوم S۲۶ می‌گردد. این مکانیسم از انتقال Nrf2 از سیتوپلاسم به هسته جلوگیری می‌کند. بنابراین مقادیر بالایی از Nrf2 غیر متصل از سیتوپلاسم به هسته منتقل می‌شود و به ARE متصل می‌شود و باعث فعال شدن فاکتور رونویسی وابسته به ARE می‌گردد که می‌تواند آنزیم‌های دفاعی آنتی

[۱۰] vascular Endothelial Growth Factor
[۱۱] Insulin-like Growth Factor-۱
[۱۲] Matrix metalloproteinases

اکسیدانی مانند همئوکسیژناز-۱ (HO-1)[۱۳] و سوپراکسیددیسموتاز ۱ (SOD1)[۱۴] را فعال کند (۱۷). از طرف دیگر ژن Nrf2 دارای خاصیت ضدالتهابی از طریق مسیر NF-κB[۱۵] می‌باشد که می‌تواند با کاهش تعداد میکروگلی‌ها میزان التهاب را در سیستم عصبی کاهش دهد. مطالعات دیگری نیز وجود دارد که اثبات می‌کند میزان بیان ژن Nrf2 با افزایش سن در انسان و حیوانات کاهش می‌یابد که همراه با افزایش میزان بیماری‌های تخریب‌کننده عصبی می‌باشد. با توجه به این که Nrf2 هم در مکانیسم‌های ضد التهابی و هم در فرآیندهای ضد استرس اکسیداتیو و هم در فعالیت نرمال میتوکندری نقش مهمی دارد، واضح است که Nrf2 می تواند یک هدف درمانی پایدار را در شرایط عصبی نشان دهد. مطالعات نشان داده است که فعال شدن آن بسیاری از فرآیندهای درگیر در اختلالات نورودژنراتیو از جمله اختلال عملکرد میتوکندری، استرس اکسیداتیو و التهاب عصبی را کاهش می‌دهد (۱۸).

الیگودندروسیت‌ها، سلول‌های تولیدکننده میلین در سیستم عصبی مرکزی هستند که در برابر تغییرات در تامین انرژی سلولی و استرس اکسیداتیو آسیب پذیر می‌باشند. علاوه بر این، استرس اکسیداتیو پاسخ‌های استرسی را در الیگودندروسیت‌ها ایجاد می‌کند و سیستم Nrf2-ARE الیگودندروگلیال از نظر عملکردی در این فرآیند نقش دارد. استرس اکسیداتیو، از دست دادن الیگودندروسیت و دمیلیناسیون متعاقب آن نشانه‌های بارز ضایعات MS و مدل حیوانی کوپریزون هستند (۱۹). بنابراین با توجه به این نکات می‌توان دریافت که Nrf2 در الیگودندروسیت‌های آسیب دیده در MS مورد هدف قرار می‌گیرد و این ژن می‌تواند در بررسی تاثیر عوامل درمانی در بیماری MS بعنوان یک مکانیسم مهم مورد بررسی قرار گیرد.

با وجود تحقیقات زیاد در زمینه پیوند سلولی در بیماری ام اس و موفقیت آمیز بودن آن و همین‌طور بررسی بسیاری از مکانیسم‌های دخیل در فرآیند دمیلینه‌شدن اما هنوز به بررسی بعضی از عوامل موثر در از بین رفتن اولیگودندروسیت-ها بعنوان سلول‌های سازنده میلین، نظیر نقص در بیان ژن Nrf2 پرداخته نشده است. در این مطالعه ضمن تأکید بر اهمیت اولیگودندروسیت‌ها در مهار یا کاهش دمیلیناسیون در مدل تجربی MS، به تأثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان پیوند شده بر بهبود میلین‌سازی با تکیه بر بررسی مکانیسم Nrf2 پرداخته شده است.

روش

در این مطالعه تجربی، ابتدا ۱۸ سر موش نر بالغ نژاد C57BL/6 مورد استفاده قرار گرفتند که به‌صورت تصادفی به سه گروه شامل کنترل (بدون هیچ مداخله‌ای) (Ctrl)، مدل کوپریزون (CPZ) و مدل کوپریزون به همراه پیوند سلول MSC تقسیم‌بندی شدند.

ایجاد مدل دمیلیناسیون با استفاده از کوپریزون

القاء میلین‌زدایی و ایجاد مدل موشی مالتیپل اسکلروزیس با استفاده از Cuprizone انجام گرفت. ترکیب غذای پودر شده موش با ۰/۲٪ Cuprizone تهیه شد و به مدت ۱۲ هفته، موش‌های C57BL/6 نر (۸ هفته‌ای) تحت این رژیم غذایی قرار گرفتند. پس از پایان این زمان با تهیه مقاطع بافتی، میلین‌زدایی در جسم پینه‌ای مشاهده شد.

تأیید مدل دمیلیناسیون

در پایان هفته دوازدهم جهت تایید مدل دمیلیناسیون، با استفاده از پارافرمالدئید ۴٪ و از طریق قلب، پرفیوژن انجام و مغز ۳ حیوان خارج شد. سپس مقاطع بافتی تهیه شد و با استفاده از Luxol fast blue و میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت.

تهیه سلول‌های بنیادی

BMSCs از استخوان تیبیا و فمور موش‌های ۴-۶ هفته‌ای آسپیره شد و در شرایط آزمایشگاهی مورد کشت با شرایط استاندارد قرار گرفت. ضمن انجام کار، کلیه اصول اخلاقی که باید در حین پژوهش بر روی حیوان انجام شود، رعایت شد. موش‌ها با مخلوطی از کتامین و زایلازین به طور عمیق بیهوش شدند و بافت‌های نرم اطراف استخوان‌های فمور و تیبیا با قیچی جدا گردید، سپس استخوان‌ها در محیط کشت DMEM[۱۶] حاوی ۱۵ درصد سرم گاوی در دیش‌های ۱۰

[۱۳] Heme oxygenase-1
[۱۴] Superoxide dismutase-1
[۱۵] Nuclear factor-κB
[۱۶] Dulbecco's Modified Eagle Medium

سانتی‌متری ریخته شد و بقیه مراحل در زیر هود استریل انجام گرفت. سپس دو سر استخوان بریده شد و به وسیله یک سرنگ، محیط کشت DMEM با فشار به داخل کانال استخوانی تزریق شد تا محتویات مغز استخوان شسته شوند، سپس مغز استخوان را در لوله‌های استریل جمع‌آوری و در دور ۱۲۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد، سپس محیط رویی را تخلیه و رسوب سلولی با ۵ میلی لیتر DMEM حاوی سرم گاوی و ۱۰۰ واحد بین‌المللی آنتی‌بیوتیک پنی‌سلین و ۱۰۰ واحد بین‌المللی آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین تازه معلق شد. پس ازشمارش، با تراکم ۱۰۰۰۰۰ سلول در سانتی‌متر مربع به طور اولیه در فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متری کشت داده و با انجام چند پاساژ سلول‌ها تکثیر داده شد.

نشان‌دار کردن سلول‌ها

برای نشانه‌گذاری سلول‌ها و نیز برای ردیابی دراز مدت سلول-ها از رنگ فلورسنت DiI استفاده شد که به میزان ۵ میلی‌لیتر از آن استفاده شده و به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور قرار گرفت.

تزریق داخل بطنی سلول‌ها

۱۲ هفته بعد از شروع آزمایش، موش‌ها در داخل یک دستگاه استریوتاکسی قرار گرفتند و تزریق با استفاده از مختصات زیر انجام شد: ۰/۵ میلی‌متر قدامی خلفی نسبت به Bregma، ۰/۷۵ میلی‌متر داخلی خارجی و ۲/۵ میلی‌متر پشتی شکمی از سطح مغز. سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از پاساژ سوم از ظرف جدا شدند. میزان بقای این سلول‌ها بالای ۸۰ در صد بود و با استفاده از یک سرنگ همیلتون ۵ میکرولیتر به بطن راست تزریق شدند. حجم ۲ میکرولیتر شامل حدود ۳۰۰۰۰۰ سلول در مدت ۴ دقیقه به داخل بطن طرفی (راست) تزریق گردید. بعد از تزریق، برش بخیه شد و ۳۰ میلی‌لیتر PBS استریل به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن بصورت زیرجلدی تزریق شد تا از دست دادن آب را جبران کند. موش‌ها گرم نگه داشته شدند تا بطور کامل ریکاوری شوند، حیوانات روزانه تا حداقل یک هفته مانیتور شدند.

آزمون رفتاری Rotarod

آزمون روتارود برای بررسی میزان هماهنگی حرکتی و تعادل در گروه‌های مورد مطالعه انجام شد. این آزمایش با استفاده از یک شتاب‌دهنده روتارود (IITC Life Science Inc, CA) صورت گرفت که در آن حیوانات روی یک استوانه چرخان (با قطر ۳ سانتی‌متر) قرار گرفتند و سه بار در روز به مدت ۳ روز متوالی روی روتارود ارزیابی شدند. یک روز قبل از شروع جلسه آزمایش، هر حیوان به مدت ۳ دقیقه در دستگاه آموزش داده شد که به تدریج از سرعت ۴ تا ۳۵ دور در دقیقه افزایش یافت. این آموزش، مهارت‌های حیوانات را بهبود می‌بخشد و از افتادن تصادفی جلوگیری می‌کند. ۲۴ ساعت پس از شروع آزمایش، هر حیوان با همان سرعت به مدت ۵ دقیقه در دستگاه روتارود مورد آزمایش قرار گرفت. زمان لازم برای هر حیوان برای حفظ تعادل خود روی استوانه چرخان ثبت و به عنوان زمان تأخیر در افتادن ارائه گردید.

بررسی میلین‌زایی مجدد

بر اساس مطالعات قبلی، ۱۴ روز پس از تزریق سلول، پرفیوژن موش‌ها و تهیه مقاطع بافتی انجام گرفت. در این بخش از مطالعه، جهت بررسی میلین زایی مجدد در گروه‌های مربوطه از رنگ‌آمیزی اختصاصی Luxol fast blue استفاده شد (۲۰).

بررسی ژن‌ها با استفاده از روش qRT-PCR

در این مطالعه، ۱۴ روز پس از پیوند سلول، جهت بررسی میزان بیان ژن‌های CX3CL1، TGF-β و Nrf2 از تکنیک qRT-PCR استفاده شد در این بررسی‌ها ابتدا RNA[۱۷] کل استخراج و سپس cDNA ساخته شد و طراحی پرایمرها با استفاده از سایت Primer-BLAST انجام شد. cDNA حاصله با استفاده از روش Real Time PCR تکثیر و مورد بررسی قرار گرفت. اولین و مهم‌ترین مسئله در هنگام کار با RNA، دقت در جلوگیری از آلودگی با RNase است. آنزیم RNase، نوکلئازی است که در هنگام پاره شدن سلول‌ها در بافت خارج می‌شود و روی سطح پوست، به فراوانی موجود است.

استخراج RNA کل

[۱۷] Ribonucleic Acid

ابتدا یک میلی‌لیتر از محلول RNX+ به میکروتیوب حاوی سلول‌ها اضافه شد. ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به محلول فوق اضافه شده و به مدت ۱۵ دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، ۳ فاز حاصل شد. قسمت بالایی حاوی RNA، فاز میانی حاوی DNA و فاز پائینی حاوی پروتئین بود. جداسازی فاز رویی با دقت انجام شد تا آلودگی با پروتئین‌ها و فاز DNA صورت نگیرد. فاز آبی جدا و به میکروتیوب دیگری انتقال یافت و با حجم برابر خود از ایزوپروپانول مخلوط شد. میکروتیوب در دور ۱۲۰۰۰ rpm و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز بالایی دور ریخته و ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد اضافه شد. دوباره پس از سانتریفیوژ، محلول رویی دور ریخته و پس از رسوب، ۲۴ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC (۰/۰۱ درصد) و ۱ میکرولیتر EDTA اضافه شد، سپس به مدت کوتاهی سانتریفیوژ و در نهایت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شده و پس از قرارگرفتن در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه OD آن خوانده شد.

روش کار ساخت cDNA

به لوله واکنش ۱ میکروگرم RNA اضافه شد. ۱ میکرولیتر از پرایمر Oligo (dT) به آن اضافه و حجم نهایی توسط آب مقطر عاری از RNase به ۱۲ µl رسید، سپس محصول به مدت ۳ تا ۵ ثانیه vortex و به مدت کوتاهی Spin شد. بلافاصله لوله‌ها به ظرفی منتقل و ۴ میکرولیتر بافر 5X و ۲ میکرولیتر dNTP و ۱ میکرولیتر RNasin داخل لوله اضافه شد. محلول واکنش پس از Spin کوتاه به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه و محلول واکنش ۱ µl آنزیم RT[۱۸] به آن اضافه شد. به منظور مهار آنزیم RT، محلول واکنش ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس بلافاصله میکروتیوب‌ها را روی یخ قرار داده و در ۲۰- درجه ذخیره شدند.

.سلول‌ها در همه گروه‌ها از نظر میزان بیان ژن‌های CX3CL1، TGF-β و Nrf2 نسبت به ژن مرجع GAPDH مورد بررسی قرار گرفت. میزان بیان هر ژن هدف نسبت به ژن رفرنس با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه گردید. داده‌های حاصل از این تکنیک به‌صورت نمودارهای کمی ارائه شد.

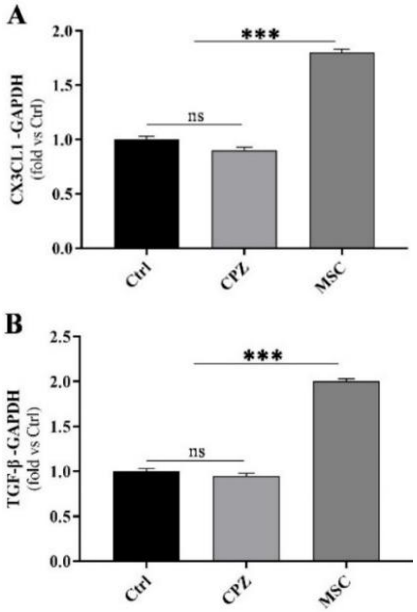
مشخصات ابزار جمع‌آوری اطلاعات و نحوه جمع‌آوری آن

داده‌های حاصل از این مطالعه با استفاده از میکروسکوپ نوری جمع‌آوری گردید. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS[۱۹] نسخه ۲۰ و آزمون واریانس یکطرفه (ANOVA) استفاده شد.

یافته‌ها

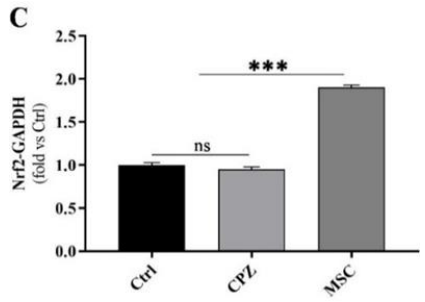
تأثیر پیوند سلول‌های بنیادی بر ژن‌های CX3CL1، TGF-β و Nrf2 با استفاده از روشReal time PCR در جسم پینه‌ای در مدل دمیلینه مزمن کوپریزون

در این مطالعه آنالیز qRT-PCR برای ژن‌های CX3CL1، TGF-β و Nrf2 نشان داد که سطح بیان این ژن‌ها در گروه دریافت‌کننده سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان به‌صورت معنی‌داری ($P<0.001$) نسبت به سایر گروه‌ها افزایش یافته بود (شکل ۱). این نتایج نشان می‌دهند که سلول‌های بنیادی، ترشح فاکتورهای تغذیه‌ای از جمله CX3CL1 و TGF-β و همچنین ژن Nrf2 را به عنوان یک ژن تعدیل‌کننده سیستم آنتی‌اکسیدانی را افزایش می‌دهند.



[۱۸] Reverse Transcriptase

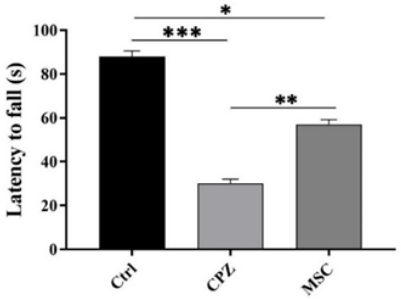
[۱۹] Statistical package for social science



شکل ۱. بررسی تأثیر تزریق سلول بنیادی بر میزان بیان ژن‌ها از جمله CX3CL1، TGF-β و Nrf2 در مدل دمیلینه مزمن کوپریزون در جسم پینه‌ای به روش qRT-PCR. نمودارها، بیان ژن‌های CX3CL1 و TGF-β را به عنوان تروفیک فاکتور و ژن Nrf2 را به عنوان یک ژن ضد التهابی و کاهنده استرس اکسیداتیو در گروه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهند. نتایج نشان داد که میزان این ژن‌ها در گروه کوپریزون به صورت معنی‌داری کاهش یافت و پیوند سلولی سبب افزایش بیان این ژن‌ها گردید. از ژن GAPDH به‌عنوان کنترل داخلی برای نرمالایز کردن استفاده شده است. داده‌ها به‌صورت mean±SEM بیان شده است. معنی‌داری با P<0.001*** نشان داده شده است.

بررسی بهبود عملکرد رفتاری و تعادل با استفاده از روش Rotarod

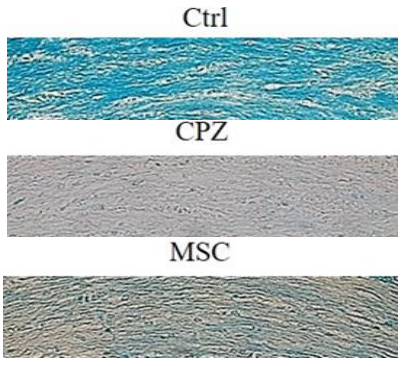
در این مطالعه، هماهنگی حرکتی و تعادل با استفاده از تست روتارود در موش‌هایی که به مدت ۱۲ هفته با کوپریزون تغذیه شده و با سلول‌های بنیادی درمان شده بودند، بررسی شد. نتایج نشان داد که درمان با کوپریزون به طور قابل توجهی میانگین زمان دویدن در تست روتارود را در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد ($P \leq 0.001$). این نتیجه نشان داد که مسمومیت با کوپریزون می‌تواند هماهنگی حرکتی را مختل کند. پس از درمان حیوانات با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، آن‌ها در مقایسه با گروه CPZ، مدت زمان طولانی‌تری را روی دستگاه روتارود حرکت کردند ($P < 0.01$). این نتایج نشان می‌دهد که سلول درمانی در موش‌های مبتلا به MS با استفاده از مدل کوپریزون می‌تواند نقایص حرکتی و تعادل را بهبود دهد (شکل ۲).



شکل ۲. بررسی تأثیر تزریق سلول بنیادی بر میزان تعادل و هماهنگی حرکتی در مدل دمیلینه مزمن کوپریزون در جسم پینه¬ای به روش روتارود. ارزیابی‌های مربوط به نقایص رفتاری در موش‌ها پس از قرار گرفتن در معرض کوپریزون و درمان با سلول های بنیادی مزانشیمی نشان داد که مسمومیت با کوپریزون باعث اختلال در هماهنگی حرکتی شد، که پس از درمان حیوانات با سلول های بنیادی، این نقایص تاحدودی بهبود یافت. معنی داری با ***P<0.001، **P < 0.01 و *P < 0.05 نشان داده شده است.

تأثیر پیوند سلول‌های بنیادی بر میزان میلین‌سازی مجدد در جسم پینه‌ای در مدل دمیلینه مزمن کوپریزون با استفاده از رنگ آمیزی اختصاصی LFB.

برای تعیین میزان میلین‌زدایی و میلین سازی مجدد در جسم پینه ای در گروه‌های مختلف رنگ‌آمیزی LFB انجام شد. این رنگ آمیزی اختصاصی، مختص بررسی میلین بوده و نواحی میلیندار، رنگ آبی به خود گرفته و نواحی فاقد میلین، سفید رنگ دیده می شوند. همان طور که در تصویر نشان داده شده است در گروهCPZ ، تجویز کوپریزون در غذای موش ها به مدت ۱۲ هفته، منجر به دمیلینه شدن شدید و قابل توجه در جسم پینه ای شده است. در گروه پیوند سلول، دانسیته رنگ آبی نسبت به گروه CPZ افزایش یافته است (شکل ۳). میزان نواحی میلینه در گروه دریافت کننده کوپریزون کمتر از گروه کنترل بوده است. در گروه دریافت کننده سلول میزان نواحی آبی نشان دهنده میلین سازی مجدد می باشد که نسبت به گروه CPZ به صورت قابل توجهی افزایش یافته است (شکل ۳). نتایج حاصل بیان می کند که تجویز کوپریزون به مدت ۱۲ هفته سبب دمیلینه شدن مزمن در ناحیه جسم پینه ای می گردد و پیوند سلول های بنیادی مزانشیمی سبب میلین سازی مجدد در این ناحیه می شود.



شکل ۳. بررسی تأثیر پیوند سلول‌های بنیادی بر بهبود آسیب

میلین در مدل دمیلینه مزمن با کوپریزون در جسم پینه‌ای. تصاویر، رنگ‌آمیزی غلاف میلین با استفاده از LFB در گروه‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد که در جسم پینه‌ای گروه CPZ میزان میلین کمتری نسبت به گروه کنترل وجود دارد، درحالی‌که در گروه دریافت‌کننده سلول مناطق میلینه (آبی) بیشتری مشاهده می‌شود.

بحث

در مطالعه حاضر ما به بررسی تاثیر پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان بر میلین‌سازی مجدد در مدل دمیلیناسیون کوپریزون پرداختیم. در ابتدای این مطالعه به منظور القاء مدل دمیلینه مزمن، سمیت الیگودندروسیت‌ها و بررسی اثرات درمانی MSC از تجویز خوراکی کوپریزون به مدت ۱۲ هفته استفاده شد. مدل‌های آزمایشگاهی یک ابزار ارزشمند برای ارزیابی مکانیسم‌های سلولی و مولکولی هستند که در روند از بین‌رفتن میلین و میلین‌سازی مجدد درگیر می‌شوند. در فرآیند دمیلینه‌شدن القاء شده توسط کوپریزون، با سمیت الیگودندروسیت‌ها، میلین تخریب می‌شود (۲۱). از مزایای مدل کوپریزون این است که یک مدل آزمایشی مورد قبول برای از بین رفتن میلین جهت بررسی آسیب‌شناسی مرتبط با بیماری MS است که از ویژگی‌های آن ایجاد آسیب در الیگودندروسیت‌ها (۲۲, ۲۳) و بررسی فرآیند میلین‌سازی مجدد و سهولت استفاده از آن در رژیم غذایی برای ایجاد آسیب می‌باشد، همچنین سد خونی-مغزی دست‌نخورده باقی می‌ماند (۲۴-۲۶).

در این مطالعه، از تزریق داخل بطنی سلول‌های بنیادی استفاده شد. زیرا در این روش، نسبت به تزریق داخل وریدی به تعداد سلول کمتری نیاز است و مانند روش‌های سیستمیک، سلول‌ها در اندام‌های دیگری مانند ریه به دام نمی‌افتند، از این‌رو میزان زیادی سلول به ناحیه دچار جراحت و دمیلینه وارد می‌شوند. مشابه با مطالعه ما Nessler و همکاران در سال ۲۰۱۳ پتانسیل MSC پیوندی را به مهاجرت و لانه‌گزینی ثابت کردند و گزارش کردند که پیوند این سلول‌ها سبب کاهش التهاب می‌شود (۲۷). تحقیقاتی وجود دارد که به اثرات درمانی MSC در بیماری‌های تخریب-کننده عصبی مختلف شامل اختلالات دمیلینه‌کننده اشاره می‌کند (۲۸-۳۰).

در مدل دمیلینه شدن القایی با کوپریزون، افزایش آستروسیت‌ها، فعال‌شدن سلول‌های میکروگلی و آسیب‌های سیستم عصبی اتفاق می‌افتد و تصور بر این است که این‌ها با ترشح فاکتورهای تسهیل‌کننده التهاب، سبب ایجاد التهاب CNS در بیماری MS می‌شوند و از طرف دیگر تعادل بین تولید استرس اکسیداتیو و آنتی‌اکسیدان هم از بین می-رود (۳۱). همچنین مطالعه دیگری ثابت کرد که افزایش شدید آستروسیت‌ها و میکروگلی‌ها در مدل کوپریزون همراه با بیان سیتوکین‌های‌التهابی مانند مولکول‌های تسهیل‌کننده التهاب از قبیل IL-1β، TNF-α، اینترفرون گاما و اکسیدنیتریک مشاهده شد (۳۲).

در مطالعه حاضر، میزان بیان ژن‌ها از جمله CX3CL1، TGF-β و Nrf2 با استفاده از Real time PCR بررسی شد. نتایج حاصل از بخش مولکولی نشان داد که میزان بیان ژن CX3CL1 و TGF-β به صورت معنی‌داری در گروه کوپریزون کاهش یافته بود و در گروه پیوند سلول به صورت معنی‌داری افزایش یافت. از آنجایی که این دو ژن به عنوان تروفیک فاکتور و ضد التهابی هستند، می‌توان نتیجه گرفت که سلول‌های بنیادی منبع اصلی تروفیک فاکتورها و کاهنده التهاب هستند. از طرف دیگر Nrf2 به عنوان یکی از فاکتورهای رونویسی، یک تنظیم کننده ضروری در مکانیسم دفاعی در مقابل استرس اکسیداتیو است و میزان بیان این ژن در گروه کوپریزون به صورت معنی‌داری کاهش یافت که نشان‌دهنده فعال شدن استرس اکسیداتیو است. میزان بیان ژن Nrf2 در گروه سلول بنیادی افزایش معنی‌داری داشت که بیان‌کننده توانایی این سلول‌ها در برقراری تعادل بین استرس اکسیداتیو تولید شده در این بیماری و سیستم آنتی‌اکسیدانی می‌باشد.

هم‌سو با یافته‌های ما، Liu و همکارانش نشان دادند که سلول‌های میکروگلی چندین عامل سمیت سلولی ROS[۲۰]

[۲۰] Reactive Oxygen Species

تولید می‌کنند که بصورت مستقیم یا غیر مستقیم در آسیب به الیگودندروسیت‌ها و از بین رفتن میلین شرکت می‌کنند. زیرا اولا، گزارش شده است که ROS می‌تواند مستقیما آپوپتوز الیگودندروسیت را القا کرده و منجر به از بین رفتن میلین در بیماری MS شود. ثانیا، ROS مستقیما روی ترکیبات چربی و پروتئین میلین از طریق پراکسیداسیون تأثیر گذاشته و باعث از بین رفتن میلین از طریق تولید ماتریکس متالوپروتئیناز گردد. ثالثا، سلول‌های پیش‌ساز الیگودندروسیت در مقایسه با الیگودندروسیت‌های بالغ با شدت بیشتری به استرس اکسیداتیو حساس می‌باشند و بنابراین میلین سازی مجدد و ترمیم CNS اتفاق نمی‌افتد (۳۳).

هم‌راستا با یافته‌های ما، Upadhayay S و همکاران در سال ۲۰۲۱ به بررسی هدف قرار دادن مسیر سیگنالینگ آنتی اکسیدانی Nrf2/HO-1 در پیشرفت بیماری MS و تأثیر بر اختلالات عصبی آن پرداختند. آن‌ها بیان کردند که سیگنالینگ آنتی اکسیدانی Nrf2/HO-1 برای تکثیر سلول‌های عصبی، بقا و نوروژنز ضروری است. سیگنالینگ آنتی اکسیدانی Nrf2/HO-1 در MS درگیر می‌شود. اختلال در تنظیم Nrf2/HO-1 در بیماری‌های نورودژنراتیو مختلف دیده می‌شود. کاهش مسیر سیگنالینگ Nrf2/HO-1 مرتبط با ایجاد التهاب عصبی، اختلال در تنظیم ایمنی، از دست دادن الیگودندروسیت و دمیلینه‌شدن می‌باشد. فعال‌کننده‌های بالقوه Nrf2/HO-1 می‌توانند سبب محافظت عصبی در MS و کاهش عوارض عصبی مرتبط با آن را فراهم کنند (۳۴).

بنابراین ما می‌توانیم از مطالعه حاضر نتیجه بگیریم که سلول‌های بنیادی با ترشح فاکتورهای تروفیک و Nrf2 می‌توانند بیان گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن را کاهش داده و از یک طرف آسیب به الیگودندروسیت‌های بالغ را کاهش دهند و از طرف دیگر سبب مهاجرت و تمایز سلول‌های پیش‌ساز و اجدادی به ناحیه آسیب دیده گردند که همراه با تحریک میلین‌سازی می‌باشد و در نهایت منجر به کاهش جراحات در بیماری‌های تخریب‌کننده عصبی می‌گردند.

مطالعه ما نشان داد که سلول درمانی سبب مهار استرس اکسیداتیو و التهاب عصبی از طریق ژن‌های CX3CL1، TGF-β و Nrf2 می‌گردد که همراه با بهبود در میلین‌سازی مجدد و ترمیم آکسون است. هم‌راستا با این داده‌ها گزارشی وجود دارد که اثرات مثبت سلول‌درمانی در میلین‌سازی مجدد و کاهش آسیب آکسونی را بیان می‌کنند (۱۰). میزان میلین‌سازی مجدد با استفاده از رنگ‌آمیزی اختصاصی میلین یا LFB مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج ما نشان داد که میزان میلین‌سازی مجدد در تصاویر LFB در گروه پیوند سلولی بیشتر از گروه کوپریزون بود. این مطلب بیان‌گر این موضوع است که تزریق سلول با کاهش محیط التهابی و تولید فاکتورهای تروفیک و ROS سبب ترمیم میلین و حفظ ساختمان آکسون می‌شوند. مشابه با نتایج مطالعه ما Hofer و همکارانش در سال ۲۰۱۶ در مطالعه خود نشان دادند که سلول‌های بنیادی، می‌توانند سلول‌های پیش‌ساز مجاور را تحریک کند که ممکن است به OPC تمایز یابند و سلول‌های جدید تولید شده به نواحی دمیلینه مهاجرت کرده و سبب میلین‌سازی مجدد شود (۳۵).

Lim و همکاران در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۸ انجام دادند گزارش کردند که عناصر پاتوژن شامل کیناز تنظیم‌کننده خارج‌سلولی (ERK) و کیناز انتهایی N (GNK) می‌توانند NF-kB و MAPKS را فعال کنند. این پروتئین‌ها می‌توانند تولید آنزیم‌های تسهیل‌کننده التهاب از قبیل iNOS، COX-2 و TNF-α را تعدیل کنند. این فاکتورهای تسهیل‌کننده التهاب با فعالیت‌های توکسیک و اختلال در ریزمحیط‌هایی که باعث یکپارچگی فعالیت‌های سلول می‌شوند، باعث به‌هم زدن هومئوستاز بدن و تشدید علائم بیماری می‌شوند (۳۶). مطابق با مطالعه ما Papazian و همکارانش نشان دادند که BMSC فاکتورهایی را آزاد می‌کنند که نورن‌ها را در مقابل سمیت گلوتامات محافظت می‌کنند. سمیت گلوتامات، آسیب نورونی و الیگودندروسیت‌ها را در شرایط تخریب عصبی از قبیل MS و EAE ایجاد می‌کند. بنابراین یافته‌های آن‌ها نشان‌دهنده تأثیرات حفاظت عصبی MSC است (۳۷).

محدودیت‌های مطالعه، شامل تاخیر یا عدم دسترسی به برخی کیت‌ها و مواد آزمایشگاهی بود.

نتیجه گیری

در نهایت یافته‌های ما نشان داد که پیوند داخل بطنی سلول-های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان می‌تواند روش مفیدی برای بهبود دمیلینه‌شدن مزمن در بیماری‌های تخریب‌کننده عصبی از قبیل MS باشد و با فهم دقیق مکانیسم‌های درگیر در فعال‌شدن و تکثیر الیگودندروسیت-های پیش‌ساز و بالغ توسط فاکتورهای تروفیک مترشحه از سلول‌ها می‌توان به نتایج بهتری دست یافت. زیرا از یک طرف این سلول‌ها با استفاده از تروفیک فاکتورها سبب القای میلین‌سازی مجدد می‌گردند و از طرف دیگر سبب کاهش ژن‌های التهابی و استرس اکسیداتیو از طریق مسیر Nrf2 در این بیماری می‌شوند. بنابراین سلول درمانی می‌تواند به‌عنوان یک روش مناسب برای تقویت میلین‌سازی و کاهش التهاب از طریق تعادل در سیستم آنتی‌اکسیدانی و استرس اکسیداتیو در بیماری‌هایی از قبیل MS باشد.

تشکر و قدردانی

از ریاست و معاونت محترم پژوهشی دانشکده علوم پزشکی ساوه به‌دلیل حمایت مادی و معنوی در اجرای این پژوهش صمیمانه قدردانی و تشکر می‌نمایم.

ملاحظات اخلاقی

تمامی داده‌ها و مطالب موجود در این مقاله مطابق با قوانین کمیته اخلاق دانشکده علوم پزشکی ساوه نوشته شده است و دارای کد اخلاق (IR.SAVEHUMS.REC.1403.014) می‌باشد.

کداخلاق

(IR.SAVEHUMS.REC.1403.014)

تضاد منافع

بین نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافعی وجود ندارد.

References:

1. Rolak LA. Multiple sclerosis: it's not the disease you thought it was. Clinical Medicine & Research. 2003;1(1):57-60.
2. McQualter JL, Bernard CC. Multiple sclerosis: a battle between destruction and repair. Journal of neurochemistry. 2007;100(2):295-306.
3. Stüve O. Knowns and unknowns in the future of multiple sclerosis treatment. Journal of the neurological sciences. 2009;287:S30-S6.
4. Joannides A, Chandran S. Human embryonic stem cells: an experimental and therapeutic resource for neurological disease. Journal of the neurological sciences. 2008;265(1-2):84-8.
5. Dulamea AO. The contribution of oligodendrocytes and oligodendrocyte progenitor cells to central nervous system repair in multiple sclerosis: perspectives for remyelination therapeutic strategies. Neural regeneration research. 2017;12(12):1939.
6. Rossi S, Furlan R, De Chiara V, Motta C, Studer V, Mori F, et al. Interleukin-1β causes synaptic hyperexcitability in multiple sclerosis. Annals of neurology. 2012;71(1):76-83.
7. Barati S, Yadegari A, Shahmohammadi M, Azami F, Tahmasebi F, Rouhani MR, et al. Curcumin as a promising therapeutic agent for diabetic neuropathy: From molecular mechanisms to functional recovery. Diabetology & Metabolic Syndrome. 2025;17(1):314.
8. Zhao C, Gillette DD, Li X, Zhang Z, Wen H. Nuclear factor E2-related factor-2 (Nrf2) is required for NLRP3 and AIM2 inflammasome activation. Journal of Biological Chemistry. 2014;289(24):17020-9.
9. Barati S, Kashani IR, Tahmasebi F, Mehrabi S, Joghataei MT. Effect of mesenchymal stem cells on glial cells population in cuprizone induced demyelination model. Neuropeptides. 2019;75:75-84.
10. Tahmasebi F, Asl ER, Vahidinia Z, Faghihi F, Barati S. The comparative effects of bone marrow mesenchymal stem cells and supernatant transplantation on demyelination and inflammation in cuprizone model. Molecular Biology Reports. 2024;51(1):674.
11. Zhang X. Stem cell-derived exosomes modulate the inflammatory microenvironment and enhance regenerative capacity of

oligodendrocytes. Chinese Journal of Tissue Engineering Research. 2026;30(19):5007.
12. Salvetti M, Landsman D, Schwarz-Lam P, Comi G, Thompson AJ, Fox RJ. Progressive MS: from pathophysiology to drug discovery. Multiple Sclerosis Journal. 2015;21(11):1376-84.
13. Picard-Riera N, Decker L, Delarasse C, Goude K, Nait-Oumesmar B, Liblau R, et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis mobilizes neural progenitors from the subventricular zone to undergo oligodendrogenesis in adult mice. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2002;99(20):13211-6.
14. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. Nature reviews immunology. 2008;8(9):726-36.
15. Koh S-H, Young Noh M, Won Cho G, Suk Kim K, Hyun Kim S. Erythropoietin increases the motility of human bone marrow-multipotent stromal cells (hBM-MSCs) and enhances the production of neurotrophic factors from hBM-MSCs. Stem cells and development. 2009;18(3):411-22.
16. Baghaei K, Varjavand P, Malmir A, Mazhari S, Tokhanbigli S, Hatami B, et al. Mesenchymal stem cells foster Ly-6C low macrophages polarization through the CX3CL1 pathway to ameliorate liver fibrosis. Cytotherapy. 2020;22(5):S67.
17. Khassafi N, Tameh AA, Mirzaei H, Rafat A, Barati S, Khassafi N, et al. Crosstalk between Nrf2 signaling pathway and inflammation in ischemic stroke: Mechanisms of action and therapeutic implications. Experimental Neurology. 2023:114655.
18. Brandes MS, Gray NE. NRF2 as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. ASN neuro. 2020;12:1759091419899782.
19. Nellessen A, Nyamoya S, Zendedel A, Slowik A, Wruck C, Beyer C, et al. Nrf2 deficiency increases oligodendrocyte loss, demyelination, neuroinflammation and axonal damage in an MS animal model. Metabolic Brain Disease. 2020;35:353-62.
20. Tahmasebi F, Asl ER, Faghihi F, Bolandi N, Barati S. Synergistic effects of olfactory ecto-mesenchymal stem cell supernatant and ellagic acid on demyelination and glial modulation in a chronic multiple sclerosis model. Cellular and Molecular Neurobiology. 2025;45(1):40.
21. Martínez-Pinilla E, Calatayud-Morán JM, Menéndez-Pérez C, Villar-Conde S, Rivas-Santisteban R, Peláez R, et al. Neuroprotective role of cannabinoid CB1 and GPR55 receptors in a cell model of multiple sclerosis. Molecular Neurobiology. 2026;63(1):482.
22. Kipp M, Clarner T, Dang J, Copray S, Beyer CJAn. The cuprizone animal model: new insights into an old story. 2009;118(6):723-36.
23. Torkildsen Ø, Brunborg L, Myhr KM, Bø LJANS. The cuprizone model for demyelination. 2008;117:72-6.
24. Silvestroff L, Bartucci S, Soto E, Gallo V, Pasquini J, Franco PJJoCN. Cuprizone-induced demyelination in CNP:: GFP transgenic mice. 2010;518(12):2261-83.
25. Gudi V, Moharregh-Khiabani D, Skripuletz T, Koutsoudaki PN, Kotsiari A, Skuljec J, et al. Regional differences between grey and white matter in cuprizone induced demyelination. 2009;1283:127-38.
26. Groebe A, Clarner T, Baumgartner W, Dang J, Beyer C, Kipp MJTC. Cuprizone treatment induces distinct demyelination, astrocytosis, and microglia cell invasion or proliferation in the mouse cerebellum. 2009;8(3):163-74.
27. Nessler J, Bénardais K, Gudi V, Hoffmann A, Tejedor LS, Janßen S, et al. Effects of murine and human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on cuprizone induced demyelination. PLoS One. 2013;8(7):e69795.
28. Volkman R, Offen D. Concise review: mesenchymal stem cells in neurodegenerative diseases. Stem cells. 2017;35(8):1867-80.
29. Kemp K, Redondo J, Mallam E, Scolding N, Wilkins A. The use of mesenchymal stem cells for treating neurodegenerative diseases. Stem Cells and Cancer Stem Cells, Volume 13: Springer; 2015. p. 3-20.
30. Glenn JD, Smith MD, Kirby LA, Baxi EG, Whartenby KA. Disparate effects of mesenchymal stem cells in experimental autoimmune encephalomyelitis and cuprizone-induced demyelination. PLoS One. 2015;10(9):e0139008.
31. Gudi V, Gingele S, Skripuletz T, Stangel M. Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned. Frontiers in cellular neuroscience. 2014;8:73.

32. Voß EV, Škuljec J, Gudi V, Skripuletz T, Pul R, Trebst C, et al. Characterisation of microglia during de-and remyelination: can they create a repair promoting environment? Neurobiology of disease. 2012;45(1):519-28.
33. Liu J, Tian D, Murugan M, Eyo UB, Dreyfus CF, Wang W, et al. Microglial Hv1 proton channel promotes cuprizone-induced demyelination through oxidative damage. Journal of neurochemistry. 2015;135(2):347-56.
34. Upadhayay S, Mehan S. Targeting Nrf2/HO-1 anti-oxidant signaling pathway in the progression of multiple sclerosis and influences on neurological dysfunctions. Brain Disorders. 2021;3:100019.
35. Hofer HR, Tuan RS. Secreted trophic factors of mesenchymal stem cells support neurovascular and musculoskeletal therapies. Stem cell research & therapy. 2016;7(1):131.
36. Lim H-S, Kim YJ, Kim B-Y, Park G, Jeong S-J. The Anti-neuroinflammatory Activity of Tectorigenin Pretreatment via Downregulated NF-κB and ERK/JNK Pathways in BV-2 Microglial and Microglia Inactivation in Mice With Lipopolysaccharide. Frontiers in pharmacology. 2018;9.
37. Papazian I, Kyrargyri V, Evangelidou M, Voulgari-Kokota A, Probert L. Mesenchymal Stem Cell Protection of Neurons against Glutamate Excitotoxicity Involves Reduction of NMDA-Triggered Calcium Responses and Surface GluR1, and Is Partly Mediated by TNF. International journal of molecular sciences. 2018;19(3):651.

The effect of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation on Nrf2 deficiency and remyelination in a cuprizone-induced demyelination model

Fatemeh Tahmasebi, Shirin Barati[1*]

1.Department of Anatomy, Saveh University of Medical Sciences, Saveh, Iran.

Received :26/04/2026 E-Published: 05/13/2026

ABSTRACT:

Introduction: Multiple sclerosis is a chronic inflammatory demyelinating disease of the central nervous system accompanied by autoimmune manifestations. Transplanted cells differentiate into various types of neural tissue cells, thereby restoring the functional network and acting as a source of neurotrophic factors to support the remaining cells in the tissue. This study emphasis's the importance of oligodendrocytes in inhibiting or reducing demyelination in an experimental MS model and investigates the effect of transplanted bone marrow mesenchymal stem cells on oligodendrocyte lineages by examining the Nrf2 mechanism.

Methods: This study used 8-week-old male C57BL/6 mice. To induce the chronic demyelination model of MS, the mice received a diet containing 0.2% cuprizone per kilogram of food for 12 weeks. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplants were then injected into the right lateral ventricle of the mice via intraventricular injection. The rotarod behavioral test was used to assess behavioral impairment and recovery rate. Two weeks after cell injection, the rate of remyelination and axon repair was studied using Luxol Fast Blue (LFB) staining. The expression levels of the CX3CL1, TGF-β and Nrf2 genes were evaluated using real-time PCR. Finally, statistical analyses were performed using SPSS software and a t-test and one-way ANOVA. Mean ± SEM was used to describe the data and $P < 0.05$ was considered significant.

Results: In this study, we found that, compared to other groups, mesenchymal stem cell transplantation increased the expression of the TGF-β, CX3CL1 and Nrf2 genes, as well as improving function. Furthermore, cell transplantation was found to significantly improve myelination and axonal repair, as assessed by LFB images.

Conclusion: The findings of this study finally showed that the intraventricular injection of mesenchymal stem cells can be an effective treatment for chronic demyelination in neurodegenerative diseases such as MS. This is because, on the one hand, cell therapy reduces oxidative stress and inflammation by using factors secreted by cells in the culture medium and, on the other hand, it increases the rate of myelination and axonal repair. Therefore, cell transplantation can be considered a suitable method for enhancing myelination and reducing inflammation in diseases such as MS.

Keyword :Stem cell, cuprizone model, Nrf2, MS.

[*]**Corresponding Author: Shirin Barati, E-mail: baratishirin@yahoo.com**

CITATIO: Barati S, Tahmasbi F. Evaluation of the effect of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation on Nrf2 deficiency and remyelination in a cuprizone-induced demyelination model. *Journal of Saveh University of Medical Sciences*, 2026; 1(4): 1-13. doi: 10.22034/sumsj.2026.579617.1085