● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیست‌وسوم، شمارهٔ ۴، ص ۴۳۵-۴۲۱، ۱۳۹۵

مقالهٔ پژوهشی

بهبود ضایعه نخاعی موش صحرایی با استفاده از پیوند سلول‌های بنیادی عصبی مشتق از مغز استخوان

حجت‌اله عباس‌زاده[۱]، تقی طریحی*[۲]، مجید صادقی‌زاده [۳]، علیرضا دلشاد[۴]، طاهر طاهری[۵]، علی‌اصغر پیوندی[۶]

خلاصه

مقدمه: سلول درمانی از روش‌های جدید درمانی است که می‌تواند در بهبود ضایعات نخاعی مؤثر باشد. در این پژوهش از سلول‌های بنیادی عصبی در درمان ضایعه نخاعی ایجاد شده با روش له‌شدگی (contusive) در موش صحرایی آزمایشگاهی استفاده شد.

روش: سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان (BMSCs) از استخوان موش‌های صحرایی استخراج شد. پس از سه مرحله پاساژ این سلول‌ها، ابتدا به نوروسفر و سپس به سلول‌های بنیادی عصبی تمایز داده شد. در مرحله in vivo تعداد ۴۳ سر موش صحرایی ماده بالغ به ۵ گروه تقسیم شدند. در گروه اول (Sham) فقط عمل جراحی لامینکتومی انجام شد، در حالی که در بقیه گروه‌ها پس از لامینکتومی، له‌شدگی در نخاع ایجاد شد. در گروه دوم پس از له‌شدگی هیچ درمانی صورت نگرفت. در بقیه گروه‌ها، ۷ روز پس از ضایعه تزریق صورت گرفت، به این ترتیب که در گروه سوم سرم فیزیولوژی، در گروه چهارم سلول‌های BMSCs تمایز نیافته و در گروه پنجم سلول‌های بنیادی عصبی (NSCs) همه به شکل داخل نخاعی تزریق شد. در همه‌ی گروه‌ها یک روز قبل از ضایعه تا ۱۲ هفته بعد، بهبودی حرکتی حیوان به‌وسیله تست Basso, Beattie, and Bresnahan (BBB) بررسی شد.

یافته‌ها: در این تحقیق درصد قابل توجهی از سلول‌های کشت داده شده پس از پاساژ چهارم سلول‌های بنیادی مغز استخوان بودند. این سلول‌ها سپس به نوروسفر و سلول‌های بنیادی عصبی تبدیل شدند. در بررسی تست رفتاری، گروه‌های تجربی سلول درمانی بهبودی حرکتی معنی‌داری را نسبت به گروه‌های کنترل داشتند. این بهبودی در هفته‌های دوم تا چهارم مشخص‌تر بود اما در فاصله هفته‌های چهارم تا دوازدهم میزان بهبودی کندتر گردید.

نتیجه‌گیری: پیوند سلول‌های بنیادی عصبی باعث بهبود نسبی حرکتی در موش صحرایی دارای ضایعه نخاعی با روش له‌شدگی می‌شود.

کلمات کلیدی: سلول‌های استرومایی مغز استخوان، تمایز، سلول‌های بنیادی عصبی ، ضایعه طناب نخاعی

۱- استادیار، مرکز تحقیقات اختلالات شنوایی و گروه بیولوژی و علوم تشریح دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران ۲- استاد، گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران و مرکز علوم اعصاب شفا، بیمارستان خاتم الانبیا، تهران، ایران ۳- استاد، گروه ژنتیک دانشکده علوم دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران ۴- دانشیار، گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران، ایران ۵- مرکز علوم اعصاب شفا، بیمارستان خاتم الانبیا، تهران، ایران ۶- استاد، مرکز تحقیقات اختلالات شنوایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

* نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک: ttiraihi@yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۴/۱۰ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۴/۱۰/۲۴ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۱۱/۳

مقدمه

ضایعات نخاعی معمولا در اثر آسیب شدید مکانیکی به نخاع ایجاد می‌شوند و باعث ایجاد مشکلات قلبی- عروقی، ترومبوزهای وریدی، استئوپروزیس، زخم‌های فشاری ودردهای نوروپاتیک می‌شوند. ضایعات نخاعی سبب شکسته شدن سد خونی مغزی و رهاسازی فاکتورهای التهابی و فعال شدن سلول‌های گلیالی شده که نهایتاً سبب نکروز بافت نخاعی می‌شوند(۱). بعد از بروز ضایعه، آبشاری از سیگنالینگ اتفاق می‌افتد که سبب فعال‌سازی دوره‌ای فاکتورهای التهابی سیتوکینی و شیموکینی می‌شود که آپوپتوزیس، از بین رفتن میلین، از بین رفتن اکسون‌ها و دژنراسیون را به‌همراه دارد. فرایند التهاب ابتدا با هجوم سلول‌های ایمنی، لنفوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها به محل ضایعه آغاز می‌شود که این سلول‌ها بقایای سلولی را هضم و سلول‌های مرده را از بین می‌برند (۲). این سلول‌ها با ترشح ماتریکیس متالوپروتئیناز به محل ضایعه سبب از بین رفتن بافت نخاع می‌شوند (۳). همچنین ماکروفاژها با فاگوسیتوزیس و آزادسازی سیتوکین‌های حفاظتی همانند FGF, NGF, NT3 سبب رژنراسیون نورونی و ترمیم بافت نخاع می‌شوند (۴). وقتی ضایعه نخاعی اتفاق می‌افتد سلول‌های شبه الیگودندروسیت سریع‌تر از تمام سلول‌ها مورد هدف واقع شده، مورد آپوپتوزیس و نکروزیس قرار می‌گیرند و سبب از بین رفتن میلین در راه‌های صعودی و نزولی اکسونی می‌شود. مکانیسم دقیق آپوپتوزیس الیگودندروسیت هنوز به‌طور کامل شناخته نشده است. به‌نظر می‌رسد گیرنده FAS که بر سطح الیگودندروسیت قرار دارد توسط لیگاند FAS توسط سلول میکروگلیالی فعال شده و سبب راه انداختن آبشار آپوپتوزی می‌شود (۵).

در روش سلول درمانی از منابع سلولی مختلفی برای میلین‌سازی از جمله سلول‌های بنیادی مزانشیمی، عصبی و الیگودندروسیت‌ها استفاده می‌شود و روش سلول درمانی برای یک بیماری ویژه، به میزان زیادی به پیچیدگی آن ناهنجاری بستگی دارد. امروزه سلول درمانی به‌عنوان یک راهکار مهم در پزشکی ترمیمی مطرح می‌باشد. در مهندسی بافت، سلول‌ها به‌طور قطع مهم‌ترین بخش از بازسازی و ترمیم بافت بیمار را به عهده دارند. فراموش نکنیم که جنبه‌ی دیگر مهندسی بافت ایجاد بستر موضعی مناسب برای سلول‌های ویژه‌ای است که باید پیوند شوند (۶).

یکی دیگر از سلول‌های بنیادی بالغ، سلول‌های بنیادی عصبی هستند. سلول‌های بنیادی عصبی عمدتاً در نواحی اپاندیمال بطن‌های مغزی و کانال مرکزی نخاع یافت می‌شوند (۷). این سلول‌های بنیادی عصبی Nestin را بیان می‌کنند که یک مارکر تکوینی سلول‌های نورواپیتلیالی است (۸).

اما عامل تعیین‌کننده‌ی دیگر در اینجا نیاز به منابع سلولی قابل اعتماد، از سلول‌های چند توان است که می‌توانند با نرخ مرگ محدود به‌دست آورده شوند و علاوه بر آن به‌طور دقیق قابل کنترل باشند و نیز در بافت هدف به‌خوبی جای‌گیری شوند. سلول‌های بنیادی بالغین برای این کار مناسب به‌نظر می‌رسند. با بررسی منابع سلولی مختلف برای پیوند زدن آشکار شده که پیوند زدن سلول‌های بنیادی جنینی روش مناسب و استاندارد برای معالجه‌ی بیماری‌های نورودژنراتیو نمی‌باشد زیرا که علاوه بر رسیدن به نتایج گوناگون، مسائل و مشکلات اخلاقی و اجرایی در استفاده از آن‌ها وجود دارد (۹).

با توجه به نقش مثبت سلول‌های بنیادی عصبی در بهبود حرکتی، در این پژوهش ابتدا تمایز سلول‌های استرومایی

مغز استخوان به سلول‌های بنیادی عصبی در محیط in vitro با استفاده از القاگرهای غیرسمی انجام شد و سپس با پیوند اتولوگ این سلول‌ها به نخاع ضایعه دیده به روش له‌شدگی (contusion) در موش صحرایی آزمایشگاهی، میزان بهبود حرکتی آن مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

تهیه نوروسفر و سلول‌های بنیادی عصبی

سلول‌های بنیادی استرومایی از مغز استخوان موش صحرائی ماده و بالغ نژاد اسپراگو–داولی تهیه شده از موسسه پاستور با سن ۸–۶ هفته جدا شده و سپس کشت داده شدند. پس از پاساژ سوم، سلول‌ها به‌وسیله Trypsin/EDTA جدا شده و در فلاسک $25cm^2$ با غلظت 10^5سلول در هر سانتی‌متر مربع در محیط DMEM/F12 غنی شده با مواد زیر کشت داده شدند:

2% B27 (Gibco)

Basic fibroblast growth factor 20 ng/ml

Epidermal growth factor 20 ng/ml

Penicillin 100 U/ml

Streptomycin 100 mg/ml

این مواد و فاکتورهای رشد ۳ بار در هفته با محیط فوق تعویض شد. پس از ۱روز ساختارهای شبیه نوروسفر دیده شدند. این نوروسفرها تا ۵ روز کشت داده شدند.سپس نوروسفرها در پلیت‌های معمولی با استفاده از محیط نوروسفر و همچنین FBS 5% تبدیل به سلول‌های بنیادی عصبی شدند. سپس FBS به تدریج از محیط حذف شد چون سبب تمایز سلول‌ها به سمت آستروسیت می‌شود. هنگامی که تراکم این سلول‌های چسبیده به کف فلاسک به ۷۰ تا ۸۰ درصد رسید، پاساژ داده شدند. پاساژ سلول‌ها توسط Trypsin 0.25% (Germany, Merck) و EDTA 0.04% (Germany, Merck) انجام شد. برای بررسی تمایز این سلول‌ها به سلول‌های شبه عصبی و گلیالی بیان آنتی‌بادی‌های اولیه anti-GFAP monoclonal antibody (1:100, Chemicon)، anti-Nestin monoclonal antibody (1:300)، anti-NF68 monoclonal antibody (1:200), anti-NF200 polyclonal antibody (1:300) و (هر سه از نوع موشی از Santa Cruz Biotechnology بودند) استفاده شد. در روش ایمونوسیتوشیمیایی با آنتی‌بادی اولیه و ثانویه برای شمارش سلول‌ها از روش شمارش چشمی استفاده شد. در این روش با استفاده از میکروسکوپ اینورت فلوئوروسنت نیکون بعد از استفاده از آنتی‌بادی اولیه و ثانویه به رنگ سبز (FITC) و هسته سلول‌ها به رنگ قرمز (با استفاده از اتیدیوم برماید) در می‌آیند. سلول‌هایی که هسته قرمز و سیتوپلاسم سبز داشتند، به‌عنوان مثبت و سلول‌هایی که فقط هسته قرمز داشتند به‌عنوان منفی در نظر گرفته شدند. ۶ لام در هرگروه انتخاب و از هر لام ۴ فیلد انتخاب شد. بعد از شمارش از ۴ لام و از مجموع ۲۴ فیلد یک میانگین گرفته شد. برای بیان mRNA از ژن Neuro D,Oct-4 و تکنیک RT-PCR استفاده شد.

تهیه موش صحرائی بالغ و گروه‌بندی

در این پژوهش از ۴۳ سر موش صحرائی ماده و بالغ نژاد اسپراگو–داولی تهیه شده از موسسه پاستور با سن ۸–۶ هفته استفاده شد که دلیل انتخاب موش ماده تخلیه راحت‌تر ادراری بعد از ضایعه نخاعی است. حیوانات در یک دوره روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته و در شرایط مطلوب و استاندارد حیوانخانه مرکز علوم اعصاب شفا در بیمارستان خاتم الانبیای تهران نگه‌داری شده و به‌طور تصادفی به ۵ گروه تقسیم شدند:

گروه اول (شم: Sham operated) حیوانات این گروه که گروه شاهد عمل لامینکتومی این پژوهش را تشکیل می‌دادند، فقط عمل لامینکتومی را تجربه کرده و هیچگونه ضایعه نخاعی در آنها ایجاد نشد (تعداد=۷).

گروه دوم (C1): در این گروه پس از لامینکتومی، له‌شدگی انجام شد ولی هیچگونه درمانی اعمال نگردید (تعداد=۷).

گروه سوم (C2): این گروه مشابه گروه دوم بوده و پس از هفت روز از له‌شدگی مجموعاً مقدار ۲۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی به‌طور مساوی درسه موضع از نخاع شامل مرکز ضایعه، ۳ میلی‌متر به طرف سر و همین فاصله به طرف دم در مدت ۹ دقیقه تزریق شد (تعداد=۷).

گروه چهارم: در این گروه پس از گذشت هفت روز از له‌شدگی، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی حاوی دو میلیون سلول‌های بنیادی مغز استخوان تمایز نیافته نشاندار شده درسه موضع از نخاع شامل مرکز ضایعه، ۳ میلیمتر به طرف سر و همین فاصله به طرف دم در مدت ۹ دقیقه تزریق شد (تعداد=۱۱).

گروه پنجم: در این گروه پس از گذشت هفت روز از له‌شدگی، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی حاوی دو میلیون NSC تمایز نیافته نشاندار شده با رنگ(USA,Sigma) Hoechst درسه موضع از نخاع شامل مرکز ضایعه، ۳ میلیمتر به طرف سر و همین فاصله به طرف دم در مدت ۹ دقیقه تزریق شد (تعداد=۱۱).

جراحی‌ها بر روی حیوانات

جراحی اول، برای استخراج سلول‌هلی بنیادی مشتق از مغز استخوان، از استخوان فمور به‌منظور پیوند اتوگراف انجام شد. در این روش پس از بیهوش کردن حیوان، پوست و عضلات ناحیه ران کنار زده شد و بعد از رویت تنه استخوان فمور، با مته سرریز یک سوراخ در استخوان ایجاد و سپس با یک سرنگ حاوی محیط و سرم محتویات مغز استخوان آسپیره و وارد فلاسک شدند و سپس موضع دوباره بخیه زده شد. جراحی دوم، انجام لامینکتومی و له‌شدگی بود و جراحی سوم، باز نمودن مجدد ناحیه لامینکتومی و پیوند سلول به صورت داخل نخاعی بود. بررسی حرکتی بر اساس تست BBB قبل و بعد از جراحی اول بر روی حیوانات انجام و در صورت وجود هر گونه نقص حیوان از مطالعه خارج می‌شد. همچنین این بررسی در روزهای اول، چهارم و هفتم پس از جراحی دوم و در ادامه پس از جراحی سوم در روزهای هشتم و یازدهم و در پایان هفته‌های دوم تا دوازدهم انجام و نتایج حاصله ثبت گردید.

آماده کردن و نشان دار کردن سلول‌ها و پیوند آنها

قبل از پیوند سلول‌ها لازم بود از یک نشان‌گر برای تعیین سرنوشت سلول‌ها پس از پیوند استفاده شود. به این منظور از نشانگر Hoechst استفاده شد که در هسته قرار می‌گیرد. رنگ Hoechst با غلظت ۲۵ میکرومولار در فلاسک حاوی سلول‌ها با تراکم حدود ۸۰ درصد سلول به محیط کشت اضافه شد. به این ترتیب تمام هسته‌ها رنگ می‌شوند. زمان لازم برای رنگ شدن سلول‌ها یک دقیقه بود وسپس سلول‌ها با PBS شستشو داده شدند. در پایان مرحله نشاندار نمودن، سلول‌ها با PBS شسته شدند. پس از رنگ آمیزی ۴ فیلد انتخاب و بعد از شمارش سلول‌های بارنگ آبی، میانگین ۴ فیلد در هر فلاسک محاسبه و به‌عنوان سلول‌های رنگ گرفته در نظر گرفته شدند. سپس توسط محلول تریپسین و EDTA، از کف فلاسک کنده شده و سانتریفوژ شدند. مایع رویی سلول‌ها کاملاً تخلیه شد و

محتوی سلولی فلاسک توسط PBS مجددا به‌صورت سوسپانسیون درآمد و شمارش گردید و هر بار تعداد ۳۰۰۰۰۰ سلول جدا و با ۹ میکرولیتر محلول سرم فیزیولوژی به‌حالت سوسپانسیون آماده پیوند در آمد. سپس سوسپانسیون همگن سلولی به‌دست آمده توسط یک سرنگ هامیلتون ۱۰ میکرولیتری متصل به سرسوزن G ۳۰ کشیده و تا هنگام تزریق روی یخ نگه‌داری شد. پس از نمایان کردن نخاع توسط جراحی، تزریق در سه ناحیه از نخاع انجام شد. برای تزریق، سوزن به‌طور عمود به میزان یک میلیمتر در نخاع وارد شده و سپس سه میکرولیتر از سوسپانسیون توسط پمپ میکروواینجکتور در مدت سه دقیقه تزریق شد.

بررسی حرکتی

بررسی حرکتی توسط یک دوربین فیلمبرداری دیجیتال (Sony mini DV-DCR-HC32E) انجام شد. برای انجام عملیات از یک استوانه پلاستیکی به قطر ۱۰۶/۵ cm و ارتفاع ۶۰ cm به‌عنوان میدان حرکتی استفاده گردید. با تکرار تصویربرداری، حیوان به محیط عادت کرده نتیجه آزمایش دقیق‌تر می‌شود. در هر مرحله آزمایش هر حیوان به مدت حدود ۳ الی ۴ دقیقه در داخل محیط آزمایش قرار داده شد.

برای امتیاز دهی به حیوان ابتدا فیلم توسط نرم افزار Video Wave 5.1 به‌صورت حرکت آهسته و فریم به فریم مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به معیارهای بررسی که در ذیل به آنها اشاره شده است به هر حیوان نمره مربوطه داده شد و نتایج حاصله پس از ثبت در فرم‌های خام و نرم افزار آماری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت .

معیارهای امتیازات(۲۱-۰) در بررسی حرکتی

صفر: عدم مشاهده حرکت در مفاصل اندام خلفی

۱: حـرکت خفیف (کمتر از ۵۰ درصد میزان حرکت طبیعی) در یکی از مفاصل لگن، زانو و یا مچ پا

۲: حرکت ممتد (بیشتر از ۵۰ درصد میزان حرکت طبیعی) در یک مفصل همراه با حرکت خفیف در یک مفصل دیگر

۳: حرکت ممتد و کشیده در دو مفصل

۴: حرکت خفیف در سه مفصل (لگن، زانو و مچ) اندام خلفی

۵: حرکت خفیف در دو مفصل و حرکت ممتد در مفصل سوم

۶: حرکت ممتد در دو مفصل و حرکت خفیف در مفصل سوم

۷: حرکت ممتد در هر سه مفصل

۸: حرکت جارویی پا (روی پنجه رد شدن) یا گذاشتن پنجه روی زمین بدون انتقال وزن

۹: گذاشتن ممتد یا متناوب پنجه روی زمین همراه با انتقال وزن و یا گاهی مشاهده می‌شود حیوان وزن خود را روی پشت پنجه تحمل می‌کند.

۱۰: برداشتن گام‌های موردی بر روی کف پا همراه با انتقال وزن، اما بدون هماهنگی بین اندام‌های قدامی و خلفی

۱۱: برداشتن گام‌های متوالی بر روی کف پا همراه با انتقال وزن، اما بدون هماهنگی بین اندام‌های قدامی و خلفی

۱۲: برداشتن گام‌های متوالی بر روی کف پا همراه با انتقال وزن، و با هماهنگی نسبی بین اندام‌های قدامی و خلفی

۱۳: برداشتن گام‌های متوالی بر روی کف پا همراه با انتقال وزن، با هماهنگی کامل بین اندام‌های قدامی و خلفی

۱۴: برداشتن گام‌های متوالی بر روی کف پا همراه با انتقال وزن، با هماهنگی کامل بین اندام‌های قدامی و خلفی و حرکت چرخشی پنجه پا در مرحله ابتدایی یا انتهایی تماس پا با زمین

۱۵: برداشتن گام‌های متوالی بر روی کف پا همراه با انتقال وزن، با هماهنگی کامل بین اندام‌های قدامی و خلفی و انگشتان در حین حرکت به جلو دیده نمی‌شود.

۱۶: برداشتن گام‌های متوالی بر روی کف پا همراه با انتقال وزن، با هماهنگی کامل بین اندام‌های قدامی و خلفی و انگشتان در حین حرکت به جلو، به‌طور واضح دیده می‌شود.

۱۷: برداشتن گام‌های متوالی بر روی کف پا همراه با انتقال وزن، با هماهنگی کامل بین اندام‌های قدامی و خلفی و انگشتان در حین حرکت به جلو دیده می‌شود در مراحل ابتدایی و انتهایی تماس پا، با زمین پنجه موازی با تنه حیوان نیست.

۱۸: برداشتن گام‌های متوالی بر روی کف پا همراه با انتقال وزن، با هماهنگی کامل بین اندام‌های قدامی و خلفی و انگشتان در حین حرکت به جلو دیده می‌شود. در مراحل ابتدایی و انتهایی تماس پا با زمین، پنجه موازی با تنه حیوان است.

۱۹: برداشتن گام‌های متوالی بر روی کف پا همراه با انتقال وزن، با هماهنگی کامل بین اندام‌های قدامی و خلفی و انگشتان در حین حرکت به جلو دیده می‌شود. در مراحل ابتدایی و انتهایی تماس پا با زمین، پنجه موازی با تنه حیوان بوده، معمولا" دم به طرف بالا قرار گرفته تنه دارای حالت پایداری است.

۲۰: برداشتن گام‌های متوالی بر روی کف پا همراه با انتقال وزن، با هماهنگی کامل بین اندام‌های قدامی و خلفی و انگشتان در حین حرکت به جلو دیده می‌شود. در مراحل ابتدایی و انتهایی تماس پا با زمین، پنجه موازی با تنه حیوان بوده، معمولا" دم به طرف بالا قرار گرفته تنه دارای حالت پایداری است.

۲۱: برداشتن گام‌های متوالی بر روی کف پا همراه با انتقال وزن، با هماهنگی کامل بین اندام‌های قدامی و خلفی و انگشتان در حین حرکت به جلو دیده می‌شود. در مراحل ابتدایی و انتهایی تماس پا با زمین پنجه موازی با تنه حیوان بوده، معمولا" دم به‌طور پیوسته و ثابت بالا قرار گرفته تنه دارای حالت پایداری است.

تجزیه تحلیل آماری

تمام مقادیر بر حسب Mean±SEM ارایه شده است. اطلاعات به‌دست آمده از بررسی زنده بودن سلول‌ها و شمارش سلولی و بررسی حرکتی توسط Student t-test و روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون TUKEY مورد مقایسه قرار گرفت. سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ درنظرگرفته شد.

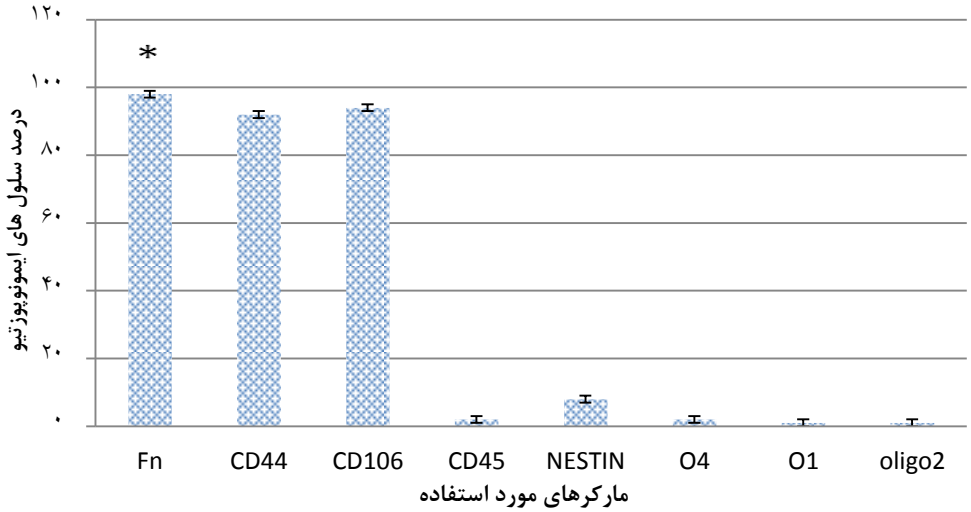
نتایج

تعیین میزان حیات سلول‌ها با تریپان بلو

بر اساس viability test درصد سلول‌های بنیادی مغز استخوان زنده، ۲۴ ساعت پس از پاساژ چهارم به بیش از ۹۶ درصد رسید که به صورت معنی‌داری بیشتر از سلول‌های نوروسفر و سلول‌های بنیادی عصبی بود ولی بین گروه نوروسفر و سلول‌های بنیادی عصبی ارتباط معنی‌داری وجود نداشت (P<۰/۰۵).

تعیین میزان خلوص سلول‌های بنیادی مغز استخوان به روش ایمونوسایتوشیمی

برای اثبات استرومائی بودن سلول‌های بنیادی مغز استخوان و تعیین خلوص آنها از آنتی‌بادی‌های فیبرونکتین، CD44 و CD90 استفاده گردید. ۹۸/۲۴±۱/۲۲ درصد سلول‌ها با آنتی فیبرونکتین و ۹۳/۲±۱/۱۱ درصد سلول‌ها با آنتی CD44 و ۹۴/۲±۱/۲۲ درصد سلول‌ها با آنتی CD106 واکنش دادند. در این مرحله آنتی‌بادی CD45 که خاص سلول‌های خون‌ساز است تنها در ۲/۵±۱/۴۴ از سلول‌ها بیان شد. بررسی ایمونوسایتوشیمی سلول‌های BMSCs با استفاده از آنتی‌بادی Nestin نشان از بیان ۴/۲ درصدی داشت اما آنتی‌بادی‌های اختصاصی سلول‌های الیگودندروسیت، Oligo2 و O1 و O4 به مقدار ناچیزی بیان شدند (شکل ۱).



شکل ۱. *مقایسه سطح معنی‌داری درصد بیان آنتی‌بادی‌های CD44, CD106, CD45, NESTIN, Fibronectin O1, O4 و oligo2 برای تعیین سلول‌های BMSCs، شبه عصبی و شبه الیگودندروسیت توسط تکنیک ایمونوسایتوشیمی در مرحله قبل از ایجاد تمایز.*

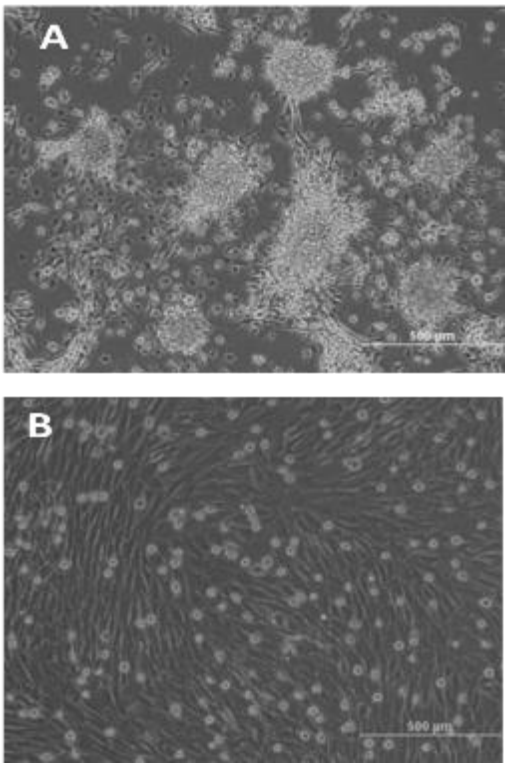
*-اختلاف معنی‌دار با گروه بقیه گروه‌ها (P<۰/۰۵)

تعیین بنیادین بودن BMSCs به روش RT-PCR

در بررسی RT-PCR از سلول‌های BMSCs و NSCS تمایز نیافته ژن Oct-4 در سطح mRNA به‌خوبی بیان شده است که این موضوع علاوه بر بیان فیبرونکتین تایید دیگری بر بنیادین بودن سلول‌های فوق می‌باشد.

مورفولوژی سلول‌ها پس از تشکیل نوروسفر و سلول‌های بنیادی عصبی

در بررسی مورفولوژی BMSCs قبل از شروع تمایز این سلول‌ها به شکل کاملا پهن و دوکی با زوائد کوتاه و هسته بیضی دارای یک تا چند هستک بودند. بعد از تشکیل نوروسفر سلول‌ها به شکل توده‌های کروی شکلی در آمدند که میزان تشکیل این کره‌ها و اندازه آنها با گذشت زمان بیشتر و بزرگتر شد. سپس این سلول‌ها به محیط کشت عصبی منتقل شده و از حالت کروی به حالت کشیده تبدیل شدند (شکل۲).



شکل ۲. *تصاویر فاز کنتراست از سلول‌های نوروسفری (A) و سلول‌های بنیادی عصبی (B) پس از کشت در کوکتل عصبی تهیه شده.*

تعیین میزان تمایز بعد از تشکیل سلول‌های بنیادی عصبی به روش ایمونوسایتوشیمی

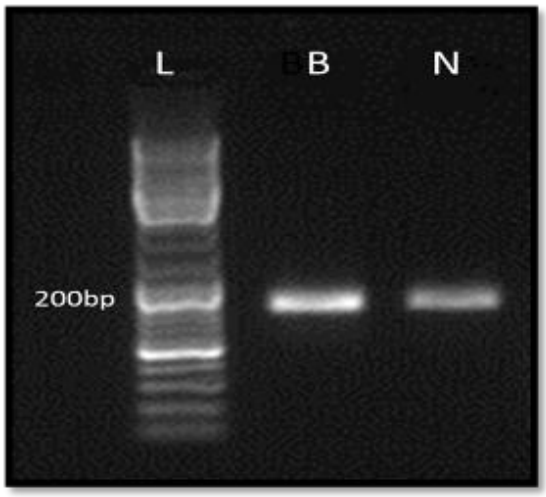
در بررسی ایمونوسایتوشیمی سلول‌های بنیادی عصبی با آنتی‌بادی‌هایGFAP, Fibronectin, NF68 , Nestin, O4, O1, Oligo2 درصدهای متفاوتی از سلول‌های رنگ گرفته به‌وسیله میکروسکوپ فلورسنت تشخیص داده شد. به‌منظور تعیین درصد سلول‌های ایمونوپوزیتیو شبه عصبی و همچنین شبه گلیالی شمارش سلولی صورت گرفت. بیان مارکرهای Nestin و NF68 در سلول‌های بنیادی عصبی برابر با ۷۹/۰۳±۴/۶۳ و ۸۲±۵/۶۲ بود. میزان بیان GFAP در این مرحله ۱۴/۲۵±۲/۲۲ درصد و میزان بیان Oligo2 ۲/۴±۰/۵۳ درصد بود (P<۰/۰۵).

بررسی بنیادین بودن سلول‌های بنیادی عصبی به روش RT-PCR

در بررسی کیفی RT-PCR سلول‌های بنیادی عصبی باند مشخصی را از بیان mRNA ژن OCT4 با اندازه 200BP بر روی ژل الکتروفورز نشان دادند، که مارکر بنیادی بودن سلول‌های بنیادی می‌باشد (شکل۳).

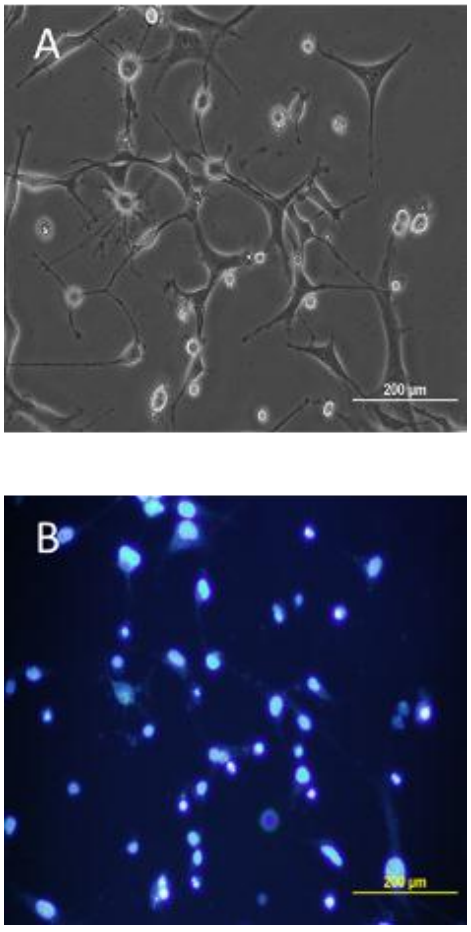
درصد سلول‌های علامت دار شده با Hoechst در محیط کشت

درصد سلول‌های BMSCs وNSC نشان‌دار با Hoechst در محیط کشت قبل از پیوند حدود ۹۴ درصد بود (شکل ۴).



شکل ۳. *بررسی بنیادین بودن سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان و سلول‌های بنیادی عصبی.*

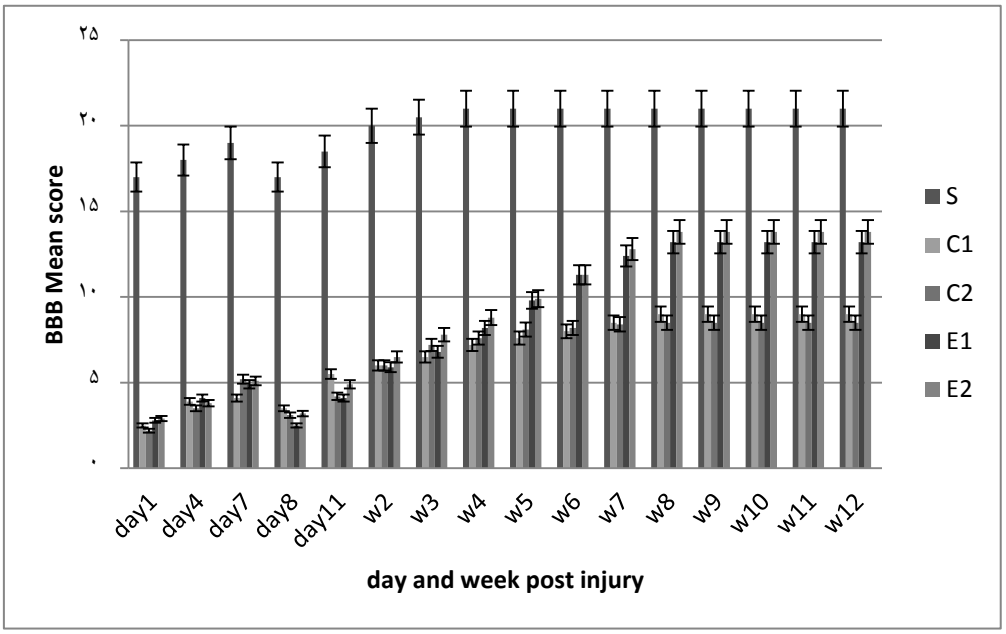
L: LADEER و B: BMSCS, N: NSCs



شکل ٤. *تصاویر فاز کنتراست (A) و نشانه‌گذاری شده (B) سلول‌های بنیادی عصبی با رنگ حیاتی HOCHEST*

تست حرکتی قبل و بعد از جراحی اول و دوم

نمره تست حرکتی همه گروه‌ها قبل از جراحی اول و دو روز پس از آن برابر ۲۱ بود که نشان دهنده سلامت حرکتی حیوان قبل و بعد از جراحی دوم است. میانگین نمره تست حرکتی گروه شم در تمام طول آزمایش نسبت به گروه‌های دیگر دارای اختلاف معنی‌دار بود. این نمره در پایان هفته دوم در این گروه به عدد ۲۱ رسید که نشان از بهبودی کامل این گروه بود. بررسی میانگین نمره تست حرکتی در روز اول پس از جراحی دوم در همه گروه‌های آزمایشی به جز گروه شم کاهش شدیدی نشان داد. این میزان در پایان هفته اول بهبودی خودبخودی در همه گروه‌ها داشت. این افزایش از هفته دوم تا هفته هشتم در گروه‌های کنترل از یک روند افزایشی و صعودی برخوردار بود ولی بعد از آن حالت پلاتو پیدا کرد. با گذشت روزهای بیشتر از تزریق سلول در همه گروه‌های درمانی شاهد بهبود حرکتی بودیم. این بهبودی از هفته دوم تا هفته دهم در گروه‌های ۴و ۵ از یک روند افزایشی و صعودی برخوردار بود.



S: Sham; C1: Contusion only; C2: Contusion+ injection normal saline; E1: Contusion+IS BMSCs; E2: Contusion+ IS NSCs

شکل ۵. *مقایسه میانگین تست حرکتی بین گروه‌های شم، کنترل و درمانی که نشان از بهبودی معنی‌دار گروه درمان نسبت به دیگر گروه‌ها و گروه کنترل دارد. گروه شم با تمام گروه‌های دیگر دارای اختلاف معنی‌دار است.*

بحث

در این پژوهش ابتدا با تولید نورورسفر از سلول‌های بنیادی مشتق شده از مغز استخوان و تبدیل آنها به سلول‌های بنیادی عصبی روند سلول درمانی در درمان ضایعات نخاعی موردبررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از بهتر بودن درمان در تست رفتاری درگروه‌های تجربی نسبت به گروهای کنترل بود. ۰در این تحقیق ما ابتدا سلول‌های استحصال یافته از مغز استخوان را پس از چند پاساژ و بعد از اینکه سلول‌ها مورفولوژی یکسانی پیدا کردند به سلول‌های نوروسفر تبدیل کردیم که نوروسفرهای ایجاد شده کروی شکل بودند و به‌صورت توده‌های شناور به چشم می‌خوردند که این توده‌ها با گذشت زمان بزرگتر شده و تعداد آنها نیز

افزایش پیدا کرد که این یافته با نتایج حاصل ازتحقیق سایر پژوهشگران تطبیق داشت (۱۲). سلول‌های بنیادی مغز استخوان اگر به‌مدت چند ساعت در محیط القایی قرار گیرند به‌شکل توپ‌هایی در می‌آیند که به آنها نوروسفر گفته می‌شود که این کره‌ها پس از یک ساعت به سمت همدیگر حرکت کرده و پس از یک روز تبدیل به کره‌های کاملی می‌شوند (۱۳). بعد از تشکیل نوروسفر و سلول بنیادی عصبی viability test انجام گرفت و مشاهده شد که میزان سلول‌های زنده در حد قابل قبولی است که دلیل آن را می‌توان به استفاده از مواد غیر سمی B27 و فاکتورهای نورورتروفیکEGF, BFGF نسبت داد. در مطالعات قبلی از القاکننده‌هایی مانندBHA βME, DMSO و RA استفاده می‌شد که دارای اثرات القائی متفاوتی بودند و با متمایز کردن سلول‌های بنیادی مغز استخوان آنها را به سمت سلول‌های شبه عصبی و شبه گلیال پیش می‌برد ولی درصد سلول‌های استحصال یافته پایین بود (۱۴). اما، در این تحقیق درصد سلول‌های به‌دست آمده بسیار بالاتر بود که می‌تواند به‌دلیل استفاده از مواد غیر توکسیک باشد. به‌منظور تولید سلول‌های عصبی از سلول‌های بنیادی مغز استخوان همواره از القاگرهای با سمیت بالا استفاده شده است، این ترکیبات افزایش دهنده سطح آدنوزین مونوفسفات حلقوی داخل سلولی (cAMP) بوده و می‌توانند سلول‌های بنیادی مغز استخوان را تحریک کرده و مورفولوژی سلول عصبی را ایجاد نمایند (۱۵). یکی دیگر از القاگرهای مورد استفاده رتینوییک اسید (RA) می‌باشد که به‌طور گسترده‌ای در القا به رده‌های عصبی مؤثر است که ما از این ماده به‌صورت کوکتل با B27 استفاده کردیم (۱۶).

پس از تشکیل نوروسفر و باقی ماندن این سلول‌ها در محیط القایی فاقد سرم بعد از مدت ۷ روز این سلول‌ها با استفاده از محیط حاوی سرم ۵ درصد تبدیل به سلول‌های بنیادی عصبی شدند. سلول‌های فوق بعد از چند پاساژ و با کاهش تدریجی سرم از نظر ایمونوسیتوشیمیایی و بیان mRNA ژن، Oct-4 Neuro D مورد بررسی قرار گرفتند تا بنیادی بودن و همچنین عصبی بودن آنها تایید شود. میزان بیان آنتی‌بادی‌های اختصاصی NESTIN و NF۶۸ در این سلول‌ها در حدود ۸۰ درصد بود که حاکی از مناسب بودن این سلول‌ها جهت تبدیل به رده گلیالی بود. در مطالعات پیشین ثابت شده است که هرچه سلول‌های بنیادی عصبی بیان پایین‌تری از مارکر Nestin داشته باشند بلوغ کمتری دارند؛ در واقع با بلوغ سلول‌های عصبی بیان Nestin کاهش می‌یابد. ضمن آنکه بیان آنتی‌بادی GFAP که مارکر آستروسیت‌ها می‌باشد پایین بود که نتایج این تحقیق با تحقیقات دیگران همخوانی داشت (۱۷). در مطالعه‌ی دیگری سلول‌های بنیادی مغز استخوان به سلول‌های بنیادی عصبی تبدیل شده و بیان مارکرهای عصبی توسط ایمونوسیتوشیمی بررسی شده که نتایج حاکی از بیان بالای Nestin و عدم بیان GFAP بوده است (۱۸). در مرحله in vivo بعد از ایجاد لامینکتومی با استفاده از روش NEW YORK ضایعه نخاعی به‌روش له‌شدگی انجام شد و موش‌های صحرایی در گروه‌های ۲و۳و۴ هفت روز بعد از ایجاد ضایعه تحت تزریق سرم فیزیولوژی، سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان و سلول‌های بنیادی عصبی قرار گرفتند.

Kuhn و Palmer سلول‌های بنیادی مغز استخوان را تحت شرایط آزمایشگاهی in vitro به سلول‌های عصبی تمایز داده و سپس آنها را به مدل‌های حیوانی دارای ترومای سیستم عصبی مرکزی پیوند زدند. در مطالعه فوق عملکرد ترشحی سلول‌های بنیادی مغز استخوان، آزادسازی فاکتورهای رشد، سایتوکاین‌ها و نقش آنها در بهبود عملکرد نورولوژیک مطرح گردید. همچنین مشخص شد این سلول‌ها با تولید Brain Nateriuteric Peptide از طریق کاهش فشار داخل جمجمه‌ای باعث بهبود آسیب‌های مغزی و نخاعی می‌گردد (۱۹). Ankeny و همکاران برای درمان بیماری‌های نورودژنراتیو، ظرفیت کاربرد سلول‌های بنیادی مغز استخوان

موش صحرایی را مورد بررسی قرار دادند. آنها در این تحقیق نشان دادند سلول‌ها پس از انجام ۶ پاساژ توانایی بیان NGF و GDNF را دارند این فاکتورهای نوروتروفیک مترشحه از سلول اولاً باعث بقای سلول شده و ثانیاً رشد زوائد عصبی را به همراه داشتند (۲۰).

در مورد بررسی رفتار حرکتی همان طور که نتایج نشان داد، میانگین نمره بررسی حرکتی دو روز پس از جراحی اول برابر ۲۱ بود که نشان دهنده توانایی حیوان در استفاده از سیستم عصبی- عضلانی اندام تحتانی پس از جراحی بود. در روز اول پس از جراحی دوم در همه گروه‌های آزمایشی به غیر از گروه شم نمره بررسی حرکتی شدیداً کاهش یافت که این کاهش ناشی از مرحله حاد آسیب نخاعی بود. به‌علت کاهش التهاب و پدیده ترمیم خودبخودی میانگین نمره بررسی حرکتی همه گروه‌ها تا پایان هفته اول از بهبودی تقریباً یکسانی نشان داد که این وضعیت در مطالعات دیگر نیز دیده شده است (۲۱). افزایش نسبی نمره بررسی حرکتی گروه کنترل با تزریق سرم فیزیولوژی در نخاع پس از جراحی سوم نیز ناشی از کاهش التهاب و پدیده ترمیم خودبخودی است که موجب بهبودی کمی در حرکت حیوان گردید.

در تحقیق حاضر طرح ایجاد حفره و ترمیم آن در ناحیه ماده خاکستری و سفید عمدتاً از یک وضعیت متقارن تبعیت می‌کرد که نشان دهنده این است که ایجاد ضایعه در نخاع وتزریق به درستی انجام شده است. عدم بهبودی خودبخودی مؤثر بافت نخاع توسط سلول‌های درونزاد مانند سلول‌های بنیادی عصبی یا سلول‌های پیش‌ساز الیگودندروسیت نشان از آسیب جدی به بافت نخاع دارد. وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه شم و گروه‌های ۴و۵ را شاید بتوان به وسعت آسیب نسبت داد که در گروه شم سلول‌های درونزاد به تنهایی توان بازسازی این ناحیه را ندارند در حالی که در گروه‌های درمانی سلول‌های پیوندی همراه با سلول‌های درون زاد در بهبود ضایعه نقش موثری دارند. مشابه این نتایج در پژوهش Cloutier و همکاران در گروه درمان شده با سلول‌های بنیادی جنینی انسانی در موش صحرایی دارای ضایعه نخاعی در اثر له‌شدگی سطح مقطع نخاع در ناحیه مرکزی به‌طور معنی‌داری بیش از گروه شاهد بود (۲۲).

Ankeny ثابت کرد پیوند NSCs در بالا و پایین حفره می‌تواند با آزاد کردن فاکتورهایی مثل GDNF، NGF و NTFs منجر به نفوذ آکسونی در حفره شده در نتیجه سد ایجاد شده توسط آستروسیت‌های تحریک شده را شکسته و ارتباط بین بخش‌های پروگزیمال و دیستال ضایعه برقرار گردد (۲۳). در مطالعه حاضر وجود اختلاف معنی‌دار در میانگین اندازه حفره یا حفرات باقیمانده بین گروه‌های تجربی با گروه‌های شاهد را با استدلال اخیر مبنی بر اینکه سلول‌های برونزاد با کمک سلول‌های درونزاد توانسته‌اند از نکروز و آپوپتوز جلوگیری کرده و در ایجاد بافت جدید شرکت و بین قسمت‌های پروگزیمال و دیستال حفره ارتباط برقرار نموده‌اند توجیه کرد. Keirstead و همکاران نشان دادند تزریق تعداد متفاوت سلول‌های پیوندی هفت روز پس از ضایعه له‌شدگی در بالا و پایین محل ضایعه هیچ تفاوتی در نتیجه بررسی رفتاری ایجاد نمی‌کند (۲۴).

نتیجه‌گیری

پیوند سلول‌های بنیادی عصبی از طریق داخل نخاعی موجب بهبود رفتاری در موش صحرایی دارای ضایعه نخاعی نسبت به گروه شاهد گردید. این نوع پیوند انتخاب مناسبی برای بهبود حرکتی اندام‌های فلج شده و ترمیم بافت بخش آسیب دیده در ضایعه نخاع است.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله مراتب تشکر وقدردانی خود را از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و مرکز علوم اعصاب شفا، بیمارستان خاتم الانبیا اعلام میدارند.

References

1. Donnelly EM, Lamanna J, Boulis NM.Stem cell therapy for the spinal cord. Stem *Cell Res Ther* 2012; 3(4):24.
2. Anderson AJ, Robert S, Huang W, Young W, Cotman CW. Activation of complement pathways after contusion-induced spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2004; 21(12):1831-46.
3. Wright KT, El-Masri W, Osman A, Chowdhury J, Johnson WE. Concise review: Bone marrow for the treatment of spinal cord injury: mechanisms and clinical applications. *Stem Cells* 2011; 29(2):169-78.
4. Rabchevsky AG, Streit WJ. Grafting of cultured microglial cells into the lesioned spinal cord of adult rats enhances neurite outgrowth. *J Neurosci Res* 1997; 47(1):34-48.
5. Li W, Maeda Y, Ming X, Cook S, Chapin J, Husar W, Dowling P. Apoptotic death following fas activation in human oligodendrocyte hybrid cultures. *J Neurosci Res* 2002; 69(2): 189–196.
6. Abbaszadeh HA, Tiraihi T, Delshad AR, SadeghiZadeh M Taheri, T. Bone marrow stromal cell transdifferentiation into oligodendrocyte-like cells using triiodothyronine as a inducer with expression of platelet-derived growth factor α as a maturity marker. *Iran Biomed j* 2013; 17(2): 62-70.
7. Ronaghi M, Erceg S, Moreno-Manzano V, Stojkovic M. Challenges of stem cell therapy for spinal cord injury: human embryonic stem cells, endogenous neural stem cells, or induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2010; 28(1):93-9.
8. Chen MS, Huber AB, van der Harr ME, Frank M, Schnell L, Spillmann AA, et al. Nogo-A is a myelin associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* 2000; 403: 434-9.
9. Xue M, Hollenberg MD, Yong VW. Combination of Thrombin and Matrix Metalloproteinase-9 Exacerbates Neurotoxicity in Cell Culture and Intracerebral hemorrhage in mice. *J Neurosci* 2006; 26(40): 10281-91
10. Zhang N, Yan H, Wen X. Tissue-engineering approaches for axonal guidance. *Brain Res Brain Rev* 2005; 49(1):48-64.
11. Hou SY, Zhang HY, Quan DP, Liu XL, Zhu JK. Tissue-engineered peripheral nerve grafting by differentiated bone marrow stromal cells. *Neuroscience* 2006; 140(1):101-10.
12. Marshall GP, Reynolds BA, Laywell ED. sings the neurosphere assay to quantify neural stem cells in vivo. Curr Pharm Biotechnol. 2007 Jun; 8(3):141-5.
13. Darabi S, Tiraihi T, Ruintan A, Abbaszadeh HA, Delshad A, Taheri T.Polarized neural stem cells derived from adult bone marrow stromal cells develop a rosette-like structure. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2013; 49(8): 638-
14. Kaka GR, Tiraihi T, Delshad A, Arabkheradmand J, Kazemi H. In vitro differentiation of bone marrow stromal cells into oligodendrocyte-like cells using triiodothyronine as inducer. Int J Neurosci. 2012 May; 122(5):237-47.
15. Deng W1, Obrocka M, Fischer I, Prockop DJ. In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early

progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. Biochem Biophys Res Commun. 2001 Mar 23; 282(1):148-52.

16. Darabi S, Tiraihi T, Delshad A, Sadeghizadeh M. A new multistep induction protocol for the transdifferentiation of bone marrow stromal stem cells into GABAergic neuron-like cells. Iran Biomed J. 2013; 17(1):8-14.
17. Abbaszadeh HA, Tiraihi T, Delshad A, Saghedizadeh M, Taheri T, Kazemi H. Differentiation of neurosphere-derived rat neural stem cells into oligodendrocyte-like cells by repressing PDGF-α and Olig2 with triiodothyronine. *Tissue Cell* 2014; 46(6): 462-9.
18. Gharibani PM, Tiraihi T, Arabkheradmand J. In vitro differentiation of GABAergic cells from bone marrow stromal cells using potassium chloride as inducer. Restor Neurol Neurosci. 2010;28(3):367-77
19. Kuhn HG, Palmer TD, Fuchs T. Adult neurogenesis: a compensatory mechanism for neuronal damage. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2001; 251(4):152-8.
20. Ankeny D.P. McTigue D.M. Jakeman L.B. Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidance for axons after contusive spinal cord injury in rats. Exp. Neurol. 2004; 190:17-31.
21. Abbaszadeh HA, Tiraihi T, Noori-Zadeh A, Delshad AR, Sadeghizade M, Taheri T. Human ciliary neurotrophic factor–overexpressing stable bone marrow stromal cells in the treatment of a rat model of traumatic spinal cord injury. *Cytotherapy* 2015; 17(7): 912-21.
22. Cloutier F, Siegenthaler MM, Nistor G, Keirstead HS.Transplantation of human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitors into rat spinal cord injuries does not cause harm. Regen Med. 2006 Jul; 1(4):469-79.
23. Ankeny DP, McTigue DM, Guan Z, Yan Q, Kinstler O, Stokes BT, Jakeman LB. Pegylated brain-derived neurotrophic factor shows improved distribution into the spinal cord and stimulates locomotor activity and morphological changes after injury. Exp Neurol. 2001 Jul; 170(1):85-100.
24. Keirstead HS, Nistor G, Bernal G, Totoiu M, Cloutier F, Sharp K, Steward O. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. J Neurosci. 2005 May 11; 25(19):4694-705.

Improvement of Spinal Cord Injury in Rat Model via Transplantation of Neural Stem Cells Derived From Bone Marrow

Hojjat-allah Abbaszadeh, Ph.D.[1], Taki Tiraihi, Ph.D.[2*], Majid Sadeghizade, Ph.D. [3], Alireza Delshad, Ph.D. [4], Taher Taheri, M.D.[5], Ali Asghar Peyvandi, M.D. [6]

1. Assistant Professor, Hearing Disorders Research Center & Department of Biology and Anatomical Sciences, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Professor, Department of Anatomical Science, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran and Shefa Neuroscience Research Center, Khatam Al-Anbia Hospital, Tehran, Iran

3. Professor, Department of Genetics, Faculty of Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

4. Associate Professor, Department of Anatomical Science, School of Medical Science, Shahed University, Tehran, Iran

5. Shefa Neuroscience Research Center, Khatam Al-Anbia Hospital, Tehran, Iran

6. Professor, Hearing Disorders Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* Corresponding author; e-mail: ttiraihi@yahoo.com

(Received: 30 June 2015 Accepted: 22 Jan. 2016)

Abstract

Background & Aims: Cell therapy is among the novel therapeutic methods effective in the treatment of spinal cord injuries. The aim of the present study was using neural stem cells (NSCs) in treating contusion spinal cord injury in rat model.

Methods: Bone marrow stromal cells **(**BMSCs) were isolated from adult rats. After three passages, these cells were transdifferntiated to neurospheres and subsequently to neural stem cells (NSCs). At *in vivo* studies, 43 adult female rats were divided into 5 groups. For the first group or Sham, laminectomy was the only procedure performed, whereas for the other four groups, after laminectomy, a contusion Spinal Cord Injury (SCI) was induced, as well. In group 2, no treatment was performed. In the other groups, injection was performed 7 days after SCI, as such: in groups 3, 4, and 5 normal saline, BMSCs, and NSCs were injected, respectively. The injections were administered intraspinally (IS). Motor improvement was assessed via BBB test one day before SCI and continued up to 12 weeks afterwards in all groups.

Results: The current study revealed that a considerable percentage of the cells were BMSCs after the fourth passage. These cells were then transformed into neurospheres and NSCs. In all the experimental cell-therapy groups, a significant motor improvement was observed in comparison with that in the control group. This healing was more obvious during the period between the 2^{nd} and the 4^{th} weeks and less prominent during the period between the 4^{th} and the 12^{th} weeks.

Conclusion: Transplantation of NSCs leads to partial motor improvement in contusive rat models.

Keywords: Bone marrow stromal cell, Differentiation, Neural stem cells, Spinal cord injury

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2016; 23(4): 421-435