

## تحقیقی

# اثر پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان

## بر تعداد سلول‌های عصبی و حافظه در مدل ضایعه هیپوکامپ توسط تری متیلین کلراید

سهیلا مددی درگاهی<sup>۱</sup>، دکتر مینا افتخارزاده<sup>۲</sup>، احمد مهدی پور<sup>۳</sup>، دکتر منصوره سلیمانی<sup>۴</sup>، دکتر مهدی مهدی زاده<sup>۵\*</sup>

۱- کارشناس ارشد آناتومی، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران. ۲- استادیار، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران. ۳- استادیار، گروه آناتومی، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران. ۴- استادیار، گروه آناتومی، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران. ۵- استادیار، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، گروه آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی ایران.

## چکیده

**زمینه و هدف:** امروزه به دنبال تایید وجود نورون‌ز در مغز پستانداران بالغ، استفاده از سلول‌های بنیادی به عنوان یک روش درمانی مناسب برای بهبود بسیاری از بیماری‌های سیستم عصبی مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. بدین ترتیب که با پیوند سلول‌های بنیادی، بازسازی نورونی در نواحی تخریب شده ایجاد می‌گردد. این مطالعه به منظور تعیین اثر پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بر آسیب‌های وارده به هیپوکامپ انجام شد.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی ۲۸ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در چهار گروه ۷ تایی کنترل، مدل، شاهد و درمان قرار گرفتند. حیوانات نوروتوکسین تری متیلین کلراید را به میزان ۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از طریق تزریق داخل صفاقی دریافت کردند. یک هفته پس از دریافت نوروتوکسین، سلول‌های بنیادی به روش استریوتاکسی تزریق شد. شش هفته پس از تزریق سلول‌ها، حافظه فضایی موش‌ها به روش ماز آبی موریس بررسی شد. همچنین مطالعه بافتی با روش رنگ‌آمیزی نیسل و شمارش سلول‌های سالم توسط نرم‌افزار *Olysia bio report* انجام گردید.

**یافته‌ها:** به دنبال پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، تعداد نورون‌های سالم در گروه درمان ( $74 \pm 15/19$ ) در مقایسه با گروه شاهد ( $44/67 \pm 12/91$ ) و گروه مدل ( $48/56 \pm 18/105$ ) بیشتر بود ( $P < 0/05$ ). همچنین در آزمون ماز آبی موریس، به دنبال پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، گروه درمان ( $378/35 \pm 189/18$ )، مسافت و زمان کمتری برای رسیدن به سکوی مخفی طی نمود؛ ولی این کاهش نسبت به گروه شاهد ( $428/18 \pm 192/56$ )، ( $40/14 \pm 14/89$ ) و گروه مدل ( $407/98 \pm 225/44$ )، ( $37/68 \pm 17/15$ ) معنی‌دار نبود. همچنین مسافت طی شده در ربع هدف توسط گروه درمان ( $799/8 \pm 125/91$ ) نسبت به گروه مدل ( $588/51 \pm 136/94$ ) و گروه شاهد ( $566/48 \pm 86/47$ ) افزایش آماری معنی‌داری یافت ( $P < 0/05$ ).

**نتیجه‌گیری:** استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان باعث کاهش آسیب‌های وارده به هیپوکامپ به صورت افزایش تعداد نورون‌های پیرامیدال و بهبود حافظه گردید.

**کلید واژه‌ها:** نورون‌ز، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، هیپوکامپ، تری متیلین کلراید، حافظه فضایی

\* نویسنده مسؤول: دکتر مهدی مهدی زاده، پست الکترونیکی [mehdizadeh.m@iums.ac.ir](mailto:mehdizadeh.m@iums.ac.ir)

نشانی: تهران، بزرگراه همت، دانشگاه علوم پزشکی ایران، گروه آناتومی، تلفن ۰۲۱-۸۶۷۰۴۵۴۳، شماره ۸۸۶۲۲۶۸۹  
وصول مقاله: ۹۳/۴/۱۰، اصلاح نهایی: ۹۳/۶/۹، پذیرش مقاله: ۹۳/۸/۶

## مقدمه

صورت پرخاشگری، کاهش حافظه کوتاه مدت و شناخت فضایی مشاهده می‌شود (۲).

ناحیه شاخ آمون هیپوکامپ یکی از اولین نواحی است که در بیماری آلزایمر دچار آسیب می‌شود. این آسیب به صورت کاهش نورونی، کاهش انتقال و پلاستیسیته سیناپس‌ها، نقصان یادگیری و کاهش میزان هماهنگی روانی - حرکتی و در مجموع موجب مشکلات حافظه و عدم آگاهی از موقعیت می‌شود (۱).

با وجود نقش بسیار کلیدی هیپوکامپ در حافظه و یادگیری فضایی، این بافت بسیار حساس و آسیب‌پذیر است (۱). صدمه به هیپوکامپ به دنبال کمبود اکسیژن، آنسفالیت، صرع داخلی لوب تمپورال و عفونت، آلزایمر، هانتینگتون، سکتة مغزی، ایسکمی و به‌ویژه ترومای مغزی ایجاد می‌شود. همچنین در برابر عفونت وارده به مغز، تغییرات رفتاری در سیستم لیمبیک، آمیگدال و هیپوکامپ به

نقایص رفتاری مرتبط با عملکردهای شناختی در مدل‌های حیوانی است (۱۶-۱۴).

با تایید نوروزنر در مغز فرد بالغ و سلول‌های بنیادی عصبی ساکن در مغز بالغ پستانداران، دریچه نوینی به روی محققین برای استفاده از سلول‌های بنیادی در درمان بیماری‌های نورودژنراتیو گشوده شده است. بدین ترتیب که با پیوند سلول‌های بنیادی، بازسازی نورونی در نواحی تخریب شده ایجاد می‌شود. تحقیقات گسترده‌ای روی اثرات درمانی سلول‌های بنیادی در نواحی مختلف بدن و به ویژه بیماری‌های سیستم عصبی در سطح جهانی انجام شده است (۱۷).

منابع مختلف سلول‌های بنیادی برای درمان بیماری‌های نورودژنراتیو مطرح شده که در این میان سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان (BM-MSCs) به علت درجات بالای پلاستیسیته، قابلیت دسترسی آسان، خاصیت تضعیف‌کنندگی سیستم ایمنی و نیز گسترش سریع در محیط کشت، در بیماری‌های پاتولوژیک متعددی مورد استفاده قرار گرفته است (۱۸). همچنین این سلول‌ها پرتوان بوده و قادر به تمایز به رده‌های سلولی استوژنیک، کندروژنیک، ادیوژنیک و سلول‌های نورونی و گلیالی هستند (۱۹). در مطالعه‌ای به دنبال القا TMT و ایجاد آسیب هیپوکامپ، از سلول‌های آمیوتیک انسانی به منظور درمان آسیب وارده استفاده گردید (۲۰)؛ ولی تاکنون از سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان در این مدل آسیب هیپوکامپ که در اثر تزریق TMT ایجاد می‌گردد؛ استفاده نشده است.

این مطالعه به منظور تعیین اثرات درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای جبران آسیب وارده به هیپوکامپ که نقش مهمی در حافظه و یادگیری دارند؛ انجام شد.

### روش بررسی

در این مطالعه تجربی از ۲۸ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۲۵۰-۳۰۰ گرم استفاده شد. موش‌ها تحت شرایط استاندارد با دوره روشنایی - تاریکی ۱۲ ساعته و دمای  $21 \pm 3$  درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و در تمام طول دوره آزمایش، آب و غذای کافی در اختیار داشتند. این مطالعه مورد تصویب کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران قرار گرفت و طبق پروتکل اصول کار با حیوانات در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران طی تابستان ۱۳۹۲ لغایت بهار ۱۳۹۳ انجام گردید.

حیوانات به صورت تصادفی انتخاب و در چهار گروه هفت‌تایی به شرح زیر قرار گرفتند.

گروه کنترل: بدون هیچ دخالتی مورد مطالعه قرار گرفتند.  
گروه مدل: نوروتوکسین TMT را به میزان ۸ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن از طریق تزریق داخل صفاقی دریافت کردند.  
گروه شاهد: پس از دریافت نوروتوکسین TMT، PBS را به

در روند تکامل مغز گونه‌های مختلف، در برخی از نواحی مغز فرایند ایجاد نورون به اثبات رسیده است. این فرایند به نام نوروزنریز شناخته می‌شود. نخستین بار در سال ۱۹۶۰ مطالعات Altman نوروزنریز را در بالغین نشان داد (۳). این روند محدود به زمان خاصی نبوده و از قبل تولد آغاز و در زمان بلوغ هم ادامه می‌یابد (۴و۳).

فرایند نوروزنریز در دو ناحیه از مغز قدامی پستانداران بالغ شامل ناحیه ساب‌نتریکولار (SVZ) و شکنج دندان‌های (DG) در گونه‌های مختلف شامل جوندگان، پریمات‌ها و انسان رخ می‌دهد (۵). در بیماری‌های سیستم اعصاب مرکزی چون آلزایمر، ایسکمی و تروماهای مغزی، برخی از نواحی سیستم عصبی مرکزی دچار تغییرات نورودژنراتیو می‌شوند که متعاقب دژنراسیون، روند نوروزنریز در DG و SVZ تحریک شده و نورون‌های جدید در محل‌های دژنراسیون تولید می‌شوند و این نورون‌های جدید جایگزین سلول‌های عصبی آسیب دیده می‌شوند (۶).

سیستم عصبی، هدف داروها و سموم محیطی است و بیماری‌های نورودژنراتیوی چون آلزایمر، پارکینسون و اسکروزیس آمیوتروفیک طرفی در اثر سموم محیطی ایجاد می‌شود (۷).

تری‌متیلین کلراید (TMT) نوروتوکسینی است که باعث تخریب نورون‌ها در سیستم عصبی مرکزی انسان و جوندگان می‌شود. TMT با اتصال به میتوکندری باعث مهار فسفریلاسیون می‌شود. تغییرات ادماتو در نورون‌ها به علت اشکال در تولید ATP است. این مسأله ممکن است برگشت‌پذیر باشد. البته تغییرات نوروتوکسیک شدید و دایمی نیز دیده شده است (۸). تزریق این نوروتوکسین موجب دژنراسیون نورون‌های سیستم لیمبیک به خصوص نواحی دندریت جایروس و CA1 هیپوکامپ، پیاز بویایی و هسته آمیگدال شده و منجر به از بین رفتن قدرت یادگیری، حافظه فضایی و نقص شدید عملکردهای شناختی می‌شود (۹). بعد از تزریق TMT، ابتدا میکروگلیا و سپس آستروسیت‌ها نسبت به آن واکنش داده و فعال می‌شوند. زیرا آنها نسبت به شرایط نورولوژیکی چون آسیب‌های مغزی، بیماری‌های عفونی، ویروسی و نورودژنراتیو مانند آلزایمر بسیار حساس هستند (۱۰). حدود ۷۲ ساعت بعد از تزریق TMT علائمی چون لرزش، تحرک زیاد، پرخاشگری، کاهش وزن و کاهش تعداد نورون‌ها در هیپوکامپ، هسته آمیگدال و ساقه مغز مشاهده می‌شود (۱۱). علائم TMT مشابه علائم بیماری هیپوکسی-ایسکمی، آلزایمر و سایر بیماری‌های نورودژنراتیو است که در آن فقدان حافظه کوتاه مدت یک ویژگی مشخص در مراحل اولیه بیماری است (۱۲و۱۳). براساس مطالعات، استفاده از TMT دارای مشخصات خوبی به عنوان یک مدل دژنراتیو است و یک روش پیشنهادی مناسب در مطالعه روی تخریب نورونی، اختلال حافظه و

روش استریوتاکسی دریافت نمودند.

گروه درمان: پس از دریافت نورو توکسین، سلول‌های بنیادی را به روش استریوتاکسی دریافت کردند.

برای ایجاد مدل بیلوژیک آسیب هیپوکامپ، TMT به میزان ۸ mg/kg به روش داخل صفاقی تزریق شد (۴).

یک هفته پس از تزریق نورو توکسین، موش‌های گروه‌های شاهد و درمان با مخلوطی از ۱۰۰ mg/kg کتامین (SigmaChemical Co., Saint Louis, USA) و ۱۰ mg/kg زیلازین (SigmaChemical Co., Saint Louis, USA) بیهوش شدند (۴). سپس تحت جراحی استریوتاکسی قرار گرفتند و با استفاده از اطلس (Paxinos and Watson) مختصات نقطه CA1 هیپوکامپ سمت راست بر روی جمجمه موش مشخص گردید و پس از رسیدن به عمق مدنظر، بر طبق مختصات، تزریق انجام شد.

در گروه شاهد، پس از رسیدن به نقطه مورد نظر میزان ۴ میکرولیتر PBS به ناحیه CA1 هیپوکامپ سمت راست تزریق شد. و در گروه درمان نیز تعداد ۱۰۰۰۰۰ سلول در ۴ میکرولیتر PBS به ناحیه CA1 هیپوکامپ سمت راست تزریق گردید (۲۱).

مختصات CA1 هیپوکامپ براساس اطلس پاکسینوس (AP: -3/80, ML: 2/2, DV: 2/9): شش هفته پس از تزریق سلول (۷ هفته پس از تزریق نورو توکسین)، تست حافظه فضایی (ماز آبی مورس) بر روی موش‌ها انجام شد (۲۲).

مغز موش‌ها با پارافرمالدئید ۴ درصد به روش پرفیوژن داخل قلبی فیکس و خارج گردید و سرانجام برش‌هایی با ضخامت ۴ میکرون از قالب‌های پارافینی تهیه شد. این برش‌ها مورد مطالعه بافتی با استفاده از رنگ کرزیل و یوله (نیسل) قرار گرفت.

رنگ آمیزی نیسل (Nissl staining): برای بررسی تعداد سلول‌های سالم در ناحیه CA1 هیپوکامپ از رنگ آمیزی کرزیل و یوله استات ۰/۱ درصد استفاده شد. از این روش برای شناسایی نورو ن‌های سالم از تکروز شده در بافت مغز و طناب نخاعی استفاده می‌گردد. در این رنگ آمیزی سلول‌های سالم و طبیعی به صورت سلول‌های یوکروماتین گرد دیده می‌شوند (۲۳). از هر گروه ۳ سر موش و از هر موش تعداد ۳ برش برای رنگ آمیزی نیسل انتخاب گردید. بعد از تهیه عکس با استفاده از نرم‌افزار Olysia bio report شمارش سلولی در یک میلی‌متر مربع انجام شد.

برای بررسی حافظه فضایی از دستگاه Morris Water Maze استفاده شد. این دستگاه برای بررسی یادگیری و حافظه فضایی طراحی شده و شامل حوضچه استوانه‌ای سیاه رنگی به قطر ۱۳۶ سانتی‌متر و ارتفاع ۶۰ سانتی‌متر است که تقریباً تا ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر با آب ۲۰-۱۹ درجه سانتی‌گراد پر می‌شود. حوضچه به طور فرضی چهار ربع تقسیم می‌شود و سکوی کوچکی به قطر ۱۰

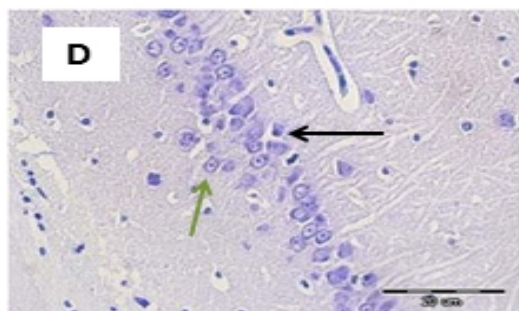
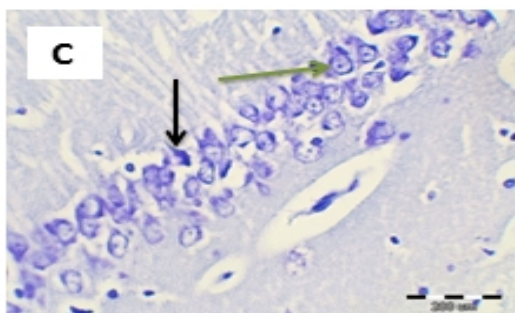
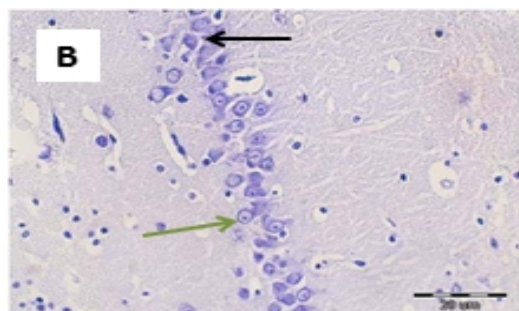
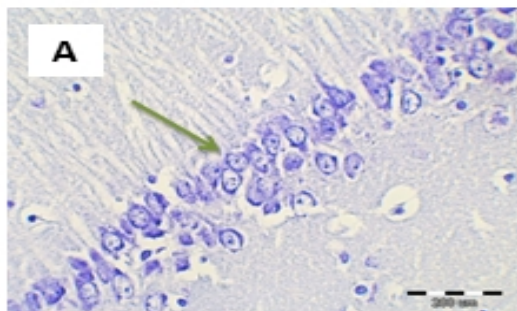
سانتی‌متر در حدود یک سانتی‌متر زیر آب، در مرکز یکی از چهار ربع دایره قرار می‌گیرد و حیوان می‌تواند برای فرار از آب روی آن قرار گیرد. در بالای حوضچه دوربین فیلمبرداری قرار دارد. یک فرستنده نور مادون قرمز به موش متصل و مسیر حرکت حیوان از طریق دوربین مدار بسته که نور مادون قرمز را ردیابی می‌کند؛ به کامپیوتر منتقل می‌شود. این بررسی شامل دو فاز آموزش و روز آزمون بود. مدت فاز یادگیری شامل چهار روز متوالی است. در هر روز حیوان از چهار ناحیه مختلف دایره به صورت تصادفی به آب انداخته شد و هر بار به حیوان ۶۰ ثانیه فرصت داده شد تا سکو را پیدا کند و در صورت پیدا نکردن سکو، حیوان توسط آزمایش کننده روی سکو قرار داده شد و پس از ۱۵ ثانیه استراحت بر روی سکو، حیوان از ناحیه دیگری به آب انداخته شد. در روز پنجم از حیوان آزمون گرفته شد. در این حالت سکو برداشته شد و میزان مسافتی که حیوان در ربع مربوط به سکو طی نمود؛ نشانه میزان یادگیری حیوان ارزیابی گردید. ارزیابی انجام گرفته در این تست شامل اندازه گیری زمان و مسافت طی شده برای رسیدن به سکوی مخفی بود.

جداسازی و کشت سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان: برای استخراج مغز استخوان، از یک سر موش صحرایی نر نژاد Wistar با سن تقریبی ۲ ماه استفاده شد. ابتدا حیوان توسط کلروفورم تحت بیهوشی عمیق قرار گرفت. سپس بافت‌های نرم اطراف استخوان‌های درشت‌نی و ران با اسکالپل و قیچی جدا شد و در زیر هود، دو سر استخوان بریده شد و با استفاده از یک سرنگ، ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco, Germany) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum; Gibco, Germany) و یک درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین - استرپتومایسین (Pen/Strep; Gibco, Germany) به داخل کانال استخوانی هدایت شد و محتویات مغز استخوان آن به داخل فلاسک تخلیه شد.

فلاسک حاوی سلول داخل انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با میزان ۵ درصد CO2 نگهداری شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت محیط کشت سلولی با محیط تازه تعویض گردید. محیط سلول‌ها هر ۳-۴ روز یک بار تعویض شد. زمانی که سلول‌ها در اثر تکثیر ۷۰ تا ۸۰ درصد کف فلاسک را پر کردند؛ با استفاده از محلول Trypsin / EDTA (Gibco, Germany) پاساژ داده شدند. تمامی سلول‌های پیوند شده در پاساژ چهارم بودند.

برای بررسی زنده بودن سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان از رنگ آمیزی تریپان بلو (Viability test) استفاده شد. در این رنگ آمیزی سوسپانسیون سلولی در PBS (Phosphate Buffer Saline; Gibco, Germany) تهیه شد و یک نمونه به میزان برابری با تریپان بلو ۰/۴ درصد رنگ آمیزی و با لام

نئوبار شمارش گردید. درصد سلول‌های زنده که در این رنگ آمیزی رنگ نگرفته بودند؛ از سلول‌های مرده که در اثر عدم کارایی غشای سلولی به رنگ آبی در آمده بودند (درصد توانایی زیستی)؛ توسط فرمول تعداد کل سلول‌ها تقسیم بر تعداد سلول‌های زنده ضرب در عدد ۱۰۰ مشخص گردید.



شکل ۲: سلول‌های ناحیه CAI هیپوکامپ در برش کرونال و با رنگ آمیزی کریزل ویوله در گروه‌های کنترل (A)، مدل (B)، درمان (C) و شاهد (D)

نوک پیکان سبز: نورون سالم دارای هسته سالم و یوکروماتین  
نوک پیکان سیاه: سلول پیکنوزه با هسته هتروکروماتین  
رنگ آمیزی نیسل (بزرگ‌نمایی ۴۰۰×)

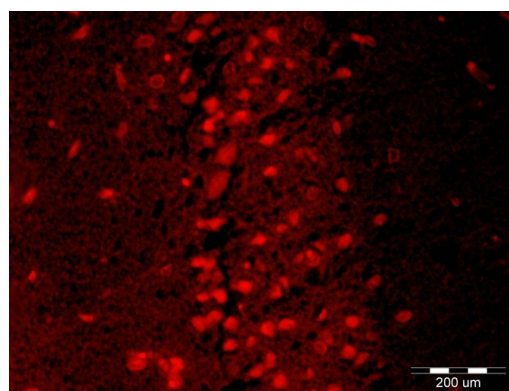
در رابطه با زمان طی شده برای رسیدن به سکوی مخفی، اختلاف آماری معنی‌داری در گروه‌های مدل (۳۷/۶۸±۱۷/۱۵) و شاهد (۲۷/۲۹±۱۴/۹۴) نسبت به گروه کنترل (۴۰/۱۴±۱۴/۸۹)

نشان دار کردن سلول‌ها با رنگ Dil: سلول‌ها قبل از تزریق توسط رنگ فلورسنت رنگ (Invitrogen™ c7000 CM-Dil)، که سیتوپلاسم سلول‌ها را رنگ می‌کند؛ نشاندار شدند. برای تهیه محلول اولیه ۵۰ میکروگرم رنگ در ۵۰ میکرولیتر DMSO با غلظت نهایی یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر حل و به فلاسک حاوی سلول اضافه گردید. سپس سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از گذشت این زمان، فلاسک حاوی سلول از انکوباتور خارج و به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (برای افزایش نفوذپذیری سلول‌ها به رنگ) قرار داده شدند و آنگاه محیط کشت به سلول‌ها اضافه شد.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-16 و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند و در موارد معنی‌دار بودن اختلاف، از آزمون توکی استفاده شد. سطح معنی‌داری آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

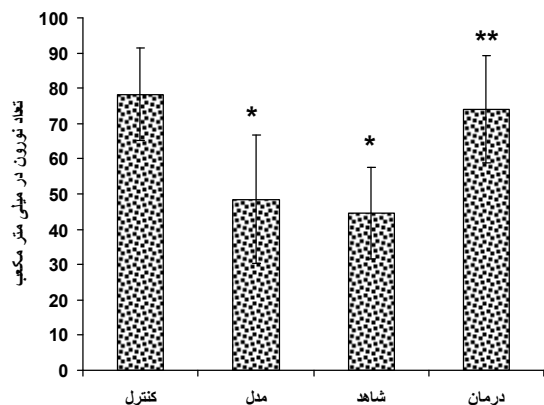
نتایج حاصل از رنگ آمیزی تریپان‌بلو نشان داد که بیش از ۹۷ درصد سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان رنگ نگرفته و زنده هستند. حضور سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان پیوندی باقی مانده در محل ضایعه در شکل یک قابل مشاهده است (شکل یک).



شکل ۱: سلول‌های نشاندار شده با رنگ فلورسنت Dil در ناحیه CAI هیپوکامپ (بزرگ‌نمایی ۴۰۰×)

با توجه به نتایج آزمون رفتاری، گروه‌های مدل (۴۰۷/۹۸±۲۲۵/۴۴) و شاهد (۴۳۸/۱۸±۱۹۲/۵۶) مسافت بیشتری را برای رسیدن به سکوی مخفی در مقایسه با گروه کنترل





نمودار ۴: تعداد سلول‌های یوکروماتین ناحیه CA1 هیپوکامپ در گروه‌های مورد مطالعه  
\*  $P < 0.05$  گروه‌های مدل و شاهد نسبت به گروه کنترل  
\*\*  $P < 0.05$  گروه درمان نسبت به گروه‌های مدل و شاهد

در روز آزمون میزان مسافت طی شده در ربع هدف در گروه‌های مدل ( $588/51 \pm 136/94$ ) و شاهد ( $546/48 \pm 86/47$ ) نسبت به گروه کنترل ( $811/32 \pm 135/78$ ) کاهش آماری معنی‌داری یافت ( $P < 0.05$ ) و گروه درمان ( $799/8 \pm 125/91$ ) نیز نسبت به گروه‌های مدل و شاهد، مسافت بیشتری را در ربع هدف سپری کرد ( $P < 0.05$ ) (نمودار ۳).

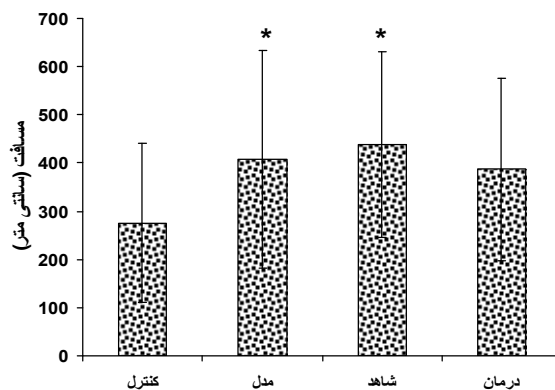
نتایج حاصل از شمارش سلول‌های سالم به دنبال رنگ‌آمیزی نیسل: تزریق نوروتوکسین در گروه‌های مدل ( $48/56 \pm 18/105$ ) و شاهد ( $44/67 \pm 12/971$ )، منجر به کاهش تعداد سلول‌های یوکروماتین در ناحیه هیپوکامپ شد و این کاهش در مقایسه با گروه کنترل ( $78/22 \pm 13/113$ ) معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ). همچنین پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان باعث افزایش تعداد سلول‌های سالم و یوکروماتین در گروه درمان ( $74 \pm 15/19$ ) شد که این افزایش در مقایسه با گروه‌های شاهد و مدل از نظر آماری معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ) (شکل ۲) (نمودار ۴).

### بحث

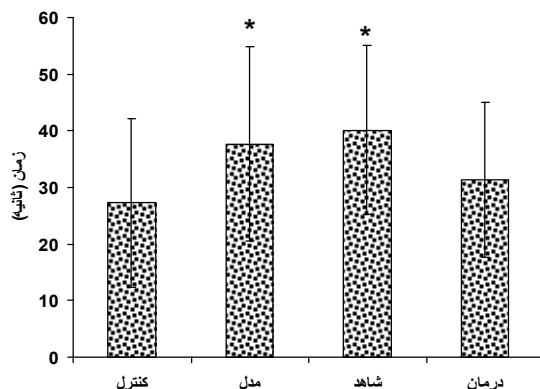
با توجه به نتایج این مطالعه پیوند سلولی باعث افزایش تعداد سلول‌های پیرامیدال ناحیه CA1 هیپوکامپ و بهبود الگوی رفتاری حیوانات به دنبال آسیب آن گردید.

آسیب هیپوکامپ به دنبال تزریق TMT در موش‌های صحرایی به صورت تخریب نورون‌های پیرامیدال ناحیه CA1 و گرانولر DG، نکروز نورونی، آپاپتوز و همچنین افزایش بیان GFAP مشاهده می‌گردد (۲۴ و ۴). نتایج به دست آمده از رنگ‌آمیزی نیسل پس از القای TMT در گروه مدل مطالعه حاضر نیز کاهش سلول‌های سالم را در ناحیه هیپوکامپ نشان داد که دلیل واضحی بر وجود تخریب نورونی در این ناحیه از مغز به دنبال تزریق این نوروتوکسین است. همچنین تزریق TMT باعث آسیب‌های رفتاری به دنبال انجام

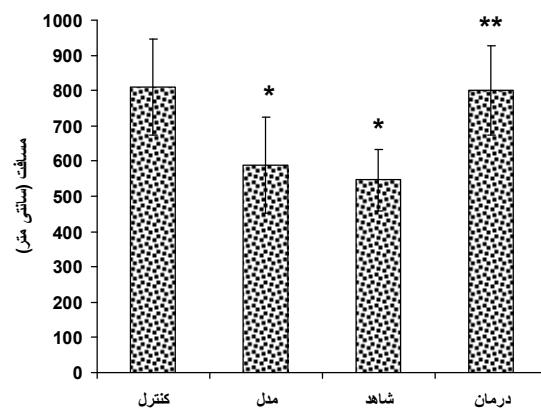
مشاهده شد ( $P < 0.05$ ) و گروه‌های مدل و شاهد زمان بیشتری را برای رسیدن به سکوی مخفی سپری کردند. همچنین گروه درمان ( $31/3 \pm 13/67$ ) به دنبال پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان زمان کمتر غیرمعنی‌داری را نسبت به گروه‌های مدل و شاهد برای رسیدن به سکوی مخفی سپری نمود (نمودار ۲).



نمودار ۱: مسافت طی شده برای رسیدن به سکوی مخفی در روزهای آموزش در گروه‌های مورد مطالعه  
\*  $P < 0.05$  گروه‌های مدل و شاهد نسبت به گروه کنترل



نمودار ۲: زمان طی شده برای رسیدن به سکوی مخفی در روزهای آموزش در گروه‌های مورد مطالعه  
\*  $P < 0.05$  گروه‌های مدل و شاهد نسبت به گروه کنترل



نمودار ۳: مسافت طی شده در ربع هدف در روز آزمون در گروه‌های مورد مطالعه  
\*  $P < 0.05$  گروه‌های مدل و شاهد نسبت به گروه کنترل  
\*\*  $P < 0.05$  گروه درمان نسبت به گروه‌های مدل و شاهد

نشان دادند که پیوند داخل مغزی MSCs در مدل حیوانی سکنه مغزی، تکثیر NSCs اندوژنوس را افزایش داد و از مرگ سلول‌ها جلوگیری نمود و بهبود عملکردی را سبب شد (۳۵).

سلول‌های استرومایی مغز استخوان باعث افزایش نورون‌های کولینرژیک می‌شود (۳۶) و سیستم کولینرژیک، دوپامینرژیک و سروتونرژیک نقش مهمی در فرآیند یادگیری و حافظه دارد (۳۷). در مطالعه Munoz و همکاران پیوند سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان (MSCs) باعث افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی (NSCs) ساکن در هیپوکامپ گردید. سلول‌های تازه تولید شده نیز قادرند مارکرهای نورونی و آستروسیتی را بیان کنند (۲۱).

Omprakash و همکاران سلول‌های آمینیونی انسانی (Human Amniotic Epithelial Cells) را به داخل هیپوکامپ موش صحرایی پس از تزریق TMT، پیوند کردند. مطالعات بافتی آنها نشان داد که پس از پیوند سلول‌ها نورون‌های نواحی CA1 و CA3 تا نزدیک به سطح طبیعی بازسازی شدند (۲۰). همچنین مطالعات نشان داده است که تزریق داخل وریدی BMSC، باعث بهبود معنی‌داری در عملکرد موش‌های صحرایی مدل سکنه مغزی می‌شود (۳۸).

در مطالعه Wu و همکاران پیوند سلول‌های استرومایی مغز استخوان (MSCs) به موش مدل آلزایمری، باعث بهبود عملکرد شناختی و یادگیری شد. همچنین نتایج مطالعات بافتی، افزایش تعداد نورون‌ها را در گروه دریافت کننده سلول نشان داد (۳۶). بررسی رفتاری مطالعه حاضر نیز نشان داد که پیوند سلولی ممکن است در بهبود حافظه فضایی مؤثر باشد.

Chen و همکاران نیز در مطالعه‌ای مشابه، سلول‌های استرومایی مغز استخوان (MSCs) را به داخل مغز موش صحرایی مدل ایسکمی مغزی پیوند زدند. مطالعات بافتی آنها نشان داد که سلول‌های پیوندی زنده مانده و به سلول‌های عصبی متمایز شدند. همچنین تست رفتاری انجام شده، بهبود عملکرد رفتاری گزارش گردید (۳۰) که موافق با نتایج حاصله در مطالعه حاضر است. مطالعات نشان داده پس از پیوند داخل مغزی این سلول‌ها، هیچ اثری از عفونت یا رد پیوند مشاهده نشده و با توجه دسترسی آسان و تکثیر زیاد در محیط کشت می‌توانند منبع مناسبی برای پیوند سلولی محسوب شوند. همچنین بیماران می‌توانند از سلول‌های مغز استخوان خود استفاده کرده و در این صورت مشکلات احتمالی ایمنی و پس‌زدگی پیوند ایجاد نمی‌شود (۳۹).

### نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه در تایید مطالعات قبلی نشان داد که پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان می‌تواند به عنوان یک روش درمانی مناسب در بهبود آسیب‌های وارده به هیپوکامپ در

آزمون‌های رفتاری مانند ماز آبی موریس و passive avoidance می‌شود (۲۵).

در حدود ۷۲ ساعت پس از تزریق TMT علامتی چون هایپراکتیویته، تشنج، لرزش، کاهش وزن و نیز پرخاشگری در موش‌ها مشاهده می‌شود (۲۶) که این علائم در حیوانات مطالعه حاضر مشاهده گردید.

به دنبال برخی اختلالات نورولوژیکی چون ایسکمی گلوبال گذرا و صرع تکثیر پیش‌سازهای نورونی در هیپوکامپ موش صحرایی بالغ صورت می‌گیرد. این تکثیر نورونی (نورونرژ) پاسخی برای مقابله با آسیب وارده به هیپوکامپ است. اگرچه این پاسخ ترمیمی برای جبران آسیب وارده کافی نبوده و علیرغم تحریک نورونرژ و بازسازی نورونی ترمیم قابل توجهی در هیپوکامپ موش صحرایی رخ نمی‌دهد. به همین دلیل باید به دنبال درمان‌های جایگزینی نورونی در بسیاری از بیماری‌های نورودژنراتیو و دیگر آسیب‌های سیستم عصبی مرکزی بود (۴).

مغز استخوان بالغین محتوی سلول‌های بنیادی و پیش‌ساز است که دارای پتانسیل تمایزی چندگانه هستند (۲۷). سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان (BMSCs) انسان و موش صحرایی بالغ قادرند در شرایط *in vitro* به نورون متمایز شوند (۲۸).

در مطالعه Lee و همکاران BMSCs موش در سیستم عصبی مرکزی آسیب دیده مهاجرت کرد و به نورون‌ها و آستروسیت‌ها تمایز یافت (۲۹). بهبود عملکرد ایجاد شده به دنبال پیوند داخل مغزی BMSCs، ممکن است بیشتر به دلیل عوامل رشدی و سیتوکین‌های مترشحه از این سلول‌ها باشد تا تمایز مستقیم آنها به سلول‌های عصبی (۳۰).

پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی باعث افزایش بیان عوامل رشد توسط سلول‌های ساکن در مغز و نیز منجر به تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی عصبی درون‌زاد (NSCs) به سلول‌های عصبی می‌گردد (۲۱). همچنین عوامل مترشحه از MSCs ممکن است روی آستروسیت‌های مجاور اثر گذارد و فعالیت آستروسیت‌ها نیز می‌تواند باعث افزایش نورونرژ شود؛ زیرا آستروسیت‌ها در مجاورت NSCs هیپوکامپ قرار دارند (۳۱) و عواملی را ترشح می‌کنند که به‌طور مستقل می‌تواند نورونرژ را افزایش دهد (۳۲).

MSCs با ترشح سیتوکین‌ها و عوامل رشدی نظیر NGF، BDNF و VEGF با فعالیت‌های پاراکرین، باعث کاهش نکروز و محافظت از سلول‌های تازه تولید شده می‌شود (۳۳ و ۳۴).

در این مطالعه نیز به دنبال پیوند سلولی در گروه درمان تراکم سلول‌های سالم در ناحیه CA1 هیپوکامپ نسبت به گروه‌های مدل و شاهد بیشتر بود. این امر می‌تواند به دلیل ترشح عوامل رشدی باشد که از MSCs ترشح شده‌اند. در مطالعه‌ای مشابه Yoo و همکاران

پزشکی تهران بود. بدین وسیله از همه مسئولین آزمایشگاه علوم اعصاب، گروه علوم تشریحی و مرکز تحقیقات سلولی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران سپاسگزاری می‌گردد.

بسیاری از بیماری‌های سیستم عصبی مرکزی مؤثر باشد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه سهیلا مددی درگاهی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته آناتومی از دانشکده پزشکی دانشگاه علوم

### References

- Eichenbaum H, Yonelinas AR, Ranganath C. The medial temporal lobe and recognition memory. *Annu Rev Neurosci*. 2007;30:123-52.
- Annane D. Hippocampus: a future target for sepsis treatment. *Eur J Intensive Care Med*. 2009; 35(4):585-6.
- Altman J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*. 1962 Mar;135(3509):1127-8.
- Corvino V, Geloso MC, Cavallo V, Guadagni E, Passalacqua R, Florenzano F, et al. Enhanced neurogenesis during trimethyltin-induced neurodegeneration in the hippocampus of the adult rat. *Brain Res Bull*. 2005 May;65(6):471-7.
- Taupin P. The hippocampus: neurotransmission and plasticity in the nervous system. 1<sup>st</sup>. New York: Nova Biomedical Books. 2008; pp:20-25.
- Jin K, Peel AL, Mao XO, Xie L, Cottrell BA, Henshall DC, et al. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 Jan;101(1):343-7.
- Liu M, Sun A, Shin EJ, Liu X, Kim SG, Runyons CR, et al. Expression of microsomal epoxide hydrolase is elevated in Alzheimer's hippocampus and induced by exogenous beta-amyloid and trimethyl-tin. *Eur J Neurosci*. 2006 Apr;23(8):2027-34.
- Fechter LD, Young JS, Nuttall AL. Trimethyltin ototoxicity: evidence for a cochlear site of injury. *Hear Res*. 1986;23(3):275-82.
- Fiedorowicz A, Figiel I, Zaremba M, Dzwonek K, Oderfeld-Nowak B. The ameboid phenotype of NG2 (+) cells in the region of apoptotic dentate granule neurons in trimethyltin intoxicated mice shares antigen properties with microglia/macrophages. *Glia*. 2008 Jan;56(2):209-22.
- McCann MJ, O'Callaghan JP, Martin PM, Bertram T, Streit WJ. Differential activation of microglia and astrocytes following trimethyl tin-induced neurodegeneration. *Neuroscience*. 1996 May; 72(1):273-81.
- Vogel W, Grünebach F, Messam CA, Kanz L, Brugger W, Bühring HJ. Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. *Haematologica*. 2003 Feb;88(2):126-33.
- Martin F, Corrigan FM, Donard OF, Kelly J, Besson JA, Horrobin DF. Organotin compounds in trimethyltin-treated rats and in human brain in Alzheimer's disease. *Hum Exp Toxicol*. 1997 Sep;16(9):512-5.
- Morita M, Imai H, Liu Y, Xu X, Sadamatsu M, Nakagami R, et al. FK506-protective effects against trimethyltin neurotoxicity in rats: hippocampal expression analyses reveal the involvement of periarterial osteopontin. *Neuroscience*. 2008 Jun;153(4):1135-45.
- Ishida N, Akaike M, Tsutsumi S, Kanai H, Masui A, Sadamatsu M, et al. Trimethyltin syndrome as a hippocampal degeneration model: temporal changes and neurochemical features of seizure susceptibility and learning impairment. *Neuroscience*. 1997 Dec;81(4):1183-91.
- Casalbore P, Barone I, Felsani A, D'Agnano I, Michetti F, Maira G, et al. Neural stem cells modified to express BDNF antagonize trimethyltin-induced neurotoxicity through PI3K/Akt and MAP kinase pathways. *J Cell Physiol*. 2010 Sep;224(3): 710-21.
- Ogita K, Nishiyama N, Sugiyama C, Higuchi K, Yoneyama M, Yoneda Y. Regeneration of granule neurons after lesioning of hippocampal dentate gyrus: evaluation using adult mice treated with trimethyltin chloride as a model. *J Neurosci Res*. 2005 Dec; 82(5):609-21.
- Macklis JD. Transplanted neocortical neurons migrate selectively into regions of neuronal degeneration produced by chromophore-targeted laser photolysis. *J Neurosci*. 1993 Sep; 13(9):3848-63.
- Lee JK, Jin HK, Bae JS. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduce brain amyloid-beta deposition and accelerate the activation of microglia in an acutely induced Alzheimer's disease mouse model. *Neurosci Lett*. 2009 Jan;450(2):136-41.
- Solchaga LA, Lazarus HM. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. 2<sup>nd</sup>. New York: Allogeneic Stem Cell Transplantation: Springer. 2010; pp:477-90.
- Omprakash K, Muthusamy R, Devanand B, Puranik KN, Kumar RR, Gurushanthaiah M. Human amniotic epithelial (HAE) cell grafts restore cell numbers in a rat model after trimethyltin chloride (TMT)-induced lesion. *Current Neurobiology*. 2011; 2(2):107-12.
- Munoz JR, Stoutenger BR, Robinson AP, Spees JL, Prockop DJ. Human stem/progenitor cells from bone marrow promote neurogenesis of endogenous neural stem cells in the hippocampus of mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005 Dec;102(50):18171-6.
- Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol*. 2002 Mar;174(1):11-20.
- Erdoğan S, Sağsöz H, Akbalik ME. Anatomical and histological structure of the tongue and histochemical characteristics of the lingual salivary glands in the Chukar partridge (*Alectoris chukar*, Gray 1830). *Br Poult Sci*. 2012;53(3):307-15.
- Yoneyama M, Nishiyama N, Shuto M, Sugiyama C, Kawada K, Seko K, et al. In vivo depletion of endogenous glutathione facilitates trimethyltin-induced neuronal damage in the dentate gyrus of mice by enhancing oxidative stress. *Neurochem Int*. 2008 Mar-Apr;52(4-5):761-9.
- Halladay AK, Wilson DT, Wagner GC, Reuhl KR. Trimethyltin-induced alterations in behavior are linked to changes in PSA-NCAM expression. *Neurotoxicology*. 2006 Mar;27(2):137-46.
- Kawada K, Yoneyama M, Nagashima R, Ogita K. In vivo acute treatment with trimethyltin chloride causes neuronal degeneration in the murine olfactory bulb and anterior olfactory nucleus by different cascades in each region. *J Neurosci Res*. 2008 May;86(7):1635-46.
- Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997 Apr;276(5309):71-4.
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and

human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*. 2000 Aug;61(4):364-70.

29. Lee J, Kuroda S, Shichinohe H, Ikeda J, Seki T, Hida K, et al. Migration and differentiation of nuclear fluorescence-labeled bone marrow stromal cells after transplantation into cerebral infarct and spinal cord injury in mice. *Neuropathology*. 2003 Sep;23(3):169-80.

30. Chen J, Li Y, Wang L, Lu M, Zhang X, Chopp M. Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *J Neurol Sci*. 2001 Aug;189(1-2):49-57.

31. Song H, Stevens CF, Gage FH. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature*. 2002 May;417(6884):39-44.

32. Rudge JS, Alderson RF, Pasnikowski E, McClain J, Ip NY, Lindsay RM. Expression of Ciliary Neurotrophic Factor and the Neurotrophins-Nerve Growth Factor, Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin 3-in Cultured Rat Hippocampal Astrocytes. *Eur J Neurosci*. 1992;4(6):459-471.

33. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells*. 2007 Nov;25(11):2896-902.

34. Lee JS, Hong JM, Moon GJ, Lee PH, Ahn YH, Bang OY;

STARTING collaborators. A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke. *Stem Cells*. 2010 Jun;28(6):1099-106.

35. Yoo SW, Kim SS, Lee SY, Lee HS, Kim HS, Lee YD, et al. Mesenchymal stem cells promote proliferation of endogenous neural stem cells and survival of newborn cells in a rat stroke model. *Exp Mol Med*. 2008 Aug;40(4):387-97.

36. Wu QY, Li J, Feng ZT, Wang TH. Bone marrow stromal cells of transgenic mice can improve the cognitive ability of an Alzheimer's disease rat model. *Neurosci Lett*. 2007 May;417(3):281-5.

37. Biessels GJ, Kerssen A, de Haan EH, Kappelle LJ. Cognitive dysfunction and diabetes: implications for primary care. *Prim Care Diabetes*. 2007 Dec;1(4):187-93.

38. Li Y, Chen J, Chen XG, Wang L, Gautam SC, Xu YX, et al. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology*. 2002 Aug;59(4):514-23.

39. Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats—similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998 Mar;95(7):3908-13.



## Original Paper

## Effect of bone marrow mesenchymal stem cells on memory and neuronal cells number in the trimethyltin chloride damaged hippocampus

Madadi Dargahi S (M.Sc)<sup>1</sup>, Eftekharzadeh M (Ph.D)<sup>2</sup>, Mahdipour A (M.Sc)<sup>3</sup>  
Soleimani M (Ph.D)<sup>4</sup>, Mehdizadeh M (Ph.D)<sup>\*5</sup>

<sup>1</sup>M.Sc in Anatomy, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

<sup>2</sup>Assistant Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

<sup>3</sup>Ph.D Candidate in Tissue Engineering, Department of Tissue Engineering, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. <sup>4</sup>Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. <sup>5</sup>Professor, Cellular and Molecular Research Center, Department of Anatomy, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

---

### Abstract

**Background and Objective:** Stem cells are a suitable treatment method for improvement of central nervous system diseases. Neuron regeneration is occur in damaged region using stem cell transplantation. This study was done to determine the effect of bone marrow mesenchymal stem cells on memory and neuronal cells graft number in the trimethyltin chloride damaged hippocampus.

**Methods:** In this experimental study, 28 wistar male rats were allocated into four groups including control, model, Vehicle and treatment groups. Animals were received 8 mg/kg/bw of neurotoxin trimethyltin chloride by the intraperitoneal injection for causing damaged in hippocampus. One week after intraperitoneal injection of trimethyltin chloride, stem cells was injected by stereotaxy method. Six weeks after stem cells injection, the spatial memory was assessed by Morris water maze and histological studies were done by Nissl staining and normal cells count by Olysia bio report software.

**Results:** After bone marrow mesenchymal stem cells graft, the number of normal cells were more in the treatment group ( $74 \pm 15.190$ ) in compared to the Vehicle ( $44.67 \pm 12.971$ ) and Model ( $48.56 \pm 18.105$ ) groups ( $P < 0.05$ ). Also in Morris water maze test, the treatment group ( $387.35 \pm 189.18$ ), ( $31.30 \pm 13.67$ ) spent shorter distance and escape latency to reach the hidden platform, but this reduced non significantly in compared to Vehicle ( $438.18 \pm 192.56$ ), ( $40.14 \pm 14.89$ ) and model ( $407.98 \pm 225.44$ ), ( $37.68 \pm 17.15$ ) groups. The model and Vehicle groups spent longer distance to reach the hidden platform in comparison with the control ( $275.45 \pm 165.10$ ) group ( $P < 0.05$ ). Also the traveled distance in target quarter had significant increased in the treatment groups ( $799.80 \pm 125.91$ ) in compared to model ( $588.51 \pm 136.94$ ) and Vehicle ( $546.48 \pm 86.47$ ) groups ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** Using the bone marrow mesenchymal stem cells leads to reduce hippocampal lesions and increase the number of pyramidal neurons and improving memory in damaged hippocampus in animal model.

**Keywords:** Neurogenesis, Bone marrow mesenchymal stem cells, Hippocampus, Trimethyltin chloride, Spatial memory

---

\* Corresponding Author: Mehdizadeh M (Ph.D), E-mail: mehdizadeh.m@iums.ac.ir

Received 1 Jul 2014

Revised 31 Aug 2014

Accepted 28 Oct 2014

Cite this article as: Madadi Dargahi S, Eftekharzadeh M, Mahdipour A, Soleimani M, Mehdizadeh M. [Effect of bone marrow mesenchymal stem cells on memory and neuronal cells number in the trimethyltin chloride damaged hippocampus]. J Gorgan Uni Med Sci. 2015; 17(1): 14-22. [Article in Persian]