

بررسی میزان آپوپتوز در سلول‌های هیپوکامپ به دنبال تزریق داخل وریدی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در مدل ایسکمی - ریپرفیوژن موش صحرایی

باقر پورحیدر^۱، مریم شاهی*^۲، غلامحسین فرجاه^۳، معصومه جوانمرد^۴، مجتبی کریمی پور^۵، فاطمه اتابکی^۶

تاریخ دریافت 1393/03/01 تاریخ پذیرش 1393/05/21

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: ایسکمی مغزی به‌عنوان یک معضل بزرگ جهانی شناخته شده است و ریپرفیوژن متعاقب آن در نهایت منجر به مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی یا آپوپتوز می‌گردد. نواحی مشخصی از مغز و انواع خاصی از نورون‌ها از جمله نورون‌های هرمی ناحیه CA1 هیپوکامپ نسبت به ایسکمی مغزی حساس‌ترند. یکی از روش‌های درمانی که امروزه به‌طور شایع در بین محققین رواج دارد سلول درمانی (cell therapy) می‌باشد. لذا در این مطالعه برآن شدیم تا میزان آپوپتوز در سلول‌های هیپوکامپ را پس از تزریق داخل وریدی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (BMSCs) در مدل ایسکمی - ریپرفیوژن موردبررسی قرار دهیم

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۴۰ سر موش صحرایی نر بالغ با وزن ۲۵۰-۳۰۰ گرم به‌طور تصادفی به پنج گروه هشت‌تایی تقسیم شدند که شامل گروه‌های کنترل، شم، ایسکمی، vehicle، treatment بودند گروه شم متحمل استرس جراحی بدون مسدود کردن شریان‌های کاروتید مشترک شد. در گروه ایسکمی شریان‌های کاروتید مشترک هردو طرف به مدت بیست دقیقه مسدود شده و سپس مجدداً جریان خون برقرار شد. در گروه vehicle ایسکمی ایجاد شده و پس از ۷ روز ۳۰ μl PBS از طریق ورید دمی تزریق شد. در گروه treatment ایسکمی ایجاد شد و پس از ۷ روز سلول‌های BMSC به تعداد ۸۰۰ هزار در ۳۰ μl سوسپانسیون سلولی از طریق ورید دمی تزریق شد. ۷۲ ساعت قبل از تزریق سلول‌ها با BrdU نشان‌دار شدند. در روز ۱۲ پس از ایسکمی با روش پرفیوژن داخل قلبی و با پارافرمالدئید ۴ درصد موش‌ها فیکس شدند و مغز آن‌ها خارج گردید و پس از پردازش بافتی برش‌های ۵ میکرونی تهیه شد. جهت شناسایی سلول‌های BMSC بررسی ایمونوهیستوشیمی با آنتی‌بادی Anti-BrdU انجام شد. برای نشان دادن سلول‌های آپوپتوتیک از رنگ‌آمیزی تانل استفاده شد. یافته‌ها: در نمونه‌های ایسکمی ایندکس آپوپتوز ۴۲/۳۷ درصد مشاهده شد که این میزان در گروه درمان ۲۲/۶۱ درصد بود این یافته‌ها نشان می‌دهند که میزان آپوپتوز در گروه تحت درمان با سلول‌های بنیادی مغز استخوان در مقایسه با گروه ایسکمی بسیار کمتر بود نتیجه‌گیری: ایسکمی - ریپرفیوژن به مدت ۲۰ دقیقه باعث آسیب و مرگ نورونی وسیع در هیپوکامپ به‌ویژه در ناحیه CA1 می‌شود و تزریق سلول‌های بنیادی مغز استخوان به‌طور معنی‌داری موجب کاهش تعداد نورون‌های آپوپتوتیک می‌گردد. واژگان کلیدی: ایسکمی - ریپرفیوژن، هیپوکامپ، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، آپوپتوز

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و پنجم، شماره هفتم، ص ۵۹۷-۵۸۶، مهر ۱۳۹۳

آدرس مکاتبه: ارومیه، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، دانشکده پزشکی، تلفن: ۰۴۴-۳۲۷۸۰۸۰۳

Email: bpourheydar@yahoo.com

مقدمه

ایسکمی مغزی^۷ عبارت است از کاهش میزان متابولیت‌های مغزی در اثر کاهش جریان خون که به کاهش ذخیره اکسیژن و در نتیجه مرگ بافت مغزی یا سکنه مغزی منجر می‌شود (۱،۲).

^۱ استادیار علوم تشریحی، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی ارومیه، مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشگاه پزشکی ارومیه

^۲ دانشجوی کارشناسی ارشد آناتومی دانشکده پزشکی ارومیه، (نویسنده مسئول)

^۳ استادیار علوم تشریحی، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی ارومیه، مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشگاه پزشکی ارومیه

^۴ استادیار علوم تشریحی، گروه علوم تشریحی، دانشگاه پزشکی ارومیه

^۵ دانشیار علوم تشریحی، گروه علوم تشریحی، دانشگاه پزشکی ارومیه

^۶ استادیار علوم تشریحی، گروه علوم تشریحی، دانشگاه پزشکی ارومیه

cerebral ischemia ۷

مغزی تحت مطالعه دانشمندان است هدف اصلی این درمان‌ها جلوگیری از بین رفتن نورون‌های بیشتر یا (Neurostoration) و جایگزین شدن نورون‌های جدید (Neurogenesis) می‌باشد که این دو موجب بهبود عملکردی بعد از ایسکمی خواهد شد (۱۱).

یکی از راه‌های درمانی که امروزه به‌طور شایع در بین محققین رواج دارد سلول درمانی (cell therapy) می‌باشد. در این روش سلول‌های بنیادی در محل ضایعه و یا از طریق داخل وریدی تزریق می‌شود. این سلول‌ها موجب ایجاد نورون‌های جدید (Neurogenesis) و ایجاد رگ‌های تازه (Angiogenesis) (۱۲) و در کل موجب بهبود عملکردی می‌گردند. محققین از مختلف انواعی از سلول‌های بنیادی برای درمان ایسکمی مغزی استفاده می‌کنند ولی از بین این سلول‌ها سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (BMSC) نسبت به انواع دیگر سلول‌ها از مزایای ویژه‌ای برخوردارند که عبارت‌اند از: ۱- اینکه این سلول‌ها قابل دسترسی بوده و می‌شود آن‌ها را از مغز استخوان تهیه کرد و کشت داد و در پیوند سلولی استفاده کرد. ۲- این سلول‌ها از قدرت تکثیر بالایی برخوردارند و به‌سرعت تکثیرشده و به محل ضایعات سیستم عصبی مرکزی مهاجرت می‌کنند (۱۳) ۳- اینکه این سلول‌ها Allogenic هستند و Non-immunogenic می‌باشند لذا سیستم ایمنی را تحریک نکرده و ریسک دفع پیوند بسیار پایینی دارند (۱۴).

مطالعات اخیر نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (BMSC) به‌طور طبیعی قادرند به استئوسیت، کندروسیت، آدیپوسیت، میوسیت، آستروسیت، نورون و سلول‌های اندوتلیال متمایز شوند (۱۵ و ۱۶) همچنین پژوهشگران بر این باورند که موجب بقای سلول‌های عصبی شده و از آپوپتوز آن‌ها جلوگیری می‌کنند و از این طریق موجب بهبود عملکردی و رفتاری در آن‌ها می‌شود (۲۱-۱۷).

این یافته‌ها نشان می‌دهد که سلول‌های BMSC از طریق ترشح فاکتورهای نوروتروفیک و نیز افزایش میزان نوروتزیس سبب بقای نورون‌ها شده و از این طریق موجب بهبود عملکردی در ضایعات مختلف سیستم عصبی می‌شوند. در ایسکمی مغزی هم از آنجاکه نورون‌ها در اثر تولید رادیکال‌های آزاد دچار آپوپتوز می‌شوند و مطالعات نشان می‌دهند که تزریق سلول‌های BMSC موجب آزاد شدن فاکتورهای نوروتروفیک می‌شوند که موجب بقای نورون‌ها می‌گردد و نیز از آنجاکه در جستجوهای خود ما به مقاله‌ای که در آن میزان آپوپتوز بعد از پیوند سلول‌های BMSC در این نوع مدل ایسکمی - ریپرفیوژن برخورد نکرده‌ایم لذا در این مطالعه بر آن شدیم پس از ایجاد مدل ایسکمی - ریپرفیوژن و پیوند

ایسکمی مغزی به‌عنوان یکی از ناتوان‌کننده‌ترین حوادث مغزی شناخته شده است (۳) که بعد از سرطان و سکته قلبی از دلایل عمده مرگ‌ومیر در جهان و اولین عامل از کارافتادگی افراد بالای ۶۵ سال می‌باشد. عوامل مختلفی در ایجاد ایسکمی مغزی نقش دارند که عبارت‌اند از: ایست قلبی، آترواسکلروز، حوادث ترومبوامبولیتیک، انقباض عروق، اختلالات مادرزادی قلب، فشارخون پایین، ضربات وارده به سر، آنمی داسی شکل، خفگی و برخی از تومورها و ... (۵،۴).

ایسکمی مغزی منجر به اختلالات عصبی نظیر اختلالات حرکتی، حسی، بینایی، اختلال در تکلم^۱ (۶) و نقایص شناختی^۲، فراموشی^۳ و اختلال در یادگیری فضایی^۴ و حافظه می‌گردد (۷).

ایسکمی مغزی باعث کاهش میزان اکسیژن در سلول‌ها و در نتیجه موجب کاهش ATP در آن‌ها می‌شود و به دنبال آن میزان برداشت رادیکال‌های آزاد کاهش می‌یابد در این حالت سلول‌ها برای بقای خود از تنفس بی‌هوازی برای تولید ATP استفاده می‌کنند که این باعث تجمع لاکتات می‌شود تجمع لاکتات موجب اسیدوز شده و به همراه افزایش میزان رادیکال‌های آزاد موجب مرگ سلولی می‌شود.

در اثر بازگشت مجدد خون (ریپرفیوژن) به بافت پس از ایسکمی، آسیب ثانویه‌ای ایجاد می‌شود که به‌مراتب بیشتر از ایسکمی تنهاست. به‌عبارت‌دیگر در اثر بازگشت مجدد خون به بافت رادیکال‌های آزاد اکسیژن و سایر اکسیداتیوها و رادیکال‌های هیدروکسیل (OH-) تولید می‌شوند که به بافت هدف حمله کرده و به‌شدت به آن آسیب می‌رساند و باعث تخریب سلولی با شدت بیشتری نسبت به ایسکمی می‌شود (۹،۸).

نواحی مشخصی از مغز و انواع خاصی از نورون‌ها نسبت به ایسکمی حساس‌ترند که از جمله نورون‌های پیرامیدال ناحیه CA1 هیپوکامپ از این نواحی می‌باشند. این ناحیه از مغز توسط شریان کرونیدی قدامی که شاخه‌ای از کاروتید داخلی می‌باشد خون‌رسانی می‌شود این شریان به علت بلند و نازک بودن مستعد ترومبوزیس است و بنابراین هیپوکامپ جزو اولین مناطقی از مغز است که در بیماری‌های مغزی مثل ایسکمی مغزی، ترومای مغزی، صرع، آلزایمر و هانتینگتون دچار آسیب می‌شود (۱۰).

با توجه به نقش حیاتی هیپوکامپ در تشکیل حافظه جدید و تجزیه و تحلیل اطلاعات فضایی، یافتن راه‌هایی به‌منظور کاهش دادن آسیب وارده و ترمیم آن در پی بیماری‌ها از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است راه‌های درمانی متعددی برای درمان ایسکمی

¹ aphasia

² agnosia

³ amnesia

⁴ spatial learning

سلول‌های BMSC میزان آپوتوز سلول‌های هیپوکامپ را بررسی کنیم.

مواد و روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی:

این مطالعه تجربی بر روی ۴۰ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با وزن ۲۵۰-۳۰۰ گرم خریداری شده از انستیتو پاستور تهران در دانشکده پزشکی ارومیه انجام شد. حیوانات تحت شرایط استاندارد با دوره روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته و دمای 21 ± 3 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و دسترسی کامل به آب آشامیدنی و غذای کافی داشتند.

این مطالعه با تصویب کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه و رعایت اصول کنوانسیون هلسینکی در مورد کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام شده است.

گروه بندی حیوانات:

موش‌های صحرایی به صورت تصادفی انتخاب شده و در پنج گروه هشت تایی به شرح زیر قرار گرفتند: الف) گروه کنترل ($n=8$) که هیچ مداخله‌ای روی حیوانات این گروه صورت نگرفت (ب) گروه شم ($n=8$) که در آن حیوانات تحت استرس جراحی بدون مسدود کردن شریان‌های کاروتید مشترک قرار گرفتند. ج) گروه ایسکمی ($n=8$) در این گروه به منظور القای ایسکمی، شریان‌های کاروتید مشترک هر دو طرف به طور همزمان به مدت ۲۰ دقیقه مسدود شده و سپس مجدداً جریان خون برقرار گردید. د) گروه vehicle- ($n=8$) که در این گروه ایسکمی ایجاد شد و بعد از ۷ روز PBS (Phosphate Buffer Saline) (Sigma, آلمان) از طریق ورید دمی تزریق شد؛ و گروه Treatment - ($n=8$) در حیوانات این گروه ایسکمی ایجاد شد و بعد از ۷ روز سلول‌های BMSC از طریق ورید دمی تزریق شد

ایجاد مدل ایسکمی - ریپرفیوژن:

به منظور ایجاد مدل ایسکمی - ریپرفیوژن ابتدا با استفاده از مخلوط کتامین (شرکت دارو پخش، ایران) ۱۰۰ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم وزن و گزیزلازین (شرکت دارو پخش، ایران) ۱۰ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم وزن، حیوانات بی‌هوش شده بر روی تخت جراحی فیکس شدند و تحت شرایط استریل در قسمت قدامی گردن برشی به اندازه ۱/۵ - ۱ سانتیمتر داده شد. شریان‌های کاروتید مشترک هر دو طرف در معرض دید قرار گرفتند و با استفاده از کلمپ‌های مخصوص به مدت ۲۰ دقیقه مسدود گردیدند سپس کلمپ‌ها برداشته شده تا مجدداً جریان خون برقرار گردد (ریپرفیوژن) (۲۳).

کشت سلول‌های BMSC:

سلول‌های بنیادی مغز استخوان (BMSC) تحت شرایط استریل از رت‌های بالغ نر نژاد ویستار با سن ۱۲ هفته و وزن ۲۵۰-۳۰۰ گرم طبق پروتکل Azizi و همکاران (۲۴) تهیه شد. بدین ترتیب که آن‌ها با دوز بیش از حد pentobarbital کشته شدند و تیبا و فمور آن‌ها درآورده شد و مغز استخوان آن‌ها توسط مدیوم $(\alpha\text{-MEM})$ (Sigma, آلمان) فلش شد. سپس سوسپانسیون سلولی آن‌ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۸۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. به pellet سلولی ۱۰ میلی‌لیتر مدیوم $\alpha\text{-MEM}$ اضافه شد. این مدیوم حاوی FBS (Fetal Bovine Serum) (Invitrogen, آمریکا) ده در صد و ۲ میلی‌لیتر گلوتامین و $100 \mu\text{g/ml}$ استرپتومایسین (Sigma, آلمان) بود. سپس سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 پنج درصد انکوبه شدند. سلول‌های تکثیر شده سه بار پاساژ داده شدند.

نشان‌دار کردن سلول‌های BMSC:

۷۲ ساعت قبل از پیوند سلول‌های BMSC، آن‌ها را توسط ماده Brodu (bromodeoxyuridine) (Sigma, آلمان) نشان‌دار کردیم. برای نشان‌دار کردن این سلول‌ها Brodu با غلظت $3 \mu\text{g/ml}$ به مدیوم حاوی این سلول‌ها اضافه کردیم (۱۹).

پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان^۵:

در روز هفتم پس از ایجاد مدل ایسکمی - ریپرفیوژن، سوسپانسیونی از سلول‌های بنیادی مغز استخوان کشت شده تهیه گردید و به میزان ۸۰۰ هزار در $30 \mu\text{l}$ سوسپانسیون سلولی از طریق ورید دمی تزریق شد.

پرفیوژن ترنس کاریال^۶:

در روز ۱۲ بعد از ایسکمی، حیوانات با استفاده از تزریق داخل صفاقی با دوز مضاعف کتامین (160 mg/kg) و گزیزلازین (20 mg/kg) بی‌هوش شدند و سپس بر روی تخت مخصوص پرفیوژن قرار داده شدند و برشی در پوست ناحیه قدامی قفسه سینه و شکم آن‌ها داده شد. پس از باز کردن شکم، اتصالات کبد و دیافراگم قطع شده و غضروف‌های دنده‌ای دو طرف بریده شده و جدار قدامی قفسه سینه بالا نگه داشته شد. پس از باز کردن پریکاردیوم، کانولا از طریق قاعده بطن چپ به آرامی به داخل آئورت صعودی وارد شد. برای جلوگیری از لخته شدن خون ابتدا $0/1$ میلی‌لیتر خارج گردید. در ادامه 250 میلی‌لیتر محلول فیکساتیو شامل پارافرمالدئید ۴ درصد در فسفات بافر $0/1$ مولار به بدن حیوان تزریق شد

ایمونوهیستوشیمی (Immunohistochemistry):

⁵ Transplantation Procedure

⁶ Transcardial Perfusion

فلورسانس توسط میکروسکوپ فلورسان قابل مشاهده می‌شود. ترکیب آنتی‌بادی آنتی - فلوروسین و HRP به نوکلئوتیدی که حاوی فلوروسین است می‌چسبد که با استفاده از سوبسترای پراکسیداز، هیدروژن پراکسید و دی‌آمینو بنزیدین (DAB) و یک رنگ دائم شناسایی شده است. با استفاده از این راهکار، هسته‌های آپوپتوتیک رنگ قهوه‌ای تیره به خود می‌گیرند. لذا با کمک کیت تانل هسته‌های نورون‌های آپوپتوتیک به رنگ قهوه‌ای تیره مشخص می‌شوند ولی نورون‌های نکروتیک و سالم رنگ زیادی را جذب نمی‌کنند. در این آزمون انتهای کروماتین شکسته شده برای تمایز آپوپتوز و رنگ‌آمیزی این هسته‌ها توسط آنزیم‌هایی مشخص شده و با دی‌آمینو بنزیدین (DAB) رنگ می‌شوند (۲۵).

مراحل رنگ‌آمیزی تانل به شرح زیر انجام شد:

- دپارافینه کردن نمونه‌ها و آب دهی در الکل‌های نزولی به ترتیب در ۱۰۰، ۹۰، ۸۰ و ۷۰ درجه

- انکوباسیون بافت‌ها در پر اکسید هیدروژن رقیق شده با متانول به میزان ده درصد برای غیرفعال سازی پر اکسید هیدروژن درون بافتی

- انکوباسیون با پروتئیناز K (Proteinase K)(Rosch, آلمان) رقیق شده در بافر PBS، با غلظت ۱ میلی‌گرم در هر ۱۰ میلی‌لیتر به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.

- انکوباسیون با آنزیم (In Situ Cell Death Detection) رقیق شده با حلال اختصاصی به میزان ۵۰/۵۰۰ به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.

- انکوباسیون با کانورتور POD (Converter POD, HRP) به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.

- انکوباسیون با محلول کروموزن دی‌آمینو بنزیدین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.

- قرارگیری در رنگ همتوکسیلین (به‌عنوان رنگ زمینه به مدت ۱۰ ثانیه)

- مراحل آگیری در الکل‌های افزایشی ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ درجه

- قرارگیری در گزلیل در دو مرحله حداقل ۱۵ دقیقه

- چسباندن لامل

- مشاهده با میکروسکوپ نوری

(محلول شستشو در تمام مراحل PBS با PH= 4/7 بود)

شمارش سلولی و تعیین ایندکس آپوپتوز:

در این مطالعه به‌منظور شمارش سلول‌های آپوپتوتیک، ۲۰ میدان میکروسکوپی با بزرگنمایی ۴۰۰ به‌صورت تصادفی انتخاب شده و پس از شمردن تعداد سلول‌های آپوپتوتیک میانگین آن‌ها را ثبت می‌کنیم. علاوه بر شمارش سلول‌های آپوپتوتیک کل

پس از پرفیوژن ترنس کاردیال مغز حیوان درآورده شده و به مدت یک هفته در محلول پارافمالدئید ۴درصد نگهداری شد یک هفته پس از انجام پروسه پردازش بافتی، برش‌های پارافینی به ضخامت ۵ میکرون تهیه شد و سپس بر اساس دستورالعمل کیت ایمونوهیستوشیمی برش‌ها را رنگ‌آمیزی کردیم. این روش برای شناسایی سلول‌های BMSC بکار می‌رود. مراحل انجام رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی به ترتیب زیر بود:

- دپارافینه کردن لام‌ها در محلول گزلیل (Xylol)

- آب دهی در الکل‌های نزولی به ترتیب در ۱۰۰، ۹۰، ۸۰ و ۷۰ درجه

- انکوباسیون برش‌ها در Formamide (Merck, آلمان) ۵۰ درصد

- انکوباسیون برش‌ها در 2x SSC (Standard Sodium Citrate) (Merck, آلمان) به مدت دو ساعت در دمای ۶۵ درجه

- انکوباسیون در 2N HCl (Merck, آلمان) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد.

- فروربردن در Boric acid (Merck, آلمان) یک‌دهم نرمال (PH= 8.5) به مدت ۱۰ دقیقه

- شستشو در PBS

- انکوباسیون با Mouse anti-BrdU Monoclonal Antibody (Sigma, آلمان) به مدت یک شبانه‌روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد.

- فروربردن سه بار در PBS و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه

- انکوباسیون با Secondary antibody conjugated with horse radish peroxidase (goat anti-mouse IgG-peroxidase) (Sigma, آلمان) به مدت دو ساعت

- انکوباسیون با محلول رنگ‌زای (کروموزن) DAB (Diaminobenzidin tetrachloride hydrate) (Sigma, آلمان) به مدت ۵ دقیقه

- رنگ‌آمیزی همتوکسیلین به‌منظور رنگ‌آمیزی زمینه (Counter staining)

- چسباندن لامل

- مشاهده با میکروسکوپ نوری

رنگ‌آمیزی تانل:

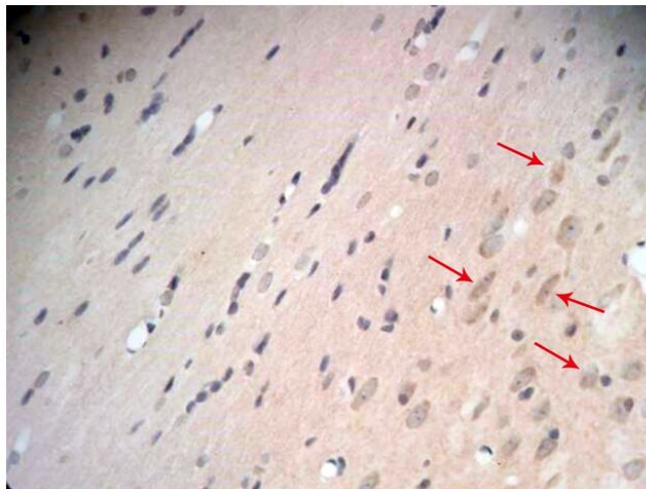
در مرحله آخر برش‌های تهیه‌شده از گروه‌های مختلف توسط رنگ‌آمیزی تانل رنگ‌آمیزی شد و میزان آپوپتوز سلول‌های ناحیه هیپوکامپ در گروه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. کیت تانل (Rosch, آلمان) می‌تواند قسمت‌های مختلف DNA هسته را در آپوپتوز تشخیص دهد با استفاده از روش تانل، نوکلئوتید نشان‌دار با فلوروسین به انتهای DNA شکسته شده متصل می‌شود و

کشت سلول‌های BMSC انجام شد و سلول‌ها سه بار پاساژ داده شدند و سه روز قبل از پیوند با Brdu (Sigma، آلمان) نشان‌دار شدند. بعد از پرفیوژن ترنس کاردیال و تهیه برش‌های پارافینی برای شناسایی سلول‌های BMSC بر اساس دستورالعمل کیت ایمونوهیستوشیمی برش‌ها با Anti-Brdu (Sigma، آلمان) رنگ‌آمیزی شدند. یافته‌های ایمونوهیستوشیمی وجود سلول‌های پیوند شده را در محل ضایعه (هیپوکامپ) تأیید کرد. به عبارت دیگر یافته‌های ایمونوهیستوشیمی نشان داد که سلول‌های پیوند شده زنده مانده و در محل ضایعه (هیپوکامپ) حضور یافتند. تصاویر میکروسکوپی نشان داد که سلول‌های BMSC که از طریق ورید دمی حیوان تزریق شده بودند به محل ضایعه (هیپوکامپ) مهاجرت کرده و زنده مانده و در اطراف هیپوکامپ تجمع پیدا کردند (شکل ۱).

سلول‌های هر میدان نیز شمرده شده میانگین آن‌ها را ثبت می‌کنیم و پس از شمارش شاخص آپتوز (Apoptotic index) را طبق فرمول زیر برای هر گروه تعیین می‌کنیم: ایندکس آپتوز مساوی است با تعداد سلول‌های آپتوتیک تقسیم بر تعداد کل سلول‌ها ضربدر ۱۰۰. روش تحلیل داده‌ها: داده‌ها در گروه‌های مختلف جمع‌آوری و مرتب‌شده و با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد بررسی قرار گرفت. جهت آنالیز آماری از روش ANOVA (One-Way Analysis of Variance) استفاده شد و از آزمون Tukey جهت مقایسه دوه‌دو در بین گروه‌ها استفاده شد در تمامی محاسبات P-Value کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

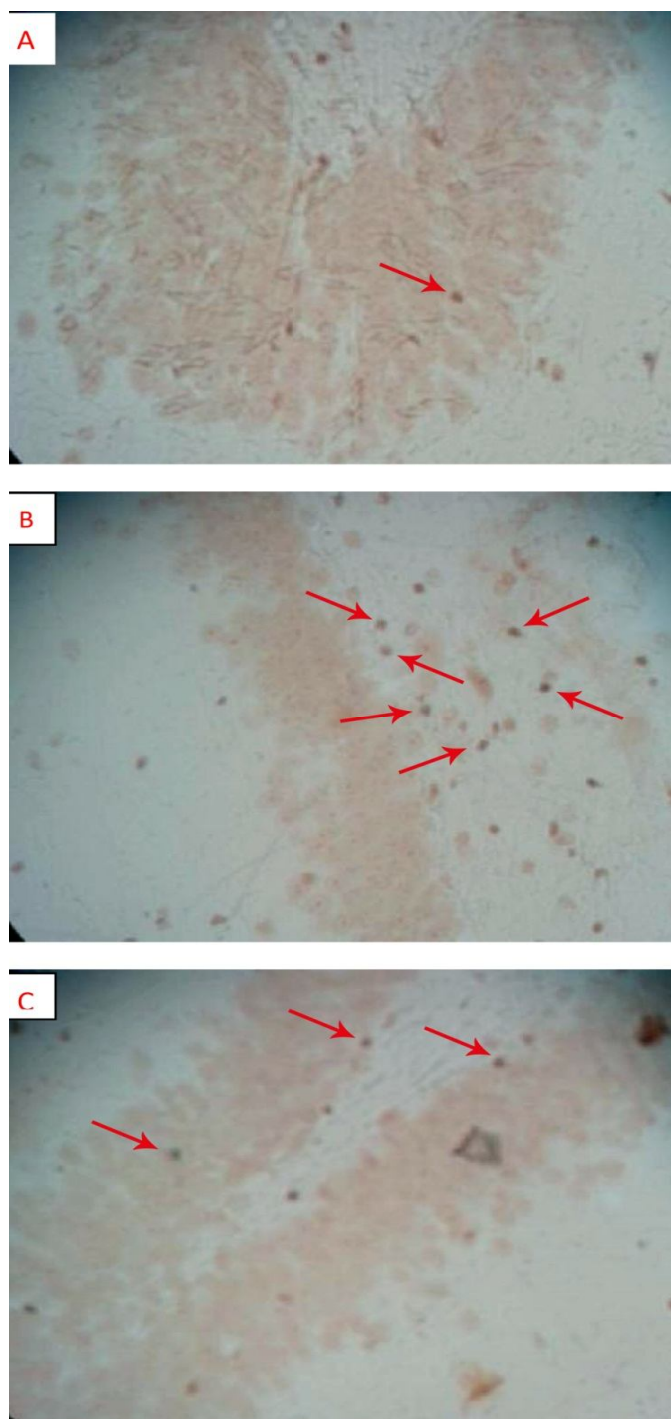
یافته‌های ایمونوهیستوشیمی:



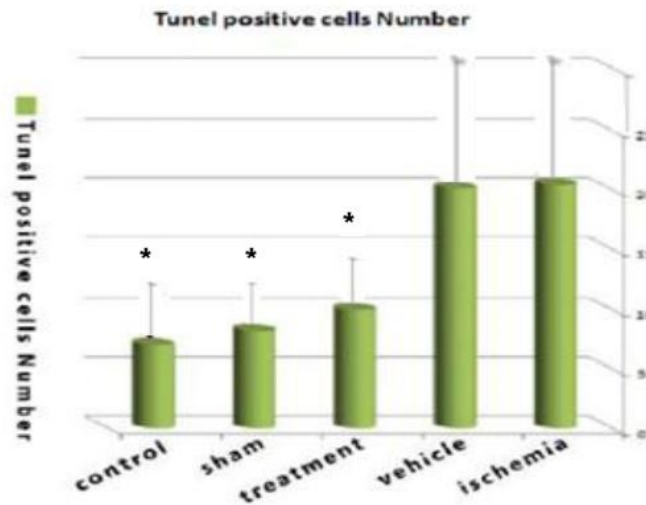
شکل (۱): یافته‌های ایمونوهیستوشیمی: پیکان‌ها سلول‌های Brdu مثبت را نشان می‌دهد. این سلول‌ها در واقع سلول‌های بنیادی مغز استخوان هستند که زنده مانده و به هیپوکامپ مهاجرت کرده و در اطراف محل ضایعه مستقر شده‌اند (بزرگنمایی ۴۰۰)

رنگ‌آمیزی تانل: در این مطالعه ما از رنگ‌آمیزی تانل به منظور تعیین میزان سلول‌های آپتوتیک در ناحیه CA1 هیپوکامپ استفاده کردیم. شکل ۲ نتایج حاصل از این رنگ‌آمیزی را نشان می‌دهد. یافته‌ها نشان داد میانگین تعداد سلول‌های تانل مثبت در گروه کنترل برابر $7/05 \pm 2/982$ و در گروه شم برابر $8/25 \pm 2/693$ و در گروه ایسکمی برابر $10/308 \pm 2/45$ و در گروه و هیکل برابر $9/67 \pm 3/974$ می‌باشد. در صد سلول‌های تانل مثبت (آپتوتیک) در گروه کنترل ۱۵/۴۴ درصد، در گروه ایسکمی ۴۳/۳۷ درصد، در گروه درمان ۲۳/۶۱ درصد، در

گروه شم ۱۷/۹۲ درصد و در گروه و هیکل ۴۳/۲۹ درصد می‌باشد. به عبارت دیگر این نتایج نشان می‌دهد گروه کنترل دارای کمترین و گروه ایسکمی دارای بیشترین میزان سلول‌های آپتوتیک می‌باشد و گروه درمان دارای سلول‌های آپتوتیک بسیار کمتر نسبت به گروه ایسکمی می‌باشد. بررسی آماری نشان داد بین گروه‌های کنترل و ایسکمی از نظر میانگین سلول‌های تانل مثبت اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p=0.000$) (نمودار ۱). نتایج همچنین نشان داد بین گروه ایسکمی و گروه درمان از نظر میانگین سلول‌های تانل مثبت اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p=0.000$) (نمودار ۱).



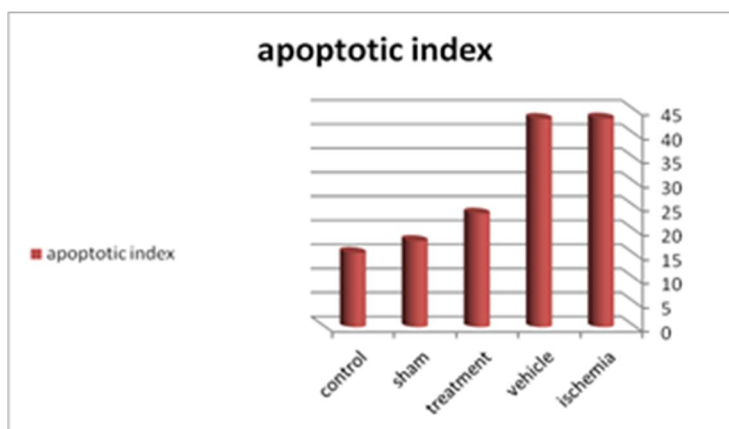
شکل (۲): تصاویر میکروسکوپی از واکنش تانل A- گروه کنترل با کمترین تعداد سلول‌های تانل مثبت (آپوتوتیک) B- گروه ایسکمی با بیشترین تعداد سلول‌های تانل مثبت (آپوتوتیک) C- گروه درمان با سلول‌های تانل مثبت (آپوتوتیک) کمتر از گروه ایسکمی. سلول‌های تانل مثبت به رنگ قهوه‌ای دیده می‌شوند و با علامت پیکان نشان داده شده‌اند.



نمودار (۱): میانگین تعداد سلول‌های تانل مثبت همراه با SD در بین گروه‌های مورد مطالعه با توجه به نمودار بیشترین میانگین تعداد سلول‌های تانل مثبت متعلق به گروه ایسکمی می‌باشد. بین گروه ایسکمی و گروه درمان از نظر میانگین تعداد سلول‌های تانل مثبت اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($P=0.000$).
* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین گروه مورد نظر با گروه ایسکمی می‌باشد.

تعیین ایندکس آپتوز:
نتایج مربوط به تعیین ایندکس آپتوز نشان داد که میزان ایندکس آپتوز برای گروه‌های ایسکمی و وهیکل و درمان و شم و کنترل به ترتیب برابر با ۴۳/۳۷ درصد و ۴۳/۲۹ درصد و ۲۳/۶۱ درصد و ۱۷/۹۲ درصد و ۱۵/۴۴ درصد می‌باشد در حقیقت این نتایج نشان می‌دهد که میزان ایندکس آپتوز در گروه درمان نسبت به گروه ایسکمی بسیار پایین‌تر می‌باشد (نمودار ۲).

تعیین ایندکس آپتوز:
نتایج مربوط به تعیین ایندکس آپتوز نشان داد که میزان ایندکس آپتوز برای گروه‌های ایسکمی و وهیکل و درمان و شم و کنترل به ترتیب برابر با ۴۳/۳۷ درصد و ۴۳/۲۹ درصد و ۲۳/۶۱ درصد و ۱۷/۹۲ درصد و ۱۵/۴۴ درصد می‌باشد در حقیقت این نتایج نشان می‌دهد که میزان ایندکس آپتوز در گروه درمان نسبت به گروه ایسکمی بسیار پایین‌تر می‌باشد (نمودار ۲).



نمودار (۲): میزان ایندکس آپتوز در گروه‌های مورد مطالعه. نتایج نشان می‌دهند که میزان ایندکس آپتوز در گروه درمان نسبت به گروه ایسکمی بسیار پایین‌تر می‌باشد.

ریپرفیوژن، از طریق ورید دمی، میزان آپتوز را در سلول‌های هیپوکامپ کاهش می‌دهد.

بحث
نتایج این مطالعه نشان داد که تزریق سلول‌های بنیادی مغز استخوان (BMSCs) یک هفته پس از ایجاد ضایعه ایسکمی -

BDNF (Brain derived neurotrophic factor) bFGF (Fibroblast growth factor β) را اندازه‌گیری کردند و نتیجه گرفتند بخشی از بهبود رفتاری به علت افزایش این فاکتورها می‌تواند باشد (۲۷).

Crigler و همکاران در پژوهشی نشان دادند که سلول‌های BMSC مقادیر فراوانی از نوروتروفین‌ها، فاکتورهای رشد و سیتوکین‌ها را ترشح می‌کنند و نشان دادند که این فاکتورها سبب بهبود و تحریک تکثیر سلولی و بقا و تمایز سلول‌ها می‌شود (۲۸).

Chen و همکاران در پژوهش خود نشان دادند که سلول‌های BMSC فاکتورهای زیر را ترشح می‌کنند: -BDNF -NGF -NT3 -GDNF (Glial cell derived neurotrophic factor) -VEGF (Vascular -bFGF - (Neurotrophin 3) -HGF (Hepatocyte growth -endothelial growth factor) -CNTF (Ciliary neurotrophic factor) (۲۹).

Nicaise و همکاران سلول‌های BMSC را در مدل ALS (Amyotrophic lateral sclerosis) تزریق کردند و مشاهده کردند که این سلول‌ها فاکتور رشد عصبی (NGF) و (FGF-2) و IGF (Insulin like growth factor) را بیان کردند و نتیجه گرفتند که سلول‌های BMSC با بیان این فاکتورهای رشد در مغز موجب بقای نورون‌ها می‌شوند (۳۰).

Pourheydar و همکاران سلول‌های بنیادی مغز استخوان و سلول‌های شوان را کشت دادند و به‌طور موضعی در محل ضایعه نخاعی مدل حیوانی تزریق کردند که موجب بهبود رفتاری در این حیوانات شده و نیز ترمیم آکسون‌های صدمه‌دیده را مشاهده کردند (۳۱) و نتیجه گرفتند که سلول‌های BMSC با ترشح فاکتورهای نوروتروفیک موجب بقای نورون‌ها شده و از این طریق سبب بهبود رفتاری در حیوانات ضایعه دیده شده‌اند.

Munoz و همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند که سلول‌های بنیادی مغز استخوان موجب افزایش نورون‌زیس در سلول‌های بنیادی هیپوکامپ می‌شوند (۳۲).

Chen و همکاران در مطالعه‌ای با ایجاد مدل استروک از طریق بستن شریان‌های مغزی میانی و تزریق سلول‌های بنیادی مغز استخوان، میزان نورون‌زیس و آپوپتوزیس و نیز بیان bFGF را بررسی کردند و نتیجه گرفتند که این سلول‌ها موجب افزایش نورون‌زیس و کاهش آپوپتوز و افزایش بیان bFGF می‌شوند (۳۳).

این یافته‌ها نشان می‌دهند که سلول‌های BMSC از طریق ترشح فاکتورهای نوروتروفیک و نیز افزایش نورون‌زیس سبب بقای نورون‌ها شده و موجب کاهش آپوپتوز در آن‌ها گشته و از این طریق موجب بهبود رفتاری و عملکردی در ضایعات مختلف سیستم عصبی مرکزی و محیطی می‌شوند.

یافته‌های ایمونوهیستوشیمی این مطالعه نشان داد که سلول‌های بنیادی مغز استخوان کشت داده شده و نشان‌دار شده توسط Brdu، به محل ضایعه (ناحیه هیپوکامپ) مهاجرت کرده و زنده ماندند و در اطراف محل ضایعه تجمع پیدا کردند (شکل ۱)

یافته‌های رنگ‌آمیزی تانل که به‌منظور تعیین میزان سلول‌های آپوپتوتیک پس از ضایعه ایسکمی انجام شد نشان داد که میانگین تعداد سلول‌های تانل مثبت در گروه ایسکمی بیشترین و در گروه کنترل کمترین میزان را دارد. بررسی آماری نشان داد بین گروه ایسکمی و گروه کنترل از نظر میانگین تعداد سلول‌های آپوپتوتیک اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($p=0.000$). (نمودار ۱) این یافته‌ها نشان می‌دهد که مدل ایسکمی-ریپرفیوژن که در آن شریان‌های کاروتید مشترک هر دو طرف و به‌طور همزمان به مدت ۲۰ دقیقه مسدود می‌شود و سپس جریان خون مجدداً برقرار می‌شود (ریپرفیوژن)، مدل تجربی قابل قبولی است و میزان بالای میانگین تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در گروه ایسکمی این نکته را تأیید می‌کند به‌عبارت‌دیگر این مدل قادر است سبب ایسکمی شده و تعداد فراوانی از سلول‌های هیپوکامپ را دچار آپوپتوز کند. میانگین تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در گروه درمان نسبت به گروه ایسکمی به‌طور چشمگیری کاهش پیدا کرد به‌عبارت‌دیگر اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های درمان و ایسکمی از نظر میانگین تعداد سلول‌های آپوپتوتیک مشاهده شد ($p=0.000$). و نیز میزان ایندکس آپوپتوز در گروه درمان نسبت به گروه ایسکمی بسیار پایین‌تر بود (نمودار ۲) این یافته‌ها نشان می‌دهد که تزریق سلول‌های BMSC موجب بقای بیشتر سلول‌های هیپوکامپ و نیز کاهش آپوپتوز در این سلول‌ها گشته است. حال پیوند سلول‌های BMSC با چه مکانیسمی از آپوپتوز سلول‌های هیپوکامپ جلوگیری می‌کند؟ به نظر می‌رسد این افزایش بقای سلول‌های هیپوکامپ و کاهش آپوپتوز در این سلول‌ها به علت تولید فاکتورهای رشد ((Growth factors و فاکتورهای نوروتروفیکی است که توسط سلول‌های BMSC تولید می‌شود.

مطالعات متعددی در مورد درمان ضایعات سیستم عصبی مرکزی و محیطی با استفاده از سلول‌های BMSC صورت گرفته است که نتایج مطالعه ما با نتایج این مطالعات هم‌خوانی دارد که در اینجا به تعدادی از آن‌ها اشاره می‌شود:

Mahmood و همکاران مطالعه‌ای را بر روی ضایعات تروماتیک مغزی انجام داده و سلول‌های BMSC را به‌صورت داخل وریدی در موش صحرایی تزریق کردند و مشاهده کردند این سلول‌ها به‌طور موفقیت‌آمیز به مغز حیوان مهاجرت کرده و سبب بهبود عملکردی شدند (۲۶) آن‌ها میزان تولید فاکتورهای نوروتروفیک (NGF (Nerve growth factor

نتیجه‌گیری

به‌طور خلاصه یافته‌های تحقیق حاضر نشان می‌دهد که پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در مدل ایسکمی-ریپرفیوژن موجب بقا و نوروها و کاهش آپوتوزیس در سلول‌های هیپوکامپ می‌شود لذا پیوند این سلول‌ها در ضایعات ایسکمیک یک روش درمانی مؤثر بوده و ضروری است در مطالعات سلول درمانی آینده برای درمان ضایعات ایسکمیک از این سلول‌ها استفاده شود. از آنجا که مطالعات انجام شده در زمینه درمان ضایعات ایسکمیک توسط سل ترایی بیشتر در زمینه بهبود رفتاری این ضایعات بوده است لذا پیشنهاد می‌شود مطالعات بعدی در زمینه بررسی پلاستی سیتی و برقراری سیناپس‌های جدید توسط نوروها های تازه تولید شده باشد.

تقدیر و تشکر

مطالعه حاضر مصوب مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی دانشکده پزشکی بوده و از حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه برخوردار شده است. پروسه‌های کشت سلولی و ایمونوهیستوشیمی در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی و رنگ‌آمیزی تانل و سایر مراحل مطالعه در مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی دانشکده پزشکی انجام شده است در اینجا لازم میدانیم از معاونت محترم پژوهشی و همکاران عزیز در مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی صمیمانه سپاسگزار می‌کنیم.

References:

- Johansson BB. Current trends in stroke rehabilitation. A review with focus on brain plasticity. *Acta Neurol Scand* 2011; 123(3): 147-59.
- Rosenkranz K, Meier C. Umbilical cord blood cell transplantation after brain ischemia-from recovery of function to cellular mechanisms. *Ann Anat* 2011;193(4):371-9.
- Thom T, Haase N, Rosamond W, Howard VJ, Rumsfeld J, Manolio T, et al. Heart disease and stroke statistics-2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2006;113(6):e85-151.
- Handjinikolaou L, Kotidis K, Galinanes M. Relationship between reduced elasticity of extracardiac vessels and left main stem coronary artery disease. *Eur Heart J* 2004; 25(6): 508-13
- Bernard SA, Gray TW, Buist MD, et al. Treatment of comatose survivors of out of hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *N Engl J Med* 2002; 346(8): 557-63.
- Andrews EM, Tsai S-Y, Johnson SC, Farrer JR, Wagner JP, Kopen GC, et al. Human adult bone marrow-derived somatic cell therapy results in functional recovery and axonal plasticity following stroke in the rat. *Exp Neurol* 2008;211(2):588-92.
- Bokura H and Robinson RG. Long term cognitive impairment associated with caudate stroke. *Stroke* 1997; 28:970-5.
- Huang L, Chen N, Ge M, Zhu Y, Guan S, Wang J-H. Ca²⁺ and acidosis synergistically lead to the dysfunction of cortical GABAergic neurons during ischemia. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;394(3):709-14.
- Simonová Z, Sterbová K, Brozek G, Komárek V, Syková E. Postnatal hypobaric hypoxia in rats impairs water maze learning and the morphology of neurones and macroglia in cortex and hippocampus. *Behav Brain Res* 2003;141(2):195-205.
- Eichenbaum H. Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron* 2004;44(1):109-20.
- Chen J, Choop M. Neurorestorative treatment of stroke; cell and pharmacological approaches. *Neuro Rx* 2006;3: 466-73.
- Guo F, Lv S, Lou Y, Tu W, Liao W, Wang Y, et al. Bone marrow stromal cells enhance the angiogenesis in ischaemic cortex after stroke: involvement of notch signalling. *Cell Biol Int* 2012;36(11):997-1004.

13. Borlongan CV, Glover LE, Tajiri N, Kaneko Y, Freeman TB. The great migration of bone marrow-derived stem cells toward the ischemic brain: therapeutic implications for stroke and other neurological disorders. *Prog Neurobiol* 2011;95(2):213–28.
14. Ra JC, Shin IS, Kim SH, Kang SK, Kang BC, Lee HY, et al. Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans. *Stem Cells Dev* 2011;20(8):1297–308.
15. Zhao L-R, Duan W-M, 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;174(1):11–20.
16. Wislet-Gendebien S, Bruyère F, Hans G, Leprince P, Moonen G, Rogister B. Nestin-positive mesenchymal stem cells favour the astroglial lineage in neural progenitors and stem cells by releasing active BMP4. *BMC Neurosci* 2004;5:33.
17. Mahmood A, Lu D, Lu M, Chopp M. Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells. *Neurosurgery* 2003;53(3):697–702; discussion 702–3.
18. Mahmood A, Lu D, Chopp M. Intravenous administration of marrow stromal cells (MSCs) increases the expression of growth factors in rat brain after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2004;21(1):33–9.
19. Joghataei MT, Bakhtiari M, Pourheydar B and et al. Co- transplantation of Schwann cells and Bone marrow Stromal Cells promotes locomotor recovery in rat contusion model of spinal cord injury. *Yakhteh Med J* 2010; 12(1): 7-16.
20. Wilkins A, Kemp K, Ginty M, Hares K. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells secrete brain-derived neurotrophic factor which promotes neuronal survival in vitro. *Stem Cell Res* 2009; 3: 63- 70.
21. Nicaise C, Mitrecic D, Pochet R. Brain and spinal cord affected by amyotrophic lateral sclerosis induce differential growth factors expression in rat mesenchymal and neural stem cells. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2011; 37: 179-88.
22. Rossignol J, Boyer C, Leveque X, Fink KD. Mesenchymal stem cell transplantation and DMEM administration in a 3NP rat model Huntington's disease; morphological and behavioral outcomes. *Behav Brain Res* 2011; 217: 369-78.
23. McBean DE, Kelly PA. Rodent models of global cerebral ischemia; a comparison of two-vessel occlusion and four-vessel occlusion. *Gen Pharmacol* 1998; 30(4):431-4.
24. Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats. Similarities to astrocytes grafts. *Proc. Natl.Acad. Sci USA* 1998; 95:3908-13.
25. Negoescu A, Guillermet CH, Lorimier PH, et al. TUNEL apoptotic cell detection in archived paraffin-embedded tissues. *Biochemica* 1998;3:36-47.
26. Mahmood A, Lu D, Lu M, chopp M: Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of bone marrow stromal cells. *Neurosurgery* 2003; 53:697.
27. Mahmood A, Lu D, Chopp M. Intravenous administration of marrow stromal cells (MSCS) increases the expression injury. *J Neurotrauma* 2004; 21:33.
28. Crigler L, Robey R.C, Asawachaicharn A, Gaupp D. Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro – regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neurogenesis. *Exp. Neurol* 2006; 198: 54-64.

29. Chen Q, Lon, Y yuan X, Zou L, Sun J. protective effects of bone marrow stromal cell transplantation in injured rodent brain: synthesis of neurotrophic factors. *J Neurosci Res* 2005; 80:611-9.
30. Nicaise C, Mitrecic D, Pochet R. Brain and spinal cord affected by amyotrophic lateral sclerosis induce differential growth factors expression in endogenous mesenchymal and neural stem cells. *Neuropathol. Appl Neurobiol* 2011, 37, 179-88.
31. Joghataei M.T, Bakhtiari M, Pourheydar B. Co – transplantation of Schwann cell and bone marrow stromal cells promotes loco motor recovery in rat contusion model of spinal cord injury. *Yakhteh Med J* 2010;12(1):7-16.
32. 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;102(50):18171–6.
33. Chen J, Li Y, Katakowski M, Chen X, Wang L, Lu D, et al. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *J Neurosci Res* 2003;73(6):778–86.

EVALUATION OF APOPTOSIS IN HIPPOCAMPAL CELLS OF RAT FOLLOWING INTRAVENOUS INJECTION OF BONE MARROW STROMAL CELLS IN ISCHEMIA-REPERFUSION MODEL

Bagher Pourheydar¹, Maryam Shahi^{2*}, Gholam Hossein Farjah³, Masoome Javanmard⁴, Mojtaba Karimipour⁵, Fatemeh Atabaki⁶

Received: 22 May, 2014; Accepted: 12 Aug, 2014

Abstract

Background & Aims: Cerebral ischemia is known as a major worldwide problem and subsequent reperfusion leads to apoptosis or programmed cell death. Specific regions of the brain and specific types of neurons, including hippocampal CA1 pyramidal neurons are more sensitive in cerebral ischemia. Today cell therapy is one of the common treatments that spread among the researchers. In this study, we evaluated apoptosis in hippocampal cells of rat following intravenous injection of bone marrow stromal cells (BMSCs) in ischemia-reperfusion model.

Materials & Methods: In this study, adult male wistar rats (n=40) weighting (250-300g) were used. The rats were divided into the five groups of 8 animals including: control, sham, ischemia, vehicle, and treatment. In the sham group surgery was performed without blocking common carotid arteries. In ischemia group common carotid arteries blocked for twenty minutes and then allowed to reperfusion. In the vehicle group 7 days after ischemia, 30µl PBS was injected via tail vein. In the treatment group BMSC cells (800000/ 30 µl suspension) were injected into the tail vein 7 days after ischemia. And 72 hours before transplantation, the cells were labeled with Brdu. 12 days after ischemia, rats were fixed with 4% Paraformaldehyde through transcardial perfusion and their brains were removed. After histological processing, 5 micron sections were prepared for staining. For immunohistochemistry study anti-Brdu anti-body was used and BMSC cells were identified. Apoptotic cells were detected by TUNEL staining.

Results: Sever apoptosis was observed in ischemia group. The mortality rate in the group which was treated with BMSC was lower.

Conclusion: Ischemia-reperfusion for 20 minutes causes damage and extensive neural death in the hippocampus, especially in CA1 region and injection of bone marrow stromal stem cells significantly decreased the number of apoptotic neurons.

Keywords: Ischemia, Reperfusion, Hippocampal, Bone marrow stromal cells, Apoptosis

Address: Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran, **Tel:** +9844 32780803

E-mail: bpourheydar@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2014; 25(7): 597 ISSN: 1027-3727

¹ Assistant Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Neurophysiology Research Center, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

² Master Student, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran (Corresponding Author)

³ Assistant Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Neurophysiology Research Center, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

⁴ Assistant Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

⁵ Associate Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

⁶ Assistant Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran