

بررسی پاسخ پاداشی هسته آکومبنس مغز پس از تزریق سلول های مزانکیمال بنیادی به دنبال دمیلیناسیون ناشی از اتیدیوم بروماید

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۶/۶ : تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۱۷

چکیده

مقدمه و هدف: دمیلیناسیون مهم ترین عارضه بیماری ام اس است که طی آن لایه میلین اطراف فیبرهای عصبی و هسته های مغزی دچار آپوپتوز یا مرگ سلولی می شوند. هسته آکومبنس یکی از هسته های ناحیه استریاتوم است که در پاسخ پاداشی مغز موثر است. رویکردی که اخیرا به آن توجه زیادی شده است سلول درمانی با استفاده از سلول های بنیادی است. بنابراین هدف این مطالعه بررسی پاسخ پاداشی هسته آکومبنس به دنبال تزریق سلول های مزانکیمال بنیادی در دمیلیناسیون ناشی از اتیدیوم بروماید در موش های صحرایی نر بود.

مواد و روش ها: موش های صحرایی نر نژاد ویستار به وزن ۲۵۰-۳۰۰ گرم در روز جراحی تحت بیهوشی قرار گرفته، سپس ۲/۵ میکرولیتر اتیدیوم بروماید (EB) ۰.۰۱ درصد تزریق شد. همچنین از آنجا که نیاز به تزریق سلول های بنیادی در بطن مغز خواهد بود، همزمان یک کانول در محل مختصات بطن قرار داده شد تا دیگر نیاز به بیهوشی مجدد نباشد. حیواناتی که در گروه های کنترل، آسیب، شاهد جراحی (Sham) و درمان قرار گرفته اند تا سه روز در شرایط پس از جراحی در اتاق حیوانات بصورت تمیز نگهداری شدند. سپس وارد اتاق استریل برای پیوند سلول بنیادی مزانشیمال (۱۰۰۰۰۰*۵) شدند.

در روزهای صفر، ۱۴ و ۲۸ پس از جراحی در گروه های مورد آزمایش تست رفتاری ترجیح مکان شرطی (CPP; Conditioned Place Preference) انجام شد. جهت ارزیابی پاسخ پاداشی حیوانات از تزریق زیرجلدی مرفین استفاده گردید.

نتایج: یافته های این پژوهش نشان داد که پاسخ شرطی شده حیوانات در تست رفتاری CPP در گروه هایی که سلول بنیادی را ۱۴ و ۲۸ روز قبل دریافت کرده اند در مقایسه با آسیب (گروه دریافت کننده EB) به طور معناداری افزایش یافت. **نتیجه گیری:** بنابراین استفاده از سلول های بنیادی به عنوان یک عامل موثر در روند بازسازی سیستم عصبی و بهبود پاسخ پاداشی، بایستی مورد توجه و مطالعه بیشتری قرار گیرد.

کلمات کلیدی: دمیلیناسیون، هسته آکومبنس، سلول های بنیادی مزانکیمال، تست آزمون ترجیح مکان شرطی

مقدمه

این بیماری فعالیت سیستم ایمنی باعث التهاب بافتی و مرگ سلول های عصبی می گردد.^{۱-۸} یکی از دلایل اصلی بروز بیماری، دمیلیناسیون در نورون هاست البته پس از مدتی مقداری رمیلیناسیون خودبخودی نیز رخ می دهد.^{۹-۱۵} به دنبال دمیلیناسیون در دستگاه عصبی مرکزی (CNS) که یکی از نشانه های بارز بیماری MS است، دو نتیجه حاصل می شود: یا اکسون به صورت دمیلینه باقی مانده و مستعد آتروفی می شود که سهم بسزایی در ایجاد فاز

بیماری ام اس (MS; Multiple Sclerosis) یکی از شایع ترین بیماری های عصبی در انسان است که با فراوانی قابل توجهی در اوایل بزرگسالی بروز می کند. بروز آن در زنان دو تا سه برابر مردان است. مهمترین علائم این بیماری عبارتند از: فلج، فقدان حس، خستگی، نقایص شناختی و اختلالات بینایی. ام اس یک بیماری التهابی مزمن است که منجر به دمیلینه شدن نورون ها می گردد. در

مهدی گودرزوند^۱، کامبیز رهام پور^۲، پگاه عزیز^۳، محمدامین شرافت^۴، اشرف نظری برون^۴، عباس حق پرست^{۵*} و سارا طاهری^۶

^۱استادیار فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران
^۲استادیار فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران
^۳کارشناسی ارشد فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
^۴کارشناسی ارشد فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، زابل، ایران
^۵دانشیار فیزیولوژی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
^۶کارشناس پرستاری، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

* نویسنده مسئول: دانشیار فیزیولوژی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۰۹۱۲-۲۱۴۹۸۵۷
E-mail: haghparast@yahoo.com

مطالعات نشان می‌دهد که MSC باعث تنظیم عملکرد سلول های T helper در محیطی که همراه با سلولهای بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید کشت داده شده‌اند، می‌شود.^{۳۳} بر اساس این شواهد برآن شدیم که اثر تزریق سلول های بنیادی مزانشیمی را بر پاسخ های پاداشی مدل حیوانی MS بررسی نماییم.

مواد و روش ها

در این پژوهش از موش های صحرایی ویستار با وزن ۲۵۰-۳۰۰ گرم استفاده شد. موش های صحرایی با رعایت اصول اخلاقی در محیط مناسب در قفس های چهار تایی با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته و دمای حیوانخانه 24 ± 2 بود. حیوانات به چهار گروه کنترل، آسیب، شاهد جراحی (Sham) و درمان تقسیم شدند. موش های صحرایی در روز جراحی تحت بیهوشی قرار گرفته و پس از اطمینان از بیهوشی کامل، سر حیوانات در دستگاه استریوتاکسی جهت مشخص نمودن مختصات هسته آکومبسن ثابت گردید. سپس مجموعه حیوان سوراخ شده و با توجه به اطلس پاکسینوس با سرنگ هاملتون ۲/۵ میکرولیتر ایتیدیم بروماید ۰/۰۱ درصد برای القای دمیالیناسیون موضعی در هسته آکومبسن استفاده شد. همچنین برای تزریق سلول های بنیادی در بطن مغز، یک کانول نیز در محل مختصات بطن قرار داده شد.

بعد از جراحی حیوانات به مدت سه روز برای بهبودی در حیوانخانه نگهداری شدند و سپس برای پیوند سلول بنیادی (5×10^6) وارد اتاق استریل شدند. پس از آماده سازی سلول ها، فقط گروه درمان سلول های بنیادی مزانشیمی که از مغز استخوان موش های صحرایی تهیه شده بود را دریافت کردند.

در روز های صفر، ۱۴ و ۲۸ پس از جراحی در گروه های مورد آزمایش تست رفتاری ترجیح مکان شرطی (CPP) جهت ارزیابی سیستم پاداش انجام شد.

مطالعه رفتاری

ترجیح مکان شرطی

دستگاه ترجیح مکان شرطی (Conditioned preference place; CPP) که از دو محفظه مستطیل شکل متصل به هم با ابعاد

پیشرونده MS دارد؛ و یا اینکه در طی یک فرآیند ترمیمی که رمیالیناسیون نامیده می‌شود، صفحات جدید میلین دور آکسون دمیالینه تشکیل و قابلیت هدایت پتانسیل عمل در طول نورون را به آن باز می‌گرداند.^{۳۷-۳۶}

ام اس یک بیماری با اتیولوژی ناشناخته است که با یک مرحله موقت فروکشی و عود و نیز یک مرحله پیشرفته مزمن مشخص می‌شود. پلاک های این بیماری در نتیجه دمیالینه شدن اعصاب درون ماده سفید حاصل می‌آیند که با رنگ آمیزی اختصاصی از بین رفتن میلین را می‌توان دید. واژه مولتیپل بیانگر این واقعیت است که بیش از یک منطقه از مغز و نخاع مبتلا می‌شوند و از آنجایی که در ناحیه آسیب دیده بافت عصبی سخت و ژلاتینه می‌شود اصطلاح اسکروز به آن نسبت داده شده است.^{۳۸}

تاکنون اصلی ترین استراتژی های درمان MS بر ایجاد راهکارهایی برای جلوگیری از فرایند دمیالیناسیون استوار بوده است. این در حالی است که اخیراً روش هایی که باعث پیشبرد رمیالیناسیون شده و از دست دادن آکسون را به حداقل می‌رسانند، نیز مورد توجه قرار گرفته‌اند.^{۱۱} یکی از بخش هایی از مغز که دچار عارضه دمیالیناسیون می‌شود، ماده سفید هسته آکومبسن (یا استریاتوم شکمی) عقده های قاعده ای مغز می‌باشد که این عارضه موجب اختلال در سیستم پاداش مغز می‌شود و موجب بروز اختلال در فعالیت های شناختی فرد می‌گردد.^{۱۶}

گزارش شده است که تزریق داخل مجموعه ای فاکتور های رشد، خصوصاً فاکتور رشد مشتق از پلاکت (PDGF) می‌تواند روند رمیالیناسیون را تحریک و تسریع کند. این تحریک روی تکثیر سلول های اجدادی الیگودندروسیت ها می‌باشد که افزایش این سلول ها در رمیالیناسیون بسیار حائز اهمیت است ولی در مجموع رمیالیناسیون موجود ناکافی است.^{۱۷} همچنین گزارشاتی وجود دارد که کاشت سلول های بنیادی مزانشیمی (MSC) به عنوان یک درمان جایگزین برای برخی از بیماری های خود ایمنی مطرح شده است. مطالعات حیوانی تایید کرده است که تزریق MSC می‌تواند به طور معنی داری علائم مننژیت خود ایمن، گلوومرولونفریت، ام اس و لوپوس اریتماتوز را بهبود بخشد.^{۱۸-۲۱} هرچند که مکانیزم اثر این کاشت سلولی به درستی شناخته نشده است اما مشخص شده است که MSCها نقش مهمی در تمایز و تکثیر لنفوسیت های T دارند.^{۲۲}

گرفت. در این مطالعه اختلاف زمان سپری شده در محفظه تزریق مورفین و سالیین به عنوان نمره شرطی سازی (Conditioning score) در نظر گرفته شد.

جداسازی سلول های بنیادی مزانشیمال مشتق از مغز قرمز استخوان

پس از قربانی کردن موش ها، استخوان ران و درشت نی حیوانات جدا شدند و پس از حذف عضلات، مغز قرمز استخوان به روش فلاشینگ جمع آوری شد و پس از عبور از فیلتر ۱۰۰ میکرومتر، نمونه ها به فلاسک کشت حاوی محیط کشت DMEM با گلوکوز پایین به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) کشت داده شدند. سلول ها پس از رسیدن به تراکم (دانشیته) مناسب توسط تریپسین ۲۵٪، درصد پاساژ داده شدند و در پاساژ سوم آماده تمایز به رده های دیگر و نیز القای ژن شدند.

القای ژن GFP از طریق وکتور به درون سلول های بنیادی مغز قرمز استخوان

ابتدا وکتور لنتی وایرال pLOX-EWGFP حاوی پروموتور EF-1 آلفا با ژن eGFP به پلاسمید های psPAX2 و pMD2.G القا شد و سپس این مجموعه به رده سلولی T 293 منتقل (ترانسفکت) شد. پس از آن وکتورهای ویروسی تکثیر شده جمع آوری شد و به محیط کشت سلول های بنیادی مغز قرمز اضافه شد و بدین ترتیب سلول های بنیادی حامل ژن GFP شدند تا بتوان به راحتی مورد ردیابی قرار گیرند. در نهایت سلول های بنیادی مزانشیمی از طریق کانولی که قبلاً تعبیه شده بود به داخل هسته آکومبئس تزریق شد.

نتایج

مشاهده سلول های GFP مثبت در هسته آکومبئس

در بررسی های ایمونوفلوروسانت، وجود سلول های GFP مثبت نشان دهنده انتقال سلول های بنیادی مزانشیمی می باشد. در شکل ۱ سلول هایی که به رنگ سبز دیده می شوند GFP را بیان کرده اند که حضور این سلول ها در مختصات مورد نظر موید انتقال موفقیت آمیز سلول های بنیادی مزانشیمی به هسته آکومبئس می باشد.

cm ۳۰×۳۰×۴۰ تشکیل شده است. در بخش میانی این وسیله نیز یک محفظه مستطیل شکل کوچکتر وجود دارد که از طریق آن امکان دسترسی به دو محفظه دیگر وجود دارد. کف هر کدام از این دو محفظه توسط محرک های حسی متفاوتی از هم مجزا شده اند به طوری که دیوارها و کف هر محفظه دارای خصوصیات منحصر به فردی می باشد. در این آزمایش حیوان پس از آموزش با استفاده از روش ترجیح مکان شرطی، مورد بررسی قرار گرفت. هر کدام از آزمون های ترجیح مکان شرطی شامل یک برنامه زمان بندی ۵ روزه بودند که در سه مرحله زیر انجام شد:

الف) مرحله پیش شرطی سازی

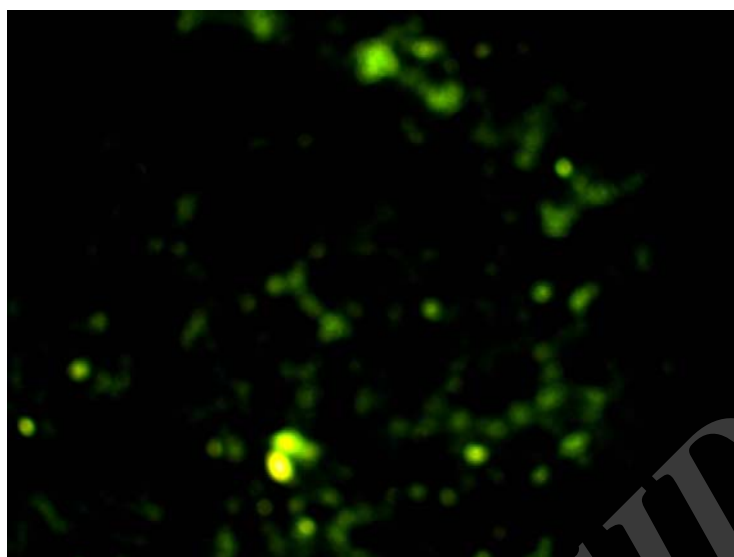
در این مرحله که یک روز به طول می انجامید، حیوان در بخش میانی دستگاه ترجیح مکان شرطی قرار داده شده و به او اجازه داده می شد تا به مدت ۱۰ دقیقه آزادانه به جستجو در بخش های مختلف دستگاه پردازد. در طول این مرحله مدت زمانی که حیوان در هر محفظه سپری می کرد اندازه گیری می شد.

ب) مرحله شرطی سازی

این مرحله شامل یک برنامه زمان بندی ۳ روزه بود و در هر روز طی ۲ نوبت انجام می شد. به این نحو که در روز اول حیوان در نوبت صبح یک دوز مشخص مورفین (۵ mg/kg) را به روش زیرجلدی دریافت کرده و فوراً به مدت ۴۵ دقیقه در یکی از محفظه های دستگاه مکان شرطی قرار داده می شد. این محفظه از محفظه های دیگر مجزا شده بود. در نوبت بعد از ظهر حیوان یک دوز مشخص سالیین (۱ ml/kg) را دریافت کرده و در محفظه دیگری از دستگاه مکان شرطی به مدت ۴۵ دقیقه قرار داده می شد. در روز دوم حیوان سالیین را در نوبت صبح و مورفین را در نوبت بعد از ظهر دریافت می کرد. در روز سوم نیز مانند روز اول عمل می شد.

ج) مرحله بعد از شرطی سازی (مرحله آزمون)

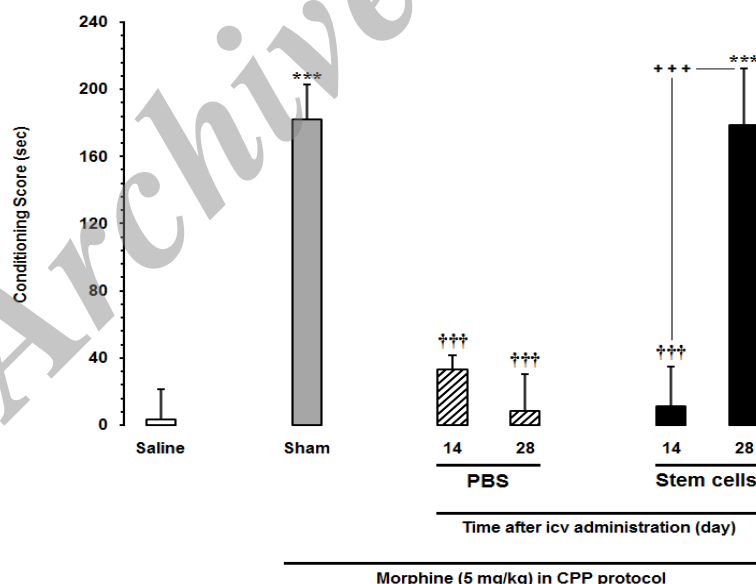
در پنجمین روز از برنامه زمان بندی به حیوان اجازه داده می شد تا آزادانه به مدت ۱۰ دقیقه به جستجو در این سه محفظه پردازد. در این مرحله هم مانند مرحله پیش شرطی سازی مدت زمان سپری شده در هر محفظه با دوربین و نرم افزار اتوویژن اندازه گیری می شد و اینکه آیا حیوان در روز نهایی مکان دریافت مورفین را نسبت به مکان دریافت سالیین ترجیح می دهد، مورد ارزیابی قرار



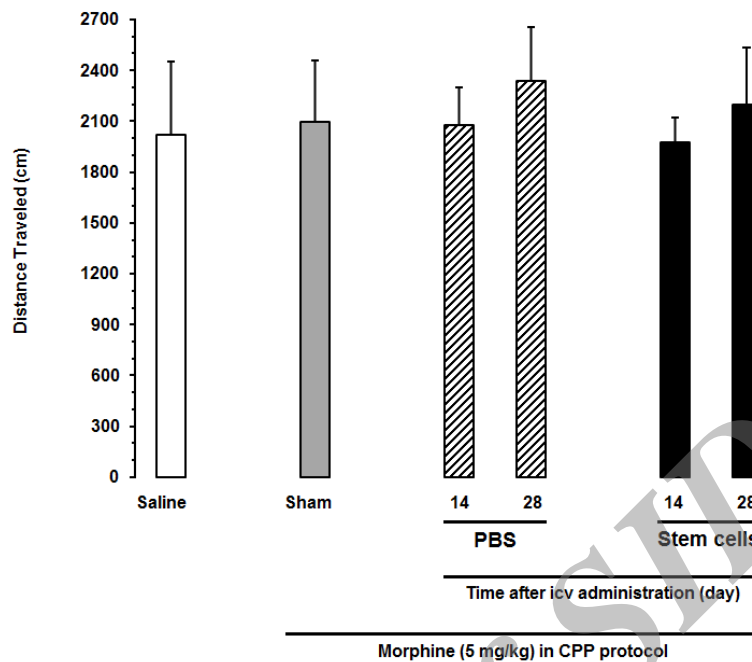
شکل ۱. وجود سلولهای GFP مثبت در بافت هسته آکومبیس پس از انتقال. سلول های بنیادی بیان کننده GFP به رنگ سبز مشاهده می شوند. Scale Bar=50 μ m

تیدیوم بروماید این هسته تخریب شده و نمره شرطی شدن حیوان به نحو معناداری کمتر از نمره شرطی شدن گروه شم است که به جای سالیین اتیدیوم بروماید دریافت کرده است (شکل ۲).

تزریق داخل هسته ای اتیدیوم بروماید نمره شرطی شدن را کاهش داد. یافته‌های رفتاری نشان می‌دهد که پس از تزریق داخل هسته ای



شکل ۲. حیوانات پس از تخریب هسته آکومبیس بوسیله اتیدیوم بروماید، سلول های بنیادی را به صورت درون هسته آکومبیس دریافت کرده و سپس به ترتیب ۱۴ و ۲۸ روز بعد مورد تست CPP قرار گرفتند و نمره شرطی شدن آنها با گروه Sham (گروهی که فقط جراحی شدند) و گروه کنترل (گروهی که سالیین دریافت کردند) مقایسه شد. تزریق درون بطن مغزی سلول های بنیادی ۲۸ روز پس از تخریب هسته آکومبیس توسط اتیدیوم بروماید، توانست نمره شرطی شدن را به حالت عادی برگرداند.



شکل ۳. حیوانات پس از تخریب هسته آکومبئس بوسیله اتیدیوم بروماید، سلول های بنیادی را به صورت درون هسته آکومبئس دریافت کرده و سپس به ترتیب ۱۴ و ۲۸ روز بعد مورد تست CPP قرار گرفتند و مسافت طی شده توسط آنها با گروه Sham (گروهی که فقط جراحی شدند) و گروه کنترل (گروهی که سالین دریافت کردند) مقایسه شد. میزان فعالیت حرکتی حیوانات در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی داری نداشت.

شده بود، در هیچیک از زمان های مورد بررسی تفاوت معناداری وجود نداشت (شکل ۳).

بحث

در بررسی های ایمونوهیستولوژیک مطالعه حاضر بیان ژن GFP در ناحیه هسته آکومبئس پس از انتقال سلول های بنیادی مزانشیمی حاکی از گرفت موفقیت آمیز این سلول ها می باشد. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می گردد ۱۴ روز پس از تزریق اتیدیوم بروماید هنوز نمره شرطی موش های صحرایی افزایش نیافته است و با گروهی که PBS در یافت کرده اند تفاوت آماری ندارد. اما ۲۸ روز پس از تزریق نمره شرطی شدن افزایش یافته و به حد نمره شرطی شدن در گروه شاهد جراحی (Sham) که در آنها هسته آکومبئس تخریب نشده است می رسد. شاید این مدت زمان برای شروع عملکرد در سلول های ترانس پلنت شده ضروری باشد. ایشیدا و همکارانش گزارش دادند که انتقال سلول های دوپامینی

تزریق سلول های بنیادی مزانشیمی به داخل بطن مغز نمره شرطی شدن را بهبود بخشید.

همانطور که در شکل ۲ مشاهده می گردد ۲۸ روز پس از تخریب هسته آکومبئس توسط تزریق اتیدیوم بروماید، رفتار پاداشی حیوان به طور معناداری بهبود یافت و نمره شرطی شدن موش های صحرایی پس از انتقال سلول ها به حد موش های کنترل رسید. این درحالی است که ۱۴ روز پس از ترانس پلنت شدن سلول ها هنوز بهبود معناداری در نمره شرطی شدن مشاهده نمی گردد.

میزان فعالیت حرکتی حیوانات در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی داری نداشت.

ارزیابی فاصله پیموده شده توسط موش های صحرایی پس از تزریق داخل بطنی سلول های بنیادی مزانشیمی حاکی از آن است که میزان فعالیت حرکتی حیوانات تیمار شده با سلول های بنیادی و موش های صحرایی که هسته آکومبئس آنها با اتیدیوم بروماید تخریب

روتارود را به طور معناداری بهبود بخشید که مویید بهبود عملکرد شناختی حیوان پس از تزریق MSC به محل ضایعه می‌باشد.^{۲۶} بهبود نمره شرطی شدن حیوانات در مطالعه حاضر نیز همانند مطالعه عدالت ونش و همکاران بهبود عملکرد شناختی موش‌ها پس از ۴ هفته را تایید می‌نماید. اما در این مطالعه تغییر معناداری در توانایی حرکتی حیوان مشاهده نشد که احتمالاً به محل ضایعه مربوط می‌باشد که در این مطالعه تخریب هسته اکومبسنس تداخل کمتری با توانایی حرکتی حیوان دارد. ضمن اینکه تاثیر آزمون متفاوت در ارزیابی لوکوموشن را نباید از نظر دور داشت. در مجموع می‌توان نتیجه گیری کرد که ترانس پلنت کردن سلولهای بنیادی مزانشیمی (MSC) می‌تواند اثر تخریبی اتیدیوم بروماید بر نورون‌های هسته اکومبسنس را کاهش داده و رفتارهای شناختی حیوان را بهبود بخشد بدون اینکه روی لوکوموشن حیوان تاثیر معناداری داشته باشد.

تشکر و قدردانی

این طرح با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی البرز انجام شد. از این رو، مجری و سایر همکاران کمال تشکر و قدردانی را از این دانشگاه دارند.

به هسته اکومبسنس موشهایی که سلولهای دوپامینرژیک آنها با ۶- هیدروکسی دوپامین تخریب شده بود پس از گذشت ۴ هفته از زمان گرفت توانست هاپیر اکتیویته ایجاد شده با مت آمفتامین را به حالت حیوانات طبیعی برگرداند^{۲۴} که مویید زمان بروز پاسخ رفتاری در مطالعه حاضر است.

افزایش نمره شرطی شدن در موشهای صحرايي که MSC دریافت کرده بودند احتمالاً ناشی از بهبود عملکرد نورون‌های هسته اکومبسنس در گروه MSC است که می‌تواند به دلیل کاهش میزان آپوپتوز در اثر تزریق اتیدیوم بروماید باشد. در سال ۲۰۱۲ ز آوو و همکارانش نیز با تزریق MSC به موش‌های نارس مبتلا به رتینوپاتی گزارش کردند که در گروهی که MSC در یافت نموده‌اند تعداد نورون‌های TUNEL مثبت و نورون‌های DAPI مثبت کمتر از گروه تیمار نشده بود^{۲۵} که مویید کاهش آپوپتوز نورونی به دنبال ترانس پلانتاسیون MSC است.

در مطالعه ای که عدالت منش و همکارانش در سال ۲۰۱۱ انجام دادند به دنبال تخریب یک طرفه مخچه توسط کینولینیک اسید، ترانس پلنتاسیون MSC توانست پس از گذشت ۶ هفته یادگیری حیوان در ماز آبی موريس و نیز توانایی حرکتی در

References

1. Annapurna A, Kumar VK, Rao PMM, Rao KS, et al. Multiple Sclerosis: the disease and its treatment. *Indian J. Pharmacol* 2002; 34: 3-15.
2. Bell JI, Lathrop GM. Multiple loci for Multiple Sclerosis. *Nat. Genet* 1996; 13(4): 377-378.
3. Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple Sclerosis—the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* 2006; 354 (9): 942-55.
4. Hafler DA. Multiple sclerosis. *Am Soc Clin Investig* 2004; 788-794.
5. McQualter JL and Bernard CC. Multiple sclerosis: a battle between destruction and repair. *J Neurochem* 2008; 100: 295-306.
6. Rolak LA. Multiple Sclerosis: It's Not The Disease You Thought It Was. *Marshfield Clinic* 2003: 57-60.
7. Shivane AG and Chakrabarty A. Multiple sclerosis and demyelination. *Curr Diagn Pathol* 2007; 13: 193-202.
8. Wingerchuk DM, Lucchinetti CF, Noseworthy JH. Multiple Sclerosis: Current Pathophysiological Concepts. *Lab Invest* 2001; 81: 263-281.
9. Keirstead H. Stem cells for the treatment of myelin loss. *Trends Neurosci* 2005; 28: 677-683.
10. Piraino PS, Yednock TA, Messersmith EK, et al. Spontaneous remyelination following prolonged inhibition of integrin in chronic EAE. *J. Neuroimmunol* 2005; 167: 53-63.
11. Shields SA, Gilson JM, Blakemore, W.F. Remyelination occurs as extensively but more slowly in old rats compared to young rats following gliotoxin-induced CNS demyelination. *Glia* 1999 28:77-83.
12. Stangel M, Hartung HP. Remyelinating strategies for the treatment of multiple sclerosis. *Prog. Neurobiol.* 2002; 68: 361-376.

13. Cerghet M, Skoff RP, Bessert D et al. Proliferation and death of oligodendrocytes and myelin proteins are differentially regulated in male and female rodents. *J Neurosci* 2006; 26: 1439-1447.
14. Li WW, Penderis J, Zhao C. Females remyelinate more efficiently than males following demyelination in the aged but not young adult CNS. *Exp Neurol* 2006; 202: 250-254.
15. Matejuk A, Hopke C, Vandenbark AA. Middle-age male mice have increased severity of experimental autoimmune encephalomyelitis and are unresponsive to testosterone therapy. *J Immunol* 2005; 174:2387-2395.
16. Batista S, Zivadinov R, Hoogs M, et al. Basal ganglia, thalamus and neocortical atrophy predicting slowed cognitive processing in multiple sclerosis. *J Neurol* 2012; 259(1):139-46.
17. Ruffini F, Kennedy TE, Antel JP. Inflammation and remyelination in the central nervous system. *Am J. Pathol.* 2004; 164: 1519-1522.
18. Ozaki K, Sato K, Oh I. Mechanisms of immunomodulation by mesenchymal stem cells. *Int J Hematol.* 2007; 86 (1):5-7.
19. Uccelli A, Pistoia V, Moretta L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol.* 2007; 28 (5): 219-226.
20. McTaggart SJ, Atkinson K. Mesenchymal stem cells: immunobiology and therapeutic potential in kidney disease. *Nephrol (Carlton)* 2007;12 (1):44-52.
21. Gonzalez MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, et al. Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum.* 2009; 60(4):1006-1019.
22. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood.* 2005; 105(5):2214-2219.
23. Wang Q, Li X, Luo J, et al. The allogeneic umbilical cord mesenchymal stem cells regulate the function of T helper 17 cells from patients with rheumatoid arthritis in an in vitro co-culture system *BMC Musculoskelet Disorder.* 2012; 13: 249.
24. Ishida Y, Hashitani T, Kumazaki M, et al. Behavioral and biochemical effects of intra-accumbens dopaminergic grafts. *Brain Research Bulletin* 1990; 24(3): 487-492.
25. Zhao YS, Zhao KX, Wang XL, et al. Effects of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation on retinal cell apoptosis in premature rats with retinopathy 2012; 14 (12): 971-975.
26. Edalatmanesh MA, Bahrami AR, Hosseini E, et al. Bone marrow derived mesenchymal stem cell transplantation in cerebellar degeneration: a behavioral study. *Behav Brain Res* 2011; 20; 225 (1): 63-70.