ORIGINAL ARTICLE

Using Chitosan/polyethylen Oxide (Cs/PEO) as a Scaffold and Wharton Jelly-derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation on the Repair of Transcected Sciatic Nerve in Wistar Rats: A Behavioral and Histological Study

Mehrnaz Moattari[1],
Homa Kouchesfahani[2],
Gholamreza Kaka[3],
Homayoun Sadraie[4],
Majid Naghdi[5]

[1] PhD Student in Developmental Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
[2] Associate Professor, Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
[3]Associate Professor, Neuroscience Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4] Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Neuroscience Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[5] Assistant Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran

(Received Aguyst 1, 2015 Accepted October 26, 2015)

Abstract

Background and purpose: The aim of this study was to determine the effects of chitosan/polyethylene oxide (Cs/PEO) scaffold and human mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly (WJ-hMSCs) on regeneration of the sciatic nerve injury in rats.

Materials and methods: In this research, 42 adult male rats were divided into six groups. 1- Normal (intact) group: healthy rats without any nerve transection; 2- Control group: sciatic nerve was cut and sutured; 3- Sham group: culture medium was injected; 4- Cs/PEO group: scaffold with a thin Cs/PEO was used around the injury site; 5- WJ-hMSC group: WJ-hMSCs injected around the site of injury, and 6- WJ-hMSCs-Cs/PEO group: WJ-hMSCs were seeded on Cs/PEO membrane and used around the injury site. Behavioral assessments were done at 2, 4, 6 and 8 weeks following the surgery. Histological evaluation was performed at the end of the study.

Results: Our results showed that behavioral values in experimental groups significantly increased when compared to intact group ($P<0.05$). These values in WJ-hMSC-Cs/PEO group significantly improved compared to the control and sham groups ($P<0.05$). In addition, histological findings revealed significant increase in the number of nerve fibers in experimental groups compared to intact group ($P<0.05$). Histological results revealed improvements in groups 4, 5 and 6, however, there was no significant difference between these groups and sham or control group.

Conclusion: This study showed the positive effects of chitosan/polyethylene oxide scaffold and human mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly on nerve regeneration of transected sciatic nerve in rat model.

Keywords: chitosan scaffold, Wharton jelly, sciatic nerve, repair

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(133): 196-205 (Persian).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-15]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و پنجم شماره ۱۳۳ بهمن سال ۱۳۹۴ (۲۰۵-۱۹۶)

استفاده از کیتوسان/پلی اتیلن اکسید به عنوان داربست همراه با پیوند سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از ژله وارتون بر ترمیم عصب سیاتیک قطع شده در موش های صحرایی نژاد ویستار: یک مطالعه رفتاری و بافت شناسی

مهرناز معطری[۱]
هما کوچصفهانی[۲]
غلامرضا کاکا[۳]
همایون صدرایی[۴]
مجید نقدی[۵]

چکیده

سابقه و هدف: هدف از این مطالعه بررسی اثرات داربست کیتوسان/ پلی اتیلن اکسید (Cs/PEO) و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از ژله وارتون (WJ-hMSCs) بر ترمیم آسیب عصب سیاتیک در موش‌های صحرایی است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۴۲ موش صحرایی نر بالغ به ۶ گروه زیر تقسیم شدند: ۱- گروه نرمال(سالم): بدون قطع عصب سیاتیک؛ ۲- گروه شاهد: عصب سیاتیک قطع شده و سپس بخیه زده شد؛ ۳- گروه شم: محیط کشت در محل قطع عصب تزریق شد؛ ۴- گروه Cs/PEO: داربست Cs/PEO روی محل قطع عصب قرار گرفت؛ ۵- گروه WJ-hMSCs: این سلول در محل آسیب تزریق شد؛ و ۶- گروه WJ-hMSCs-Cs/PEO: از سلول های WJ-hMSCs کشت داده شده روی داربست Cs/PEO در اطراف آسیب استفاده شد. بررسی رفتاری در انتهای هفته‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ و ارزیابی بافت شناسی در پایان آزمایش انجام شد.

یافته‌ها: در پایان هفته ۸ پس از جراحی، نتایج رفتاری در گروه‌های قطع عصب نسبت به گروه سالم به صورت معنی‌داری افزایش نشان داد ($p<۰/۰۵$) و در گروه WJ-hMSCs-Cs/PEO نتایج به طور معنی‌داری نسبت به گروه‌های شاهد و شم بهبود یافت ($p<۰/۰۵$). هم‌چنین در پایان هفته ۸ پس از جراحی، نتایج بررسی های بافت شناسی حاکی از کاهش تعداد رشته‌های عصبی در گروه های قطع عصب نسبت به گروه سالم بود ($p<۰/۰۵$). نتایج بررسی‌های بافت‌شناسی بهبودی را در گروه‌های درمانی ۴، ۵ و ۶ نسبت به گروه‌های شاهد و شم نشان داد اما این تفاوت معنی‌دار نبود.

استنتاج: در مطالعه حاضر اثرات مثبت داربستی کیتوسان/پلی‌اتیلن اکسیدو سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از ژله وارتون بر ترمیم عصب سیاتیک قطع شده در مدل موش صحرایی نشان داده شد.

واژه های کلیدی: داربست کیتوسان، ژله وارتون، عصب سیاتیک، ترمیم

مقدمه

یکی از ناتوانی‌های شایع مشکل آسیب عصب محیطی است. برای نمونه، میزان آسیب عصب محیطی در کشورهای در حال توسعه(۲،۱) مورد در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر در هر سال ارزیابی شده است(۳). آسیب عصب به

مولف مسئول: غلامرضا کاکا- تهران: دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، E-mail: gh_kaka@yahoo.com
۱. دانشجوی دکتری رشته تکوین جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
۲. دانشیار، گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
۳. دانشیار، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران
۴. استاد، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران
۵. استادیار، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۴/۵/۱۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۴/۵/۲۸ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۸/۴

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-15]

نوروپراکسی، آکسونتمزیس و نوروتمزیس تقسیم شده است و در شدیدترین آسیب عصب رشته‌های عصبی و غلاف عصبی دچار از هم گسیختگی شده و بهبود با کمک جراحی میکروسکوپی امکان‌پذیر است(۴). سلول درمانی به عنوان استراتژی ترمیم عصب، محیط مناسبی را در سیستم عصبی محیطی فراهم می‌آورد(۵). بند ناف به عنوان یک دور ریز پزشکی مد نظر است. بخشی از بند ناف، ژله وارتون است که منبع غنی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی با خصوصیات منحصر به فرد مانند سرعت تکثیر بالا، ایمنی‌زایی پایین و جداسازی غیرتهاجمی آن است(۸-۶). مطالعات گسترده بر توانایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون برای تمایز انواع متفاوت سلول‌ها مانند انواع سلول‌های مزانشیمی مانند ادیپوسیت‌ها، کندروسیت‌ها، استئوبلاست‌ها و سلول‌های مشابه نورونی مانند آستروسیت‌ها، الیگودندروسیت ها، میکروگلیا، نورون‌ها و سلول‌های مشابه نوروگلیا تأکید دارد(۱۰،۹). کیتوسان یک پلیمر طبیعی با ویژگی‌های زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری، فعالیت ضد میکروبی، ویژگی ترمیم زخم و اثرات ضد توموری است(۱۱) که به آسانی با پلیمرهای سنتزی به منظور افزایش قدرت و چسبندگی سلول ترکیب می‌شود. پلی‌اتیلن گلیکول با نام دیگر پلی اکسی اتیلن یا پلی اتیلن اکسید برای ترمیم انتهای میلین دار آکسون سیستم عصبی مرکزی به‌کار می‌رود. همچنین کیتوسان ویسکوزیته بالایی دارد و برای تهیه داربستی نازک از پلی اتیلن اکسید به عنوان کوپلیمر به منظور کاهش ویسکوزیته آن استفاده می‌شود(۱۲). بر اساس مطالعات گذشته استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از ژله وارتون اثرات مثبتی بر روند بهبود عملکردی و مورفولوژیکی داشته است(۱۳). هم‌چنین استفاده از داربستی متخلخل کیتوسان به تنهایی و یا با ترکیبی از سلول‌های مزانشیمی مشتق از ژله وارتون موجب افزایش معنی‌دار رشته‌های عصبی میلین‌دار و ضخامت میلین شده است(۱۴). با استفاده ترکیبی از نوروسفرها و لوله راهنمای عصب کیتوسانی، ۶ هفته پس از جراحی بهبود و ترمیم شکاف عصب به میزان ۱۰mm درعصب سیاتیک مشاهده گردید(۱۳). در مطالعه دیگری بهبودی عملکردی و الکتروفیزیولوژیکی در گروه کیتوسان بیش‌تر از گروه سیلیکون نشان داده شد(۱۵). بنابراین، هدف از این مطالعه بررسی اثرات سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از ژله وارتون کشت شده روی داربستی کیتوسان/پلی اتیلن اکسید بر ترمیم عصب سیاتیک قطع شده در موش‌های صحرایی‌نژاد ویستار می‌باشد.

مواد و روش ها

پژوهش حاضر بر روی ۴۲ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار به وزن ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم انجام شد. موش‌های صحرایی در مرکز حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) در شرایط طبیعی شامل چرخه ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دمای ۲۵-۲۳ درجه سانتی‌گراد، آب و غذای کافی نگهداری شدند. همه آزمایش‌ها و عمل‌های انجام شده بر اساس قوانین حمایت از حیوانات آزمایشگاهی که مصوب دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) بوده است انجام گردید. موش‌ها توسط مخلوطی از کتامین به مقدار mg/kg ۹۰ و گزیلازین به مقدار mg/kg ۱۰ به صورت داخل صفاقی بیهوش شدند. پس از تراشیدن موی پای راست حیوان، پوست ناحیه خلفی خارجی ران توسط بتادین و الکل استریل شد. برشی طولی به میزان ۳ سانتی‌متر در پوست خلفی خارجی ران ایجاد شد. عضلات همسترینگ و فاسیا کنار زده شد و عصب سیاتیک نمایان و در گروه‌های آزمایشی قطع شد. برای تهیه سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون به شرح زیر عمل شد (۱۶). بند ناف‌های انسانی در محلول نمکی Hanks (Gibco, USA) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به دنبال آلودگی‌زدایی در اتانل ۷۰ درصد (Sigma, UK)، رگ‌های خونی از بند ناف جدا شدند. سپس ژله وارتون به قطعات $5\ cm^2$/. تقسیم و به مدت ۵

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-15]

دقیقه سانتریفوژ شد. پس از جداسازی محلول رویی، رسوب ایجاد شده توسط DMEM (Gibco, USA) شستشو و به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد و رسوب به مدت ۱۸ ساعت در کلاژناز قرار گرفت. پس از شستشو و هضم بیش‌تر در تریپسین ۲۵٪ درصد (Gibco,USA)، FBS برای متوقف کردن تریپسینه شدن به بافت مزانشیمی افزوده شد و برای بررسی سلول‌های زنده حجمی برابر از سوسپانسیون سلول‌ها و نیز تریپان بلو استفاده شد. با توجه به این که سلول‌های زنده رنگ تریپان بلو را به خود نمی گیرند و سلول‌های مرده آبی رنگ می‌شوند، به کمک لام نئوبار و میکروسکوپ اینورت با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر، تعداد و درصد مرگ و میر سلولی شمارش و ثبت گردید. برای ایمنوسیتوشیمی سلول‌های WJ-hMSC از روش کاکا و همکاران استفاده شد(۱۷)، به‌طوری‌که برای شناسایی سلول‌های WJ-hMSC از آنتی‌بادی CD44 و فیبرونکتین و از آنتی‌بادی CD45 به عنوان مارکر سلول‌های بنیادی خونساز استفاده گردید(۱۸). به منظور نشاندار کردن سلول‌ها با BrdU، ۳µg/ml محلول بروموئوکسی یوریدین سه روز قبل از پیوند به محیط کشت اضافه گردید و سلول‌های نشان دار شده برای تزریق مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور تهیه داربستی کیتوسان/ پلی اتیلن اکسید، ۰/۲۵ گرم کیتوسان با وزن مولکولی کم و ۰/۰۸۳ گرم پلی اتیلن اکسید به آرامی در محلول ۵۰ سی‌سی اسید استیک ۰/۵ مولار با دمای ۴۰ درجه سانتی گراد اضافه گردید و در rpm ۲۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. ۵/۷ml مخلوط در پتری دیش‌های پلاستیکی با قطر ۷۵ ml قرار گرفت و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک گردید. فیلم‌ها به قطعات 1cm×1cm بریده شدند. سپس موش‌ها به طور تصادفی به ۶ گروه تقسیم شدند: ۱- گروه نرمال (سالم): موش‌های صحرایی سالم بدون آسیب؛ ۲- گروه شاهد: عصب سیاتیک قطع شد و سپس بخیه زده شد؛ ۳- گروه شم: محیط کشت روی اپی نوریوم در محل آسیب تزریق شد؛ ۴- گروه کیتوسان/پلی اتیلن اکسید (Cs/PEO): از داربست لایه نازک کیتوسان/پلی اتیلن اکسید روی آسیب استفاده گردید؛ ۵- گروه سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون (WJ-hMSCs): ۵۰۰۰۰۰ سلول بنیادی به محل آسیب تزریق شد؛ و ۶- گروه سلول های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون بند ناف - کیتوسان/پلی اتیلن اکسید (WJ-hMSCs-Cs/PEO): از داربستی با ۵۰۰۰۰۰ سلول بنیادی مزانشیمی ژله وارتون بند ناف به همراه لایه نازک کیتوسان/پلی اتیلن اکسید در اطراف آسیب استفاده شد. پس از تزریق، پوست با نخ بخیه ۰-۵ سیلک دوخته شد و با بتادین ضد عفونی گردید.

به منظور بررسی رفتاری (ارزیابی شاخص عملکرد عصب سیاتیک)، در پایان هفته های ۲، ۴، ۶ و ۸ بعد از عمل جراحی کف پای مربوط به عصب مجروح موش صحرایی با جوهر رنگی شد، سپس حیوان بر روی کاغذ سفیدی در کف راهرویی به ابعاد ۲۰×۷×۶۰ سانتی متر راه رفت. ارزیابی شاخص عملکرد عصب سیاتیک بر اساس فرمول زیر برای پای جراحی شده و پای سالم محاسبه گردید:

$$SFI = |-38.5\ (EPL-NPL/NPL)+109.5\ (ETS-NTS/NTS) + 13.3\ (EIT-NIT/NIT)-8.8|$$

طول کف پا (PL)، فاصله بین سر انگشتان ۱ و ۵ (TS)، فاصله بین سر انگشتان ۲ و ۴ (IT)، سمت آزمایش(E=Experimental)، و سمت سالم (N=Normal) (تمام اندازه‌ها بر حسب میلی‌متر). در بررسی مقادیر SFI اگر مقدار ۱۰۰ یا کم‌تر باشد فعالیت حرکتی به طور کامل از بین رفته است. اعداد بین ۱۰۰ الی ۱۰ سیر بهبودی حرکتی را نشان می‌دهد و نتایج بین صفر تا ۱۰ طبیعی بودن حرکت پا به شمار می‌رود(۱۹،۲۰). جهت ارزیابی رفلکس درد از آزمون رفتاری صفحه داغ استفاده شد. در پایان هفته‌های۲، ۴، ۶ و ۸ پس از جراحی پای دچار آسیب روی صفحه داغ با دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و مدت زمانی که طول کشید تا حیوان پای آسیب دیده خود را از سطح بلند

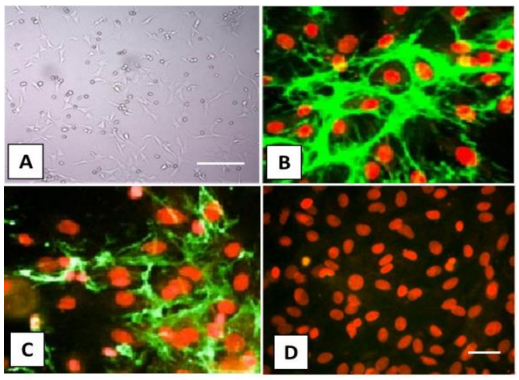
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-15]

کند، به عنوان زمان پاسخ در نظر گرفته شد. به منظور بررسی بافت شناسی، در پایان هفته هشتم پس از ترمیم، همه حیوانات جهت مطالعه بافت شناسی پرفیوژن شدند. در تمام موارد پس از پرفیوژن، عصب سیاتیک را یک میلی‌متر قبل و یک میلی متر بعد از محل ترمیم بریده و نمونه در ثابت‌کننده فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد. پس از ۷۲ ساعت و ثبوت نمونه‌ها و انجام مراحل پروسس، از ناحیه دیستال عصب سیاتیک قطع شده به صورت عرضی برش تهیه شد و با روش هماتوکسیلین- ائوزین رنگ‌آمیزی گردید. نمونه‌ها توسط میکروسکوپ پیشرفته تحقیقاتی در بزرگ‌نمایی شیئی ۱۰۰ توسط دوربین دیجیتالی متصل به کامپیوتر عکس گرفته شدند و تعداد رشته‌های عصبی در سطحی برابر با ۱۰۰۰۰ میکرومتر مربع و با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ برابر شمارش شدند. داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS 22.0 تجزیه و تحلیل شدند. نتایج به دست آمده به صورت میانگین و خطای انحراف از میانگین (Mean±SEM) نمایش داده شدند. برای مقایسه نتایج بین گروه‌ها از روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه و post-hoc Tukey استفاده گردید. سطح معنی‌داری $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

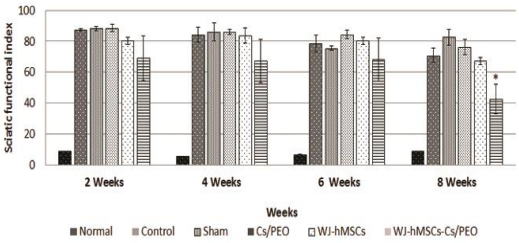
یافته ها

نتایج حاصل از ایمنوسیتوشیمی حاکی از بیان CD44 و فیبرونکتین به عنوان مارکرهای سلول‌های مزانشیمی و عدم بیان CD45 به عنوان مارکر سلول‌های بنیادی خونساز بود.

نمودار شماره ۱ نتایج حاصل از ارزیابی شاخص عملکرد عصب سیاتیک را در همه گروه‌های مورد آزمایش نشان می‌دهد. قبل از جراحی، ارزیابی SFI در همه گروه‌ها نزدیک صفر بود. پس از قطع عصب، به دلیل فقدان کامل عملکرد عصب سیاتیک میانگین SFI به ۱۰۰ در همه حیوانات رسید. در پایان هفته ۲، ۴، ۶ و ۸ پس از جراحی، بهبود عملکرد عصب سیاتیک به صورت کاهش SFI در گروه های درمانی مشاهده شد به طوری که در پایان هفته هشتم تفاوت معنی‌داری بین گروه کیتوسان/پلی اتیلن اکسید-سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون (WJ-hMSCs-Cs/PEO) و گروه شاهد و شم مشاهده شد ($p<۰/۰۵$).



تصویر شماره ۱: فتومیکروگراف از سلول بنیادی مزانشیمی تمایز نیافته ژله وارتون. A- در پاساژ سوم سلول‌های چسبنده دوکی شکل دیده می‌شود. بزرگنمایی 400×. نوار مقیاس: ۲۰۰ میکرومتر؛ B- آنتی‌بادی اولیه ضد فیبرونکتین؛ C- آنتی‌بادی اولیه ضد CD44؛ D- آنتی‌بادی CD45 به عنوان مارکر سلول‌های بنیادی خونساز با آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با FITC. هسته‌ها با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شده‌اند. بزرگنمایی1000×. نوار مقیاس: ۵۰ میکرومتر

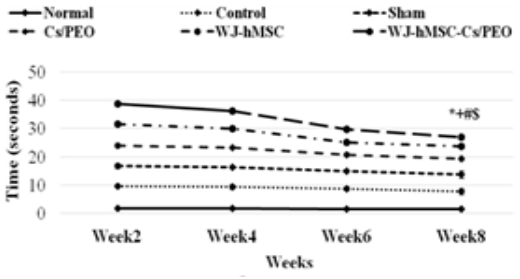


نمودار شماره ۱: ارزیابی شاخص عملکرد حرکتی عصب سیاتیک در پایان هفته های ۲، ۴، ۶ و ۸ بعد از ترمیم در گروه های مورد آزمایش. *نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه شاهد و شم است

تست رفلکس درد به منظور ارزیابی طرز حرکت و عملکرد ضد دردی اعصاب محیطی استفاده شد. همان طور که در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است، در پایان هفته ۲، ۴، ۶ و ۸ پس از جراحی در گروه‌های مورد آزمایش تفاوت معنی داری به صورت افزایش

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-15]

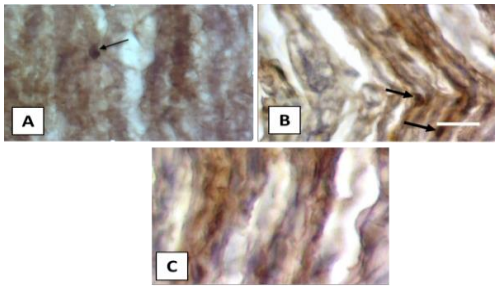
مدت زمان رفلکس بین گروه نرمال و گروه‌های مورد آزمایش دیده شد ($p<۰/۰۵$). طی هفته‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ پس از جراحی، بهبود در گروه‌های درمانی به صورت کاهش مدت زمان رفلکس درد دیده شد که در گروه درمانی کیتوسان/پلی‌اتیلن اکسید-سلول‌های مزانشیمی ژله وارتون (WJ-hMSCs-Cs/PEO) نسبت به گروه شاهد، گروه شم، گروه کیتوسان/ پلی‌اتیلن اکسید و گروه سلول‌های مزانشیمی ژله وارتون در پایان هفته هشتم پس از جراحی معنی‌دار بود. نمودار شماره ۲ آنالیز تست رفلکس درد را در پایان هفته‌های ۲،۴، ۶ و ۸ پس از جراحی نشان می‌دهد.



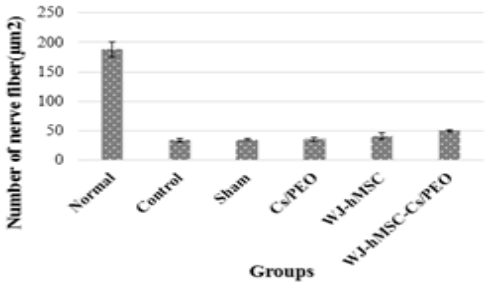
نمودار شماره ۲: ارزیابی یافته های حاصل از تست رفلکس درد در پایان هفته های ۲، ۴، ۶ و ۸ بعد از ترمیم در گروه های مورد آزمایش. *+ # $ به ترتیب نشاندهنده اختلاف معنی داری با گروه شاهد، شم، Cs/PEO و WJ-hMSCs است

در رابطه با نتایج بافت‌شناسی و ایمنوهیستوشیمی، بر اساس نتایج حاصل از تزریق BrdU ، ملحق شدن سلول‌های کشت شده در عصب سیاتیک در هفته هشتم پس از جراحی مشاهده شد.

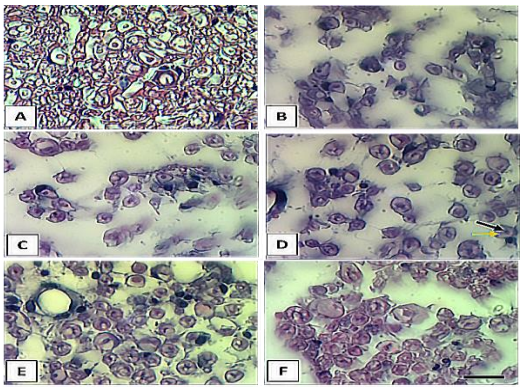
نمودار شماره ۳ تعداد کلی رشته‌های عصبی را در مساحتی برابر $۱۰۰۰۰ \mu m^2$ در گروه‌های مختلف و تصویر شماره ۳ تصویر میکروسکوپی از برش های عرضی عصب سیاتیک با بزرگ نمایی ۱۰۰۰ برابر را نشان می‌دهد. کاهش معنی‌دار تعدادکلی رشته‌های عصبی بین گروه نرمال و گروه‌های مورد آزمایش مشاهده شد ($p<۰/۰۵$). اگر چه تعداد کلی رشته های عصبی در $۱۰۰۰۰ \mu m^2$ در گروه‌های درمانی رو به افزایش بود اما تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های درمانی در مقایسه با گروه‌های شاهد و شم دیده نشد. نمودار شماره ۳ تعداد کلی رشته‌های عصبی را در $۱۰۰۰۰ \mu m^2$ نشان می‌دهد و تصویر شماره ۲ تصویر میکروسکوپی از برش‌های عرضی عصب سیاتیک با بزرگ نمایی ۱۰۰۰ برابر را نشان می‌دهد.



تصویر شماره ۲: فتومیکروگراف ایمنوهیستوشیمی از سلول های BrdU مثبت در برش های طولی عصب سیاتیک. A- گروه WJ-hMSCs ؛B- گروه WJ-hMSCs-Cs/PEO ؛ C- گروه کنترل منفی. فلش سیاه: هسته های نشاندار شده BrdU. بزرگنمایی×۱۰۰۰. نوار مقیاس ۳۰ میکرومتر



نمودار شماره ۳: تعداد کلی رشته های عصبی در $۱۰۰۰۰ \mu m^2$. کاهش معنی دار رشته های عصبی بین گروه نرمال و گروه های مورد آزمایش دیده شد ($p<۰/۰۵$). تعداد رشته‌های عصبی در گروه های درمانی نسبت به گروه شاهد و شم رو به افزایش است که از لحاظ آماری این افزایش معنی دار نبود.



تصویر شماره ۳: تصویر میکروسکوپی از برش های عرضی عصب

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-15]

سیاتیک با بزرگ نمایی ۱۰۰۰ برابر. نوار مقیاس: ۱۰میکرومتر. A – گروه نرمال؛ B–گروه شاهد؛ C–گروه شم؛ D–گروه درمان با داربستی کیتوسان/پلی اتیلن اکسید؛ E–گروه درمان با سلول های مزانشیمی ژله وارتون؛ F– گروه درمان با کیتوسان/پلی اتیلن اکسید–سلول های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون. همان طور که در تصویر مشاهده می شود، پیکان سیاه رنگ میلین و پیکان نارنجی آکسون را نشان می دهد

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان‌دهنده روند بهبودی حسی و حرکتی در قالب آزمون‌های رفتاری ارزیابی شاخص عملکرد سیاتیک و آزمون رفلکس درد در گروه سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از ژله وارتون و داربستی کیتوسان/پلی اتیلن اکسید (WJ-hMSCs-Cs/PEO) در درازمدت یعنی در هفته هشتم پس از جراحی است.

گارتنر و همکاران (۲۰۱۴) ضمن استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از ژله وارتون و داربستی ®vivosorb، بهبود عملکرد حرکتی و حسی را طی ۱۲ هفته مورد بررسی قرار دادند و افزایش بهبود عملکرد حرکتی و حسی را در حیوانات درمان شده با سلول های ژله وارتون تمایز یافته و تمایز نیافته به همراه افزایش غلاف میلین مشاهده کردند(۱۳).

دینگ و همکاران (۲۰۱۰) از پیوند اتولوگ سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و داربست کیتوسان/PLGA برای درمان شکاف ۵۰mm عصب سیاتیک در سگ استفاده‌کردند واین ترکیب موجب ترمیم عصب سیاتیک و بهبود عملکرد پس از ۶ ماه گردید(۲۱). سیموس و همکاران (۲۰۱۰) از داربست‌های کیتوسان نوع ۳ برای درمان آکسونتمزیس استفاده کردند و ترمیم معنی‌دار عصب و بهبود عملکرد را ۲۰ هفته پس از جراحی مشاهده نمودند. آن‌ها این نتایج را به اثر مستقیم کیتوزان نوع ۳ بر تحریک تکثیر سلول شوان، طویل شدن آکسون و میلینه شدن آن نسبت دادند(۲۲).

گارتنر و همکاران (۲۰۱۲) از هیبریدی از داربستی کیتوسان و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از ژله وارتون در مدل آکسونوتمزیس استفاده کردند و پس از ۱۲ هفته رشد دوباره آکسونی و بهبود عملکرد حرکتی و حسی را مشاهده نمودند(۲۳). در واقع بهبود عملکرد حرکتی و حسی در گروه WJ-hMSCs-Cs/PEO می‌تواند به این دلیل باشد که تزریق سلول‌ها به تنهایی موجب استقرار این سلول‌ها در سایر نقاط می‌شود. در حالی که استفاده از داربست موجب می‌شود تا سلول‌ها از آن به عنوان یک لنگرگاه استفاده کرده، homing بهتری یافته و در بافت مورد نظر استقرار پیدا کنند. هم‌چنین چندین مکانیسم احتمالی برای توضیح اثرات سلول‌های بنیادی مزانشیمی در ترمیم آسیب عصب محیطی توصیف شده است که شامل ترشح فاکتورهای رشد، ساخت و رسوب ماتریکس خارج سلولی، ترشح مولکول‌های ضد التهاب و ضد آپوپتوز برای ایجاد ریزمحیط مناسب برای ترمیم عصبی است(۲). در واقع مولکول‌های فعال زیستی مترشحه از سلول‌های بنیادی مزانشیمی به صورت مستقیم و یا غیرمستقیم و یا هر دو راه فعالیت می‌نمایند. اثرات مستقیم با پیام‌رسانی بین سلولی و اثرات غیر مستقیم با وادار کردن سلول‌های دیگر به رهایش مولکول‌های فعال عمل کننده در این ناحیه است. به این اثرات غیر مستقیم *تروفیک* اطلاق می‌شود. BDNF یا فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز(۲۴)، NT4/5 یا نوروتروفین-۵/۴ (۲۵)،GDNF یا فاکتور نوروتروفیک مشتق از سلول‌های گلیال(۲۶)، PDGF یا فاکتور رشد مشتق از پلاکت، EGF یا فاکتور رشد اپیدرمال، LIF یا فاکتور مهار لوکمیا، IGF-I یا فاکتور رشد مشابه انسولین، NAP-2 یا پروتئین فعال کننده نوتروفیل-۲، VEGF یا فاکتور رشد اندوتلیال رگی و HGF یا فاکتور رشد هپاتوسیتی از فاکتورهای نوروتروفیک مهم ترشح شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون هستند که در مقادیر بالا بیان می‌شوند. این فاکتورها در زنده ماندن، تمایز و حفظ نورون‌های حسی و حرکتی نقش دارند. اثرات غیر

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-15]

مستقیم و مثبت سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون بر زنده ماندن و تکثیر سلول‌های شوان با ترشح نوروتروفین‌ها صورت می‌گیرد که جزء کلیدی دژنراسیون والرین هستند و توسط آن ها بیان NGF یا فاکتور رشد عصب افزایش پیدا می‌کند و بنابراین ترمیم آکسونی در ناحیه آسیب دیده روی می‌دهد. در واقع، ترمیم نورون های حسی و بهبود درک حس درد به این مکانیسم پاراکرین بر می‌گردد(۲۷). در رابطه با داربستی کیتوسان/ پلی‌اتیلن اکسید مطالعات قبلی نشان می‌دهند که کیتوسان با خصوصیاتی هم‌چون زیست سازگار بودن، زیست تخریب‌پذیر بودن، سمیت کم، ارزان بودن و یا این که به سلول‌های شوان اجازه چسبیدن و زنده ماندن در بستر خود را می دهند و از سوی دیگر موجب تقویت آنژیوژنز می شوند نقش مهمی در ترمیم عصبی ایفا می‌کنند(۱۵). بنابراین، بهبود تعداد رشته‌های عصبی می‌تواند به علت پیشرفت رگ‌زایی باشد که محیط مناسبی برای رشد آکسون و بهبود ترمیم عصب فراهم می‌آورد.

در پایان می توان نتیجه گیری کرد که با توجه به اطلاعات حاصل از این پژوهش، استفاده از داربستی کیتوسان/پلی اتیلن اکسید- سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون (WJ-hMSCs-Cs/PEO) راهکار مناسبی در ترمیم آسیب عصب محیطی است.

References

1. Hsueh YY, Chang YJ, Huang TC, Fan SC, Wang DH, Chen JJ, et al. Functional recoveries of sciatic nerve regeneration by combining chitosan-coated conduit and neurosphere cells induced from adipose-derived stem cells. Biomaterials 2014; 35(7): 2234-2244.
2. Wang J, Ding F, Gu Y, Liu J, Gu X. Bone marrow mesenchymal stem cells promote cell proliferation and neurotrophic function of Schwann cells in vitro and in vivo. Brain Res 2009; 1262: 7-15.
3. Rosberg HE, Carlsson KS, Cederlund RI, Ramel E, Dahlin LB. Costs and outcome for serious hand and arm injuries during the first year after trauma a prospective study. BMC Public Health 2013; 13: 501.
4. Lukovic D, Moreno Manzano V, Stojkovic M, Bhattacharya SS, Erceg S. Concise review: Human pluripotent stem cells in the treatment of spinal cord injury. Stem Cells 2012; 30(9): 1787-1792.
5. Peng J, Wang Y, Zhang L, Zhao B, Zhao Z, Chen J, et al. Human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells differentiate into a Schwann-cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. Brain Res Bull 2011; 84(3): 235-243.
6. Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. Bone 2003; 33(6): 919-926.
7. Roobrouck VD, Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM. Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. Exp Cell Res 2008; 314(9): 1937-1944.
8. Troyer DL, Weiss ML. Wharton's Jelly Derived Cells Are a Primitive Stromal Cell Population. Stem cells 2008; 26(3): 591-599.
9. Grimpe B, Silver J. The extracellular matrix in axon regeneration. Prog Brain Res 2001; 137: 333-349.
10. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. J Neurosci Res 2000; 61(4): 364-370.
11. Geng X, Kwon OH, Jang J. Electrospinning

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-15]

of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. Biomaterials 2005; 26(27): 5427-5432.

12. Emamgholi A, Kaka Gh R, Sadri M, Sadraee H, Hosseini H. The synthesis of chitosan/ polyethylene nanofibersoxide on chitosan membrane: an applicable model in tissue engineering. AMHSR 2013; 10(4): 300-305 (Persian).
13. Gärtner A, Pereira T, Armada-da-Silva P, Amado S, Veloso A, Amorim I, et al. Effects of umbilical cord tissue mesenchymal stem cells (UCX®) on rat sciatic nerve regeneration after neurotmesis injuries. JSRM 2014; 10(1): 14-26.
14. Shirosaki Y, Hayakawa S, Osaka A, Lopes MA, Santos JD, Geuna S, et al. Challenges for nerve repair using chitosan-siloxane hybrid porous scaffolds. Biomed Res Int 2014; 2014: 153808.
15. Raisi A, Azizi S, Delirezh N, Heshmatian B, Amini K. Use of chitosan conduit for bridging small-Gap peripheral nerve defect in sciatic nerve transection model of rat. Iranian Journal of Veterinary Surgery 2010; 2(1): 89-100 (Persian).
16. Chen H, Zhang Y, Yang Z, Zhang H. Human umbilical cord Wharton's jelly-derived oligodendrocyte precursor-like cells for axon and myelin sheath regeneration. Neural Regen Res 2013; 8(10): 890-899.
17. 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 Neuro Sci 2012; 122(5): 237-247.
18. Zolfagari D, KaKa G, Sadri M, Sadraie SH, Emamgoli A, Asghari Jafarabadi M, et al. Study of the Coculture of Bone Marrow Stromal Cells (BMSCs) with PLGA Nanofibers Coated with Gelatin and Poliy-L-lysine. JZUMS 2014; 22(92): 1-13 (Persian).
19. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. Plast Reconstr Surg 1989; 83(1): 129-138.
20. Moazami Goudarzi M, Azarnia M, Kaka Gh, Sadraii SH, Khatibi Aghda A. Study of Bone Marrow Stromal Cells, Nerve Growth Factor, and Marginal on Nerve Regeneration in Rat Crushed Sciatic Nerve. J Mazandaran Univ Med Sci 2013; 23(102): 96-105 (Persian).
21. Ding F, Wu J, Yang Y, Hu W, Zhu Q, Tang X, et al. Use of tissue-engineered nerve grafts consisting of a chitosan/poly (lactic-co-glycolic acid)-based scaffold included with bone marrow mesenchymal cells for bridging 50-mm dog sciatic nerve gaps. Tissue Eng Part A 2010; 16(12): 3779-3790.
22. Simões MJ, Amado S, Gärtner A, Armada-Da-Silva PA, Raimondo S, Vieira M, et al. Use of chitosan scaffolds for repairing rat sciatic nerve defects. Ital J Anat Embryol 2010; 115(3): 190-210.
23. Gärtner A, Pereira T, Simões MJ, Armada-da-Silva PA, França ML, Sousa R, et al. Use of hybrid chitosan membranes and human mesenchymal stem cells from the Wharton jelly of umbilical cord for promoting nerve regeneration in an axonotmesis rat model. Neural Regen Res 2012; 7(29): 2247-2258.
24. Zhao T, Yan W, Xu K, Qi Y, Dai X, Shi Z. Combined treatment with platelet-rich plasma and brain-derived neurotrophic factor-overexpressing bone marrow stromal cells supports axonal remyelination in a rat spinal cord hemi-section model. Cytotherapy 2013; 15(7):792-804.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-15]

25. Shakhbazau A, Mohanty C, Shcharbin D, Bryszewska M, Caminade AM, Majoral JP, et al. Doxycycline-regulated GDNF expression promotes axonal regeneration and functional recovery in transected peripheral nerve. J Control Release 2013; 172(3): 841-851.
26. Dubový P, Raška O, Klusáková I, Stejskal L, Čelakovský P, Haninec P. Ciliary neurotrophic factor promotes motor reinnervation of the musculocutaneous nerve in an experimental model of end-to-side neurorrhaphy. BMC Neurosci 2011; 12: 58.
27. Guo ZY, Sun X, Xu XL, Zhao Q, Peng J, Wang Y. Human umbilical cord mesenchymal stem cells promote peripheral nerve repair via paracrine mechanisms. Neural Regen Res 2015; 10(4): 651-658.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-15]