

Study of Bone Marrow Stromal Cells, Nerve Growth Factor, and Matrigel on Nerve Regeneration in Rat Crushed Sciatic Nerve

Mostafa Moazami Goudarzi¹,
Mahnaz Azarnia²,
Gholamreza Kaka³,
Seyed Homayoon Sadraei⁴,
Amid Khatibi Aghda⁵

¹ MSc in Animal Developmental Biology, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran

² Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Tarbiat Moallem University, Tehran, Iran

³ Assistant Professor, Neuroscience Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴ Associate Professor, Department of Anatomy, Neuroscience Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁵ Assistant Professor, Department of Physical Medicine and Rehabilitation, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received February 7, 2013 ; Accepted July 19 , 2013)

Abstract

Background and purpose: The aim of this study was to test the effects of bone marrow stromal cells (BMSC), nerve growth factor (NGF) and Matrigel on nerve regeneration in crushed sciatic nerve in rat model by behavioral and electrophysiological examinations and histology.

Materials and methods: In this research 42 male adult rats were divided into six groups including Normal: healthy rats without any injuries, Control: rats with crushed sciatic nerve, Matryigel: rats with wounding cured cells by matrigel, NGF: rats with injured and crushed sciatic nerve treated by NGF, The autolog and Non-autolog remedial cells groups treated by non-autolog and autolog BMSC injection, respectively. The improvement rate was evaluated by SFI, electrophysiology and histology.

Results: In the treatment groups the SFI average increased after four weeks. The mean of SFI increased significantly after two weeks in both remedial cells groups ($P < 0.04$). The mean of nerve conductive velocity (NCV) was not significantly different in healthy group compared with treatment groups. The average of amplitude muscle action potential (AMP) in control group demonstrated an extreme decrease compared with healthy group ($P=0.067$). However, it increased in remedial groups. The count of nerve fiber in experimental groups showed a significant increase ($p=0.001$). The increase of myelin sheath width was higher in remedial (cells) group especially in non-autolog group but it was observed less in Matrigel group.

Conclusion: This study showed the positive effect of neurotrophine (NGF) and Matrigel on nerve regeneration of crushed sciatic nerve in rat model. NGF, BMSC and Matrigel injection in damaged nerve led to speedy improvement of crushed nerve.

Keywords: NGF, BMSC, Matrigel, improvement, sciatic nerve, rat

بررسی اثر سلول های استرومایی مغز استخوان به همراه نوروتروفین (NGF) و ماتریژل بر ترمیم عصب سیاتیک له شده در موش صحرایی

مصطفی معظمی گودرزی^۱

مهناز آذرنیا^۲

غلامرضا کاکا^۳

سید همایون صدرایی^۴

عمید خطیبی اقدا^۵

چکیده

سابقه و هدف: در این مطالعه تاثیر درمانی تزریق سلول های استرومایی مغز استخوان (Bone marrow stromal cells = BMSC)، فاکتور رشد عصب (Nerve growth factor = NGF) و ماتریژل بر عصب سیاتیک له شده موش صحرایی توسط بررسی رفتاری، الکتروفیزیولوژی و هیستولوژی ارزیابی شد.

مواد و روش ها: پس از له کردن عصب سیاتیک موش های صحرایی نر بالغ به طور تصادفی در شش گروه ۷ تایی تقسیم شدند. گروه نرمال، رت های سالم بدون ایجاد آسیب، گروه شاهد، رت های باله شدگی عصب سیاتیک بدون مداخله درمانی، گروه ماتریژل، رت های باله شدگی عصب سیاتیک که با تزریق NGF درمان گردیدند. گروه سلول درمانی غیر اتولوگ، رت های باله شدگی عصب سیاتیک که با تزریق غیر اتولوگ BMSC درمان شدند، گروه سلول درمانی اتولوگ، رت های باله شدگی عصب سیاتیک که با تزریق اتولوگ BMSC درمان شدند. میزان بهبودی توسط شاخص فعالیت حرکتی عصب سیاتیک (Sciatic functional index = SFI)، الکتروفیزیولوژی و مطالعات بافت شناسی ارزیابی گردید.

یافته ها: ن SFI در پایان هفته چهارم در گروه های درمان نسبت به گروه شاهد افزایش نشان داد گرچه این افزایش معنی دار نبود. میانگین SFI در پایان دو هفته پس از ترمیم در هر دو گروه سلول درمانی (اتولوگ و غیر اتولوگ) نسبت به گروه شاهد معنی دار بود ($p < 0/04$). بررسی میانگین سرعت هدایت عصب (Nerve conductive velocity = NCV) در گروه سالم نسبت به گروه های درمانی نیاز لحاظ آماری اختلاف معنی داری نداشت. میانگین دامنه پتانسیل فعالیت حرکتی (Amplitude muscle action potential = AMP) در گروه شاهد کاهش شدیدی را نسبت به گروه سالم ($p = 0/067$) نشان داد اما این متغیر در گروه های درمانی نسبت به گروه شاهد افزایش داشت. تعداد رشته های عصبی در گروه های درمانی، در هفته ششم پس از ترمیم، نسبت به گروه شاهد، افزایش داشته است. از لحاظ آماری گروه نرمال با سایر گروه های مورد آزمایش دارای اختلاف معنی دار بود ($p = 0/001$).

استنتاج: به نظر میرسد که سلول های استرومایی مغز استخوان به همراه نوروتروفین NGF و ماتریژل اثرات مثبتی بر ترمیم عصب سیاتیک له شده داشته است. به نظر می رسد، که سلول های استرومایی مغز استخوان بتوانند، با ترشح فاکتورهای رشد و نوروتروفیک در محل ضایعه از مرگ نورون های آسیب دیده جلوگیری کنند.

واژه های کلیدی: سلول های استرومایی مغز استخوان، فاکتور رشد عصب، ماتریژل، ترمیم، عصب سیاتیک، موش صحرایی

مقدمه

یکی از معضلاتی که جوامع بشری اعم از صنعتی و غیر صنعتی، با آن مواجهند، عوارض جبران ناپذیر آسیب

E-mail: gh_kaka@yahoo.com

مؤلف مسئول: غلامرضا کاکا - تهران: دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)

۱. کارشناس ارشد زیست شناسی علوم جانوری - تکوینی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

۲. دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت معلم

۳. استادیار، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

۴. دانشیار، گروه آناتومی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

۵. استادیار، گروه طب فیزیکی و توانبخشی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

✉ تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۱۹ تاریخ انجام اصلاحات: ۱۳۹۲/۱/۲۶ تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۳/۲۰

فعال کننده پلاسمینوژن بافتی می باشد (۱۱). کلاژن به عنوان یک ماتریکس ایده‌آل برای نگه‌داری فاکتورهای تغذیه کننده عصب یا سلول‌ها مفید می باشد (۱۲). سلول‌های استرومایی مغز استخوان (Bone marrow stromal cells=BMSC)، پس از ورود به بافت آسیب دیده و با توجه به شرایط محیطی بافت میزبان، به سلول‌های مورد لزوم برای بافت، تمایز می یابند. این ویژگی سلول‌های استرومایی مغز استخوان در روند ترمیم بافت عصبی آسیب دیده مؤثر می باشد. هم‌چنین سلول‌های استرومایی مغز استخوان با انتقال به محل عصب آسیب دیده، می توانند، میلین‌سازی را در اطراف فیبرهای بازسازی شده عصب تشدید کنند و به این طریق در روند ترمیم عصب مؤثر باشند. هدف از این تحقیق بررسی تأثیر تزریق ماتریژل و نوروتروفین NGF بر ترمیم عصب سیاتیک له شده توسط آزمون‌های رفتاری، شاخص عمل عصب سیاتیک و الکتروفیزیولوژی است.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر بر روی ۴۲ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار به وزن ۳۰۰-۲۵۰ گرم انجام شد. رت‌ها در مرکز حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تحت شرایط طبیعی شامل چرخه ۱۲ ساعت روشنایی و تاریکی، دمای ۲۵-۲۳ درجه‌ی سانتی‌گراد، آب و غذای کافی نگهداری شدند. همه آزمایشات و عمل‌های انجام شده براساس قوانین حمایت از حیوانات آزمایشگاهی که مصوب دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) بوده است انجام گردید.

موش‌ها توسط مخلوطی از کتامین به مقدار ۹۰ mg/kg و گزیلازین (زایلازین) به مقدار ۱۰ mg/kg به صورت داخل صفاقی بیهوش شدند. پس از تراشیدن موی پای راست حیوان، پوست ناحیه خلفی خارجی ران توسط بتادین والکل استریل شد.

برشی طولی به میزان ۳ سانتی‌متر در پوست خلفی خارجی ران ایجاد شد. عضلات هم استرینگ و فاسیا

سراسر دنیا دچار آسیب‌های ناشی از سیستم‌های عصبی می شوند (۱). تخمین زده می شود که حداقل ۱۰ هزار نفر از این تعداد به نوعی دچار آسیب غیر قابل برگشت به فیبرهای عصبی می شوند (۲). روش‌های مختلف درمانی در ترمیم اعصاب محیطی استفاده شده است اما هنوز ۵۰ درصد این ضایعات برای همیشه باقی مانده و معلولیت به جا می گذارد (۳،۴). اما با در نظر گرفتن این نکته که برخلاف سیستم عصبی مرکزی، فیبرهای عصبی محیطی قادر به بازسازی و عصب‌دهی هدف‌های دیستال می باشند و این پروسه ترمیم تقریباً بلافاصله بعد از جراحی آغاز می شود می توان این فرضیه را مطرح نمود که درک مکانیزم‌هایی که تعدیل کننده‌های اولیه ترمیم آکسونی جهت تنظیم رشد نوریت به کار می‌برند، ممکن است برای بیان روش‌هایی جدید جهت تسریع و تقویت بازسازی عصبی مفید باشند (۴). از این رو جای امیدواری است که در سیستم عصبی محیطی که بر خلاف سیستم عصبی مرکزی، قادر است بلافاصله متعاقب جراحی، فرآیندهای بازسازی را آغاز نماید، بتوان با به کار بردن مکانیسم‌های بیولوژی سلولی روش‌های نوین درمانی را ارائه نمود. فاکتور رشد عصب (Nerve growth factor=NGF) فاکتور اختصاصی برای زنده ماندن نورون‌های (۵). به دنبال قطع اکسون، سلول‌های شوان در قطعه انتهایی شروع به تولید NGF می کنند (۶). NGF سبب تحریک مهاجرت سلول‌های شوان و کاهش دژنره شدن و افزایش ترمیم عملی پس از صدمه اعصاب محیطی و افزایش تعداد آکسون‌های میلین‌دار، ضخامت میلین و بلوغ بیش تر لایه‌های اندوتلیال می گردد (۸). تحقیقات دیگر نشان می دهد که NGF ترمیم نورون‌های حرکتی را تسریع می نماید (۹،۱۰). تجویز NGF سبب افزایش تعداد آکسون‌های میلین‌دار و بلوغ بیش تر لایه‌های اندوتلیال می گردد (۱۰). ماتریژل مخلوطی از اجزا غشاء پایه است که شامل لامینین، کلاژن نوع چهارم، پروتئوگلیکان، هیپاران سولفات و هم‌چنین فاکتور رشد و فاکتور

کنار زده شد و عصب سیاتیک نمایان شد. عصب سیاتیک توسط پنس هموستاتیک متوسط جراحی به مدت ۱۰ ثانیه در دو جهت عمود بر یکدیگر له شد. این پن سپس از فشرده شدن به طور کامل بسته شده و وضعیتی مشابه را ایجاد می‌کرد. تمام نمونه‌ها با این روش تحت آسیب قرار گرفتند.

برای تهیه سلول‌های استرومایی مغز استخوان این گونه عمل شد: ابتدا موش‌های صحرایی بالغ نر به صورت تصادفی انتخاب شده و پس از بیهوش شدن استخوان ران پانمایان شده و توسط مته با قطر یک میلی‌متر سوراخی در سطح خارجی ران ایجاد شده و با کمک سرنگ ۵ میلی‌لیتر حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط Alpha-MEM و سرم جنین گاوی ۱۰ درصد Fetal Bovine Serum (FBS) و یک سرسوزن 18G مغز استخوان را از هر دو انتهای پروگزیمال و دیستال استخوان آسپیره کرده و تمام محتویات سرنگ را به درون یک فلاسک ۲۵ سی سی تخلیه و در انکوباتور با $pH=7.2$ ، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و میزان CO_2 ۵ درصد و شرایط مرطوب برای مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند و سپس این محیط تعویض گردید. هنگام تعویض محیط، سلول‌ها توسط Phosphate Buffer Saline (PBS) استریل شسته شدند. پس از آن تعویض محیط هر ۲ تا ۳ روز تا تخلیه کامل سلول‌های خونی و خون‌ساز و پر شدن بیش از ۸۰ درصد کف فلاسک ادامه یافت. سپس سلول‌های چسبیده به کف فلاسک به کمک روش آنزیمی، یعنی افزودن یک سی سی از محلول Trypsin/EDTA از کف فلاسک جدا و پاساژ داده شدند و این کار حداقل برای ۴ پاساژ و هر بار بر اساس پر شدن کف فلاسک ادامه یافت.

برای آماده کردن سلول‌های BMSC جهت تزریق در محل آسیب دیده این گونه عمل شد:

- خالی کردن محیط کشت و سلول‌ها و شستشو دادن با محلول PBS

- افزودن ۱ سی سی محلول Trypsin/EDTA

- انجام سانتریفوژ در دور ۲۰۰۰ به مدت ۴ دقیقه

- خالی کردن مایع رویی و اضافه کردن ۱ سی سی محیط کشت Alpha-MEM

- شمارش سلول‌های BMSC در سوسپانسیون حاوی سلول با کمک Neubauer Hemocytometer
- انجام سانتریفوژ در دور ۲۰۰۰ به مدت ۴ دقیقه (به همراه محیط کشت Alpha-MEM)

طریقه شمارش سلول‌های BMSC در سوسپانسیون حاوی سلول با کمک Neubauer Hemocytometer با استفاده از سمپلر به مقدار ۱۰ لاندا از سوسپانسیون حاوی سلول استرومایی برداشته و با ۱۰ لاندا تریپان بلو ترکیب شد.

سپس ۱۰ لاندا از محلول به دست آمده جهت شمارش سلولی در زیر Neubauer Hemocytometer قرار گرفت. خاصیت تریپان بلو: باعث آبی شدن سلول‌های مرده و کم کردن خطا در شمارش می‌شود.

سلول‌ها در هر ۴ مربع ۱۶ خانه‌ای Neubauer Hemocytometer شمارش شد و پس از میانگین گرفتن از تعداد سلول‌ها عدد به دست آمده در ۲۰۰۰ ضرب گردید تا تعداد سلول‌ها در حجم ۱ سی سی محیط کشت به دست آید.

سپس موش‌ها به‌طور تصادفی به ۶ گروه تقسیم شدند:

- گروه اول یا سالم بدون هیچ آسیبی؛

- گروه دوم یا شاهد که فقط عصب سیاتیک له شد و هیچ مداخله‌ای انجام نشد؛

- گروه سوم یا ماتریژل که به محل آسیب مقدار ۹ میکرولیتر ماتریژل (Biomedical, USA) تزریق شد؛

- گروه چهارم یا NGF که در محل آسیب مقدار ۹ میکرولیتر NGF (Millipore) تزریق گردید.

- گروه پنجم یا سلول درمانی غیر اتولوگ که در محل آسیب مقدار ۹ میکرولیتر از محلول BMSC غیر اتولوگ (۱۰۰ هزار سلول) به همراه NGF و ماتریژل تزریق شد.

گروه ششم یا سلول درمانی اتولوگ (۱۰۰ هزار سلول) که در محل آسیب مقدار ۹ میکرولیتر از محلول BMSC اتولوگ به همراه NGF و ماتریژل تزریق شد.

است و عددهای بین ۱۰۰-الی ۱۰- سیر بهبودی حرکتی را نشان می‌دهد و نتیجه‌های بین ۱۰- تا ۱۰+ علامت طبیعی بودن حرکت پا می‌باشد (۱۵،۱۴). این روش بهترین ارزیابی برای سنجش رفتار حرکتی است (۱۷،۱۶). بررسی الکتروفیزیولوژی: در پایان هفته ۶ موش‌ها بیهوش شده و برای ثبت دامنه پتانسیل فعالیت حرکتی Amplitude muscle action potential (AMP) و سرعت هدایت پیام عصبی (NCV) Nerve conductive velocity توسط دستگاه ثبت الکترومیوگرافی، الکتروود تحریک در زیر عصب سیاتیک قرار گرفته و از الکترودهای کفه‌ای، یکی روی عضله یگاستروکیمیوس و دیگری روی قوزک خارجی تیبیا قرار می‌گیرد.

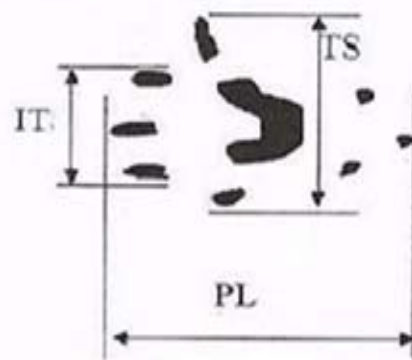
بررسی هیستولوژی: در پایان هفته ششم پس از ترمیم، همه حیوانات جهت مطالعه بافت شناسی پرفیوژن شدند. در تمام موارد پس از پرفیوژن، عصب سیاتیک را یک میلی‌متر قبل و یک میلی‌متر بعد از محل ترمیم بریده و نمونه در ثابت کننده فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد. پس از ۷۲ ساعت و ثبوت نمونه‌ها و انجام مراحل پروسس، از ناحیه له شده اعصاب سیاتیک به صورت عرضی برش تهیه شد و با روش همتاکسیلین-ائوزین رنگ آمیزی شدند. نمونه‌ها توسط میکروسکوپ پیشرفته تحقیقاتی در بزرگ‌نمایی‌های شیئی ۱۰ و ۱۰۰ توسط دوربین دیجیتالی متصل به کامپیوتر عکس گرفته شدند. ابتدا تعداد رشته‌های عصبی در سطحی برابر با ۱۰۰۰۰ میکرومتر مربع، با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ برابر شمارش شد. پس از شمارش رشته‌های عصبی، ضخامت میلین محاسبه شد. سپس تعداد و مساحت عروق خونی در سطحی برابر با ۱۰۰۰ میکرومتر مربع، با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ برابر مورد مطالعه قرار گرفت. سپس داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS 18.0 تجزیه و تحلیل شد. نتایج به دست آمده به صورت میانگین و خطای انحراف از میانگین (MeanSEM) نمایش داده شد. برای مقایسه نتایج بین گروه‌ها از روش آماری آنالیز واریانس یکطرفه و Post Hoc Tukey استفاده گردید. سطح معنی‌داری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

با استفاده از سرنگ همیلتون میزان ۹ میکرولیتر از محلول فوق به محل له شده عصب تزریق گردید. تزریق ۹ میکرولیتر در مدت ۹ دقیقه در ۳ نقطه محل ضایعه، یک میلی‌متری پروگزیمال و دیستال آن انجام گرفت. پس از تزریق، پوست با نخ بخیه ۵-۰ سیلک دوخته شد و با بتادین ضد عفونی گردید.

بررسی رفتاری (ارزیابی شاخص عملکرد عصب سیاتیک): ارزیابی شاخص عملکرد عصب سیاتیک (SFI): در پایان هفته‌های ۲، ۴ و ۶ بعد از عمل جراحی کف پای مربوط به عصب مجروح رت با جوهر رنگی شد، سپس حیوان بر روی کاغذ سفیدی که در کف راهرویی به ابعاد $20 \times 7 \times 60$ سانتی‌متر راه رفت. سپس SFI بر اساس فرمول زیر برای پای جراحی شده و پای سالم محاسبه گردید (۱۳).

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

طول کف پا (PL)، فاصله بین سر انگشتان ۵ و ۱ (TS)، فاصله بین سر انگشتان ۲ و ۴ (IT)، سمت آزمایش (Experimental=E) و سمت سالم (Normal=N) (تمام اندازه‌ها بر حسب میلی‌متر) (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: نمایش کف پای رت و معرفی پارامترهای اندازه‌گیری شده در شاخص عملکرد عصب سیاتیک (SFI)

در بررسی مقادیر SFI باید گفت اگر مقدار ۱۰۰- یا کم‌تر باشد فعالیت حرکتی به طور کامل از بین رفته

یافته‌ها

آزمون حرکتی یا SFI

بعد از له کردن عصب سیاتیک هیچ کدام از حیوانات توانایی راه رفتن بر روی کف پای آسیب دیده را نداشتند. توانایی راه رفتن در پای جراحی شده از پایان هفته دوم به بعد شروع شد. برگشت به حالت طبیعی (SFI) در حد فاصل +10 و -10 در گروه‌های شاهد، ماتریزل و NGF در پایان هفته ۶ پس از ترمیم مشاهده گردید. اما روند بهبودی در گروه‌های ترمیم شده با ماتریزل و NGF نسبت به گروه شاهد سریع‌تر بود (تصویر شماره ۲). تا انتهای هفته ششم پس از ترمیم، از لحاظ آماری اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی مشاهده نشد (جدول شماره ۱).

سپس داده‌ها توسط نرم افزار SPSS18.0 تجزیه و تحلیل شد. نتایج به دست آمده به صورت میانگین و خطای انحراف از میانگین (Mean±SEM) نمایش داده شد. برای مقایسه نتایج بین گروه‌ها از روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه و PostHocTukey استفاده گردید. سطح معنی داری $p < 0/05$ در نظر گرفته شد.



تصویر شماره ۲: تصویر پاهای آسیب دیده موش‌های گروه‌های مختلف مورد آزمایش، هنگام راه رفتن در پایان هفته‌های ۲، ۴ و ۶ پس از ترمیم، جهت ارزیابی شاخص عملکرد حرکتی عصب سیاتیک یا SFI (A. گروه سالم، B. گروه شاهد، C. گروه ماتریزل، D. گروه NGF، E. گروه اتولوگ، F. گروه غیر اتولوگ).

جدول شماره ۱: ارزیابی شاخص عملکرد حرکتی عصب سیاتیک در پایان هفته‌های ۲، ۴ و ۶ بعد از ترمیم در گروه‌های مورد آزمایش (آزمون حرکتی یا SFI)

گروه‌ها	پایان هفته	۲	۴	۶
شاهد (n=7)	-۷۴/۹±۲/۱۳	-۲۵/۰±۷/۶۲	-۹/۵±۶/۸۷	p = ۰/۹
ماتریزل (n=7)	-۶۷/۸±۱/۸۱	-۱۶/۱±۶/۳۷	-۵/۶±۳/۵۵	p = ۰/۹
NGF (n=7)	-۶۰/۴±۶/۰۱	-۱۷/۳±۹/۹۷	-۶/۷±۵/۹۷	p = ۰/۹
غیر اتولوگ (n=7)	*-۵۴/۸±۱/۵۵	-۱۲/۲±۷/۲۱	-۳/۲±۳/۷۶	p = ۰/۸
اتولوگ (n=7)	*-۴۷/۵±۳/۹۲	-۱۰/۷±۲/۱۸	-۵/۷±۲/۲۲	p = ۰/۹
نرمال (n=7)	۴/۵±۲/۵۲	-۱/۲±۳/۲۲	۶/۲±۴/۱۵	p = ۱

* اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد

الکتروفیزیولوژی

در انتهای هفته ۶ از تمام گروه‌ها الکتروفیزیولوژی به عمل آمد (جدول شماره ۲). همان‌طور که می‌دانیم با استفاده از میزان AMP می‌توان مقدار تخریب و ترمیم آکسون‌ها را به دست آورد. مقدار عددی NCV نشان دهنده سلامت میلین می‌باشد. هر چه قدر NCV در گروه‌های آزمایش شده و تحت در مان با نمونه سالم از نظر عددی اختلاف داشته باشد، نشان دهنده آسیب و عدم ترمیم میلین می‌باشد. میزان عددی AMP و NCV در هفته ششم پس از ترمیم، در گروه‌های درمانی، دارای شیب ملایمی است و این امر نشان دهنده روند بهبودی در گروه‌های درمانی می‌باشد. با دقت بیشتر، می‌توان دریافت، که روند بهبودی در گروه‌های سلول درمانی، (اتولوگ و غیر اتولوگ) نسبت به سایر گروه‌های درمانی، (شاهد، NGF و ماتریزل) بهتر بوده و این میزان به نمونه نرمال نزدیک‌تر است (مطالعات بافتی نیز این مطلب را تأیید می‌کند). از لحاظ آماری هیچ اختلاف معنی‌داری در گروه‌های مورد آزمایش مشاهده نشد.

مطالعات بافت شناسی

الف) بررسی تعداد فیبرهای عصبی

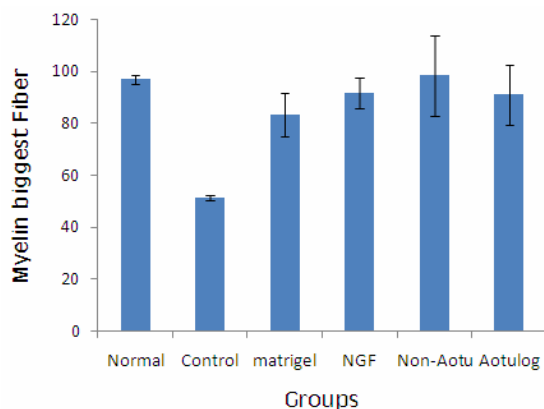
نتایج شمارش تعداد رشته‌های عصبی در سطحی برابر با ۱۰۰۰۰ میکرومتر مربع در نمودار شماره ۱ و

جدول شماره ۲: مقایسه میزان بهبودی عصب له شده، در گروه های مختلف، در بررسی الکتروفیزیولوژی {سرعت هدایت پیام عصبی (NCV) و دامنه‌ی پتانسیل فعالیت حرکتی (AMP)}

گروه‌ها	متغیرها	AMP(mv)	NCV(m/s)
سالم (n=7)		۳۳/۳±۰/۵۸	۵۴/۷±۲/۵۶
		p = ۰/۷	p = ۰/۹
شاهد (n=7)		۱۷/۲±۲/۶	۲۷/۸±۴/۲۲
		p = ۰/۷	p = ۰/۰۶
(n=7)		۱۸/۰±۳/۷۶	۳۱/۱±۷/۳۳
		p = ۰/۵	p = ۰/۱
(n=7)NGF		۲۱/۷±۴/۲۵	۳۳/۶±۶/۴۹
		p = ۰/۲	p = ۰/۲
غیر اتولوگ (n=7)		۲۶/۰±۴/۲۷	۳۵/۴±۹/۱۷
		p = ۰/۹	p = ۰/۳
اتولوگ (n=7)		۳۰/۶±۲/۱۷	۳۵/۴±۸/۹۱
		p = ۰/۷	p = ۰/۳

ب) بررسی میانگین ضخامت میلین

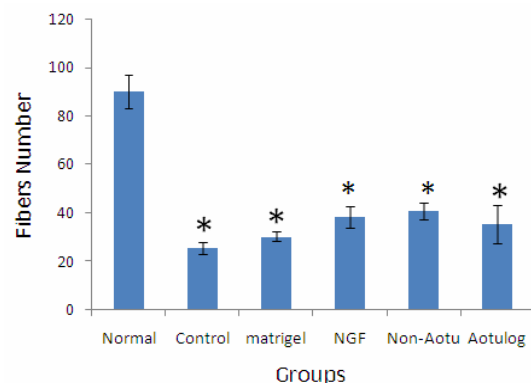
نتایج حاصل از میانگین ضخامت میلین، در گروه‌های مورد آزمایش، نشان می‌دهد که افزایش میانگین میلین در تمام گروه‌ها وجود دارد، که این افزایش ضخامت در گروه سلول درمانی به ویژه غیر اتولوگ مشهودتر است، اما این افزایش در گروه ماتریژل به نسبت سایر گروه‌های درمانی کم‌تر دیده می‌شود (نمودار شماره ۲).



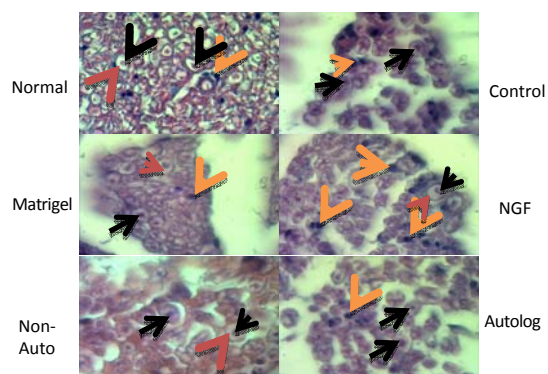
نمودار شماره ۲: ضخامت میلین بزرگ‌ترین رشته‌های عصبی در گروه‌های مورد آزمایش

با توجه به نمودار ضخامت میلین در گروه‌های سلول درمانی نسبت به سایر گروه‌ها بیش‌تر می‌باشد. از لحاظ آماری هیچ اختلاف معنی داری بین گروه‌ها مشاهده نشد.

تصویر شماره ۳ نمایش داده شده است. همان‌طور که مشخص است، تعداد رشته‌های عصبی در گروه‌های درمانی، در هفته ششم پس از ترمیم، افزایش داشته است. اما افزایش تعداد رشته‌های عصبی در گروه‌های درمان شده با NGF و سلول درمانی، نسبت به سایر گروه‌ها بیش‌تر بود. لازم به ذکر است که از لحاظ آماری، گروه نرمال با سایر گروه‌های مورد آزمایش دارای اختلاف معنی دار بود ($p = ۰/۰۰۱$).



نمودار شماره ۱: نتایج حاصل از شمارش تعداد رشته‌های عصبی در گروه‌های مورد آزمایش. همان‌طور که نمودار در هر گروه نشان می‌دهد، تعداد فیبرهای عصبی، در هفته ششم پس از ترمیم، در گروه سلول درمانی نسبت به سایر گروه‌ها افزایش داشته است. * اختلاف معنی دار با گروه نرمال.



تصویر شماره ۳: تصویر میکروسکوپی از برش‌های عرضی عصب سیاتیک، در گروه‌های مورد آزمایش با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ برابر. همان‌طور که در تصویر مشخص است، تعداد رشته‌های عصبی در گروه‌های سلول درمانی و NGF نسبت به سایر گروه‌ها بیش‌تر می‌باشد. (پیکان سیاه رنگ آکسون، پیکان قرمز میلین و پیکان نارنجی هسته سلول شوآن را نشان می‌دهد).

بحث

آزمون شاخص عمل عصب سیاتیک (آزمون SFI) در انواع مختلف بررسی ترمیم در عصب سیاتیک به منظور بررسی میزان بهبودی عملی عصب سیاتیک به طور متعدد استفاده شد است (۱۸، ۱۵). در مطالعه حاضر در پایان هفته دوم پس از ایجاد ضایعه SFI معادل $2/2 \pm 74/91$ و در پایان هفته چهارم برابر با $7 \pm 25/0$ و در پایان هفته ششم معادل $8/8 \pm 9/47$ شد که نشان می‌داد بدون دخالت هیچ نوع عامل خارجی SFI در دراز مدت (بیش از ۲ ماه) بسته به نوع و شدت ضایعه به نمونه سالم نزدیک شده و شروع به بهبودی می‌نماید. در همین رابطه می‌توان به کار Swett و همکاران که از آزمون SFI برای بررسی میزان بازگشت عمل عصب سیاتیک استفاده کردند، اشاره کرد. یافته مطالعه حاضر در استفاده از آزمون SFI برای ارزیابی بازگشت عمل عصب سیاتیک با یافته‌های سایر محققان هم‌خوانی دارد (۱۹-۲۲).

هری و همکاران با مطالعه بر روی ترمیم عصب سیاتیک موش صحرایی پس از ایجاد برش در عصب و ترمیم آن مشاهده نمودند که بیش‌تر نتایج بهبودی فانکشنال در هفته ۲ تا ۱۲ اتفاق می‌افتد (۲۳). در مطالعه حاضر SFI در پایان هفته ششم پس از ایجاد ضایعه در گروه سلول درمانی غیر اتولوگ و اتولوگ به ترتیب $3/2 \pm 3/76$ و $5/7 \pm 2/22$ به دست آمد. بهبودی و تسریع در روند ترمیم عصب له شده در گروه‌های سلول درمانی (اتولوگ و غیر اتولوگ) نسبت به گروه شاهد و دیگر گروه‌های درمانی در پایان هفته چهارم دیده شد. وانگ و همکاران پس از له کردن عصب سیاتیک و استفاده از NGF به طور موضعی جهت تسریع روند ترمیم ملاحظه نمودند که NCV چهار هفته پس از ترمیم در گروه با NGF برابر $31/68 \pm 15/32$ متر بر ثانیه و در گروه بدون NGF برابر $21/5 \pm 4/82$ می‌باشد (۲۴).

لی نیز با استفاده از گرافت ورید رانی حاوی (NGF 100ng) شکاف ۱ سانتی متر از عصب سیاتیک موش صحرایی را ترمیم نمود و نتیجه گرفت که NCV

در هفته پنجم برابر با $4/7 \pm 8/6$ است (۲۵). در تحقیق حاضر میانگین NCV در پایان هفته ششم پس از ترمیم در گروه سلول درمانی برابر با $9/17 \pm 35/46$ می‌باشد. میانگین NCV در نمونه سالم $2/56 \pm 54/75$ می‌باشد. مقدار عددی NCV نشان‌دهنده سلامت میلین می‌باشد. هر چقدر NCV در گروه‌های آزمایش شده با نمونه سالم از نظر عددی اختلاف داشته باشد، نشان‌دهنده آسیب و عدم ترمیم میلین می‌باشد. اندازه‌گیری AMP و NCV می‌تواند اطلاعاتی را در مورد کانال‌های سدیم و پتاسیم در عصب ارائه دهد. به طور حتم میزان AMP و NCV با محل و میزان سدیم در کانال‌های موجود در عصب مرتبط است و با استفاده از میزان AMP می‌توان مقدار تخریب و ترمیم آکسون‌ها را به دست آورد (۲۶). در تحقیق حاضر مقدار AMP در نمونه سالم $0/58 \pm 33/35$ می‌باشد و در گروه‌های سلول درمانی $2/17 \pm 30/66$ می‌باشد. در تحقیق حاضر، در هفته ششم پس از جراحی و له کردن عصب سیاتیک، و پیوند سلول به منظور ترمیم در عصب آسیب دیده، تعداد رشته‌های عصبی و هم‌چنین ضخامت میلین در گروه‌های مختلف درمانی، نسبت به گروه شاهد یا کنترل، افزایش داشته است. که این افزایش در گروه سلول درمانی (اتولوگ و غیر اتولوگ) مشهودتر است. در واقع پیوند سلول‌های استرومایی مغز استخوان در روند ترمیم عصب مؤثر بوده و میلین‌سازی را در اطراف عصب آسیب دیده القاء می‌کند.

Cuevas و همکارانش در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که در صورت تزریق سلول‌های BMSC تمایز نیافته به محل عصب سیاتیک قطع شده، درصدی از این سلول‌ها به سلول‌های میلین‌ساز تبدیل شده به ترمیم بافت آسیب دیده کمک می‌نمایند (۲۷).

Pereira Lopez و همکارانش در سال ۲۰۰۶ طی تحقیقی، سلول‌های استرومایی تمایز نیافته موش صحرایی را در داخل یک تیوب هدایت‌گر کلاژنی به طول سه میلی‌متر تزریق کرده و پس از شش هفته، بهبودی قابل ملاحظه‌ای را در این حیوانات نسبت به

محافظتی بر سیستم عروق خونی می‌باشد. با توجه به مطالب فوق افزایش عروق خونی در گروه‌های درمانی تحقیق حاضر توجیه پذیر است. با توجه به نتایج به دست آمده از گروه‌های مورد آزمایش به نظر می‌رسد سلول‌های استرومایی مغز استخوان به همراه ماتریژل و NGF می‌توانند در تسریع بهبودی در ترمیم آکسون‌ها و میلین‌سازی در عصب سیاتیک مؤثر باشند.

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که براساس نتایج مطالعه حاضر در ارتباط با ارزیابی رفتاری، الکتروفیزیولوژی و بافت‌شناسی دژنراسیون عصبی ناشی از له کردن عصب سیاتیک در موش صحرائی و اثر سلول‌های استرومایی مغز استخوان به همراه نوروتروفین NGF و ماتریژل بر ترمیم عصبی می‌توان نتیجه گرفت که تزریق BMSC به همراه NGF و ماتریژل در عصب آسیب دیده سبب تسریع در ترمیم عصب له شده می‌شود. در واقع حضور فاکتورهای رشد در رشد سریع و مسیریابی صحیح آکسون‌های ترمیم شده مؤثر است. به نظر می‌رسد، که سلول‌های استرومایی مغز استخوان بتوانند، با ترشح فاکتورهای رشد و نوروتروفیک در محل ضایعه از مرگ نورون‌های آسیب دیده جلوگیری کنند.

سپاسگزاری

این مطالعه با مساعدت معاونت علمی و فن‌آوری ریاست جمهوری در مرکز علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) به انجام رسید که بدین وسیله تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. He C, Chen Z, Chen Z. Enhancement of motor nerve regeneration by nerve growth factor. *Microsurgery* 1992; 13(3): 151-154.
2. Abe N, Cavalli V. Nerve injury signaling. *Curr Opin Neurobiol.* 2008; 18(3): 276-283.
3. Smith D, Tweed C, Fernyhough P, Glazner GW. Nuclear factor-KappaB activation in

حیوانات گروه کنترل مشاهده نمودند (۲۸). در تحقیق آنان تعداد آکسون‌ها و نیز تعداد آکسون‌های میلینه، نسبت به گروه کنترل، به میزان معنی‌داری افزایش یافته بود (۲۷).

Hou و همکارانش در سال ۲۰۰۶ اعلام کردند که پیوند سلول‌های استرومایی مغز استخوان که توسط ترکیبی از فاکتورهای رشد از جمله فاکتور رشد گلیال متمایز شده باشد به محل عصب قطع شده‌ای که دو سر آن توسط لوله رابط محتوی رشته‌های پلیمری به هم متصل شده باشد می‌تواند سبب ترمیم عصب در ناحیه قطع شده گردد (۲۹). تحقیقات فوق، نمایانگر نقش مثبت سلول‌های استرومایی تمایز نیافته در بهبود آسیب عصب سیاتیک است. علاوه بر اثرات سودمند ناشی از تمایز این سلول‌ها به سلول‌های شوان، ترشح فاکتورهای نوروتروفیک از جمله NGF، BDNF، GDNF و CNTF را عامل مؤثر در ترمیم عصبی دانستند (۲۷، ۲۸). همان‌طور که گفته شد کلاژن یکی از اجزاء اصلی ماتریژل می‌باشد و می‌تواند در تشکیل پری‌نوریوم در طی ترمیم عصب مؤثر باشد. کلاژن موجود در ماتریژل، سبب رشد رگ‌های خونی جهت رساندن مواد غذایی به محل آسیب دیده می‌شود و نقش مهمی در تشکیل بافت‌ها دارد. پرلکان یک پروتئوگلیکان هپاران سولفات است که نقش به‌سزایی در روند رشد عروق خونی دارد. NGF ترمیم را تسریع کرده و سبب تکامل شاخه‌های جانبی آکسون‌های حسی آسیب دیده و افزایش تعداد آکسون‌های میلین‌دار می‌شود. هم‌چنین NGF دارای اثر

- axons and Schwann cells in experimental sciatic nerve injury and its role in modulating axon regeneration: studies with Etanercept. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2009; 68(6): 691-700.
4. Frisen J. Determinants of axonal regeneration. *Histol Histopathol* 1997; 12(3): 857-868.

5. Rabinovsky ED, Draghia-Akli R. Insulin-like growth factor I plasmid therapy promotes in vivo angiogenesis. *Mol Ther* 2004; 9(1): 46-55.
6. Lundborg G. Nerve regeneration and repair- A review. *Acta Orthop Scand* 1987; 58(2): 145-169.
7. Santos PM, Winterowd JG, Allen GG, Bothwell MA, Rubel EW. Nerve growth factor: increased angiogenesis without improved nerve regeneration. *OtoLaryngol Head Neck Surg* 1991; 105(1): 12-25.
8. Chamberlain LJ, Yannas JV, Hsu HP, Spector M. Connective tissue response to tubular implants for peripheral nerve regeneration: the role of myofibroblasts. *J Comp Neurol* 2000; 417 (4): 415-430.
9. Thoenen H, Bandtlow C, Heumann R, Lindholm D, Meyer M, Rohrer H. Nerve growth factor: Cellular localization and regulation of synthesis. *Cell Mol Neurobiol* 1988; 8(1): 35-40.
10. Ernfors P, Henschen A, Olson L, Persson H. Expression of nerve growth factor receptor mRNA is developmentally regulated and increased after axotomy in rat spinal cord motoneurons. *Neuron* 1989; 2(6): 1605-1613.
11. Doubleday B, Robinson PP. The role of nerve growth factor in collateral reinnervation by cutaneous C-fibres in the rat. *Brain Res* 1992; 593(2): 179-184.
12. Santos PM, Winterowd JG, Allen GG, Bothwell MA, Rubel EW. Nerve growth factor: Increased angiogenesis without improved nerve regeneration. *OtoLaryngol Head Neck Surg* 1991; 105(1): 12-25.
13. Fawcett DW. Bloom and Fawcett. A Textbook of histology. 12th ed. New York: Chapman and Hall; 1994. p. 309-364.
14. 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.
15. Swett JE, Hong CZ, Miller PG. All peroneal motoneurons of the rat survive crush injury but some fail to reinnervate their original targets. *J Comp Neurol* 1991; 304(2): 234-252.
16. Johnston RB, Zachary L, Dellon AL, Seiler WA, Teplica DM. Improved imaging of rat hindfoot prints for walking track analysis. *J Neurosci Meth* 1991; 38: 111-114.
17. Chen S, Bisby MA. Impaired motor axon regeneration in the C57BL/Ola mouse. *J Comp Neurol* 1983; 333(3): 449-454.
18. Varejao AS, Meek MF, Ferreira AJ, Patricio JA, Cabrita AM. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *J Neurosci Meth* 2001; 108(1): 1-9.
19. Swett JE, Hong CZ, Miller PG. All peroneal motoneurons of the rat survive crush injury but some fail to reinnervate their original targets. *J Comp Neurol* 1991; 304(2): 234-252.
20. Chen S, Bisby MA. Impaired motor axon regeneration in the C57BL/Ola mouse. *J Comp Neurol* 1983; 333(3): 449-454.
21. AL-Bishri A, Dablin L, Sunzel B, Rosenquist J. Systemic betamethasone accelerates functional recovery after a crush injury to rat sciatic nerve. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63(7): 973-977.
22. Welch JA, Kraus KH, Wells MR, Blunt DG, Weremowitz J. Effect of combined administration of insulin-like growth factor and platelet-derived growth factor on the regeneration of transected and anastomosed

- sciatic nerve in rats. *Am J Vet Res* 1997; 58(9): 1033-1037.
23. Hare GMT, Evans PJ, Mackinnon SE, Best TJ, Bain JR, Szalai JP, et al. Walking track analysis: A long-term assessment of peripheral nerve recovery. *Plast Reconstr Surg* 1992; 89(2): 251-258.
24. Wang KK, Nemeth IR, Seckel BR, Chakalis-Haley DP, Swann DA, Kuo JW, et al. Hyaluronic acid enhances peripheral nerve regeneration in vivo. *Microsurgery* 1998; 18(4): 270-275.
25. Pu LL, Syed SA, Reid M, Patwa H, Goldstein JM, Forman DL, et al. Effects of nerve growth factor on nerve regeneration through a vein graft across a gap. *Plast Reconstr Surg* 1999; 104(5): 1379-1385.
26. Daube JR. Alteration of wave forms and artefacts. In: Daube JR. *Clinical neurophysiology*. Philadelphia: FADavis; 1996. p. 65-68.
27. Cuevas P, Carceller F, Dujovny M, Garcia-Gomez I, Cuevas B, Gonzalez-Corrochano R, et al. Peripheral nerve regeneration by bone marrow stromal cells. *Neurol Res* 2002; 24(7): 634-638.
28. Pereira Lopes FR, Camargo de Moura Campos L, Dias Correa J JR, Balduino A, Lora S, Langone F, et al. Bone marrow stromal cells and resorbable collagen guidance tubes enhance sciatic nerve regeneration in mice. *Exp Neurol* 2006; 198(2): 457-468.
29. Hou SY, Zhang HY, Quan DP, Liu XL, Zhu JK. Tissue-engineered peripheral nerve grafting by differentiated bone marrow stromal cells. *Neuroscience* 2006; 140(1): 101-110.