

The Effect of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells on Sensory-Motor Function and GAP-43 Protein Expression in Spinal Cord Injury Induced by Weight-Dropping in Rats

Mohsen Rezaei¹,
 Mohammad Taghi Mohammadi²,
 Hassan Qoshooni³,
 Farideh Bahrami³,
 Zahra Bahari³,
 Shima Shahyad⁴,
 Raheleh Halabian⁵

¹ PhD in Medical Physiology, School of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Professor, Department of Physiology and Medical Physics, School of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Associate Professor, Department of Physiology and Medical Physics, School of Medicine Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

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

⁵ Associate Professor, Applied Microbiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received October 13, 2024; Accepted March 3, 2025)

Abstract

Background and purpose: Spinal cord injuries are usually severe and currently lack effective treatment. Bone marrow stem cells (BMSCs) have significant potential for repair by reducing inflammation, regulating immunity, stimulating angiogenesis, promoting growth, and enhancing cell differentiation. They are promising for treating these injuries by supporting nerve axon growth and myelin regeneration. This study examines the role of BMSCs in addressing the challenges of spinal cord tissue repair.

Materials and methods: BMSCs were isolated from the femurs of 150–200 g rats, and after culturing, the third passage was used. Thirty Wistar rats (200–300 g) were divided into three groups: control, lesion control, and BMSC-treated. Spinal cord injury was induced by dropping a 10 g weight on the T13–L1 region. On the eighth day after injury, either a vehicle solution or 1 million BMSCs in 10 µL were injected into the injury site. Evaluations, including the BBB test, hot water withdrawal latency, nerve conduction velocity, LFB staining, and GAP-43 protein expression, were performed using the western blot method.

Results: Treatment with BMSCs significantly increased the BBB score, improving hind limb movement in rats. These cells also reduced the reaction time for paw withdrawal and enhanced sensory system function. Furthermore, BMSCs significantly reduced spinal reflex latency and accelerated the compound action potential (CAP) recorded in the gastrocnemius muscle. Moreover, they promoted axon growth and proliferation by increasing GAP-43 protein expression and contributed to improved myelination.

Conclusion: The results indicate that the use of BMSCs as a therapeutic approach reduces axon and myelin degeneration while promoting neuronal growth and repair. These reparative effects at the molecular level were associated with increased GAP-43 protein expression and improved sensory and motor function in the hind limbs of animals.

Keywords: spinal cord injury, bone marrow stem cells, GAP43 protein, repair

J Mazandaran Univ Med Sci 2025; 35 (243): 1-13 (Persian).

Corresponding Author: Mohammad Taghi Mohammadi - School of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran. (E-mail: Mohammadimohammadi@bmsu.ac.ir)

تأثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان بر عملکرد حسی- حرکتی و بیان پروتئین GAP43 در ضایعه نخاعی القا شده با انداختن وزنه در موش صحرایی

محسن رضائی^۱
محمد تقی محمدی^۲
حسن قشونی^۳
فریده بهرامی^۳
زهره بهاری^۳
شیما شهیاد^۴
راحله حلییان^۵

چکیده

سابقه و هدف: آسیب‌های نخاعی معمولاً شدید بوده و درمان مؤثری ندارند. سلول‌های بنیادی مغز استخوان (BMSCs) با کاهش التهاب، تنظیم ایمنی، تحریک رگ‌زایی، رشد و تمایز سلولی، پتانسیل قابل توجهی برای ترمیم دارند. آن‌ها با حمایت از رشد آکسون عصبی و بازسازی میلین، برای درمان این آسیب‌ها امیدوار کننده هستند. این مطالعه نقش BMSCs در رفع چالش‌های ترمیم بافت نخاع را بررسی می‌کند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مداخله ای-تجربی، BMSCs از استخوان ران موش‌های صحرایی (۲۰۰-۱۵۰ گرم) جدا شده و پس از کشت، از پاساژ سوم استفاده شد. ۳۰ موش ویستار (۲۰۰-۳۰۰ گرم) به سه گروه شاهد، کنترل ضایعه و تیمار با BMSCs تقسیم شدند. آسیب نخاعی با انداختن وزنه ۱۰ گرمی روی ناحیه T13-L1 ایجاد گردید. در روز هشتم بعد از آسیب، حلال یا ۱ میلیون BMSC در حجم ۱۰ میکرولیتر به محل آسیب تزریق شد. ارزیابی‌ها شامل تست BBB، تأخیر خروج از آب داغ، سرعت هدایت عصبی، رنگ‌آمیزی LFB و بیان GAP43 با روش وسترن بلات انجام گرفت.

یافته‌ها: درمان با BMSCs سبب افزایش معنی‌دار نمره BBB و بهبود حرکت اندام‌های عقبی در موش‌ها شد. همچنین، این سلول‌ها زمان واکنش بیرون کشیدن پنجه را کاهش داده و عملکرد سیستم حسی را ارتقا دادند. علاوه بر این، BMSCs توانستند تاخیر رفلکس نخاعی را به میزان قابل توجهی کاهش دهند و باعث تسریع پتانسیل عمل مرکب (CAMP) ثبت شده در عضله گاستروکنمیوس شوند. از سوی دیگر، این سلول‌ها با افزایش بیان پروتئین GAP43، رشد و تکثیر آکسون‌ها را تقویت کردند و به بهبود میلینه شدن کمک شایانی نمودند.

استنتاج: استفاده از BMSCs به عنوان یک رویکرد درمانی به کاهش انحطاط آکسون و میلین کمک کرده و رشد و ترمیم نورون‌ها را افزایش می‌دهد. این اثرات ترمیمی در سطح مولکولی باعث افزایش بیان پروتئین GAP43 و بهبود عملکرد حسی و حرکتی در اندام‌های عقبی حیوانات شد.

واژه های کلیدی: آسیب نخاعی، سلول‌های بنیادی مغز استخوان، پروتئین GAP43، ترمیم

مؤلف مسئول: محمد تقی محمدی - تهران: دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران. Email: Mohammadmohammadt@bmsu.ac.ir

۱. دکتری فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی و فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

۲. استاد فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی و فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

۳. دانشیار فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی و فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

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

۵. دانشیار بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۷/۲۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۳/۷/۲۵ تاریخ تصویب: ۱۴۰۳/۱۲/۱۳

مقدمه

آسیب طناب نخاعی از جدی‌ترین چالش‌های عصبی است. بیش از ۲۰ میلیون نفر در جهان دچار این مشکل هستند و سالانه ۹۰۰ هزار مورد جدید گزارش می‌شود (۱). در ایران، تعداد مبتلایان حدود ۱۰۰ هزار نفر تخمین زده شده و هر سال ۴ هزار نفر به این جمعیت اضافه می‌شوند. ایران در میان کشورهای در حال توسعه، رتبه دوم را در شیوع این آسیب دارد که بیش تر ناشی از تصادفات جاده‌ای است (۳،۲). این ضایعات مشکلات جسمی، روانی و اجتماعی بسیاری ایجاد کرده و هزینه‌های اقتصادی سنگینی بر خانواده‌ها تحمیل می‌کند (۴). از این رو، شناسایی و توسعه روش‌های درمانی نوین اهمیت زیادی دارد. آسیب طناب نخاعی به دو نوع اولیه و ثانویه تقسیم می‌شود (۵). آسیب اولیه ناشی از نیروی مکانیکی مستقیم بوده و تخریب آکسون‌ها، رگ‌ها و غشاهای سلولی را به دنبال دارد. آسیب ثانویه که شامل ادم، ایسکمی، التهاب، سمیت تحریکی و مرگ سلولی است، می‌تواند با اقدامات مناسب کاهش یابد، هر چند تشدید آن عوارض بیش تری به همراه دارد (۶).

سلول‌های بنیادی از طریق حفاظت عصبی، تعدیل ایمنی، بازسازی آکسون، تشکیل تنه عصبی و ترمیم میلین به بهبود ضایعات نخاعی کمک می‌کنند (۷). این مکانیسم‌ها التهابات را کاهش داده، آپوپتوز را مهار کرده، سلول‌های ضروری را جذب، رگ‌زایی را تحریک و تمایز سلولی را تسهیل می‌کنند (۸). پیوند سلول‌های بنیادی مشتق شده از مغز استخوان (BM-MSCs) در محل ضایعه نخاعی موجب کاهش التهاب، تشکیل اسکار، نفوذپذیری سد خونی-نخاعی، نوروپاتی و درد شده و عملکرد حرکتی را بهبود می‌بخشد. در مدل پیوند داخل وریدی BM-MSC، این اثرات به افزایش فاکتورهای نوروتروفیک مثل NGF، BDNF و VEGF نسبت داده می‌شود (۹). تغییر در پروتئین GAP43 شاخصی برای رشد عصبی، جوانه‌زنی آکسونی و اتصالات نورونی بوده است و ارزیابی الکتروفیزیولوژیکی نیز میزان

بازسازی ساختاری و عملکردی را نشان می‌دهد (۱۰). با توجه به پیشرفت‌های طب ترمیم و نقش سلول‌های بنیادی در درمان بیماری‌ها به‌ویژه مشکلات دژنراتیو، فرصت‌های بیش تری برای مطالعه ضایعات نخاعی وجود دارد (۸). از طرفی به دلیل عدم بررسی و یا بررسی کم تر برخی پارامترها از جمله پارامترهای الکتروفیزیولوژیک و نیز تغییرات پروتئین GAP43 و اثرات آن بر ضایعات نخاعی می‌توان این پارامترها را در ضایعات نخاعی مورد بررسی قرار داد. بر این اساس مطالعه حاضر به ارزیابی تأثیر سلول‌های بنیادی مغز استخوان بر میزان بیان پروتئین GAP43، تغییرات الکتروفیزیولوژیک و میزان میلینه شدن آکسونی در کنار بهبود عملکرد حسی و حرکتی پس از ضایعه نخاعی در موش صحرایی آزمایشگاهی پرداخته است.

مواد و روش‌ها

حیوانات و نحوه نگهداری

در این تحقیق که یک مطالعه مداخله‌ای-تجربی بود از ۳۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار تهیه شده از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) در محدوده وزنی ۲۰۰-۳۰۰ گرم استفاده شد. به علت مرگ و میر بالا در اثر ایجاد ضایعه نخاعی در موش‌ها هر گروه ۱۰ سر در نظر گرفته شد. هم‌چنین ۳ سر موش در محدوده وزنی ۲۰۰-۱۵۰ گرم برای استخراج سلول‌های بنیادی مغز استخوان استفاده شد. کد کمیته اخلاق برای مطالعه حاضر IR.BMSU.REC.1398.354 می‌باشد. حیوانات بدون داشتن محدودیتی از نظر مصرف آب و غذا در شرایط استاندارد (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با درجه حرارت 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند.

روش ایجاد ضایعه نخاعی

ایجاد ضایعه بر اساس مدل Contusion و به روش رها کردن وزنه (Ping-Weight Drop) در موش

صحرائی انجام شد (۱۱). این روش بر اساس مطالعات قبلی که بعنوان یک متد پذیرفته شده برای ایجاد ضایعات نخاعی می‌باشد؛ انتخاب شد. البته مطالعات پایلوت حاضر نیز با استفاده از برش و رنگ آمیزی بافتی در راستای همین مطالعات و تأیید آن‌ها انجام شد. حیوانات پس از بیهوشی با ایزوفلوران ۲/۵ درصد، بر روی میز جراحی تثبیت و موهای ناحیه پشتی تراشیده شد. پس از ضد عفونی، یک برش طولی در طول ستون مهره‌ها ایجاد شد و بافت‌های سست برداشته شد و بعد از کنار زدن عضلات پاراوئیرال و رباط‌ها، عمل لامینکتومی بر روی مهره T-13 حیوان انجام شد. جهت ایجاد ضربه نخاعی از یک وسیله طراحی شده با رها کردن وزنه ۱۰ گرمی از ارتفاع ۶ سانتی‌متری استفاده گردید. پس از ایجاد ضربه نخاعی تمامی برش‌های ایجاد شده در دو لایه مجزا دوخته شد و حیوان تا هوشیاری کامل در محل مناسب نگهداری گردید.

گروه‌بندی و روش اجرای مطالعه

موش‌های صحرائی سالم به صورت تصادفی به سه گروه شاهد، کنترل ضایعه و ضایعه تیمار شده با سلول‌های بنیادی ($n = 10$ در هر گروه) تقسیم شدند. در گروه شاهد فقط عمل جراحی لامینکتومی انجام شد و ضایعه نخاعی ایجاد نگردید. این گروه پس از اتمام جراحی به مدت هشت هفته در شرایط استاندارد نگهداری شدند. در گروه کنترل ضایعه بعد از لامینکتومی ضایعه نخاعی ایجاد گردید. این گروه پس از اتمام جراحی به مدت هشت هفته در شرایط استاندارد نگهداری شدند. بعد از یک هفته در این گروه محلول PBS به عنوان حلال سلول‌های بنیادی به ناحیه ضایعه دیده تزریق شد. در گروه تیمار با سلول‌های بنیادی، $10^6 \times 1$ سلول و با حجم $10 \mu l$ به صورت موضعی در محل ضایعه یک هفته پس از ایجاد ضایعه نخاعی تزریق شد.

روش تهیه سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت مغز استفوان پس از بیهوشی حیوانات ($n = 3$) با تزریق داخل

صفاقی کتامین (100 mg/kg) و زایلازین (10 mg/kg) و تراشیدن موهای ناحیه ران و ساق، برشی در پوست هر دو ناحیه ایجاد شد. پوست و عضلات کنار زده شد تا استفوان‌ها نمایان شود. سپس، با سوزن‌های G ۲۵ مغز استفوان به داخل سرنجک حاوی محیط کشت آماده کشیده شد. محتویات سرنجک حاوی بافت مغز استفوان را در زیر هود لامینار به داخل فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربع تخلیه کرده و به اندازه ۴ ml محیط کشت به آن اضافه شد و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با دی اکسید کربن ۵ درصد و شرایط مرطوب نگهداری گردید. پس از ۴۸ ساعت با تعویض محیط کشت، سلول‌های شناور جدا شدند و سپس پاساژ انجام شد (۱۲). در این مطالعه، از پاساژ سوم سلول‌ها جهت تزریق به ناحیه ضایعه نخاعی استفاده شد.

ارزیابی عملکرد حسی

جهت ارزیابی عملکرد حسی از تست رفتاری آب داغ (Hot water) استفاده شد. ابتدا مقداری آب داخل دستگاه ریخته و دمای دستگاه بر روی ۵۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. سپس حیوانات مورد آزمایش را در دستان خود فیکس کرده به طوری که حیوان دچار خستگی و فشار زیاد نگردد که این عمل موجب رفلکس در حیوان می‌شود و امکان خطا در آزمایش را افزایش می‌دهد. پنجه پای حیوان در داخل آب قرار داده شد و مدت زمانی که طول می‌کشد تا حیوان پای خود را از آب خارج کند، به عنوان زمان پاسخ ثبت شد.

ارزیابی عملکرد حرکتی

تست BBB، یک تست استاندارد معتبر جهت بررسی عملکرد حرکتی یا رفتاری حیوانات آزمایشگاهی می‌باشد (۱۳). در این پژوهش همه گروه‌ها قبل و بعد از جراحی‌ها تحت ارزیابی با این تست قرار گرفتند که در روزهای ۱، ۳، ۷ و سپس هر هفته تا پایان هفته ۸، بررسی این تست ۲۱ نمره‌ای انجام گرفت. با توجه به معیارهای بررسی به هر حیوان نمره مربوطه داده

شد و نتایج به دست آمده ثبت و آنالیز شد. در این بررسی، موش‌هایی که آسیب نخاعی شده‌اند اما دچار پاراپلژیا (نمره ۰) نشده‌اند و موش‌های گروه کنترل که عملکرد حرکتی سالمی (نمره ۲۱) نشان نمی‌دادند از روند پژوهش کنار گذاشته شدند. نمره این مقیاس که عملکرد حرکتی اندام عقبی را می‌سنجد بین ۰ (فلج کامل) تا ۲۱ (عملکرد سالم حرکتی) می‌باشد.

ارزیابی الکتروفیزیولوژیک: سرعت هدایت عصب (Nerve conduction velocity)

برای بررسی اثرات تیمارها بر مسیرهای رفلکسی در نخاع، سرعت هدایت عصبی و یا مدت زمان تأخیر ناشی از هدایت امواج الکتریکی تحریکی از عصب سیاتیک به عضله گاستروکنمیوس اندازه‌گیری می‌شود. این بررسی، توسط دستگاه ثبت الکترومیوگرافی (EMG) برای ثبت دامنه پتانسیل فعالیت حرکتی (AMP) و سرعت هدایت پیام عصبی (NCV) انجام می‌شود. موش‌ها در پایان هفته هشتم بیهوش شدند و یک الکتروود تحریک در زیر عصب سیاتیک آن‌ها برای تحریک و دو الکتروود به صورت سیم مسی در داخل عضله گاستروکنمیوس و با فاصله ۱ سانتی متر از همدیگر برای ثبت امواج EMG قرار گرفت. عصب سیاتیک با پالس‌های موج مربعی با فرکانس ۰/۱ Hz (یک تحریک در هر ۱۰ ثانیه)، طول مدت زمان (Duration) $200 \mu s$ و با شدت $500 \mu A$ برای اندازه‌گیری مدت زمان تأخیر (Latency)، تحریک شدند. Latency نشان دهنده تأخیر زمانی بین تحریک و شروع پتانسیل عمل حرکتی مرکب (CMAP) است.

اندازه‌گیری بیان پروتئین GAP43 به عنوان شاخص بازسازی آکسونی

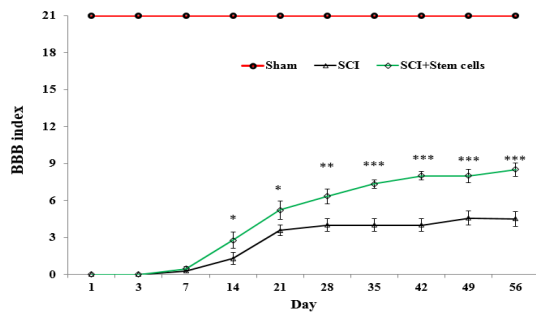
برای بررسی میزان رشد آکسون‌ها در اثر تیمارهای انجام شده بعد از ضایعه نخاعی میزان (دانسیته) مارکر، مولکول پروتئینی GAP43 با استفاده از روش وسترن بلات

اندازه‌گیری شد. پس از خارج کردن نخاع موش‌ها در پایان هفته هشتم نمونه‌ها ابتدا در دمای $80^{\circ}C$ - درجه سانتی‌گراد فریز شدند. سپس نمونه‌ها با هموژنایزر کاملاً همگن شده و سانتریفیوژ شدند. محلول رویی در دمای $20^{\circ}C$ - درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و بقیه مراحل طبق روال زیر انجام شد. نمونه به دست آمده با دستگاه الکتروفورز SDS-PAGE الکتروفورز شد و پس از انتقال باندهای ایجاد شده به کاغذ PVDF با استفاده از آنتی‌بادی اولیه گربه (orb247402) و آنتی‌بادی ثانویه خرگوش (BA1054-2) شناسایی GAP43 انجام شد. پهنای باند پروتئین GAP43 آشکارسازی و با استفاده از روش‌های دانسیتمتری تراکم مولکول‌های پروتئینی مورد نظر در نمونه‌های کنترل و تیمار شده با همدیگر مقایسه و ارزیابی شد.

ارزیابی هیستولوژیک (بافت شناسی)

رنگ آمیزی LFB

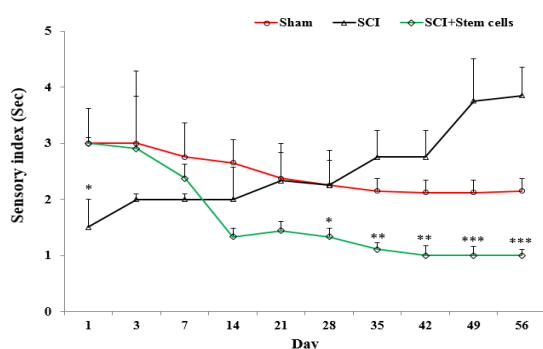
پس از آخرین بررسی رفتاری حیوانات، با انجام بیهوشی و شستشوی قلبی با سرم نرمال سالین و ماده فیکساتور (پارافرمالدهید ۴ درصد در بافر فسفات ۱ درصد مولار و گلو تارالدهید ۲/۵ درصد)، ناحیه نخاعی تیمار شده خارج شد و به مدت یک شب در ماده فیکساتور قرار گرفت. سپس به مدت یک شب در محلول سوکروز ۱۰ درصد قرار گرفته و روز بعد توسط چسب OCT قالب‌گیری شدند. برش‌های عرضی و طولی توسط دستگاه کرایو استات گرفته شد و بر روی لام‌های آغشته به پلی‌لیزین قرار گرفت. لام‌ها ابتدا با اسید کلریدریک ۱ درصد شستشو داده شدند. بعد از خشک شدن در محلول پلی‌ال‌لیزین به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند و سپس به مدت ۱ ساعت در دمای $60^{\circ}C$ - درجه خشک شدند. مقاطع برشی به صورت سریال و با ضخامت ۱۲ میکرومتر گرفته شدند. بلافاصله بعد از مقطع‌گیری با آستون مقاطع فیکس شدند. از مقاطع، لام جهت رنگ آمیزی LFB تهیه شد. از رنگ آمیزی LFB جهت تعیین میزان میلیناسیون آکسون‌های نخاع استفاده شد.



تصویر شماره ۱: ارزیابی بهبود حرکتی حیوانات در گروه‌های شاهد (Sham)، کنترل ضایعه (SCI)، و سلول‌های بنیادی (SCI+Stem cells) تا پایان هفته هشتم، نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شد و اختلاف آماری معنی‌داری در سطح $P < 0.05$ بیان شده است. در دو گروه، از روز هفتم امتیاز BBB شروع به افزایش پیدا کرده است. در گروه سلول‌های بنیادی این روند افزایشی تا پایان هفته هشتم ادامه پیدا کرده است. در گروه سلول‌های بنیادی این روند افزایشی نسبت به گروه کنترل معنی‌دار می‌باشد.

تأثیر سلول‌های بنیادی مغز استفوان بر شاخص حسی (رفلکس پس کشیدن پنجه پا)

مقایسه نتایج آزمون بین گروه شاهد و گروه کنترل ضایعه تفاوت معنی‌داری را نشان نداد، در حالی که بین گروه کنترل ضایعه و گروه سلول‌های بنیادی تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($P < 0.001$) (تصویر شماره ۲).



تصویر شماره ۲: تأخیر زمانی در رفلکس پس کشیدن پنجه پا (تست آب داغ) پس از آسیب نخاعی در گروه‌های شاهد (Sham)، کنترل ضایعه (SCI)، و سلول‌های بنیادی (SCI+Stem cells) در زمان‌های مختلف، مقیاس در نمودارها میانگین $\pm$ SEM است. تفاوت معنی‌داری در گروه درمان سلول‌های بنیادی نسبت به گروه کنترل ضایعه از روز بیست و هشتم پس از تزریق سلول‌های بنیادی شروع شده و تا روز ۵۶ افزایش می‌یابد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

نتایج آماری به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین (Mean $\pm$ SEM) ارائه شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۶ آنالیز شد و از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov) برای نشان دادن توزیع نرمال داده‌ها استفاده گردید. با توجه به این که داده‌ها از توزیع نرمال برخوردار بودند؛ از آزمون‌های پارامتریک (ANOVA) برای مقایسه میانگین‌ها و برای مقایسه درصدها و اسکورها از تست Fisher یا Tukey استفاده شد. در نهایت $P < 0.05$ بعنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد و در تمامی موارد حدود اطمینان ۹۵ درصد بود.

یافته‌ها

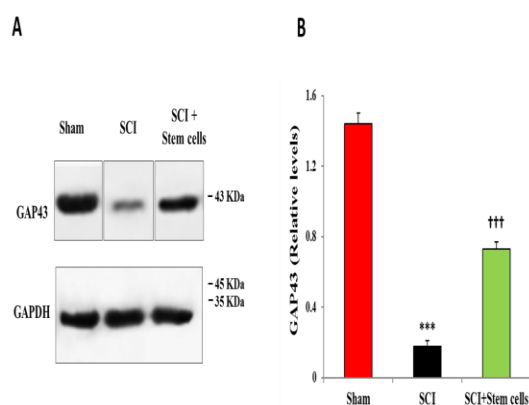
تأثیر سلول‌های بنیادی مغز استفوان بر رفتار حرکتی

مقایسه نتایج آزمون BBB score (Basso, Beattie and Bresnahan) بین گروه شاهد و گروه کنترل ضایعه تفاوت معنی‌داری را نشان نداد، در حالی که بین گروه کنترل ضایعه و گروه سلول‌های بنیادی تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($P < 0.001$) (تصویر شماره ۱). در گروه کنترل ضایعه، تا روز هفتم پس از ایجاد ضایعه، هیچ بهبود حرکتی خود به خودی در موش‌ها مشاهده نشد. اما از روز هفتم امتیاز BBB شروع به افزایش کرد و در روز ۴۹ این تغییرات به بالاترین مقدار خود (حدود ۵) رسید و سپس با اندکی کاهش تا هفته هشتم ادامه یافت و در نهایت به حدود ۴ رسید. تزریق سلول‌های بنیادی نیز نتوانست تا روز هفتم پس از تزریق افزایشی در امتیاز BBB ایجاد نماید. اما از روز هفتم امتیاز BBB به افزایش کرد و در روز چهاردهم این تغییرات نسبت به گروه کنترل ضایعه معنی‌دار شد. این تغییرات در ادامه بتدریج افزایش یافت و در هفته هشتم به بالاترین مقدار خود (حدود ۹) رسید.

این زمان در گروه کنترل ضایعه (۱/۵ ثانیه) و سلول های بنیادی (حدود ۰/۷ ثانیه) نسبت به گروه شاهد (حدود ۱/۱ ثانیه) تفاوت معنی دار نشان می دهد. این تفاوت معنی دار در گروه سلول های بنیادی نسبت به گروه کنترل ضایعه کاملاً قابل توجه است.

تأثیر سلول های بنیادی مغز استخوان بر میزان بیان پروتئین GAP43

مقایسه نتایج اندازه گیری پروتئین GAP43 با تکنیک وسترن بلات در گروه کنترل ضایعه و گروه سلول های بنیادی با گروه شاهد نشان می دهد که تفاوت معنی داری بین این دو گروه و گروه شاهد وجود دارد (تصویر شماره ۴). در گروه کنترل ضایعه میزان بیان پروتئین GAP43 نسبت به گروه شاهد به صورت معنی داری کاهش یافته در حالی که در گروه سلول های بنیادی نسبت به گروه کنترل ضایعه به صورت معنی داری افزایش یافته است ($P < 0.001$).

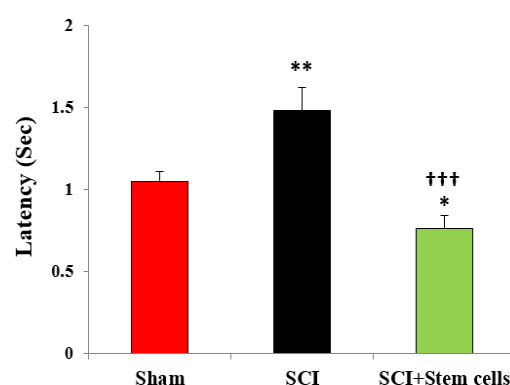


تصویر شماره ۴: میزان بیان پروتئین GAP43 در گروه های شاهد (Sham)، کنترل ضایعه (SCI) و سلول های بنیادی (SCI + cells) (Stem). داده ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ نشان داده شده است. ***: نشان دهنده تفاوت معنی دار با $P < 0.001$ در مقایسه با گروه شاهد
 †††: نشان دهنده تفاوت معنی دار با $P < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل ضایعه

این تغییرات معنی دار در پایان هفته چهارم شروع شد و تا پایان هفته هشتم ادامه پیدا کرد. در گروه کنترل ضایعه در روز اول زمان رفلکس پس کشیدن پنجه پا حدود ۱/۵ ثانیه بود اما با گذشت زمان این رفلکس افزایش یافت و در پایان هفته هشتم به حدود ۴ ثانیه رسید. در گروه شاهد، زمان رفلکس در روز اول پس از تزریق حدود ۳ ثانیه بود اما سپس روند نزولی داشت تا اینکه در پایان هفته هشتم به حدود ۲ ثانیه رسید. در گروه سلول های بنیادی در روز اول پس از تزریق زمان رفلکس ۳ ثانیه بود اما در ادامه روند نزولی پیدا کرد و در پایان هفته هشتم به کم ترین مقدار خود (۱ ثانیه) رسید.

تأثیر سلول های بنیادی مغز استخوان بر زمان تأخیر ثبت پتانسیل عمل مرکب

مقایسه نتایج آزمون NCV و تأخیر ثبت پتانسیل عمل مرکب (CMAP) در عضله گاسترکنمیوس محاسبه شده حاصل از آن در گروه کنترل ضایعه و سلول های بنیادی با گروه شاهد نشان می دهد که در هر دو گروه با گروه شاهد تفاوت معنی داری وجود دارد (تصویر شماره ۳).



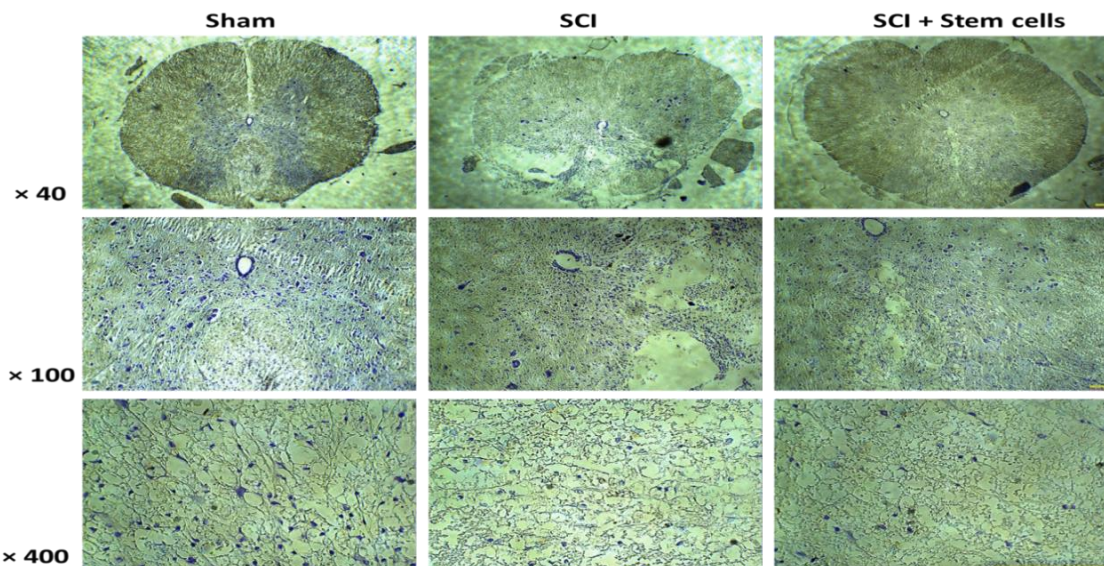
تصویر شماره ۳: نتایج آزمون NCV و تأخیر محاسبه شده از آن در گروه های شاهد (Sham)، کنترل ضایعه (SCI) و سلول های بنیادی (SCI + Stem cells). داده ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ نشان داده شده است. * و **: به ترتیب نشان دهنده تفاوت معنی دار با $P < 0.05$ و $P < 0.01$ در مقایسه با گروه شاهد
 †††: نشان دهنده تفاوت معنی دار با $P < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل ضایعه

تأثیر سلول‌های بنیادی مغز استخوان بر تغییرات بافت شناسی با استفاده از رنگ آمیزی LFB و همان‌طور که تصاویر میکروسکوپی تهیه شده از بافت نخاع نشان می‌دهد، در حیوانات گروه شاهد، نورون‌ها سالم به نظر می‌رسند و هیچ انحطاطی در میلین مشاهده نشد. در حالی که در حیوانات گروه کنترل ضایعه، دمیینه شدن نورون‌ها در مرکز نخاع مشاهده شد. به نظر می‌رسد نورون‌ها نسبت به گروه شاهد دارای استپاله‌های آکسونی نازک تر و ظریف‌تری می‌باشند. میزان دمیینه شدن در گروه سلول‌های بنیادی بسیار کم‌تر شده و به سختی قابل مشاهده است. در این گروه استپاله‌های آکسونی تا حدود زیادی به حالت نرمال برگشته و دارای ضخامت بیش‌تری هستند (تصویر شماره ۵).

بحث

بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر، ایجاد ضایعه نخاعی با استفاده از روش انداختن وزنه باعث ایجاد آسیب حسی و حرکتی در حیوانات گروه کنترل ضایعه

گردید و تیمار با سلول‌های بنیادی مغز استخوان سبب بهبود نسبی آن‌ها شد. مطالعات مشابه متعددی با استفاده از انواع سلول‌های بنیادی انجام شده و نتایج تقریباً مشابهی نیز به دست آمده است (۹). بنابراین بخشی از یافته‌های مطالعه حاضر نیز نتایج بدست آمده قبلی را تایید می‌کند. اما نتایج حاصل از مطالعات الکتروفیزیولوژیک و نتایج ملکولی تغییرات پروتئین GAP43 قبلاً کم‌تر انجام شده و تا حدودی نوین می‌باشد. پیوند سلول‌های بنیادی به ناحیه ضایعه دیده در نخاع به خصوص در مراحل حاد در مقایسه با مرحله مزمن به طور مؤثری ضایعه نخاعی را بهبود بخشیده و عوارض ناشی از آن را کاهش می‌دهد (۱۴). بنابراین در مطالعه حاضر نیز در روز هفتم بعد از ضایعه نخاعی (مرحله تحت حاد) از سلول‌های بنیادی استفاده شد. BMSCs سبب مهار سیستم ایمنی و التهاب می‌شود و سبب پیشبرد تبدیل فنوتیپ ماکروفاژها از M1 به M2 شده، فاکتورهای نوروتروفیک متعددی ترشح می‌کند (۱۵، ۱۶).



تصویر شماره ۵: تصاویر مقاطع عرضی بافت نخاع در محل جراحی و نواحی ضایعه دیده با روش رنگ آمیزی LFB در گروه‌های شاهد (Sham)، کنترل ضایعه (SCI) و سلول‌های بنیادی (SCI+Stem cells) را نشان می‌دهد. در حیوانات گروه شاهد، نورون‌ها سالم به نظر می‌رسند و هیچ انحطاطی در میلین مشاهده نمی‌شود. در حالی که در حیوانات گروه کنترل ضایعه، دمیینه شدن نورون‌ها در مرکز نخاع به وضوح مشاهده می‌شود. میزان دمیینه شدن در گروه درمان با سلول‌های بنیادی به مقدار زیادی کاهش یافته است. (Magnification: 400X, 100X, 40X – Scale bars: 100 μ m)

بنابراین این سلول‌ها با مکانیسم‌های متعدد می‌توانند برابعد مختلف ضایعه نخاعی تأثیر گذاشته و سبب تقویت رشد نورون‌های آسیب دیده و ترمیم آن‌ها شوند.

تخریب عروق نخاع در پاتوژنز SCI نقش کلیدی دارد و منجر به بروز خونریزی موضعی، تشکیل ترومبوز، کاهش خون‌رسانی، اختلال در عملکرد متابولیک و در نهایت آسیب‌های ایسکمیک و هیپوکسیک می‌شود که به نوبه خود عملکرد حرکتی را مختل می‌کند (۱۷). پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) به بافت‌های آسیب دیده در بیماری‌های قلبی-عروقی، زخم‌ها و صدمات نخاعی نشان داده است که می‌تواند تشکیل عروق جدید در ناحیه آسیب دیده را تحریک کند (۱۸). بازسازی جریان خون در محل آسیب دیده یک فرآیند حیاتی برای ترمیم و بازسازی بافت محسوب می‌شود. در نتیجه، در SCI که عروق ناحیه آسیب دیده تخریب شده و خون‌رسانی مختل می‌شود، این سلول‌ها می‌توانند نقشی حیاتی در بهبود جریان خون به ناحیه آسیب دیده ایفا کرده و شرایط لازم را برای ترمیم فراهم کنند.

التهاب عصبی در SCI به عنوان یکی از عوامل کلیدی در بروز آسیب‌های ثانویه نقش دارد. این فرآیند می‌تواند با پاکسازی بقایای سلولی در مراحل اولیه، یک محیط مناسب برای ترمیم نورون‌ها و بازسازی بافت ایجاد کند. با این حال، ادامه پاسخ التهابی ممکن است منجر به پیامدهای منفی مانند آپوپتوز سلول‌های سالم مجاور، قطع اکسون‌ها و دمیلیاسیون نورون‌هایی شود که از ضربه مکانیکی اولیه جان سالم به در برده‌اند (۱۹، ۲۰). یکی از مکانیسم‌های مهم در استفاده از MSCs برای درمان SCI، اثر ضد التهابی این سلول‌هاست (۲۱، ۲۲). MSCs قادرند فعالیت انواع سلول‌های ایمنی شامل لنفوسیت‌های T و B، نوتروفیل‌ها، مونوسیت‌ها و ماکروفاژها را مهار کنند (۲۳). بنابراین، پیوند این سلول‌ها در زمان مناسب نه تنها می‌تواند از استمرار فعالیت مخرب سیستم ایمنی جلوگیری کند، بلکه شرایط را برای ترمیم ضایعه نخاعی فراهم می‌سازد.

مطالعات نشان داده‌اند اجزای ماتریکس خارج سلولی در رشد اکسون‌ها، ترمیم میلین، کنترل التهاب و تعدیل سیستم ایمنی نقش دارند (۲۴-۲۶). هم‌چنین مشخص شده MSCs قادر به تولید و ترشح برخی از این اجزا هستند. برای مثال MSCs، فیبرونکتین جزئی کلیدی برای رشد اکسون، و همچنین لامینین و TGF- β را در محیط نخاع آسیب دیده ترشح می‌کنند که شرایط بازسازی را بهبود می‌بخشد (۲۷). بنابراین، MSCs با تولید اجزای ماتریکس خارج سلولی می‌توانند در ترمیم ضایعات نخاعی مؤثر باشند.

به نظر می‌رسد اثر درمانی پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی در آسیب نخاعی ناشی از تنظیم ریز محیط میزبان باشد، نه جایگزینی مستقیم سلول که علی‌رغم توانایی MSCs در تبدیل به انواع سلول‌ها مانند نورون، به دلیل بقای کوتاه مدت در ناحیه آسیب دیده، نقش اصلی آن‌ها جایگزینی نورون‌های آسیب دیده نیست (۲۸). تأثیر مهم‌تر این سلول‌ها تولید فاکتورهای رشد و تعدیل ایمنی است که نقش مثبتی در درمان آسیب نخاعی دارد (۲۹، ۳۰).

پروتئین GAP43 نقشی کلیدی در فرآیند ترمیم و جوانه زنی اکسون‌ها ایفا کرده و به عنوان یکی از شاخص‌های مهم برای ارزیابی ترمیم اکسونی و ایجاد اتصالات نورونی مورد استفاده قرار می‌گیرد. به همین دلیل، تغییرات در میزان پروتئین GAP43 می‌تواند نمودی از وضعیت رشد سلول‌های عصبی و اکسون‌ها باشد. در این راستا، نتایج حاصل از بررسی سطح بیان پروتئین GAP43 در مطالعه حاضر نشان داد که میزان بیان این پروتئین در محل ضایعه القا شده به شکل معنی‌داری کاهش یافته است (تصویر شماره ۴). یافته‌های مشابهی نیز در چندین مطالعه دیگر گزارش شده است (۱۰، ۳۱).

در این پژوهش، استفاده از سلول‌های بنیادی مغز استخوان منجر به افزایش معنادار پروتئین GAP43 در ناحیه آسیب‌دیده شد (تصویر شماره ۴). این پروتئین که نقشی کلیدی در رشد و ترمیم سیستم عصبی دارد، طی

فرآیند بازسازی سلول‌ها و آسیب‌های عصبی افزایش می‌یابد و به رشد آکسون‌ها و تشکیل سیناپس‌های جدید کمک می‌کند (۳۱،۱۰). نوروتروفین‌ها و اینترلوکین‌ها که در آسیب عصبی ترشح می‌شوند نیز با فعال‌سازی مسیرهای سیگنالینگ، سطح GAP43 را تقویت کرده و فرآیندهای حفاظتی و بازسازی را تحریک می‌کنند. به عنوان نمونه، فاکتورهای NGF و BDNF با فعال‌سازی گیرنده‌های اختصاصی خود، مسیرهای بقا و بازسازی را از طریق PI3K/Akt آغاز می‌کنند (۳۲). در مدل‌های سکتة مغزی و آسیب تروماتیک مغزی، نقش NGF و BDNF در محافظت عصبی و بازسازی تأیید شده است (۳۳-۳۵). بنابراین ترشح نوروتروفین‌ها و اینترلوکین‌های مختلف توسط BM-MSCs در محل ضایعات نخاعی افزایش یافته و از طریق فعال‌سازی مسیرهای سیگنالینگ خاص می‌تواند به بهبود آسیب‌های نخاعی کمک کند.

مطالعه‌ای در سال ۱۹۹۷ توسط Caroni و همکاران نشان داد که دستکاری ژنتیکی و افزایش بیان ژن GAP43 در موش‌های تراریخته باعث تقویت سیناپس‌ها و جوانه‌زنی نورونی می‌شود (۳۶). هم‌چنین سطح بالاتر mRNA مرتبط با GAP43 مستقیماً با ظرفیت بازسازی بیش‌تر ارتباط دارد. علاوه بر این، پس از قطع عصب در گانگلیون ریشه پشتی، بیان GAP43 به شدت افزایش یافته و بازسازی آکسون‌های آسیب دیده پس از صدمه به عصب سیاتیک را بهبود می‌بخشد (۳۷).

یافته‌های رنگ‌آمیزی LFB نشان می‌دهد که پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استفوان منجر به رشد قابل توجه میلین در نورون‌های آسیب دیده محل ضایعه شده است (تصویر شماره ۵). افزایش بیان GAP43 به‌عنوان شاخص میلین‌سازی، در گروه درمانی به‌طور معنی‌داری مشاهده شد و این فرایند با افزایش سرعت هدایت پالس‌های عصبی، عملکرد حسی و حرکتی را بهبود داده است. نتایج تأخیر هدایت عصبی نشان داد در گروه درمانی با سلول‌های BMSCs سرعت هدایت عصبی در مسیرهای رفلکسی حرکتی افزایش یافته و

تأخیر هدایت عصبی کاهش پیدا کرده است (تصویر شماره ۳). این بهبود باعث عملکرد بهتر سیستم حسی و حرکتی و بهبود شاخص‌های حرکتی BBB شده است (تصویر شماره ۱). در مجموع، افزایش پروتئین GAP43 با مکانیسم‌های مختلف بازسازی نورون‌ها، ترمیم آسیب نخاعی و بهبود عملکرد حسی و حرکتی را تسهیل کرده است (تصاویر شماره ۱ و ۲).

با وجود مزایای زیاد سلول‌های BMSCs در درمان ضایعه نخاعی، این سلول‌ها خالی از عوارض نیستند و ممکن است باعث سرکوب ایمنی و افزایش احتمال رشد سلول‌های سرطانی شوند (۳۸،۳۹). هم‌چنین، توانایی تبدیل به سلول‌های سرطانی مانند گلیوما را چهار سال پس از پیوند نشان داده‌اند (۴۰). بنابراین، باید راهکارهایی برای کاهش عوارض و افزایش مزایا فراهم شود تا امکان استفاده بالینی از آن‌ها فراهم گردد.

در مجموع، درمان آسیب نخاعی با سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بر مکانیسم ترمیم چند وجهی مبتنی است. این تنوع عملکردی نشان می‌دهد که این سلول‌ها قادرند بخش‌های مختلف پاتوفیزیولوژی پیچیده آسیب نخاعی را هدف قرار داده و اثرات هم‌افزا ایجاد کنند که به نتایج درمانی بهتری منجر می‌شود.

از محدودیت‌های مطالعه می‌توان گفت که با وجود امکانات مناسب، محدودیت‌هایی چون نبود انکوباتور پیشرفته، کمبود منابع مالی برای تهیه آنتی‌بادی‌ها و محدودیت در مواد بافت‌شناسی وجود داشت.

مطالعه حاضر نشان داد که درمان ضایعه نخاعی با سلول‌های بنیادی مغز استفوان می‌تواند در کاهش آسیب نخاعی، جلوگیری از گسترش آن، رشد آکسون‌ها، میلین‌سازی و ایجاد سیناپس‌های جدید تأثیرگذار باشد. این اثرات احتمالاً ناشی از فاکتورهای رشد تولید شده توسط سلول‌های بنیادی هستند که نقش مهمی در ترمیم سیستم عصبی دارند. با تحقیقات بیش‌تر و کاهش عوارض، امکان استفاده از این سلول‌ها در بیماران نخاعی وجود خواهد داشت.

بقیه‌الله (عج)، هم‌چنین از دکتر فصیحی از گروه ایمونولوژی و دکتر جلالی از گروه آناتومی که در این تحقیق همراهی کردند، قدردانی می‌کند.

سپاسگزاری

نویسندگان از همکاری اساتید و همکاران گروه فیزیولوژی و فیزیک پزشکی دانشگاه علوم پزشکی

References

1. Ding W, Hu S, Wang P, Kang H, Peng R, Dong Y, et al. Spinal cord injury: the global incidence, prevalence, and disability from the global burden of disease study 2019. *Spine* 2022; 47(21): 1532-1540. PMID: 35857624.
2. Rahimi-Movaghar V, Sayyah MK, Akbari H, Khorramirouz R, Rasouli MR, Moradi-Lakeh M, et al. Epidemiology of traumatic spinal cord injury in developing countries: a systematic review. *Neuroepidemiol* 2013; 41(2): 65-85. PMID: 23774577.
3. Mohammadi E, Villeneuve LM, Smith ZA. Spinal cord injury: the global incidence, prevalence, and disability from the global burden of disease study 2019. *Spine* 2023. PMID: 37235787.
4. Kang Y, Ding H, Zhou H, Wei Z, Liu L, Pan D, et al. Epidemiology of worldwide spinal cord injury: a literature review. *J Neurorestoratol* 2018; 6(1): 3.
5. Guest J, Datta N, Jimsheleishvili G, Gater Jr DR. Pathophysiology, classification and comorbidities after traumatic spinal cord injury. *J Pers Med* 2022; 12(7): 1126. PMID: 35887623.
6. Venkatesh K, Ghosh SK, Mullick M, Manivasagam G, Sen D. Spinal cord injury: pathophysiology, treatment strategies, associated challenges, and future implications. *Cell Tissue Res* 2019; 377(2): 125-151. PMID: 31065801.
7. Shang Z, Wang M, Zhang B, Wang X, Wanyan P. Clinical translation of stem cell therapy for spinal cord injury still premature: results from a single-arm meta-analysis based on 62 clinical trials. *BMC Med* 2022; 20(1): 1-19. PMID: 36058903.
8. Mousaei Ghasroldasht M, Seok J, Park H-S, Liakath Ali FB, Al-Hendy A. Stem cell therapy: from idea to clinical practice. *Int J Mol Sci* 2022; 23(5): 2850. PMID: 35269990.
9. Huang L, Fu C, Xiong F, He C, Wei Q. Stem cell therapy for spinal cord injury. *Cell Transplant* 2021; 30: 0963689721989266. PMID: 33559479.
10. Holahan MR. A shift from a pivotal to supporting role for the growth-associated protein (GAP-43) in the coordination of axonal structural and functional plasticity. *Front Cell Neurosci* 2017; 11: 266. PMID: 28912688.
11. Verma R, Viridi JK, Singh N, Jaggi AS. Animals models of spinal cord contusion injury. *Korean J Pain* 2019; 32(1): 12-21. PMID: 30671199.
12. Furuya T, Hashimoto M, Koda M, Okawa A, Murata A, Takahashi K, et al. Treatment of rat spinal cord injury with a Rho-kinase inhibitor and bone marrow stromal cell transplantation. *Brain Res* 2009; 1295: 192-202. PMID: 19651108.
13. Han C, Zhang L, Song L, Liu Y, Zou W, Piao H, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells: a better cell source for nervous system regeneration. *Chin Med J* 2014; 127(2): 329-337. PMID: 24438624.

14. Mothe AJ, Tator CH. Advances in stem cell therapy for spinal cord injury. *J Clin Invest* 2012; 122(11): 3824-3834. PMID: 23114605.
15. Shao A, Tu S, Lu J, Zhang J. Crosstalk between stem cell and spinal cord injury: pathophysiology and treatment strategies. *Stem Cell Res Ther* 2019; 10: 1-13. PMID: 31387621.
16. Wang Y, Fang J, Liu B, Shao C, Shi Y. Reciprocal regulation of mesenchymal stem cells and immune responses. *Cell Stem Cell* 2022; 29(11): 1515-1530. PMID: 36332569.
17. Zhang M, Hamblin MH, Yin K-J. Long non-coding RNAs mediate cerebral vascular pathologies after CNS injuries. *Neurochem Int* 2021; 148: 105102. PMID: 34153353.
18. Zanotti L, Angioni R, Cali B, Soldani C, Ploia C, Moalli F, et al. Mouse mesenchymal stem cells inhibit high endothelial cell activation and lymphocyte homing to lymph nodes by releasing TIMP-1. *Leukemia* 2016; 30(5): 1143-1154. PMID: 26898191.
19. Cao T, Chen H, Huang W, Xu S, Liu P, Zou W, et al. hUC-MSC-mediated recovery of subacute spinal cord injury through enhancing the pivotal subunits $\beta 3$ and $\gamma 2$ of the GABAA receptor. *Theranostics* 2022; 12(7): 3057. PMID: 35547766.
20. Gholaminejhad M, Jameie SB, Abdi M, Abolhassani F, Mohammed I, Hassanzadeh G. All-trans retinoic acid-preconditioned mesenchymal stem cells improve motor function and alleviate tissue damage after spinal cord injury by inhibition of HMGB1/NF- κ B/NLRP3 pathway through autophagy activation. *J Mol Neurosci* 2022; 72(5): 947-962. PMID: 35147911.
21. He X, Zhang J, Guo Y, Yang X, Huang Y, Hao D. Exosomal miR-9-5p derived from BMSCs alleviates apoptosis, inflammation and endoplasmic reticulum stress in spinal cord injury by regulating the HDAC5/FGF2 axis. *Mol Immunol* 2022; 145: 97-108. PMID: 35316648.
22. Kang J, Guo Y. Human umbilical cord mesenchymal stem cells derived exosomes promote neurological function recovery in a rat spinal cord injury model. *Neurochem Res* 2022; 47(6): 1532-1540. PMID: 35132478.
23. Gao S, Mao F, Zhang B, Zhang L, Zhang X, Wang M, et al. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce macrophage M2 polarization through the nuclear factor- κ B and signal transducer and activator of transcription 3 pathways. *Exp Biol Med* 2014; 239(3): 366-375. PMID: 24500984.
24. Gaudet AD, Popovich PG. Extracellular matrix regulation of inflammation in the healthy and injured spinal cord. *Exp Neurol* 2014; 258: 24-34. PMID: 25017885.
25. Masand SN, Perron IJ, Schachner M, Shreiber DI. Neural cell type-specific responses to glycomimetic functionalized collagen. *Biomaterials* 2012; 33(3): 790-797. PMID: 22027596.
26. Colognato H, Yurchenco PD. Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn* 2000; 218(2): 213-234. PMID: 10842354.
27. Guo S, Redenski I, Levenberg S. Spinal cord repair: from cells and tissue engineering to extracellular vesicles. *Cells* 2021; 10(8): 1872. PMID: 34440641.
28. Hofer HR, Tuan RS. Secreted trophic factors of mesenchymal stem cells support neurovascular and musculoskeletal therapies. *Stem Cell Res Ther* 2016; 7(1): 1-14. PMID: 27612948.

29. Chung H-j, Chung W-h, Lee J-H, Chung D-J, Yang W-J, Lee A-J, et al. Expression of neurotrophic factors in injured spinal cord after transplantation of human-umbilical cord blood stem cells in rats. *J Vet Sci* 2016; 17(1): 97-102. PMID: 27051345.
30. Kim Y, Jo S-h, Kim WH, Kweon O-K. Antioxidant and anti-inflammatory effects of intravenously injected adipose derived mesenchymal stem cells in dogs with acute spinal cord injury. *Stem Cell Res Ther* 2015; 6: 1-10. PMID: 26612085.
31. Chung D, Shum A, Caraveo G. GAP-43 and BASP1 in axon regeneration: implications for the treatment of neurodegenerative diseases. *Front Cell Dev Biol* 2020; 8: 567537. PMID: 33015061.
32. Nguyen TL, Kim CK, Cho J-H, Lee K-H, Ahn J-Y. Neuroprotection signaling pathway of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor against staurosporine induced apoptosis in hippocampal H19-7 cells. *Exp Mol Med* 2010; 42(8): 583-595. PMID: 20644345.
33. Wu H, Lu D, Jiang H, Xiong Y, Qu C, Li B, et al. Simvastatin-mediated upregulation of VEGF and BDNF, activation of the PI3K/Akt pathway, and increase of neurogenesis are associated with therapeutic improvement after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2008; 25(2): 130-139. PMID: 18260796.
34. Qi D, Ouyang C, Wang Y, Zhang S, Ma X, Song Y, et al. HO-1 attenuates hippocampal neurons injury via the activation of BDNF–TrkB–PI3K/Akt signaling pathway in stroke. *Brain Res* 2014; 1577: 69-76. PMID: 24997248.
35. Gudasheva T, Povamina PY, Volkova A, Kruglov S, Antipova T, Seredenin S. A nerve growth factor dipeptide mimetic stimulates neurogenesis and synaptogenesis in the hippocampus and striatum of adult rats with focal cerebral ischemia. *Acta Nat* 2019; 11(3): 31-37. PMID: 31720014.
36. Caroni P, Aigner L, Schneider C. Intrinsic neuronal determinants locally regulate extrasynaptic and synaptic growth at the adult neuromuscular junction. *J Cell Biol* 1997; 136(3): 679-692. PMID: 9024697.
37. Mason MR, Lieberman A, Grenningloh G, Anderson P. Transcriptional upregulation of SCG10 and CAP-23 is correlated with regeneration of the axons of peripheral and central neurons in vivo. *Mol Cell Neurosci* 2002; 20(4): 595-615. PMID: 12213442.
38. Galland S, Stamenkovic I. Mesenchymal stromal cells in cancer: a review of their immunomodulatory functions and dual effects on tumor progression. *J Pathol* 2020; 250(5): 555-572. PMID: 31608444.
39. Lan T, Luo M, Wei X. Mesenchymal stem/stromal cells in cancer therapy. *J Hematol Oncol* 2021; 14: 1-16. PMID: 34789315.
40. Amariglio N, Hirshberg A, Scheithauer BW, Cohen Y, Loewenthal R, Trakhtenbrot L, et al. Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS Med* 2009; 6(2): e1000029. PMID: 19226183.