

# بهبود عملکرد حرکتی نخاع به دنبال پیوند سلولهای استرومای مغز استخوان در موش صحرایی

مهرداد نقی خانی<sup>۱</sup>\*، دکتر تقی طریحی<sup>۲</sup>، دکتر منصوره موحدین<sup>۳</sup>، دکتر علیرضا دلشاد<sup>۴</sup>

## چکیده

هدف: گروههای تحقیقاتی متعددی در سراسر دنیا در حال مطالعه پیوند انواع سلولها و بافتها به عنوان یک روش درمانی مناسب برای آسیبهای سیستم عصبی میباشند. در پژوهش حاضر اثر پیوند سلولهای استرومای مغز استخوان (BMSC) با استفاده از ژل فوم در بهبود حرکتی موش صحرایی بالغ، پس از قطع نیمه نخاع در سطح مهره T۱۳ بررسی شد.

روش بررسی: پنج گروه موش صحرایی بالغ با انتخاب ساده تصادفی و به روش تجربی و مداخله‌ای مورد بررسی قرار گرفتند. در نخاع گروه اول یا کنترل هیچ دستکاری صورت نگرفت. در گروههای دوم تا پنجم نیمه از نخاع قطع شد، در گروه دوم هیچ درمانی انجام نشد، در گروه سوم ماده ژل فوم حاوی محیط کشت به محل قطع پیوند شد، در گروه چهارم علاوه بر پیوند ژل فوم سلولهای BMSC هم به محل قطع تزریق گردید و در گروه پنجم ژل فوم آغشته به BMSC پیوند زده شد. سلولهای BMSC از مغز استخوان موش صحرایی به دست آمد. در همه گروهها در روز اول و در پایان هفته‌های اول تا پنجم بعد از جراحی تست حرکتی BBB انجام شد و پس از پایان هفته پنجم قطعات نخاعی L۶ - L۴ برای مطالعات شمارش سلولی مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: میانگین نمره تست حرکتی در گروه کنترل هیچ تغییری نداشت ولی میانگین نمرات این تست در گروههای دوم تا پنجم با گذشت زمان افزایش داشت. همچنین نتیجه شمارش نرونها حرکتی در نیمه قطع شده نخاع نسبت به نیمه سالم نشانگر کاهش برابر با ۰٪ در گروه اول، ۶٪/۶۴٪ در گروه دوم، ۹٪/۴۷٪ در گروه سوم و ۵٪/۵۳٪ در گروه پنجم بود. نتایج کمی هردو روش (تست حرکتی و شمارش سلولی) اختلاف معناداری را بین گروههای چهارم و پنجم با دیگر گروهها نشان داد که مؤید نقش مؤثر BMSC در بهبود عملکرد نخاع است ( $P < 0/05$ ) و ( $P < 0/01$ ). عدم اختلاف معنادار میان گروههای دوم و سوم نشان داد که ژل فوم به تنهایی نمی‌تواند در بهبود عملکرد حرکتی نخاع مؤثر باشد.

نتیجه‌گیری: می‌توان نتیجه گرفت که سلولهای BMSC با استقرار در محل ضایعه موجب بهبود عملکرد حرکتی نخاع می‌شوند و ژل فوم پیوندی نیز داربستی را در محل ضایعه می‌سازد که سلولهای BMSC روی آن مستقر می‌شوند.

کلید واژه‌ها: آسیب نخاع / سلول مغز استخوان / پیوند سلول / موش صحرایی

- ۱- کارشناس ارشد آناتومی، دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
- ۲- پاتولوژیست، استاد دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
- ۳- دکترای آناتومی، استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
- ۴- دکترای آناتومی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی شاهد

تاریخ دریافت مقاله: ۸۴/۱۲/۲

تاریخ پذیرش مقاله: ۸۵/۳/۲۳

\*آدرس نویسنده مسئول:

تهران، پل نصر، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پرستاری، گروه علوم تشریح

تلفن: ۸۸۰۱۱۰۰۱، داخلی ۲۸۹۵

E-mail: ttirahi@yahoo.com



### مقدمه

دیدگاه استفاده از سلولهای جنینی در دهه ۸۰ میلادی رواج یافت. برنشتین و همکارانش با پیوند سلولهای جنینی نخاع، به نخاع آسیب دیده موشهای بالغ توانستند نتایج قابل ملاحظه‌ای در بهبود عملکرد نخاع آسیب دیده ببینند (۱). تسلر و همکارانش نیز پس از ایجاد برشی به اندازه ۲ تا ۳ میلی‌متر در محل اتساع کمبری نخاع موش صحرایی سلولهای جنینی E14-E15 رابه محل ضایعه تزریق نمودند و روند ترمیم گانگلیون ریشه خلفی نخاع را پس از ۲ تا ۹ ماه مورد بررسی قرار دادند. آنان ملاحظه کردند که گانگلیون ریشه خلفی نخاع ترمیم شده است (۲). در سال ۱۹۹۸ پیوند سلولهای بنیادی در درمان بیماریها مطرح شد که می‌توانست مشکل کمبود فرد اهدا کننده در روشهای پیوند بافت یا اندام را حل کند. گروهی از محققین در دانشگاه ژنوا اثر پیوند سلولهای بنیادی را در درمان بیماریهای تخریبی (Degenerative) بررسی کردند و نتایج مثبتی گرفتند (۳). چاپ ابتدا موشهای صحرایی را در سطح T9 لامینکتومی کرد، سپس با رها کردن یک وزنه ۱۰ گرمی روی نخاع، در موش ضایعه نخاعی ایجاد نمود. بعد از آن سلولهای استرومای مغز استخوان (BMSC) را در بالای ناحیه آسیب دیده تزریق کرد و برگشت عملکرد نخاع را گزارش نمود (۴). در یک تحقیق دیگر، ساساکی نقش سلولهای BMSC تحریک شده بوسیله سلولهای نوروفر را در ترمیم مجدد نخاع آسیب دیده موش مورد مطالعه قرارداد. وی ابتدا سلولهای BMSC را از مغز استخوان موشهای بالغ و سلولهای نوروفر را از جنین موش جدا کرد، این دو را با هم کشت داد و در نهایت سلولهای BMSC را به موشهایی که قطع نخاع کرده بود تزریق کرد. وی افزایش روند ترمیم و برگشت عملکرد نخاع را مشاهده نمود (۵). مغز استخوان شامل دو گروه از سلولهای بنیادی می‌باشد که عبارتند از: سلولهای بنیادی خونساز و سلولهای استرومایی مغز استخوان. این سلولها دارای دو ویژگی خود تجدید کنندگی (Self-renew) و تمایز (differentiation) به دیگر سلولهای بافت مزانشیمی بوده و می‌توان آنها را از خود فرد بیمار و یا شخص دیگری بدست آورد (۶). در یک سلسله تحقیقات با استفاده از حیوانات آزمایشگاهی نتایج مفیدی در درمان ضایعه نخاعی (۷)، آسیب مغزی (۸) و بیماری پارکینسون (۹) گزارش شده است.

پژوهش حاضر باهدف مطالعه تأثیر پیوند BMSC به واسطه ژل فوم (به عنوان یک داربست برای سلولهای پیوندی) بر روند بهبود حرکتی متعاقب قطع نیمه نخاع در موش صحرایی نژاد اسپراگو - داوولی انجام شده است. وجود و یا عدم ژل فوم و نوع و روش استفاده از آن و تکنیکهای بکار گرفته شده حالات مختلفی هستند که باعث اختلاف و

تمایز مطالعات قبلی در این زمینه و مطالعه حاضر می‌شوند. خصوصاً که در مطالعات قبلی پیوند BMSC، شمارش سلولی نرونهای حرکتی انجام نشده است.

### روش بررسی

در این پژوهش مداخله‌ای و تجربی آینده‌نگر از ۲۵ سر موش صحرایی ماده و بالغ نژاد اسپراگو - داوولی با سن  $14 \pm 2$  هفته استفاده شد. حیوانات در یک دوره روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته و در شرایط مطلوب و استاندارد حیوانخانه دانشگاه نگهداری شده و به طور تصادفی به ۵ گروه ۵ تایی تقسیم شدند.

– گروه اول (گروه کنترل، بدون هیچ گونه جراحی و درمان). حیوانات این گروه که گروه کنترل پژوهش را تشکیل می‌دهد، مورد هیچگونه عمل جراحی و ضایعه نخاعی قرار نگرفتند.

– گروه دوم (گروه قطع نیمه نخاع بدون هیچ روش درمانی). در این گروه نیمی از نخاع قطع شد ولی هیچگونه روش درمانی اعمال نگردید.

– گروه سوم (گروه قطع نیمه نخاع + ژل فوم<sup>۱</sup> حاوی محیط کشت). در این گروه پس از قطع نیمی از نخاع یک قطعه کوچک ژل و سرم در محل قطع نخاع قرار داده شد.

– گروه چهارم (گروه قطع نیمه نخاع + ژل فوم و تزریق BMSCs). در این گروه پس از قطع نیمی از نخاع علاوه بر قرار دادن یک قطعه کوچک ژل فوم در محل قطع نخاع، به وسیله سرنگ هملتون ۲۰ ل محیط کشت و سرم حاوی پانصد هزار BMSC نیز در عرض ۵ دقیقه به محل ضایعه تزریق گردید.

– گروه پنجم (گروه قطع نیمه نخاع + ژل فوم حاوی BMSCs). در این گروه پس از قطع نیمی از نخاع ژل فوم حاوی BMSCs در محل ضایعه قرار داده شد. برای این منظور قبل از پیوند، قطعات کوچک ژل فوم به ابعاد 0.5 mm در زیر هود به ۲۰ ل محیط کشت و سرم حاوی BMSC آغشته گردید.

در همه گروهها در روز اول و در پایان هفته‌های اول تا پنجم پس از جراحی، تست حرکتی BBB<sup>۳</sup> انجام شد و نتایج حاصله ثبت گردید. سپس در پایان هفته پنجم همه حیوانات کشته شده قطعات نخاعی L4-L6 آنها برای شمارش سلولی توسط میکروسکوپ نوری مورد استفاده قرار گرفت. لازم به ذکر است که در گروه اول که تحت جراحی قرار نگرفته بود نیز همزمان با گروه‌های دیگر مطالعات فوق انجام شد.



روش جراحی قطع نیمه نخاع:

در ابتدا با تزریق داخل صفاقی ۵۰mg/kg کتامین و ۲/۵mg/kg زایلوزین حیوان بیهوش شده و پس از بیهوش شدن موهای موضع عمل تراشیده شد و تمام سطح پشتی حیوان ابتدا با الکل ۷۰٪ و سپس با بتادین جراحی تمیز و ضد عفونی گردید. برای ایجاد برش جراحی پس از مشخص کردن محل برش ۲/۵ cm به سمت سری و دم حیوان پوست برش داده شد. با استفاده از کوتر قلمی از خونریزی موضعی جلوگیری شد. پس از بریدن فاسیای سطحی و عمقی و کنار زدن عضلات مجاور، زائده خاری مهره T۱۳ و لامینای مهره مشخص گردید. برای برش لامینا از یک فرز دندانپزشکی متصل به یک دریل کوچک استفاده شد. برای جلوگیری از آسیب سخت شامه برش لامینا در زیر میکروسکوپ لوپ و با نهایت دقت انجام شد. پس از رسیدن به سخت شامه با ایجاد یک برش توسط سوزن سرنگ انسولین و با استفاده از پنس میکرو جراحی سخت شامه کنار زده شد. با کمک سوزن انسولین یک نیمه نخاع را بریده و با ساکشن توسط پیپت پاستور بین دو قطعه نخاع یک فضای خالی ایجاد گردید. در گروه‌های سوم تا پنجم یک قطعه کوچک ژل فوم در این محل قرار داده شد بدین ترتیب یک نیمه نخاع قطع گردید (۱۳، ۱۰). به منظور جلوگیری از نشت مایع مغزی نخاعی، پس از انتقال سلولها به محل قطع نخاع، سریعاً با استفاده از یک قطعه فاسیا و بخیه زدن عضلات مجاور (با نخ قابل جذب ۴/۰) حفره ایجاد شده در لامینای مهره بسته شد. پس از شستشوی ناحیه با سرم فیزیولوژیک و دوختن فاسیا، پوست هم با نخ ابریشمی ۴/۰ دوخته شد. بعد از پایان عمل جراحی و تا به هوش آمدن کامل حیوان، با تاباندن نور یک چراغ مطالعه از کاهش دمای بدن حیوان به کمتر از ۳۷ درجه سانتی‌گراد جلوگیری شد. چشم‌های حیوان نیز با یک تکه گاز استریل مرطوب پوشانده شد تا قرینه خشک نشود. بر طبق دستورات حمایت از حیوانات آزمایشگاهی<sup>۱</sup> به علت احتمال دفع مایع مغزی نخاعی ۱۵-۲۵ml سرم رینگر لاکتات به صورت زیر جلدی تزریق شد. به منظور کاهش درد تا ۳ روز بعد از جراحی هر ۱۲ ساعت ۰/۲mg/kg ترامادول به صورت داخل صفاقی به حیوان تزریق شد. همچنین به منظور جلوگیری از عفونت‌های مختلف تا ۳ روز بعد از جراحی هر ۸ ساعت ۵۰mg/kg سفازولین به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. یکی دیگر از عوارض ضایعه نخاعی عدم دفع ادرار یا همان احتباس ادراری می‌باشد که برای حل این مشکل تا دو هفته پس از جراحی حداقل روزی ۲ بار مثانه حیوان به آرامی ماساژ داده شد تا تخلیه شود. ناحیه پرینه حیوان نیز با پنبه و الکل ضد عفونی گردید (۱۱، ۴).

تهیه سلولهای BMSC:

برای تهیه سلولهای مغز استخوان، از موشهای صحرایی ۸-۶ هفته از نژاد اسپراگو - داولی استفاده شد. استخوانهای درشت نی و ران حیوان جدا شده و بافت موجود در کانال مرکزی استخوانها به داخل یک فلاسک حاوی محیط کشت  $\alpha$ -mem تخلیه گردید. سپس حجم محیط کشت را به ۵cc رسانده، ۰/۵cc سرم F.C.S به آن اضافه شد. این فلاسک در اینکوباتور با شرایط ۳۷°C و ۵٪ CO2 قرار داده شد. پس از ۴ پاساژ متوالی سلولهای BMSC توسط ۰/۵ ml Brou نشان‌دار گردید و بعد از ۴۸ ساعت ۵۰۰/۰۰۰ سلول به صورت یک سوسپانسیون در ۲۰ محیط کشت جهت پیوند آماده شد.

مغز استخوان حاوی انواع سلولهای بنیادی می‌باشد که عبارتند از سلولهای بنیادی خون‌ساز، سلولهای مزانشیم مغز استخوان و ... پس از تخلیه سلولهای موجود در کانال مرکزی استخوان و کشت آنها، سلولهای استرومای مغز استخوان به کف ظرف می‌چسبند و با خالی کردن مایع داخل فلاسک این سلولها باقی می‌ماند. در نهایت پس از ۴ پاساژ، تقریباً تمام سلولهای باقی مانده در ظرف همان سلولهای استرومایی خواهند بود (۱۲). البته برای تأیید مطلب فوق، سلولهای چسبیده به کف ظرف پس از ۴ پاساژ با آنتی بادی فیبرونکتین به روش FITC مورد ارزیابی قرار گرفت.

در این تحقیق از تست حرکتی BBB استفاده گردید. حیوان مورد آزمایش در یک استوانه پلاستیکی به قطر ۱۰۶/۵ سانتی‌متر و ارتفاع ۶۰ سانتی‌متر قرار داده شد. توسط یک دستگاه دوربین فیلم برداری از حیوان فیلم گرفته شد به طوری که برای عدم حرکت در مفاصل اندام خلفی در سمت جراحی شده امتیاز صفر ثبت گردید. حداکثر امتیاز برای اندام خلفی نرمال ۲۱ در نظر گرفته شد. شمارش سلولی:

نورون‌های حرکتی هر دو نیمه نخاع با بزرگ نمایی ۴۰۰x چشمی میکروسکوپ نوری گراتیکول دار، مورد شمارش قرار گرفتند. برای این منظور از هر پنج برش متوالی یکی از آنها انتخاب گردید و نورون حرکتی واقع در شاخ قدامی نخاع که دارای هسته بزرگتر یا مساوی ۱۰ میکرومتر و حداقل هستک مشخص بود شمرده شد.

اطلاعات بدست آمده از شمارش سلولی و تست حرکتی توسط روش‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی (Tukey) مورد مقایسه قرار گرفت. در هر گروه میانگین تعداد و انحراف معیار مشخص شد و معنی داری در حد ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.



یافته‌ها

– گروه چهارم (قطع نیمه نخاع + ژل فوم و تزریق BMSC): میانگین نمره تست این گروه در روز اول  $2/2 \pm 1/9$  بود که در پایان هفته اول به  $7 \pm 0/70$  و در پایان هفته پنجم به  $16/6 \pm 0/89$  افزایش یافت. اختلاف این گروه با گروه‌های اول تا سوم معنادار ( $p < 0/01$ )، اما با گروه پنجم غیر معنادار بود.

– گروه پنجم (قطع نیمه نخاع + ژل فوم حاوی BMSC): میانگین نمره تست این گروه در روز اول  $2/1 \pm 1/9$  بود که در پایان هفته اول به  $5/8 \pm 9/6$  و در پایان هفته پنجم به  $16/8 \pm 4/1$  افزایش یافت. اختلاف این گروه با گروه‌های اول تا سوم معنادار ( $P < 0/01$ ) بود، اما با گروه چهارم غیر معنادار بود.

در پایان با مقایسه نمرات تست حرکتی کلیه گروه‌ها با یکدیگر مشاهده گردید که روند بهبود حرکتی در گروه‌های چهارم و پنجم (تحت درمان با BMSC) به مراتب بهتر از گروه‌های دیگر بوده است.

میانگین نمره همه گروه‌ها در روز اول و در پایان هفته‌های اول تا پنجم در جدول (۱) آورده شده است.

در همه گروه‌های آزمایشی در روز اول و در پایان هفته‌های اول تا پنجم پس از جراحی تست حرکتی گرفته شد که نتایج زیر به دست آمد:

– گروه اول (کنترل بدون جراحی و درمان): میانگین نمره تست حرکتی این گروه که در ابتدای پژوهش ثبت شده بود، تا پایان هیچگونه تغییری نکرد و ثابت ماند.

– گروه دوم (قطع نیمه نخاع بدون هیچ روش درمانی): میانگین نمره تست این گروه در روز اول پس از جراحی  $2/1 \pm 2/1$  بود که در پایان هفته اول به  $6/4 \pm 0/54$  و در پایان هفته پنجم به  $10/4 \pm 1/5$  افزایش یافت. اختلاف این گروه با گروه‌های اول، چهارم و پنجم معنادار ( $p < 0/01$ ) اما با گروه سوم غیر معنادار بود.

– گروه سوم (قطع نیمه نخاع + ژل فوم حاوی محیط کشت): میانگین نمره تست این گروه در روز اول پس از جراحی  $2/2 \pm 2/2$  بود که در پایان هفته اول به  $6/4 \pm 0/54$  و در پایان هفته پنجم به  $11 \pm 1$  افزایش یافت. اختلاف این گروه با گروه‌های اول، چهارم و پنجم معنادار ( $p < 0/01$ )، اما با گروه دوم غیر معنادار بود.

جدول ۱- میانگین نمره تست حرکتی گروه‌های مورد آزمایش در روز اول و در پایان هفته‌های اول تا پنجم پس از جراحی

گروه	زمان تست	روز اول	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم	هفته پنجم
اول		$2/1 \pm 0$	$2/1 \pm 0$	$2/1 \pm 0$	$2/1 \pm 0$	$2/1 \pm 0$	$2/1 \pm 0$
دوم		$2 \pm 1/2$	$6/4 \pm 0/54$	$7/2 \pm 0/44$	$8/4 \pm 0/54$	$10/2 \pm 1/7$	$10/4 \pm 1/5$
سوم		$2/2 \pm 2$	$6/4 \pm 0/54$	$7/4 \pm 0/54$	$8/6 \pm 0/54$	$11 \pm 1$	$11 \pm 1$
چهارم		$2/2 \pm 1/9$	$7 \pm 0/70$	$11/4 \pm 0/54$	$13/2 \pm 1/3$	$16 \pm 1$	$16/6 \pm 0/89$
پنجم		$2/1 \pm 1/9$	$9/6 \pm 5/8$	$11/4 \pm 0/54$	$12/8 \pm 4/7$	$14 \pm 4/1$	$16/8 \pm 4/1$

نتایج شمارش نورون‌های حرکتی آلفا

پس از تهیه و رنگ آمیزی برش‌های متوالی، با استفاده از عدسی گراتیکول تعداد نورون‌های حرکتی شاخ قدامی قطعات L۴-L۶ در هر دو نیمه نخاع مورد شمارش قرار گرفت. ابتدا در هر گروه میانگین نورون‌های حرکتی دو نیمه نخاع با یکدیگر، و سپس در هر نیمه نخاع میانگین نورون‌های حرکتی گروه‌های مختلف با یکدیگر مقایسه شد که نتایج زیر به دست آمد: در گروه اول مقایسه میانگین تعداد نورون‌های حرکتی هر دو نیمه سالم نخاع اختلاف معناداری را نشان نداد، در حالی که در گروه‌های دوم تا پنجم مقایسه تعداد نورون‌های حرکتی نیمه قطع نخاع شده با نیمه سالم اختلافی معنادار نشان داد.

نتایج شمارش نورون‌های حرکتی آلفا پس از تهیه و رنگ آمیزی برش‌های متوالی، با استفاده از عدسی گراتیکول تعداد نورون‌های حرکتی شاخ قدامی قطعات L۴-L۶ در هر دو نیمه نخاع مورد شمارش قرار گرفت. ابتدا در هر گروه میانگین نورون‌های حرکتی دو نیمه نخاع با یکدیگر، و سپس در هر نیمه نخاع میانگین نورون‌های حرکتی گروه‌های مختلف با یکدیگر مقایسه شد که نتایج زیر به دست آمد: در گروه اول مقایسه میانگین تعداد نورون‌های حرکتی هر دو نیمه سالم نخاع اختلاف معناداری را نشان نداد، در حالی که در گروه‌های دوم تا پنجم مقایسه تعداد نورون‌های حرکتی نیمه قطع نخاع شده با نیمه سالم اختلافی معنادار نشان داد.

در مقایسه میانگین تعداد نورون‌های حرکتی نیمه سالم نخاع در گروه‌های دوم و سوم معنادار بود ( $P < 0/05$ ) و بین بقیه گروه‌ها اختلاف معناداری مشاهده نگردید. در نیمه قطع شده نخاع بین گروه‌های دوم با سوم و نیز بین گروه‌های چهارم با پنجم اختلاف معناداری مشاهده نگردید، در حالی که اختلاف بین بقیه گروه‌ها معنادار بود ( $P < 0/05$ ).

جدول ۲- میانگین تعداد نورون‌های حرکتی شاخ قدامی در قطعات L<sub>۴</sub>-L<sub>۵</sub> نخاع موش صحرایی در گروه‌های مورد آزمایش

گروه آزمایش	میانگین تعداد نورون‌های حرکتی نیمه سالم ± انحراف معیار	میانگین تعداد نورون‌های حرکتی نیمه قطع شده ± انحراف معیار	درصد کاهش
اول	۱۲۵۱/۶±۵۹/۵	۱۲۵۲/۴±۵۹/۴	-
دوم	۱۰۱۶±۹۳/۴	۳۵۵/۲±۳۷	٪۶۴/۶
سوم	۹۷۱/۲±۵۵/۸	۳۴۴±۶۶/۲	٪۶۴/۶
چهارم	۱۰۹۱±۶۲/۸	۵۶۹/۲±۱۰۴/۲	٪۴۷/۹
پنجم	۱۰۸۸/۴±۱۹/۹	۵۰۶/۸±۵۷/۵	٪۵۳/۵

## بحث

در چند دهه گذشته سلولهای مغز استخوان همواره مورد توجه دانشمندان بوده است. این سلولها شامل دو گروه سلولهای بنیادی خون‌ساز و سلولهای بنیادی غیر خون‌ساز است، که سلولهای اخیر سلولهای استرومای مغز استخوان نامیده می‌شوند (۱۲).

در پژوهش حاضر به روش کریستین قطع نیمه نخاع در موش صحرایی ایجاد شد و نتایج حاصل از تست حرکتی حیوانات مورد آزمایش کاهش میانگین نمره تست حرکتی را تا ۵۰٪ نشان داد (۱۳). هانس و همکارانش در سال ۲۰۰۲ پس از قطع یکطرفه نخاع موش صحرایی بالغ، تأثیر پیش‌سازهای سرتونریک را در بهبود حرکتی حیوان بررسی نمودند. در این مطالعه در روز اول پس از جراحی (مرحله حاد) شاخص تست حرکتی BBB در گروههایی که هیچ درمانی دریافت نکرده بودند شدیداً کاهش یافت و هرچند این شاخص در پایان هفته پنجم کمی افزایش یافت اما کماکان نصف نمره گروه کنترل باقی ماند (۱۴). زائو و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۴ با ایجاد ضایعه یکطرفه نخاع در موش صحرایی کاهش شدید نمره تست رفتاری را گزارش کردند (۱۵). بنابراین با توجه به مطالب فوق و نتایج گزارش شده در قسمت قبل می‌توان گفت که روند ایجاد قطع یک طرفه نخاع در این پژوهش استاندارد بوده و تقریباً به همان میزان (۵۰٪) منجر به کاهش نمره تست حرکتی حیوانات تحت آزمایش شده است.

در قسمتهای قبل روش تهیه سلولهای BMSC توضیح داده شد و گفته شد که سلولهای استرومایی مغز استخوان به کف ظرف می‌چسبند (۱۶). هافستتر و همکارانش در تحقیق خود ابتدا سلولهای BMSC را توسط GFP<sup>۱</sup> نشاندار کردند و پس از چند پاساژ متوالی سلولهای نشاندار شده را توسط آنتی بادی بر علیه فیبرونکتین مورد ارزیابی قرار دادند و متوجه شدند که سلولهای BMSC که به آنتی بادی فوق واکنش مثبت می‌دهد

به کف ظرف محیط کشت سلول می‌چسبند (۱۷). راموس و همکارانش در سال ۲۰۰۰ سلولهای BMSC مغز استخوان حیوان و انسان را در دو محیط جداگانه کشت داده با استفاده از آنتی بادی ضد فیبرونکتین هویت BMSC این سلولها را تایید کردند (۱۸). در این پژوهش نیز با استفاده از آنتی بادی بر علیه فیبرونکتین ابتدا هویت سلولهای کشت داده شده پس از چهار پاساژ سلولی اثبات و سپس سلولهای BMSC پیوند زده شد.

در سال ۲۰۰۱ هافستتر و همکارانش در نخاع موش صحرایی در سطح T<sub>۹</sub> آسیب ایجاد کردند و سپس سلولهای BMSC را در محل ضایعه پیوند زدند، ۵ هفته بعد از پیوند سلول، آنان حیوانات را مورد آزمایش تست حرکتی قرار داده و نتیجه‌گیری کردند که نمرات تست حرکتی گروههای آزمایشی نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری را نشان می‌دهد، اما در گروه تحت درمان با BMSC میزان کاهش نمره تست حرکتی با اختلافی معنادار کمتر از دیگر گروه‌ها بود (۱۷). در سال ۲۰۰۴ اوتا و همکارانش در سطح T<sub>۸</sub>-T<sub>۹</sub> نخاع موش صحرایی ضایعه نخاعی ایجاد و سپس از طریق بطن چهارم سلولهای BMSC را در مایع مغزی نخاعی حیوان تزریق کردند. در پایان هفته پنجم از حیوانات تست حرکتی BBB گرفته شد و تفاوت معنی‌داری در بین گروههای کنترل و درمانی مشاهده گردید (۱۹). چاپ و همکارانش با استفاده از تست حرکتی BBB تأثیر پیوند مستقیم سلولهای BMSC را بر بهبود حرکتی حیوانات قطع نخاع شده مورد بررسی قرار دادند. افزایش نمرات تست حرکتی در گروه تحت درمان با سلول BMSC شاخص‌تر بود و پس از آنالیز آماری، اختلاف معنی‌داری بین گروه کنترل و گروه تحت درمان مشاهده گردید (۴). در سال ۲۰۰۴ زائو و همکارانش با پیوند سلولهای BMSC به موشهایی که دچار قطع نیمه نخاع شده بودند افزایش بهبود حرکتی این



حیوانات را در مقایسه با دیگر گروه‌های آزمایش گزارش کردند (۱۵). در پژوهش حاضر در پایان هفته پنجم بین نمره های دوم و سوم اختلاف معناداری مشاهده نگردید. با توجه به اینکه تنها تفاوت گروه سوم با گروه دوم وجود ژل فوم حاوی محیط کشت است، می‌توان نتیجه گرفت که ژل فوم حاوی محیط کشت به تنهایی نقشی در بهبود حرکتی حیوان ندارد. اختلاف معنادار گروه‌های چهارم و پنجم با گروه‌های دوم و سوم نشان دهنده نقش مؤثر ترکیب ژل فوم و BMSC و بر بهبود عملکرد نخاع می‌باشد و عدم وجود اختلاف معنادار بین گروه‌های چهارم و پنجم با یکدیگر نشان می‌دهد که روشهای تزریق BMSC در محل ژل فوم و یا آغشته کردن ژل فوم به سلولهای BMSC تفاوت چندانی با یکدیگر ندارند. محققین دیگری نیز از ژل فوم در محل قطع نخاع، داربستی برای استفاده از مواد نوروتروفیک ایجاد کرده و اثرات سودمند آنرا گزارش نمودند (۱۶-۱۸). افزایش نسبی نمره تست حرکتی گروه دوم و سوم نیز احتمالاً ناشی از پدیده ترمیم خودبخودی است که موجب بهبودی کمی در حرکت حیوان می‌شود.

با مقایسه نتایج شمارش سلولی و نتایج تست حرکتی BBB رابطه مستقیمی بین تعداد نورونهای حرکتی و نمره تست حرکتی در همه گروه‌ها مشاهده گردید، به این ترتیب که در گروه‌های چهارم و پنجم که تعداد نورونهای حرکتی با اختلافی معنادار بیشتر از گروه‌های دوم و سوم بود نمره تست حرکتی هم افزایش معناداری را نشان داد.

در بررسی پژوهش‌های انجام شده در مورد نقش BMSC بر روی آسیب‌های نخاعی، مشاهده شد که در آنها مشابه این تحقیق شمارش سلولی انجام نشده است، اما در مطالعاتی که اثر داروهای ضد التهابی در ترمیم نخاع بررسی گردیده است، این شمارش صورت گرفته است. از جمله الکساندر و همکارانش با مطالعه نقش متیل پردنیزولون در درمان قطع نخاع گزارش نمودند که این دارو اثر محافظتی داشته و از کاهش نورون‌های حرکتی آلفا جلوگیری می‌کند (۱۸). همچنین در مطالعه دیگری اثر محافظتی دپرنیل بر نورون‌های حرکتی آلفا در شاخ قدامی نخاع گزارش شده است (۱۹). با مقایسه این دو گزارش با نتایج پژوهش حاضر می‌توان نتیجه گرفت که سلولهای BMSC نیز احتمالاً بر روی نورون‌های حرکتی شاخ قدامی نخاع اثر محافظتی دارند.

با توجه به آناتومی نخاع باید اشاره کرد که در هنگام قطع نیمه نخاع ۸۰٪ از راههای نزولی که پیامها را از مراکز بالاتر به پایین می‌آورند و همچنین مقدار زیادی از راههای صعودی و ارتباطی با مراکز بالاتر از بین رفته، تقریباً تمامی حرکات در زیر سطح ضایعه در همان سمت از بین می‌رود اما پس از مدتی به علت وجود ۲۰٪ از راههای نزولی در سمت مقابل و نیز به علت پدیده ترمیم خودبخودی مقدار کمی از حرکات در زیر سطح

ضایعه بر می‌گردد. همان طوری که قبلاً بیان شد شروع پدیده التهاب منجر به آسیب سلولی در منطقه ضایعه می‌گردد. اختلال در خونرسانی و خونریزی منجر به تولید رادیکالهای آزاد می‌گردد و این مواد شدت آسیب سلولی را در منطقه افزایش می‌دهد. برای ایجاد بهبودی می‌بایست مکانیسم‌های آسیب سلولی را به حداقل ممکن رساند. کنش متقابل سلولهای BMSC و بافت عصبی احتمالاً موجب مکانیسم ترمیم (Regeneration) می‌شود. سه پدیده رگزایی (Angiogenesis)، عصب زایی (Neurogenesis)، و کاهش آپوپتوز (Apoptosis) می‌تواند از علل عمده بهبودی حرکتی در حیوانات درمان شده با BMSC باشد. سلولهای پیوندی BMSC با بیان فاکتورهای از قبیل (NGF)<sup>۱</sup>، (GDNF)<sup>۲</sup>، (BDNF)<sup>۳</sup>، (BFGF)<sup>۴</sup> و (VEGF)<sup>۵</sup> موجب ترمیم بافت عصبی می‌شوند (۲۱، ۲۰). مراحل طی شده در حین ترمیم بافت آسیب دیده مشابه مراحل تکوین بافتهای عصبی جنین می‌باشد (۲۳، ۲۲). حضور پدیده‌هایی نظیر آپوپتوز، رگزایی و عصب زایی در مراحل مختلف ترمیم نخاع به وضوح قابل مشاهده است. گروهی از محققین به تجزیه آزمایشگاهی محیط کشت مافوق (Supernatant) سلولهای BMSC پرداختند و حضور VEGF و BFGF را در آن گزارش کردند (۲۲). دو فاکتور فوق منجر به شروع روند رگزایی و شکل‌گیری عروق، عمدتاً در مجاورت محل آسیب شده (۲۵، ۲۴) و در روند ترمیم و شکل‌گیری مجدد (Remodelling) بافت عصبی نقش به سزایی دارند. همچنین تحقیقات دیگر محققین نشان داد سلولهای BMSC توانایی تولید موادی از قبیل NGF و BDNF را نیز دارند (۲۷، ۲۶).

### نتیجه‌گیری

مواد نوروتروفیک بر حفظ و بقا و یا ترمیم سلول عصبی تأثیر داشته و موجب بقای سلولهای عصبی می‌شود. با توجه به یافته‌های این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت ژل فوم داربستی را در محل قطع نخاع ایجاد می‌کند که تعداد زیادی سلولهای BMSC روی این داربست مستقر شده و از پراکنده شدن آنها جلوگیری می‌شود. همچنین می‌توان نتیجه گرفت که پیوند سلولهای BMSC به واسطه ژل موجب بهبود حرکتی موش صحرائی قطع نیمه نخاع می‌شود. در این پژوهش می‌توان به افزایش تعداد سلولهای حرکتی شاخ قدامی نخاع در دو گروه تحت درمان نسبت به دو گروه دوم و سوم اشاره کرد و آن را یکی از دلایل افزایش میانگین نمره تست حرکتی دو گروه تحت درمان نسبت به گروه‌های دوم و سوم در نظر گرفت.

1 - Neural growth factor  
2 - Glial cell derived neurotrophic factor  
3 - Brain-Derived Neurotrophic Factor  
4 - Basic Fibroblast growth Factor  
5 - Vascular Endothelial Growth Factor



محترم بخش علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی تربیت مدرس که در انجام این پروژه زحمات زیادی متحمل شدند تشکر و قدردانی می شود

### تشکر و قدردانی

بدینوسیله از جناب آقای پوربیرانوند و سرکار خانم ابراهیمی کارشناسان

### منابع:

- 1- Mc Donald J W, Liu X Z, QU Y. transplantation of embryonic stem cells in to the injured spinal cord reduces functional deficits. *Naure Med* 1999; 5:1410-1412.
- 2-Tessler A, Himes B T, Royahn C. Enhancement of adult dorsal root regeneration by embryonic spinal cord transplants. *Progress in Brain Research* 1988; 78: 213-351.
- 3- Jaconi M. Embryonic stem cells; new possible therapy of degenerative diseases *Therumsh* 2002; 5: 588-595.
- 4- Chopp M, Zangx H, Liv. Spinal cord injury in rat treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuroreport* 2000; 11: 3001-3005.
- 5- Wus, Suzuki Y, Ejiri Y. Bone marrow stromal Cells enhance differentiation spinal cord. *Neuroscience Res* 2003; 12: 354-351.
- 6- Chopp M. Li Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *The lancet Neur* 2002; 92-100.
- 7- Akiyama Y, Radtke C, Kocsis J D. Remyelination of the Rat spinal cord by Transplantation of Identified Bone Marrow Stromal cells. *Neurosci* 2002; 1, 22 (15): 6623-6630.
- 8- Mahmood A. Lu D, Yil, Chent L. Intracranial bone Marrow transplantation after traumatic brain injury improving function outcome in adult. *Neurosurg* 2001; 94: 589-595.
- 9- Li, Chen J, Wany L. Intracerebral transplantation of bone marrow cell in a 1-methyl-A- Phenyl – 2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of parkinson's disease. *Neurosci let* 2001; 316: 67-70.
- 10- Seung Y, Hyung J, Jin S Y. The survival and migration pattern of the Bone marrow stromal cells after intracerebral transplantation in Rats. *J. korean Neurosurg* 2004; 36: 400-404.
- 11- Chopp M, Zangx H, Liv. Spinal cord injury in rat treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuroreport* 2000;11: 3001-3005.
- 12- Pittenger M F, Marshak D R. Mesenchymal stem cells of human adult bone marrow. *cold spring Harbar NewYork; cold spring Harbar Laboratory press* 2001; 349-374.
- 13- Gwak Y S, Nam T S, Paik K S. Attenuation of mechanical hyperalgesia following spinal cord injury by administration of antibodies to nerve growth factor in the rat. *Neuroscience Letter* 2003; 336:117-120.
- 14- Ludewig PM, Cook TM, Nawdeezenski DA. Three-dimensional scapular orientation and muscle activity at selected Positions of homeral elevation. *JOSPT* 1996; 24 (2): 57-65
- 15- Zhao Z M, Li H Y. Intraspinal transplantation of CD34+human umbilical cord blood after spinal cord hemisection injury improve functional recovery in adult rats. *Cell Trans* 2004;13 (12): 113-122.
- 16- Bruder S P, Jainwal N. Growth kinetics self-renewal and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *Cell Biochem* 2002; 64: 278-294.
- 17- Hofstetter C P, Schwarz E J, Hess D, Widenfalk J; Marrow stromal cell from guiding strands in the injured Spinal cord and promote recovery. *PNAS* 2002; (99) 4: 2199-2204.
- 18- Sanchez –Romaz J, song S, Cardozo F. Adult Bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Experimental Neuro* 2000;164: 247-256.
- 19- Masayoshi O, Toshishisa S, Toru N, Yoko E. Bone Marrow stromal cells infused in to the cerebrospinal fluid promote functional recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation. *Experimental Neuro*; 2003; (Article: in press).
- 20- Cramer S C, Chopp M. Recovery recapitulates ontogeny. *Trends Neurosci* 2000; 23: 265-241.
- 21- Stroemer R P, Kent T A, Hulsebosch C E. Neocortical neural sprating, synaptogenesis and behavioral recovery after neocortical infarction in rats. *stroke* 1995; 26: 2135-2144.
- 22-Hamano k, Li T S , Kobayashi S. Angiogenesis induced by the implantation of self – bone marrow cells, a new material for therapeutic angiogenesis. *Cell Trans* 2000; 9: 439-443.
- 23- Tamada Y, Fukiage C, Boyle D L, Azuma M. Involvement of cysteine proteases in b FGF- induced angiogenesis in guina pig and rat cornea. *Ocul Pharmacothera* 2000; 16: 271-283.
- 24-Chopp M, Li Y, Jiong N. Increase in apoptosis and concomitant reduction of ischemic lesion volume and evidence for synaptogenesis after transient focal cerebral ischemia in treated with staurosporine. *Brain Res* 1999; 828: 197-201.
- 25-Dormady S P, Bashayan O, Dougherty R. Immortalized multipotential mesenchymal cellsand the hematopoitic microenviroment; *Hem. stem cell Res* 2001; 10:125- 140.
- 26- Mc Keon R J, Hoke A, Silver J. Injury – induced proteolycans inhibit the potential for lamini mediated axon growth on astrocytic scars. *Exp Neurol* 1995; 13:132-143.
- 27-Li Y, Chopp M, Jiong N. In situ detection of DNA fragmentation after focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res. Mol* 1995; 28: 164-168.