مطالعه ضایعات مغزی ناشی از انسداد یکطرفه شریان کاروتید و بهبود آن با استفاده از جایگزینی سلول‌های چند ظرفیتی بافت چربی

- دکتر حسینعلی غفاری پور[1]
- دکتر مهدی جلالی[2]
- دکتر محمد رضا نیکروش[2] *
- مهندس جواد سنچولی[1]
- دکتر داریوش حمیدی علمداری[2]
- دکتر معصومه ثقه الاسلام[2]

چکیده

مقدمه

سلول‌های بافت چربی سلول‌های تغییر شکل یافته و نابالغی هستند که علاوه بر یک منبع ذخیره چربی قادرند تحت شرایط خاص به عنوان گونه‌ای از سلول‌های بنیادی عمل کنند و بافت‌های از دست رفته را ترمیم نمایند. لذا در این مطالعه اثر درمانی سلول‌های مشتق از بافت چربی انسان بر ضایعه قشری مغز موش صحرایی مدل ایسکمیک مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌کار

مطالعه حاضر بر روی ۳۰ سر رت نر نژاد ویستار ۱۵۰-۱۰۰ گرمی انجام گرفت. با این توصیف که ابتدا جهت ایجاد مدل آزمایشگاهی سکته مغزی ایسکمیک، حیوانات به ۳ گروه تقسیم شده و در دو گروه تجربی و شم، شریان کاروتید راست برای مدت ۳۰ دقیقه مسدود گردید. ۷ روز پس از جراحی، ۱۰۵×۲ سلول مشتق از بافت چربی نشاندار شده با برومودزوکسی یوریدین از طریق ورید دمی به حیوانات گروه تجربی تزریق شده و در گروه شم، تزریقی صورت نگرفت. سایر حیوانات (گروه کنترل) مورد عمل جراحی و تزریق قرار نگرفتند. برای مدت ۱۴ روز حیوانات با استفاده از دو آزمون حرکتی از لحاظ اختلال حرکتی مورد بررسی قرار گرفته و وجود سلول‌های نشاندار نیز در محل ضایعه با استفاده از ایمنوهیستوشیمی تأیید گردید.

یافته‌ها

نتایج این مطالعه نشان داد که سلول‌های جدا شده از بافت چربی تزریق شده در ناحیه آسیب دیده مغزی مستقر شده و روند بهبود اختلالات حرکتی ناشی از خونریزی در گروه تجربی به صورت معنی داری در سطح احتمال ۵در صد در مقایسه با گروه شم بهتر بوده و بعلاوه بررسی‌های بافتی حاکی از کاهش درصد بافت ضایعه دیده در گروه تجربی در

۱. دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی زابل، زابل، ایران
۲. استاد علوم تشریحی، گروه علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
پست الکترونیک: doctornikravesh@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقایسه با گروه شم به شکل معنی داری تغییر یافت.

نتیجه‌گیری

چنین به نظر می‌رسد که پیوند سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی توانسته است در مقابله با ضایعات مغزی ناشی از هیپوکسی ایسکیمیک در

BrdU positive human adipose stem cells [(2×10^5 cells in 1ml saline, n=10) as experimental group] or the same amount of saline [as sham group (n=10)]. There was also one group (control) without any surgery or injections. The animals were evaluated for 14 days to test movement disorders by limb placing and corner turn tests. Transplanted stem cells were detected by immunohistochemistry.
Findings: The results demonstrated that the injected ASCs were settled in the injured area of the brain and helped to improve the movement's disorders due to bleeding, in the experimental groups ($P<0.05$), which was better, compared to the sham group. The data also revealed that size of damaged region in brain of experimental group was decreased significantly.

Conclusion
It is concluded that the adipose stem cells' transplantation has a beneficial influence on brain tissue reparation after hypoxic ischemic cell's death, especially in the hypothalamic area and cortical region.

Key words: Adipose-derived Stem Cell (ASC), brain damage, hypoxic ischemic

نواحی آسیب دیده و خصوصاً در ناحیه قشری نتایج سودمندی را بیان نماید.

کلید واژه‌ها

سلول‌های بافت چربی، ضایعه مغزی، هیپوکسی ایسکیمیک .

Cerebral damagesinduced epsilateral common carotid occlusion and their improvement by using multipotential adipose-drived stem cells

- Ghafaripoor, H.A[1]
- Jalali, M[2]
- Nikravesh, M.R☆[2]
- Sanchooli, J[2]
- Hamidi Alamdari, D[1]
- Seghatoleslam, M[1]

Abstract

Background
Adipose-derived cells are immature and transformed cells which can in specific conditions, play different roles such as providing a source of stem cells for treatment of damages and injuries. The aim of this study was to determine therapeutic effects of human adipose-derived stem cells on cerebral cortex injury in cerebral ischemic rats.

Methods
The present study included 30 male Wistar rats. The cases were divided into three groups. For experimental and sham groups, the right Carotid stroke was occlused by Common Carotid Artery occlusion (CCA) for 30 minutes in 100-150 g male Wistar rats. Seven days after surgery, the rats were divided into two groups to receive intravenously either

1. Faculty of Medicine, Zabol University of Medical Sciences, Zabol, Iran
2.Department of Anatomy and Cell's Biology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

سلول‌های بنیادی سلول‌های نامتمایزی هستند که توانایی تکثیر و تولید سلول‌های پیش ساز بافت‌های تمایز یافته را در خود حفظ می‌کنند و در نتیجه می‌توانند در پاسخ به تحریکات خاص به انواع سلول‌های موجود در بدن تمایز یابند. دانسته‌های ما در مورد این سلول ها به سرعت در حال رشد است و اخیراً چشم اندازهای جدیدی را در استراتژی‌های ترمیمی بافت‌های مختلف و از جمله بافت مغزی ناشی از صدمات مختلف به ویژه ضایعات ناشی از هیپوکسی ایسکمیک (۴-۱) و همچنین بیماری‌های مزمنی نظیر پارکینسون، کره هانتینگتون، اسکلروزیس آمیوتروفیک طرفی، اسکلروزیس مولتیپل وآلزایمر پیش روی ما گذاشته است (۴و ۵). تحقیقات نشان داده است که انواعی از سلول های بنیادی در سرتاسر دوره تکامل پستانداران تولید می‌شوند و چندین منبع برای این سلول‌ها وجود دارد که ممکن است در درمان ایسکمی مغزی مفید باشند. این سلول ها شامل: سلول‌های بنیادی جنینی (۶)، سلول‌های بنیادی عصبی موجود در نواحی در حال تکامل خاصی از مغز پستانداران بالغ (۷) و سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان، خون بند ناف و بافت چربی می‌باشند (۱۰-۸). بنابر این جهت درمان این اختلال عصبی شایع، جامعه پزشکی به یک استراتژی ترمیمی کارآمد نیازمند می‌باشد و در حال حاضر با توجه به تحقیقات گسترده‌ایی که بر روی اثر درمانی سلول‌های بنیادی در نواحی مختلف بدن و خصوصاً بر روی بیماری‌های سیتم عصبی در سطح جهانی انجام می‌شود، سلول درمانی می‌تواند یکی از راه‌های اصلی درمان سکته مغزی در نظر گرفته شود. در سال‌های اخیر گروه زیادی از محققین بر روی اثر درمانی این نوع از سلول‌های بنیادی در سکته مغزی ایسکمیک مدل آزمایشگاهی کار کرده و به نتایجی دست یافته‌اند. برای مثال De Ugarte و همکاران و همچنین Kang و همکاران در سال ۲۰۰۳ ، اثر محافظتی تزریق سلول‌های بنیادی بافت چربی را برروی موش‌های صحرایی مدل سکته مغزی ایسکمیک ناشی از گرما بررسی نمودند. در این مطالعه، آنها به حیوانات آسیب دیده یک روز پس از ایجاد ایسکمی، این سلولها را به صورت وریدی تزریق کرده و با بررسی ایمنوهیستوشیمی نشان دادند که سلول‌های مورد نظر در محل ضایعه جمع شده و در مقایسه با گروه تزریق نشده مانع از تخریب بافتی ناشی از ایسکمی شده‌اند (۱۱ و ۱۲). مطالعات سال‌های گذشته و همچنین در مطالعه ای که اخیراً بوسیله Lequeux و همکاران صورت گرفته این موضوع مشخص شده است که سلول‌های برگرفته شده از بافت چربی دارای این توانایی و قابلیت هستند که به رده های مختلف سلولی با قابلیت‌های مختلف تمایز یابند که یکی از این ویژگی‌ها تمایز آنها به سلول‌های عصبی است (۱۳). بنا بر این در ادامه مطالعات قبلی، در طراحی این تحقیق سعی شده است تا با استفاده از سلول‌های یاد شده و انتقال آنها به بدن مدل آزمایشگاهی دارای آسیب مغزی ایسکمیک، میزان بهبود حرکتی و جایگزینی این سلول‌ها در نواحی قشری مغز موش صحرایی مورد بررسی قرار گیرد.

روش پژوهش

جدا سازی، تخلیص و نشاندار کردن سلول‌های بنیادی بافت چربی

بافت چربی از نمونه‌های چربی جدا شده طی عمل جراحی لیپوساکشن در محل بخش جراحی عمومی بیمارستان رضوی تحت نظر جراح و با رعایت حقوق کامل بیماران جمع‌آوری گردید و در کوتاه ترین زمان ممکن تحت شرایط استریل در دمای محیط به آزمایشگاه کشت سلول انتقال داده شد و سپس تمام مراحل در هود لامینار انجام گرفت. جهت جدا کردن خون از بافت چربی، نمونه‌های بافت چربی حداقل در ۳ نوبت با بافر شستشو داده شد و سپس بافت چربی شسته شده با

Archive of SID

www.SID.ir

۰/۰۱ درصد آنزیم کلاژناز نوع یک، داخل شیشه استریل ۵۰۰ میلی لیتری مخلوط گردید و به مدت ۱۰ ثانیه محکم تکان داده شد تا کاملاً با هم مخلوط شدند. سپس ظرف حاوی بافت و آنزیم، داخل انکوباتور شیکردار ۳۷ درجه سانتیگراد با دور ۴۰ rpm (دور در دقیقه) برای مدت ۱تا ۲ ساعت انکوبه گردید. پس از اتمام زمان انکوبه شدن، از FBS[1] با غلظت نهایی۱۰درصد جهت خنثی کردن اثر آنزیم استفاده شد و به بافت هضم شده چربی اضافه گردید. در این مرحله سوسپانسیون چربی بدست آمده از قبل به نسبت ۳ به ۱ با PBS[2] رقیق شده و به لوله‌های فالکون ۱۵ میلی‌لیتری منتقل گردید. سپس لوله‌ها در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۸۰۰g سانتریفوژ شدند. پس از سانتریفوژ چهار فاز در لوله‌ها از بالا به پایین مشاهده گردید که به ترتیب شامل: چربی‌های معلق، بافت چربی، PBS و پلاک سلولی کف لوله می باشد. پلاک سلولی بدست آمده، با ۴-۲ میلی‌لیتر PBS معلق شده و پس از سانتریفوژ، ۲ تا ۳ مرتبه شستشو داده شد تا کاملاً سلول‌ها خالص شدند. برای شمارش سلول‌ها از لام نئوبار و جهت تعیین درصد زنده بودن آنها از رنگ تریپان بلو ۰/۴درصد استفاده گردید. جهت ردیابی سلول‌ها در بدن حیوان لازم بود تا آنها نشاندار شوند. برای این منظور از ماده برومودی اکسی یوریدین (BrdU) استفاده گردید و سلول‌های بدست آمده از مراحل جداسازی، برای مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با BrdU ۳ µg/ml در محیط کشت انکوبه گردیدند (۱۴، ۱۳).

ایجاد مدل حیوانی آسیب مغزی هایپوکسی ایسکمیک

برای این مطالعه از ۳۰ سر رت نر نژاد ویستار با وزن ۱۵۰-۱۰۰ گرم استفاده گردید. با تزریق داخل صفاقی mg/kg ۳۰ کتامین ۱ درصد و ۴mg/kg زایلازین ۲۰ سر از حیوانات (گروه های تجربی و شم) تحت بیهوشی عمیق قرار گرفته و به منظور ایجاد هیپوکسی ناشی از ایسکمی، مطابق روش Hidetoshi و همکاران شریان کاروتید راست آنها بسته شد (۱۵). این کار با برشی در ناحیه طرفی میانی گردن انجام گردید. با ورود به فاسیا و عضلات طرفی گردن حیوان و دستیابی به غلاف کاروتید، کاروتید مشترک از نسوج اطراف آن متمایز گردیده و با استفاده از گره نخ بخیه (۰۶) که از پشت شریان عبور داده شد عمل مسدود کردن آن به مدت ۳۰ دقیقه انجام گرفت. پس از آن شریان آزاد شده و پوست محل برش تحت شرایط استریل بخیه گردیده و حیوانات تا زمان به هوش آمدن تحت نظر قرار گرفتند.

سپس در روز هفتم بعد از آسیب هیپوکسی-ایسکمی، حیوانات گروه تجربی (n=10) مجدداً تحت بیهوشی قرار گرفته و از طریق ورید دمی تعداد ۱۰۵×۲ سلول بنیادی معلق در یک میلی لیتر نرمال سالین به هر یک از آنان تزریق گردید. به حیوانات گروه شم (n=10) فقط یک میلی لیتر نرمال سالین تزریق گردید. ضمناً ۱۰ حیوان سالم بدون آنکه دچار هیپوکسی شده باشند بعنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند.

بررسی تغیرات حرکتی ،رفتاری و بافتی

۲در این مرحله آزمون رفتاری جهت ارزیابی عملکرد چگونگی حرکت حیوان و وجود اختلالات حرکتی و هماهنگی حرکات و نقایص حسی-پیکری، برای حیوانات انجام گردید. این آزمون‌ها در ۳ نوبت شامل روزهای ۱ و ۷و ۱۴ بعد از تزریق سلول‌های بنیادی (۱۶، ۱۲) برای حیوانات انجام شد به صورت زیر انجام شد:

در آزمون اول، یعنی آزمون Modified limb placing به گزارش De Ryck و همکارانش (۱۷) حیوانات در شرایطی بررسی شدند که کاملاً در دست نگهداشته شده و

1. Fetal Bovian Serum
2. Phosphate buffered saline

Archive of SID

www.SID.ir

بی حرکت بودند و از هر حیوان آزمون‌های مجزا جهت بررسی کشش رو به جلو، دور شدن و نزدیک شدن طرفی اندام‌ها گرفته شد. علاوه بر این، برای بررسی قرار دادن اندام به دنبال تحریک بینایی، حیوان در فاصله ۱۰ سانتی‌متری از سطح میز به صورت معلق از دم نگه داشته شد و کم کم به سطح میز نزدیک گردید عملکرد هر یک از اندام‌های جلویی و عقبی در هر سمت بدن به صورت مجزا در ۶ تست ارزیابی شده و برای هر آزمون یک امتیاز صفر (عدم وجود پاسخ حرکتی یک اندام) ،۱ (پاسخ حرکتی ناکامل و یا با تأخیر بیشتر از ۲ ثانیه یک اندام) و ۲ (پاسخ حرکتی سریع و کامل اندام) که در مجموع ۱۶ امتیاز برای یک موش سالم است در نظر گرفته شد.

در آزمون دوم،Corner turn testing score، مطابق روش Hua و همکارانش (۱۸) حیوانات در گوشه‌ای رها شدند و سپس تعداد برگشت‌های آنها از سمت چپ و راست در ۱۰ نوبت جداگانه شمارش گردید و به صورت درصد بیان شد. اگر میزان برگشت‌های موش از هر دو سمت یکسان بود، سالم و اگر تمایل به گردش به یک سمت در حیوان بیشتر بود، نشانگر صدمه مغزی یک طرفه حیوان در نظر گرفته شد.

جهت بررسی تغییرات بافتی و درصد ضایعه بافت کورتکس در مغز موش ها، در روز ۱۴ پس از انجام آخرین مرحله آزمون‌های حرکتی، تمام حیوانات بیهوش گردیده و پس از پرفیوژن با ۱۰۰میلی‌لیتر نرمال سالین سرد و ۱۰۰ میلی‌لیتر پارافرمالدئید ۴ درصد در PBS ۰/۱ mol/l مغز آنها از جمجمه خارج شده و برای ۲۴ ساعت داخل فیکساتیو پارافرمالدئید نگهداری شد. پس از آن از هر مغز بلوک‌های پارافینی تهیه کرده، سپس با استفاده از میکروتوم روتاری برش های کرونال به ضخامت ۶ میکرون از بلوک‌ها تهیه گردید و به ازای هر ۴۰ برش ۶ میکرونی یک برش را انتخاب کرده و با H&E رنگ آمیزی نموده و سپس درصد ضایعه بافتی ناحیه قشری در مقایسه با ناحیه قشری سمت مقابل به کمک سیستم آنالیز تصویری (Data Translation, Marlboro, MA). در هر مقطع بافتی محاسبه گردید. جهت مشاهده سلول‌های بنیادی جایگزین شده در ناحیه قشری بافت مغزی ناحیه آسیب دیده جهت انجام آزمایشات ایمنوهیستوشیمی و ردیابی سلول‌های نشاندار شده با BrdU، مورد استفاده قرار گرفت. به این ترتیب که ابتدا آنتی بادی اولیه ضد BrdU را روی مقاطع ریخته و سپس آنتی بادی ثانویه نشاندار شده با پروکسیداز را به آن متصل نموده و در نهایت به کمک DAB مقاطع رنگ آمیزی شده و سلول‌های نشاندار در ناحیه بررسی شدند. ضمناً جهت ایجاد کنتراست ، از رنگ هماتوکسیلین برای رنگ آمیزی سایر سلول‌ها استفاده شد.

بررسی آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS (V.16) انجام شد، در آنالیز امتیازات حاصل از آزمون‌های رفتاری، جهت مقایسه بین گروهی و داخل گروهی از روش آنالیز واریانس و آزمون Tukey استفاده گردید. مقایسه درصد حجم از دست رفته بافت با آزمون T Test ارزیابی شد. به علاوه، برای آنالیز امتیازهای بدست آمده از آزمون‌های رفتاری از Repeated Measur نیز استفاده شد. نمایش اطلاعات بصورت Mean± SEM بود و P value کمتر از ۰/۰۵ معنی دار تلقی گردید.

یافته‌ها

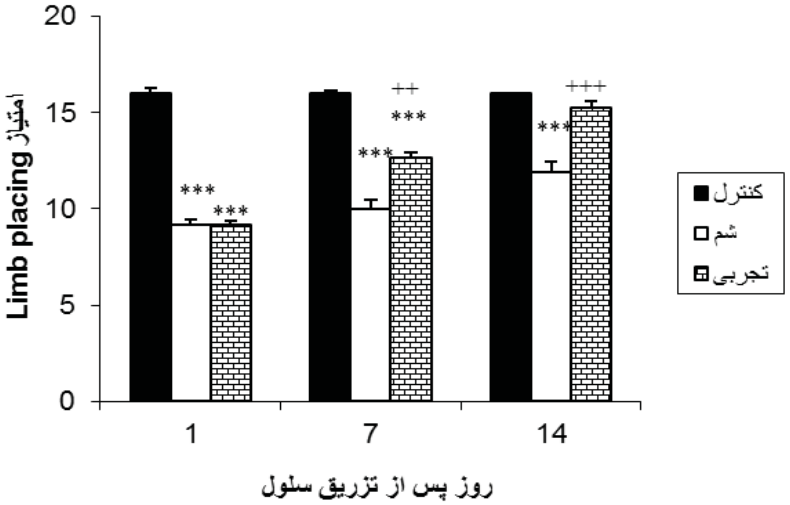
بهبود رفتارهای حرکتی

نتایج حاصل از دو آزمون رفتاری به این صورت بود که در آزمون Limb Placing توانایی حرکت اندام‌های جلویی و عقبی هر دو طرف حیوان مورد بررسی قرار گرفت و امتیازهای بدست آمده از حیوانات گروه تجربی (۰/۲۵ ± ۹/۲) و شم(۰/۲ ± ۹/۲) در روز اول پس از تزریق سلول، با یکدیگر اختلاف معنی داری نداشتند. در حالی که

Archive of SID
www.SID.ir

تا روز ۷ پس از تزریق، امتیازهای هر دو گروه افزایش یافته و از آنجائیکه این افزایش امتیاز در گروه تجربی (۰/۲۶ ± ۱۲/۷) در مقایسه با گروه شم (۰/۴۷ ± ۱۰) بارزتر بود از لحاظ آماری با یکدیگر اختلاف معنی‌دار نشان دادند. به علاوه این اختلاف تا روز ۱۴ پس از تزریق واضح تر گردید و امتیاز در گروه تجربی به ۰/۳۱ ± ۱۵/۳ و در گروه شم به ۰/۵۳ ±۱۱/۹ رسید که با یکدیگر در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌دار داشتند.

در گروه کنترل آن دسته از حیواناتی بودند که مورد جراحی قرار نگرفته و به علاوه سلولی دریافت نکرده بودند در هر سه نوبت نتایج حاصل از این آزمون برای آنها امتیاز ۱۶ بود که با توجه به امتیازهای بدست آمده از دو گروه تجربی و شم که در بالا ذکر گردید، در روز اول و هفتم پس از تزریق، این گروه با هر دو گروه اختلاف معنی دار داشته و اگر چه که این اختلاف با گروه شم تا روز ۱۴ همچنان ادامه یافته و لیکن با گروه تجربی نتیجه این گونه نبوده و بین این دو گروه اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (نمودار۱).



نمودار۱: مقایسه افزایش میانگین امتیازهای کسب شده از آزمون Modified Limb Placing در گروه‌های مورد مطالعه (n=10) در طی ۱۴ روز.

در روز ۱ پس از ایسکمی مغزی و تزریق سلول میانگین امتیازهای گروه کنترل بیشترین مقدار را نشان می‌دهد و میانگین امتیازات کسب شده در گروه‌های تجربی و شم کمترین مقدار را به خود اختصاص داده است. در روز ۷ پس از ایسکمی مغزی و تزریق سلول، میانگین گروه کنترل همچنان در بالاترین حد و میانگین مربوط به گروه شم در پایین‌ترین حد می‌باشد ولیکن میانگین‌های امتیازگروه تجربی به اندازه‌ای افزایش یافته که با گروه شم نیز اختلاف معنی‌دار پیدا کرده‌اند (P<۰/۰۱). در روز ۱۴ پس از ایسکمی مغزی و تزریق سلول اختلاف معنی دار بین میانگین‌های امتیاز گروه تجربی با گروه کنترل از بین رفته است ولیکن بیشترین تفاوت معنی دار (P<۰/۰۰۱) با گروه شم را در این زمان نشان می‌دهد. امتیازهای کسب شده درگروه ها به صورت Mean ± SE نشان داده شده است.

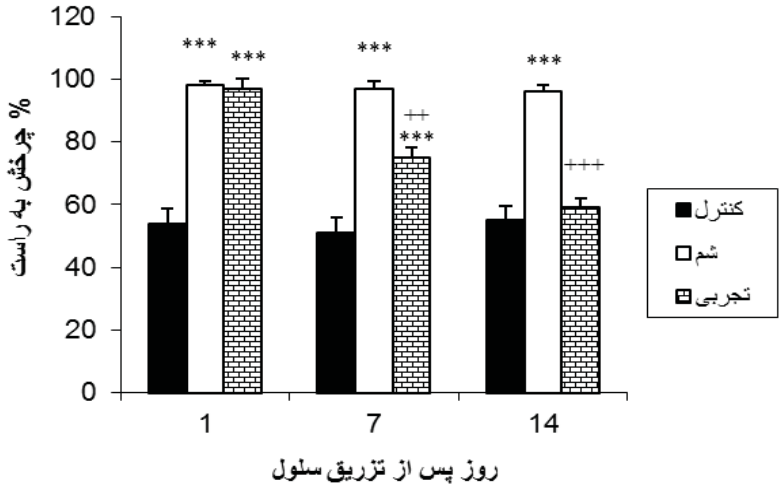
***P<0.001 vs control
+++P<0.001 vs Sham
++P<0.001 vs Sham

در آزمون Corner Turn وضعیت تعادل حرکتی مرتبط با تماس حسی ناشی از ارتعاش

Archive
www.SID.ir

موش‌های صحرایی با ثبت تعداد چرخش‌های حیوان به سمت راست که دچار هیپوکسی مغزی شده بودند بررسی گردید و به صورت در صد گزارش شد. به این ترتیب که، این آزمون همانند آزمون قبلی برای تمام گروه‌ها در روز های اول و هفتم و ۱۴ پس از تزریق سلول انجام شد و نتایج حاصل در دو گروه تجربی (۳ ± ۹۷درصد) و شم (۱/۳ ± ۹۸ درصد) در روز ۱ پس از تزریق حاکی از آن بود که با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشته ولی تا روز ۷ پس از تزریق، با توجه به نتیجه ۳/۰۷ ± ۷۵ درصد برای گروه تجربی و ۲/۱۳ ± ۹۷ درصد برای گروه شم، اختلاف بین این دو گروه معنی دار شده و این معنی دار بودن تا روز ۱۴ نیز ادامه یافت [گروه تجربی (۳/۱۴ ± ۵۹ درصد) و گروه شم (۲/۲۱ ± ۹۶ درصد)].

از طرف دیگر در گروه کنترل نتایج بدست آمده در روزهای ۱،۷ و ۱۴ پس از تزریق به ترتیب، ۴/۵۲ ± ۵۴ درصد ، ۴/۸۲ ± ۵۱ درصد و ۴/۵۳ ± ۵۳ درصد بود و با نگاهی به نتایج دو گروه دیگر در هر روز های ۱ و۷ مشخص گردید که با یکدیگر اختلاف معنی دار دارند و لیکن در روز ۱۴ در مورد گروه تجربی این اختلاف معنی دار از بین رفته است (نمودار۲).



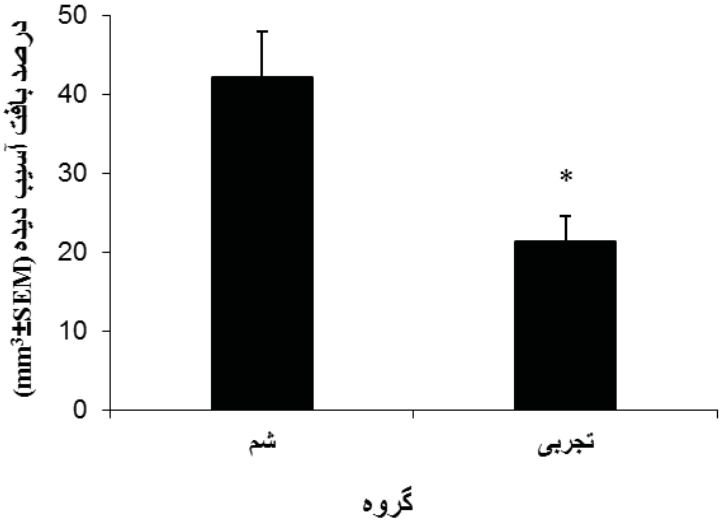
نمودار۲: مقایسه افزایش میانگین درصد چرخش به راست در آزمون Corner turn در گروه‌های مورد مطالعه (n=10) در طی ۱۴ روز. در روز ۱ پس از ایسکمی مغزی و تزریق سلول، میانگین درصد تمایل به راست در گروه کنترل ۵۰درصد را نشان می دهد و این میانگین در گروه های تجربی و شم نزدیک به ۱۰۰ درصد است. در روز ۷ پس از ایسکمی مغزی، میانگین درصد چرخش گروه کنترل همچنان ۵۰ درصد و میانگین مربوط به گروه شم در حد ۱۰۰ درصد می باشد ولیکن میانگین درصد چرخش به راست گروه تجربی از ۱۰۰ درصد کمتر شده به طوری که با گروه شم در سطح احتمال ۰/۰۱ اختلاف معنی دار پیدا کرده‌اند. در روز ۱۴ پس از ایسکمی مغزی حیوانات در گروه تجربی تقریباً ۵۰ درصد به سمت راست چرخیده و اختلاف معنی دار بین میانگین این گروه با گروه کنترل از بین رفته است (P>۰/۰۵). از طرفی بیشترین تفاوت معنی‌دار (P<۰/۰۵) با گروه شم را در این زمان نشان می‌دهد. درصد چرخش به راست درگروه‌ها به صورت Mean ± SEM نشان داده شده است.

www.SID.ir

***P<0.001 vs control
+++P<0.001 vs sham
++P<0.001 vs sham

بررسی درصد بافت آسیب دیده مغز

نتایج بدست آمده از بررسی بافت آسیب دیده مغز در سمت راست در مقایسه با سمت چپ آن در دو گروه تجربی و شم ۳ هفته پس از عمل جراحی منجر به هیپوکسی مغزی، نشان داد که درصد بافت آسیب دیده در گروه تجربی (۳/۲ ± ۲۱/۴) که یک هفته پس از جراحی سلول دریافت کرده بودند در مقایسه با گروه شم (۵/۷۳ ± ۴۲/۲) که به آنها سلول تزریق نشده بود به طور معنی داری کاهش یافته است (نمودار۳) .

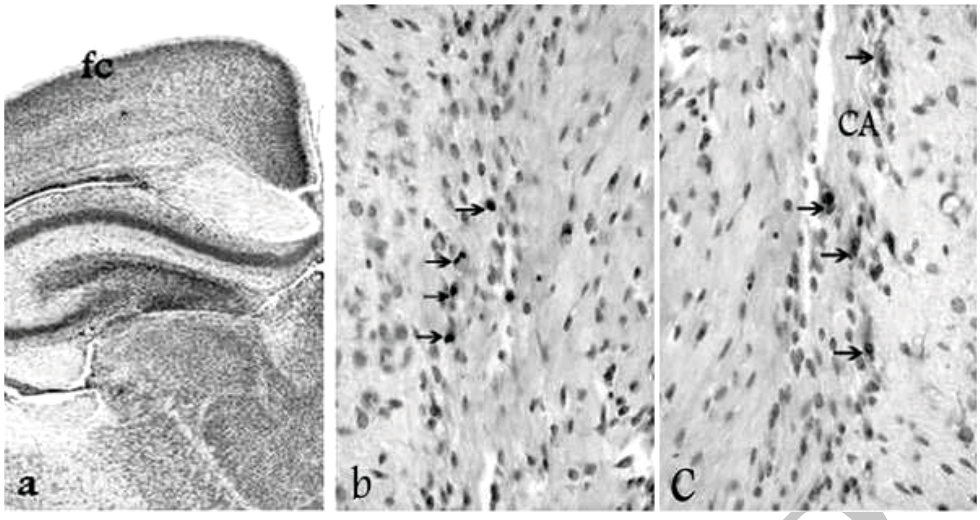


نمودار۳: مقایسه میانگین درصد حجم بافت از دست رفته نیمکره راست به نسبت نیمکره چپ مغز در گروه های تجربی و شم دو هفته پس از ایسکمی مغزی و تزریق سلول در سطح احتمال کمتر از ۵ درصد.

جایگزینی سلول‌های بنیادی نشاندار در ناحیه آسیب دیده

جهت بررسی وجود سلول‌های بنیادی نشاندار تزریق شده به گروه تجربی، مقاطع بدست آمده از مغز حیوانات این گروه مورد ارزیابی ایمنو هیستوشیمی قرار گرفتند و همانطور که در تصویر 1-c مشاهده می‌شود مهاجرت و جایگزینی سلول‌های +BrdU به صورت سلول‌هایی با هسته‌های گرد یا بیضی که کروماتین موجود در آنها رنگ قهوه‌ای DAB را جذب کرده و همچنین دارای هاله‌ای از سیتوپلاسم قهوه‌ای کم رنگ می‌باشند در ناحیه آسیب دیده مغز از رنگ زمینه بنفش ناشی از هماتوکسیلین قابل تفکیک هستند. در حالیکه در در گروه درمان هیپوکسی درمان نشده پدیده کروماتولیز و مرگ سلولی (تصویرb-1) به وضوح در نواحی ایسکیمیک دیده می‌شود.

Archive
www.SID.ir



تصویر۱، شماره a: برش کرونـال مربـوط بـه یـک نیمکـره مغـز رت ۲۱ روزه از گـروه کنتـرل بـا درشتنمایی کم که ناحیه قشر فرونتال (fc) مشخص شده است (رنـگ آمیـزی هماتوکسـیلین، و X40). شماره b: برش مربوط به ناحیه قشـر فرونتـال مغـز رت ۲۱ روزه از گروه تجربی ضـایعه دیـده و بـدون درمان که تعـدادی از سـلول‌هـای پیکنوتیـک و در حـال مـرگ بـا پیکـان‌هـای نشـانه مشـخص شده‌اند.(X100). شماره c: بـرش مربـوط بـه ناحیـه قشـر فرونتـال مغـز رت ۲۱ روزه از گـروه تجربـی درمان شده با سـلول‌هـای بنیـادی نشـاندار کـه در اطـراف یـک مـویرگ (CA) بـه رنـگ قهـوه ای (پیکانهـای نشـانه) دیـده مـی‌شـوند و جـایگزین سلول‌های از دست رفته شده‌اند (X100).

بحث و نتیجه‌گیری

در حال حاضر سلول‌هـای بنیـادی مشـتق از بافـت چربی به عنوان جایگزین مناسبی در درمان سـلولی بسیاری از بیماری ها مورد توجه قرار گرفتـه اسـت. بر اسـاس تجربیـات موجـود، تزریـق وریـدی ایـن سلول‌ها، می‌تواند به بهبود ضایعات عصبی مرتبط با کم خونی مغزی در مدل آزمایشگاهی منجـر شـود. در این مطالعه از سلول‌های استرومایی بافت چربـی انسان استفاده گردید تا اثر بخشی آنها در اختلالات حرکتی ناشی از کم خونی بخش‌های مرتبط با ایـن موضوع در قشر مغز موش صـحرایی مـورد بررسـی قرار گیرد. در این مطالعـه اثـرات حرکتـی و بـافتی تزریق وریدی سلول‌هـای بنیـادی مشـتق از بافـت چربـی انسـان در مـدل آزمایشـگاهی بـا آسـیب هیپوکسی- ایسکمی مورد بررسی قرار گرفت. برای ارزیابی نتایج از ۲ آزمون رفتـاری Limb placing و Corner Tur اسـتفاده شـد. بـرای تسـت اول، فعالیت حرکتی طبیعی برای حیوانات سالم امتیاز ۱۶ را داشت در حالیکه همـانطور کـه در بخـش نتـایج ملاحظه گردید، امتیازهای بدست آمـده از دو گـروه تجربی و شم در روزهای اول و هفتم پس از تزریق سلول با گروه کنترل اختلاف معنی داری داشـتند و لیکن تا روز ۱۴ این اختلاف در مورد گـروه تجربـی که تحت درمان با سلول قرا گرفته بود از بین رفت. بعلاوه در تست دوم نیز که معیار سالم بودن حیوان گردش اتفاقی به سمت راست و چـپ مـی باشـد و بنابر این، در صد چرخش به راست حیوان در گـروه کنترل در حدود ۵۰ درصد بود، با نگـاهی بـه نتـایج حاصل از دو گروه دیگر که در روز ۱ پس از تزریق تمایل به چرخش بـه راسـت حیوانـات نزدیـک بـه ۱۰۰ درصد است اخـتلاف معنـی داری بـین آنهـا مشخص می‌شود که به تدریج در مورد گروه تجربی تا روز ۱۴ این اختلاف از بین می رود و عدد بدست آمده از درصد چرخش‌های این گروه بـه ۵۰ درصـد نزدیک می‌شود. بعلاوه، بررسی‌هـای بـافتی نشـان داد که درصد بافت آسیب دیده نیمکره سمت راست

Archive of SID
www.SID.ir

در حیوانات گروه تجربی به طور معنی‌داری در مقایسه با گروهی که تحت تزریق قرار نگرفته است، کاهش یافته و همچنین نتایج ایمنوهیستوشیمی نشان داد که سلول‌های بنیادی نشاندار به نواحی ایسکمی مهاجرت کرده و در محل تثبیت گردیده‌اند.

مطالعات اخیر بر روی پتانسیل درمانی پیوند سلولی در سکته مغزی ناشی از ایسکمی متمرکز شده اند و از انواع زیادی از سلول‌های بنیادی مشتق از بافت‌های انسانی به صورت آزمایشگاهی بر روی مدل‌های سکته مغزی ایسکمیک استفاده شده که همگی منجربه بهبود رفتار حرکتی در حیوانات شده‌اند (۳). سلول‌های انسانی که تاکنون در این گونه مطالعات بررسی شده‌اند شامل: سلول‌های بنیادی عصبی کشت داده شده از بافت جنینی Neural stem/progenitor cells (NPCs) (۲۰، ۱۹)، رده‌های سلول‌های عصبی نامیرا (۲۲، ۲۱) ، پیش ساز سلول‌های خونساز و اندوتلیال جدا شده از مغز استخوان (۲۴،۲۳)، خون بند ناف (۲۶، ۲۵) و خون محیطی (۲۷) و سلول‌های استرومایی مشتق از بافت چربی (۱۲) می‌باشند. گروه‌های متعددی گزارش کرده‌اند که پیوند داخل وریدی و داخل مغزی سلول‌های پیش ساز خونی جدا شده از بافت چربی توانایی بهبود رفتارهای حرکتی را دارند.

در این مطالعه نتایج حاصل از تست‌های رفتاری نشان داد که تزریق سلول ۲۴ ساعت پس از جراحی منجر به افزایش امتیازهای هر دو آزمون می شود، در حالی که تزریق پس از ۷ روز فقط در امتیازهای بدست آمده از mNSS تغییرات معنی داری ایجاد می‌کند. بعلاوه بررسی ایمنوهیستوشیمی مقاطع بافتی ناحیه ایسکمیک، بیان پروتئین‌های رده‌های سلولی عصبی و گلیال توسط سلول‌های مهاجرت یافته به مغز را نشان داد که این موضوع در یافته‌های دیگران نیز به ثبت رسیده است (۲۸).

در مطالعه مشابهی درسال ۲۰۰۳ Willing و همکاران، ۲۴ ساعت پس از ایجاد مدل آزمایشگاهی سکته مغزی ایسکمیک، سلول‌های بنیادی را به دو صورت تزریق وریدی و تزریق مستقیم بداخل بافت مغزی، وارد بدن حیوانات کرده و نتایج بدست آمده را با بررسی بهبود رفتار حرکتی حیوانات به این صورت بیان کردند که، در بهبود فعالیت خودبخودی حیوان، هر دو نوع پیوند سلول کارامد بوده ولی در مورد تست رفتاری قدم زدن (Stepping test) ، فقط در صورت تزریق وریدی سلول نتایج در گروه تحت درمان در مقایسه با گروه کنترل بهبود حرکتی را نشان می دهد. بنابراین آنها نتیجه گرفتند که تزریق وریدی این سلول ها از تزریق مستقیم آن بداخل بافت آسیب دیده بهتر عمل می‌کند (۲۹).

در ادامه بررسی بهبود حرکتی ناشی از تزریق سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی (۳۰) در مدل آزمایشگاهی سکته مغزی ایسکمیک، محققین بر آن شدند تا از دوز های متعدد این سلول ها به صورت تزریق وریدی استفاده نمایند و نهایتاً علاوه براینکه به نتایج حاصل از مقالات قبل دست یافتند، این نتیجه را گرفتند که بهبود رفتار حرکتی در این حیوانات وابسته به تعداد سلول می‌باشد (۳۱).

یافته‌های حاصل از مطالعه حاضر و مطالعات قبلی، بر این امر دلالت دارند که تزریق وریدی سلول‌های مشتق از چربی می‌توانند منجر به بهبود رفتار حرکتی در مدل آزمایشگاهی شوند و بعلاوه، نتایج بدست آمده از کاهش درصد بافت آسیب دیده در نیمکره دچار هیپوکسی و همچنین قرارگیری سلول‌های نشاندار شده در ناحیه آسیب دیده این پیش فرض را تأیید می‌کند که جهت درمان سکته مغزی ناشی از هیپوکسی، می‌توان از سلول های نابالغ بافت چربی استفاده نمود. البته این موضوع را نیز باید همواره مد نظر قرار داد که هیپوکسی ایسکیمی ایجاد شده طبعاً ملزم به ایجاد ضایعه در ناحیه‌ی هیپو کامپ ، پوتامن و هسته دمدار نبوده و بقیه‌ی قسمت‌های مغز مثل قشر حرکتی را نیز در بر می‌گیرد. بنا بر این تست های رفتاری انجام شده و بهبود و یا عدم بهبودهای حرکتی ممکن است به

Archive of SID

www.SID.ir

بخش‌های دیگر مغز مربوط شود. بنا بر این یـاد آور می‌شود که در ایـن بخـش از مطالعـه آزمـون‌هـای انجام شده بصورت عـام و رنـگ آمیـزی و بررسـی تغییرات سلولی بصورت خاص در ناحیه هسته دمدار و پوتامن صورت گرفته است.

لذا با تکیه بر این حقیقت که سلول‌های تزریـق شده داخل وریدی نتایج امیدوار کننـده ای را بـرای درمان‌های کلینیکی نشان می‌دهد، بنظـر مـی‌رسـد شانس پیوند داخل وریدی در مطالعات بالینی بتواند راهگشای مناسبی برای آن دسته از نـوزادانی باشـد که در زایمانهای سخت دچار هیپوکسی مغزی شده و در معرض ضایعات مغزی غیر قابـل جبـران قـرار دارند. لازم به ذکر است که برای کاربرد بالینی این سلولها، آزمایشات بیشتری مثـل تعیـین دوز سـلول تزریقی و یا ارزیابی فواید عملکردی در مـدت‌هـای طولانی مورد نیاز است.

تشکر و قدردانی

ایـن مطالعـه در قالـب یـک طـرح پژوهشـی بـین دانشگاهی به انجام رسیده و عمده هزینـه هـای آن به وسیله معاونت محترم پژوهشـی دانشـگاه علـوم پزشکی زابل تأمین گردیده است. لذا بدینوسـیله از مساعدت های به عمل آمده در این خصوص تقدیر و تشکر می گـردد. همچنـین از خـدمات تکنیکـی سرکارخانم متجدد در آزمایشـگاه تخصصـی بافـت شناسی دانشـکده پزشـکی مشـهد، بخـش زنـان و زایمـان بیمارسـتان قـائم (عـج) و مسـاعدت هـای پرسنل آزمایشگاه کشت سـلولی دانشـکده پزشـکی مشهد قدردانی می‌شود.

References

1. Schouten JW, Fulp CT, Royo NC, Saatman KE, Watson DJ, Snyder EY. "A review and rationale for the use of cellular transplantation as a therapeutic strategy for traumatic brain injury". Journal of Neurotrauma 2004; 21:1501–38.
2. Bliss T, Guzman R, Daadi M, Steinberg GK. "Cell transplantation therapy for stroke". Stroke 2007; 38 (2):817–26.
3. Zivin JA, Choi DW: Stroke therapy. Sci Am 1991; 265:56–63.
4. Harris DT. "Cord blood stem cells: A review of potential neurological applications". Stem Cell Rev 2008; 4:269-74.
5. Ormerod BK, Palmer TD, Caldwell MA. "Neurodegeneration and cell replacement".Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2008; 363:153–70.
6. Broderick JP, Brott T, Tomsick T, Huster G, Miller R. "The risk of subarachnoid and intracerebral hemorrhages in blacks as compared with whites". N Engl J Med 1992; 326:733–36.
7. Kornblum HI. "Introduction to neural stem cells". Stroke 2007; 38 (2 Suppl):810–16.
8. Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. "Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy". Basic Clin Pharmacol Toxicol 2004; 95:209–14.
9. Safford KM, Rice HE. Stem cell therapy for neurologic disorders: therapeutic potential of adipose-derived stem cells. Curr Drug Targets. 2005; 6(1):57-62.
10. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. J Cell Physiol. 2001; 189(1):54-63.
11. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. Cells Tissues Organs. 2003; 174(3):101-109.
12. Kang SK, Lee DH, Bae YC, Kim HK, Baik SY, Jung JS. Improvement of neurological deficits by

Archive of SID
www.SID.ir

intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats. Exp Neurol. 2003; 183(2):355-66.

13. Lequeux C, Oni G, Mojallal A, Damour O, Brown SA. Adipose derived stem cells: efficiency, toxicity, stability of BrdU labeling and effects on self-renewal and adipose differentiation. Mol Cell Biochem. 2011; 351(1-2):65-75.
14. Chen J, Li Y, Wang L, Lu M, Zhang X, Chopp M. Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. J Neurol Sci. 2001; 189(1-2): 49-57.
15. Hidetoshi T, Ikuko M, Hitomi OA, Kosuke A, Kazuko W, et al. Prostaglandin D2 Protects Neonatal Mouse Brain from Hypoxic Ischemic Injury. The Journal of Neuroscience. 2007; 27(16):4303– 4312.
16. Kim JM, Lee ST, Chu K, Jung KH, Song EC, Kim SJ, et al. Systemic transplantation of human adipose stem cells attenuated cerebral inflammation and degeneration in a hemorrhagic stroke model. Brain Res. 2007; 1183: 43-50.
17. De Ryck M, Van Reempts J, Borgers M, Wauquier A and Janssen PA. Photochemical stroke model: flunarizine prevents sensorimotor deficits after neocortical infarcts in rats. Stroke 1989; 20: 1383-90.
18. Hua Y, Schallert T, Keep R F, Wu J, Hoff J T and Xi G. Behavioral tests after intracerebral hemorrhage in the rat. Stroke 2002; 33: 2478-84.
19. Ishibashi S, Sakaguchi M, Kuroiwa T, Yamasaki M, Kanemura Y, Shizuko I, Shimazaki T, Onodera M, Okano H, Mizusawa H. Human neural stem/progenitor cells, expanded in long-term neurosphere culture, promote functional recovery after focal ischemia in mongolian gerbils. J Neurosci Res 2004; 78:215–23.
20. Kelly S, Bliss TM, Shah AK, Sun GH, Ma M, Foo WC, Masel J, Yenari MA, Weissman IL, Uchida N, Palmer T, Steinberg GK. Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101:11839–44.
21. Saporta S, Borlongan CV, Sanberg PR. Neural transplantation of human neuroteratocarcinoma (hNT) neurons into ischemic rats: a quantitative dose-response analysis of cell survival and behavioral recovery. Neuroscience 1999; 91:519 –25.
22. Bliss TM, Kelly S, Shah AK, Foo WC, Kohli P, Stokes C, Sun GH, Ma M, Masel J, Kleppner SR, Schallert T, Palmer T, Steinberg GK. Transplantation of hNT neurons into the ischemic cortex: cell survival and effect on sensorimotor behavior. J Neurosci Res 2006; 83:1004 –14.
23. Chen J, Zhang ZG, Li Y, Wang L, Xu YX, Gautam SC, Lu M, Zhu Z, Chopp M. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. Circ Res 2003; 92:692–99.
24. Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. Exp Neurol 2002; 174:11–20.
25. Borlongan CV, Hadman M, Sanberg CD, Sanberg PR. Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required for neuroprotection in stroke. Stroke 2004; 35:2385–89.
26. Xiao J, Nan Z, Motooka Y, Low WC. Transplantation of a novel cell line population of umbilical cord blood stem cells ameliorates neurological deficits associated with ischemic brain injury. Stem Cells Dev 2005; 14: 722–33.

Archive of SID
www.SID.ir

27. Shyu WC, Lin SZ, Chiang MF, Su CY, Li H. Intracerebral peripheral blood stem cell (CD34+) implantation induces neuroplasticity by enhancing beta1 integrin-mediated angiogenesis in chronic stroke rats. J Neurosci 2006; 26:3444–53.
28. Vendrame M, Cassady J, Newcomb J, Butler T, Pennypacker KR, Zigova T, Sanberg CD, Sanberg PR, Willing AE. Infusion of human umbilical cord blood cells in a rat model of stroke dose-dependently rescues behavioral deficits and reduces infarct volume .Stroke 2004; 35(10):2390-95.
29. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol Biol Cell. 2002; 13(12):4279-95.
30. Foreman-Trice T. Adult stem cells from adipose tissue could save lives. Medical News Today. 2005; p.125-30
31. Lalikos JF, Li YQ, Roth TP, Doyle JW, Matory WE, Lawrence WT.

Biochemical assessment of cellular damage after adipocyte harvest. J Surg

Res. 1997;70(1):95-100

Archive of SID

www.SID.ir