

درمان بیماری صرع مدل پیلوکارپین در موش صحرایی توسط سلول‌های استرومایی مغز استخوان و بررسی تمایز سلول‌های تزریق شده به سلول‌های عصبی بالغ

نویسندگان: علیرضا عبدانی پور^{۱*}، دکتر تقی طریحی^۲ و دکتر سیدجواد میرنجفی زاده^۳

۱- کارشناس ارشد آناتومی، دانشگاه تربیت مدرس

۲- استاد گروه پاتولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

۳- استاد گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

Email: aliabdani1350@gmail.com

* نویسنده مسئول:

چکیده

هدف: درمان بیماری صرع توسط سلول‌های استرومایی مغز استخوان و بررسی تمایز سلول‌های تزریق شده به سلول‌های عصبی بالغ.

روش بررسی: موش‌های صحرایی به ۴ گروه تقسیم شدند: گروه کنترل (درمان نشده)، دو گروه درمان شده با سلول‌های استرومایی مغز استخوان بعد از ۲۴ و ۳۶ ساعت از شروع اولین حمله صرع، و یک گروه به عنوان شم که تنها فسفات بافر (PBS) دریافت کردند. برای ارزیابی رفتاری موش‌های صحرایی به مدت ۳ هفته در فاز مزمن بیماری به صورت شبانه‌روزی مانیتورینگ شدند و ۶ هفته بعد از شروع اولین حمله کشته شدند و مورد ارزیابی بافتی قرار گرفتند.

نتایج: میانگین تعداد حملات در طی ۳ هفته برای گروه کنترل $1/3 \pm 6/25$ ، گروه شم $8/2 \pm 6/2$ و گروه درمان شده با سلول‌های استرومایی مغز استخوان بعد از ۲۴ و ۳۶ ساعت از اولین حمله به ترتیب $4/2 \pm 2/25$ و $4/47 \pm 2/25$ به دست آمد. در ارزیابی بافتی تعداد سلول‌ها در نواحی مختلف هیپوکامپ برحسب تعداد سلول در میلی‌متر مربع بررسی شد. نتایج به دست آمده نشان داد که در گروه درمان شده با سلول (۲۴ ساعته و ۳۶ ساعته) تعداد سلول‌ها در نواحی CA1 تا CA4 نسبت به گروهی که فقط PBS دریافت کرده بودند به طور معنادار افزایش داشت و به عبارت دیگر، تزریق سلول‌های استرومایی مغز استخوان از آسیب‌های تخریب‌کننده ناشی از ایجاد تشنج در حیوانات جلوگیری کرد. درصد سلول‌های مهاجرت کرده به نواحی ضایعه دیده هیپوکامپ در گروه درمان شده (۲۴ ساعته) $15/81$ درصد و در گروه درمان شده (۳۶ ساعته) $13/2$ درصد به دست آمد. نتایج با استفاده از آنتی‌بادی نوروفیلانمنت ۲۰۰ گویای این مطلب بود که سلول‌های مهاجر به این منطقه بعد از ۶ هفته به نورون بالغ تبدیل شده‌اند.

نتیجه‌گیری: تزریق وریدی سلول‌های استرومایی مغز استخوان در کاهش حملات ناشی از صرع مدل پیلوکارپین مؤثر است.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های استرومایی مغز استخوان، اپیلپسی، پیلوکارپین، تزریق درون وریدی

دوماهنامه علمی - پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال پانزدهم - شماره ۷۵
تیر ۱۳۸۷

وصول: ۸۶/۲/۲۹

ارسال اصلاحات: ۸۶/۵/۲۸

دریافت اصلاحات: ۸۶/۶/۶

پذیرش: ۸۶/۸/۷

مقدمه

بیماری صرع از شایع‌ترین بیماری‌های مغز و اعصاب است که در نتیجه تخلیه الکتریکی مکرر غیرطبیعی و هم‌زمان در گروهی از نورون‌های موجود در یک منطقه ایجاد می‌شود و تظاهر آن در بیمار به شکل حمله یا حمله صرع (Seizure) نمایان می‌شود. شایع‌ترین فرم این بیماری، صرع با منشأ لوب تمپورال است [۱ و ۲].

عمده‌ترین روش‌های درمانی برای کنترل بیماری صرع، استفاده از داروهای ضدصرع، رژیم درمانی، جراحی و اخیراً استفاده از ژن درمانی و تحریک عصب واگ است. اما با توجه به عوارض ناشی از داروها و تهاجمی بودن روش جراحی و نارسا بودن سایر راه‌های درمانی که برای درمان بیماری صرع در نظر گرفته می‌شود همواره محققین درصدد یافتن روشی جدید برای درمان این بیماری هستند. با توجه به نتایج مثبت به دست آمده از تحقیقات، استفاده از سلول‌های بنیادی در بیماری‌های نورولوژیکی کاربرد فراوان پیدا کرده‌است و لذا در این تحقیق برای اولین بار در دنیا با استفاده از سلول‌های بنیادی مغز استخوان، میزان حملات بیماری صرع در مدل‌های آزمایشگاهی در طی مدت ۴۲ روز مورد ارزیابی قرار گرفت و کاهش قابل‌ملاحظه‌ای در تعداد حملات در موش‌های صحرایی مورد آزمایش دیده شد.

سلول‌های استرومایی مغز استخوان (Bone Marrow Stromal Cells: BMSCs) به عنوان سلول‌هایی چسبنده به ظروف پلاستیکی مخصوص کشت در نظر گرفته می‌شوند که قادر به تشکیل کلونی و ایجاد سلول‌هایی با قدرت تکثیر بالا هستند. این سلول‌ها متمایز نشده‌اند و قادر به بازسازی خودشان (Self-Renewal) و انواع زیادی از سلول‌ها و بنابراین ابزاری امیدبخش برای جایگزینی بافت‌ها و سلول‌های از دست رفته در بافت‌هایی هستند که به طور طبیعی قدرت ترمیم ندارند. سلول‌های ایجاد شده در طی تکثیر سلول استرومایی مغز استخوان قادرند به انواع زیادی از

سلول‌ها تبدیل شوند و بنابراین، به عنوان سلول بنیادی (Stem Cell) شناخته می‌شوند [۳].

هنگامی که این سلول‌ها به درون سیستم وریدی تزریق می‌شوند به واسطه سیتوکین‌هایی که از سلول‌های بافت آسیب دیده آزاد می‌شوند به سمت ضایعه حرکت می‌کنند و با توجه به شرایط محیطی بافت میزبان به سلول‌های همان بافت تمایز می‌یابند و با ایجاد فاکتورهای رشد گوناگون باعث جایگزینی سلول‌های از دست رفته و بهبود نقایص ایجاد شده و عملکرد بافتی می‌شوند [۴].

تزریق ۴۰۰ mg/kg پیلوکارپین هیدروکلراید به طریق زیر جلدی در موش‌های صحرایی به طور متوسط بعد از ۳۰ تا ۶۰ دقیقه از زمان تزریق باعث ایجاد حمله صرع می‌شود [۵]. پیلوکارپین (Pilocarpine) برای اولین بار توسط تورسکی (Turski) و همکارانش در سال ۱۹۸۹ ارائه شد. این روش بهترین مدل به منظور جایگزینی سلول‌های از دست رفته با سلول‌های مغز استخوان است، زیرا بیش‌ترین میزان مرگ سلولی را در ناحیه هیپوکامپ ایجاد می‌شود و همچنین در این مدل، صرعی مشابه با صرع در انسان با منشأ لوب تمپورال ایجاد می‌کند [۶]. رفتار حیوانات مورد آزمایش با استفاده از مقیاس ریسین (Racine) ثبت می‌شود. این مقیاس در سال ۱۹۷۲ معرفی شد و در این مقیاس، درجه ۴ و ۵ به عنوان حمله نام‌گذاری شده‌است [۷].

در این تحقیق، موش‌های صحرایی به ۴ گروه تقسیم شدند: کنترل (درمان نشده)، سه گروه درمان شده با تزریق ۲ تا ۳ میلیون سلول استروماتی مغز استخوان نشان‌دار شده با برومودیوکسی یوریدین (BrDu) بعد از ۲۴ و ۳۶ ساعت از شروع اولین حمله صرع و یک گروه به عنوان شم که تنها PBS دریافت کردند. برای ارزیابی رفتاری موش‌های صحرایی به مدت ۳ هفته در فاز مزمن بیماری به صورت شبانه‌روزی مانیتورینگ شدند.

فلاسک خارج شدند. بعد از ۲ تا ۳ روز سلول‌ها بر اثر تکثیر کف فلاسک را پر کردند و در این هنگام، پاساژ اول برای کشت سلول انجام شد که در طی این عمل با استفاده از محلول تریپسین / EDTA سلول‌ها از کف فلاسک جدا شدند. به وسیله پیپتاژ کردن، سلول‌ها از همدیگر جدا شدند و بعد از این مرحله، عمل سانتریفوژ سلول‌ها انجام شد. بعد از عمل سانتریفوژ، محتویات روی تیوپ فالکون تخلیه و مقداری محیط کشت به داخل تیوپ حاوی سلول اضافه شد و مجدداً عمل پیپتاژ انجام شد. محتویات داخل تیوپ فالکن بار دیگر به داخل فلاسک مخصوص کشت ریخته شد و در داخل انکیباتور ۳۷ درجه قرار گرفت. بعد از ۵ تا ۶ پاساژ مکرر سلول‌های کاملاً یکدست و بالغ در کف فلاسک باقی ماندند که آمادگی لازم برای تزریق را داشتند. درصد سلول‌های زنده توسط رنگ آمیزی تریان بلو انجام شد. در طی این عمل، سلول‌های مرده با رنگ آبی مشخص شدند که به همراه سلول‌های زنده شمارش گردیدند و در مجموع، بیش از ۹۵ درصد از سلول‌های کشت داده شده زنده بودند [۹و۸].

ایجاد مدل صرع توسط پیلوکارپین

کار با حیوانات آزمایشگاهی بر طبق رعایت اصول و موازین و اخلاقی تصویب شده در تاریخ ۲۴ نوامبر سال ۱۹۸۶ در انجمن حمایت از حیوانات در اروپا انجام می‌شود. برای ایجاد مدل صرع در ابتدا به میزان ۱mg/kg متیل اسکوپالامین به طریق زیر جلدی (۳۰ دقیقه قبل از تزریق پیلوکارپین) تزریق شد. بعد از ۳۰ دقیقه، پیلوکارپین هیدروکلراید به میزان ۴۰۰ mg/kg به طریق زیر جلدی تزریق شد. ۶۰ دقیقه بعد از شروع اولین حمله صرع به مقدار ۲/۵ mg/kg دیاپام به طریق زیر جلدی تزریق شد. تزریق دیاپام حملات را متوقف نمی‌کند، بلکه باعث کاهش هیجان (Anxiety) و ایجاد آرامش در عضلات (Relaxation) در عضلات

بررسی‌های انجام شده در این تحقیق عبارتند: ارزیابی رفتاری با استفاده از ویدئومانیتورینگ به صورت شبانه‌روزی در طی ۳ هفته در فاز مزمن بیماری، ارزیابی بافتی برای میزان سلول‌های موجود در ضخامت یک میلی‌متر از هیپوکامپ در سکشن‌های ۱۰ میکرومتری در گروه‌های کنترل درمان نشده و درمان شده، و بررسی تبدیل سلول‌های تزریق شده به نورون‌های بالغ.

هدف از این تحقیق، ارزیابی تأثیرات سلول‌های استرومایی تزریق شده در کاهش حملات ناشی از صرع مدل پیلوکارپین است و همچنین بررسی این مطلب که به دنبال تزریق سلول‌های استرومایی مغز استخوان آیا این سلول‌ها قادر خواهند بود به بخش‌های آسیب دیده مهاجرت کنند و تبدیل به نورون‌های بالغ مورد نیاز در منطقه آسیب دیده شوند؟

روش انجام کار

تهیه سلول‌های استرومایی مغز استخوان BMSC

موش‌ها صحرایی بالغ ۱۲ هفته‌ای نژاد اسپراگو دوالی (Sprague Dawley) توسط ماده شیمیایی کلروفورم کشته شدند. سپس استخوان‌های تیبیا و فمور از بدن حیوان جدا شدند. عضلات چسبیده به استخوان جدا شدند و استخوان‌ها در داخل پتری دیش حاوی PBS و پودر پنسیلین قرار گرفتند. پتری دیش داخل ظرف محتوی یخ قرار گرفت و به زیر هود منتقل شد. دو سر استخوان توسط وسایل استریل شده که از قبل در زیر هود قرار داده شده بودند قطع شدند و به وسیله سرنگ ۵ سی‌سی حاوی محیط کشت (MEM + FBS ۱۰ درصد) محتویات داخل کانال استخوان‌ها به داخل فلاسک مخصوص کشت تخلیه شد. فلاسک حاوی سلول در داخل انکیباتور با دمای ۳۷° و رطوبت ۹۵ درصد و ۵ CO₂ درصد قرار گرفت. پس از ۴۸ ساعت، محیط کشت سلول‌ها تعویض شدند و سلول‌هایی که به کف ظرف پلاستیکی نچسبیده بودند با تعویض محیط از

می‌شود و در کل، به زنده ماندن حیوان مورد آزمایش کمک می‌کند [۱۰، ۱۱، ۱۲].

به دلیل این که موش‌های صحرایی مصروع تا ۴۸ ساعت بعد از شروع حملات قادر به غذا خوردن و نوشیدن آب نیستند دو نوبت در روز (صبح و غروب) نرمال سالین ۰/۹ درصد به طریق داخل صفاقی به موش‌های تزریقی تزریق شد و از روز دوم به بعد از شیر خشک به مدت ۳ روز استفاده شد. در روز سوم، موش‌های صحرایی از غذایی که در اختیار آن‌ها قرار داده شده بود استفاده کردند [۱۳].

تزریق درون وریدی سلول‌های استرومایی مغز استخوان
در ابتدا سلول‌ها توسط تریپسین از کف فلاسک محیط کشت جدا شدند. سپس به وسیله پیپتاژ کردن سلول‌ها از همدیگر جدا شدند. آنگاه برای خشی کردن اثر تریپسین، مقداری محیط کشت به سلول‌ها اضافه شد و سلول‌ها به درون تیوپ فالكون منتقل شدند. تیوپ فالكون در دستگاه سانتریفوژ با سرعت ۱۵۰۰ دور در ثانیه به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد و پس از انجام عمل سانتریفوژ، مایعی که بر روی سلول‌ها قرار داشت خارج شد. سلول‌ها ۲ بار با PBS شستشو داده شد و مجدداً عمل پیپتاژ برای جداسازی سلول‌ها از همدیگر انجام شد. سپس سلول‌ها از فیلتر نایلونی (Nylon mesh (Falcon)) عبور داده شدند. سلول‌های عبور داده شده از مش توسط لام نتوبار شمارش شدند و در حدود ۲/۵ میلیون سلول زنده در ۰/۵ سی سی PBS از راه ورید دمی همراه با سرنگ انسولین بعد از بیهوشی کامل به موش صحرایی مورد آزمایش تزریق شد [۱۴].

ارزیابی رفتاری

تست رفتاری و شمارش تعداد حملات در موش‌های صحرایی مصروع به طور شبانه‌روزی در ۲ فاز حاد و مزمن توسط دوربین مدار بسته حساس به نور قرمز و با استفاده از کامپیوتر انجام شد و تعداد حملات در

گروه‌های درمان شده با گروه کنترل مقایسه شدند. به این منظور ۴ گروه در نظر گرفته شد:

۱. گروه کنترل،
۲. گروهی که ۲۴ ساعت بعد از اولین حمله PBS از راه وریدی دریافت کرده بودند (گروه شم دو)،
۳. گروهی که ۲۴ ساعت بعد از اولین حمله، سلول‌های استرومایی مغز استخوان از راه وریدی دریافت کرده بودند،
۴. گروهی که ۳۶ ساعت بعد از اولین حمله، سلول‌های استرومایی مغز استخوان از راه وریدی دریافت کرده بودند.

در فاز حاد بیماری، حملات اولیه حیوان مورد آزمایش ثبت شد و ارزیابی مانتورینگ به منظور بررسی تست رفتاری ۲ هفته بعد از شروع اولین حمله در فاز مزمن Chronic انجام شد. در این ارزیابی، تصاویر مربوط به موش‌های صحرایی که درون قفس‌های شیشه‌ای قرار گرفته بودند به مدت ۳ هفته به صورت شبانه‌روزی توسط دوربین حساس به نور قرمز ضبط شد.

ارزیابی‌های بافتی

بررسی‌های بافتی بعد از ۴۲ روز از زمان شروع اولین حمله در فاز مزمن انجام شد و به این منظور در طی عمل پرفیوژن از طریق بطن چپ قلب، عمل پرفیوژن به منظور فیکس اولیه انجام شد و مغز موش‌ها خارج شد و سپس به مدت یک شبانه روز در فیکساتیو پارافرمالدهید ۴ درصد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت [۱۴]. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از مرحله فیکس اولیه، پردازش بافتی Processing انجام شد. سپس سکن‌های ۱۰ میکرومتری از ناحیه هیپوکامپ تهیه شد و با رنگ‌آمیزی کریزل و یوله برای شمارش سلولی مورد بررسی قرار گرفت. در طی این رنگ‌آمیزی، نورون‌ها با هسته‌های روشن و هستک مرکزی و اجسام نیسل بازوفیلی که به طور یکنواخت در سیتوپلاسم

یافته‌ها

نتایج به دست آمده از کشت سلول

بعد از ۷۲ ساعت از شروع کشت، اکثر سلول‌ها شروع به دیفرانسیه شدن می‌کنند و نمای دوکی و شبیه فیروبلاست به خود می‌گیرند و از پاساژ دوم به بعد، شکل‌گیری کولونی‌ها به وضوح دیده می‌شود. به دلیل این که سلول‌های استرومایی مغز استخوان، سلول‌هایی هستند که به سرعت تکثیر می‌شوند از پاساژ دوم به بعد از نظر مورفولوژی، ظاهری نسبتاً هموزن و یکنواخت پیدا می‌کنند. بعد از ۴ تا ۶ پاساژ مکرر، سلول‌های کاملاً یکدست و مجبور کف فلاسک را پر می‌کنند که این سلول‌ها برای تزریق مناسب خواهند بود. برای مشخص شدن درصد سلول‌های زنده Viability test توسط رنگ‌آمیزی تریپان بلو انجام شد که در مجموع، بیش از ۹۵ درصد از سلول‌های کشت داده شده زنده بودند.

نتایج به دست آمده از مدل صرعی پیلوکارپین

در حدود ۵ دقیقه بعد از تزریق، علائم کولینرژیکی پیلوکارپین، از قبیل افزایش تنفس، ضربان قلب، آبریزش چشم، افزایش ترشح بزاق، اسهال و سایر علائم کولینرژیکی مشاهده شدند.

در حدود ۱۵ تا ۲۰ دقیقه بعد از تزریق پیلوکارپین، علائمی همچون Head nobbing حرکات سر، cratching احساس خارش، Chewing حرکات فک در موش‌های مورد آزمون مشاهده شد. بعد از ۳۰ تا ۶۰ دقیقه بعد از تزریق پیلوکارپین، اولین حمله صرع با مقیاس ۴ و ۵ ریسین در موش‌های صحرائی مورد آزمون شروع شد.

در مقیاس ریسین:

۰. فاقد واکنش (no reaction)
۱. حرکات متناوب در دهان، چشم‌زدن‌های پی‌درپی، لرزش‌های خفیف در صورت (stereotype mouthing, eye blinking, mild facial clonuses)

پراکنده شده‌اند مشاهده شدند. به این منظور ۳ گروه در نظر گرفته شد: گروه نرمال، گروه درمان نشده (گروه کنترل) و گروه درمان شده با سلول‌های استرومایی مغز استخوان (گروهی که بعد از ۲۴ ساعت از اولین حمله، سلول دریافت کرده بودند).

برای ارزیابی تعداد سلول‌ها در واحد سطح mm^2 در هیپوکامپ واقعی (۲۸۰۰ تا ۳۸۰۰ میکرومتر فاصله از برگما بر طبق اطلس پاکسینوس (Paxinus)) از فرمول $N_i = n_i \times t / (t + d - 2b)$ استفاده شد [۱۵] که در آن: n_i میانگین تعداد نوروهای شمارش شده بر حسب شبکه، ضخامت سکشن،

d میانگین قطر سلول‌ها در هر فیلد،

b عدد ثابت که وابسته به وضوح عدسی است (NA 40X $= 0.0/95 = 0.28 \mu m$)

در بررسی بافتی برای شمارش تعداد سلول‌ها در هر گروه ۵۰ برش کروئال در یک میلی‌متر از ناحیه دورسال هیپوکامپ تهیه شد (۱۰ برش به ضخامت ۱۰ میکرومتر از هر موش صحرائی در هر گروه) و از هر برش ۴ ناحیه CA4، CA3، CA2، CA1 شمارش شدند و در نهایت با استفاده از فرمول ذکر شده، تعداد سلول‌ها در هر ناحیه مشخص شدند.

از نظر ساختار شکلی، سلول‌های گروه نرمال، گرد و دارای جدار سلولی واضح، هستک واضح در مرکز و نیسل‌بادی واضح در اطراف هسته هستند، ولی سلول‌های در حال مرگ یا مرده، دیواره نامنظم و حالت چروکیده دارند و هستک واضحی در آن‌ها دیده نمی‌شود.

روش تجزیه و تحلیل آماری

برای انجام بررسی‌های آماری، مقایسه بین موش‌های بین یک گروه و گروه‌های مختلف انجام شد و برای این منظور از تست‌های نان پارامتریک non test Anova parametric- استفاده شد.

نتایج به دست آمده در تست رفتاری

نتایج حاصل از تست‌های رفتاری انجام شده توسط سیستم دوربین مدار بسته با روش ویدئومانیترینگ، تعداد حملات با مقیاس ۴ و ۵ Racine در فاز کرونیک از روز چهاردهم بعد از شروع اولین حمله تا مدت ۳ هفته به صورت شبانه‌روزی بررسی شد و نتایج حاصل در نمودار ۱ بیان شده است. همان‌گونه که در شکل نمایش داده شده تعداد حملات برای گروه کنترل $6/25 \pm 1/3$ ، برای گروه PBS $6/2 \pm 0/8$ ، برای گروه ۲۴ ساعته $2 \pm 0/4$ ، و برای گروه ۳۶ ساعته $2/25 \pm 0/5$ است. مطابق با نتایج به دست آمده، تعداد حملات برای گروه درمان شده به طور محسوس کاهش یافته و بهترین نتیجه درمانی مربوط به گروه ۲۴ ساعته است. بر مبنای آزمون توکی (Tukey's test) تعداد حملات در گروه ۲۴ و ۳۶ ساعته در مقایسه با گروه کنترل و گروه PBS دارای تفاوت معنادار هستند.

نتایج به دست آمده از شمارش سلول‌ها

در بررسی‌های بافتی، تعداد سلول‌ها در نواحی مختلف هیپوکامپ در ۳ گروه ثرمال، کنترل (درمان نشده) و درمان شده با سلول‌های استرومایی مغز استخوان مورد ارزیابی قرار گرفت و کاهش قابل ملاحظه‌ای در تعداد سلول‌های موجود در نواحی مختلف هیپوکامپ مشخص شد که در شکل ۱، ۲ و ۳ قابل مشاهده است. همچنین نتایج به دست آمده از آنالیز آماری در جدول ۱ و نمودار ۲ مشخص شده است. طبق نمودار ۲، بیش‌ترین کاهش سلولی مربوط به گروه کنترل است و همچنین تعداد سلول‌ها در نواحی مختلف در گروه ۲۴ ساعته از گروه ۳۶ ساعته بیش‌تر است.

۲. حرکات متناوب سر، لرزش شدید در عضلات

صورت (head nodding, sever facial clonuses)

۳. پرش‌های عضلانی ناگهانی در اندام جلویی

(myoclonic jerks in forelimb)

۴. لرزش و تشنج در اندام جلویی به همراه برهم

خوردن تعادل (clonic convulsions in the forelimb

with rearing)

۵. عدم تعادل هنگام حمله زمین خوردن‌های مکرر

(generalized clonic convulsion with loss balance)

در طی مراحل انجام آزمون، شدت حملات در

ساعات اولیه بسیار شدید بود و در طی این مدت،

حملات توسط تزریق دیازپام کنترل شدند. بعد از

تزریق دیازپام، موش‌ها وارد حالت کما می‌شدند و

نسبت به تحریکات محیطی هیچ‌گونه واکنشی نشان

نمی‌دادند؛ ولی حملات با شدت کم‌تر تا حدود ۸ تا

۱۲ ساعت ادامه داشت. موش‌هایی که حداقل ۳۵ تا ۴۰

دقیقه تشنج و حمله را نشان دادند به عنوان مدل برای

ادامه تحقیق انتخاب شدند.

در تعدادی از موش‌ها بعد از ۲ تا ۳ بار تزریق،

حمله صرعی ایجاد نشد و بنابراین از جریان تحقیق

خارج شدند. همچنین موش‌هایی که حمله با درجه ۱ و

۲ و ۳ ریسین را نشان دادند از تحقیق خارج شدند. فاز

Acute یا حاد در موش‌های صحرایی مورد آزمون تا ۲۴

ساعت ادامه داشت و در این زمان، حملات توسط

دیازپام کنترل شدند. ۳ تا ۶ روز بعد از اولین حمله،

موش‌های صحرایی وارد دوره کمون (Silence) شدند و

هیچ حمله‌ای را از خود بروز ندادند. زمان شروع اولین

حمله (درجه ۴ و ۵ ریسین) از لحظه تزریق پیلوکارپین

به‌طور میانگین در گروه کنترل $44 \pm 7/6$ دقیقه، در

گروهی که PBS دریافت کرده بود (شم ۲) $42 \pm 7/1$

دقیقه، در گروهی که بعد از ۲۴ ساعت سلول دریافت

کرده بود $40 \pm 8/2$ دقیقه و در گروهی که بعد از ساعت

۳۶ سلول دریافت کرده بود $37 \pm 9/5$ دقیقه به دست

آمد.

جدول ۱: تعداد سلول‌ها بر حسب میلی‌متر مربع در نواحی مختلف هیپوکامپ (گروه ۲۴ ساعته)

CA4	CA3	CA2	CA1	تعداد سلول‌ها در (#/mm ²)	گروه
۶۰/۳۲±۱۸	۱۱۹۲/۵±۴۰	۱۲۵۲/۴±۲۷	۹۳۸/۲±۴۴		نرمال
۱۹۵/۶۳±۱۲	۶۲۸/۸۱±۱۹	۳۷۶/۵۲±۱۳	۲۷۶/۵±۱۱		درمان نشده (کنترل)
۲۶۷/۱۶±۱۱	۹۷۱/۲۳±۲۸	۵۲۸/۳۶±۱۳	۵۱۸/۶۳±۱۴		درمان شده (بعد از ۲۴ ساعت تزریق)
۲۳۸±۸	۹۵۷±۴۱	۴۶۹±۱۳	۴۵۹±۱۴		درمان شده (بعد از ۳۶ ساعت تزریق)

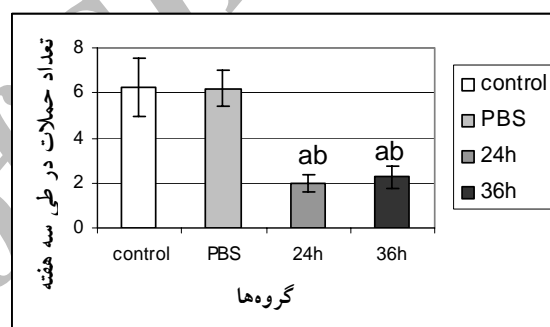
با توجه به تست آماری Wilcoxon Signed Ranks Test (Non-Parametric) تعداد سلول‌ها در نواحی (CA4, CA3, CA2, CA1) بین گروه‌های درمان شده (۲۴ ساعته و ۳۶ ساعته)، درمان نشده و نرمال انجام گردید و اختلاف معنادار در بین همه آن‌ها دیده شد ($p < 0.001$ و $p < 0.01$).



شکل ۱: تصویر هیپوکامپ گروه نرمال با رنگ آمیزی کریزیل ویوله در بزرگ‌نمایی $40\times$. تراکم سلول‌ها در مناطق مختلف هیپوکامپ مشاهده می‌شود.



شکل ۲: تصویر هیپوکامپ گروه درمان نشده با رنگ آمیزی کریزیل ویوله در بزرگ‌نمایی $40\times$. با توجه به شکل، نسبت به گروه نرمال، کاهش قابل ملاحظه‌ای در تراکم سلول‌ها در نواحی CA3, CA2, CA1 دیده می‌شود.

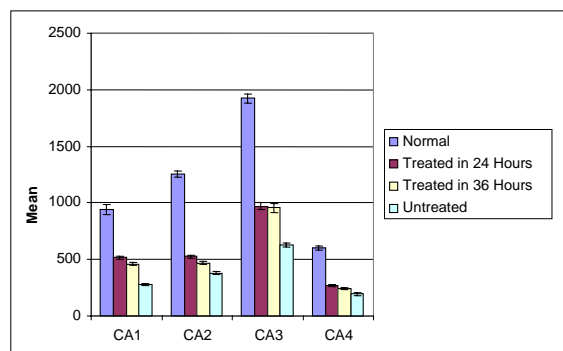


a: significant difference v.s control group ($p < 0.05$)

b: significant difference v.s pbs group ($p < 0.05$)

تفاوت معنادار در گروه‌های کنترل و گروه PBS با سایر گروه‌ها دیده شده

نمودار ۱: نمایش تعداد حاملات در طی ۳ هفته (۲۱ روز) در فاز مزمن بیماری برای ۴ گروه



نمودار ۲: مقایسه تعداد سلول‌ها در نواحی مختلف هیپوکامپ



شکل ۶: تصویر ناحیه CA3 از گروه درمان شده (تزریق سلول ۲۴ ساعت بعد از اولین حمله) تکنیک FITC بزرگ‌نمایی X ۴۰۰

سلول‌های نشاندار شده با BrdU با فلش مشخص شده‌اند و به طور پراکنده در لابه‌لای سلول‌های موجود در ناحیه CA3 دیده می‌شوند.

ارزیابی میزان مهاجرت سلول‌های استرومایی نشاندار تزریق شده

در مقاطع پارافینی تهیه شده مشخص شد که بیش‌ترین میزان مهاجرت سلول‌ها به ناحیه CA1، CA3 است و تعداد اندکی از سلول‌ها به ناحیه CA2 و CA4 مهاجرت کرده‌اند. در محاسبه درصد سلول‌های مهاجرت کرده به ناحیه هیپوکامپ در هر دو گروه درمان‌شده (۳۶ ساعت و ۲۴ ساعت تزریق بعد از شروع اولین حمله) نتیجه برای گروه ۲۴ ساعته ۱۵/۸۱ درصد و برای گروه ۳۶ ساعته ۱۳/۲ درصد به دست آمد. با استفاده از تکنیک ایمونوهیستوشیمی FITC، HRP از مقاطع پارافینی تهیه شده سلول‌ها در نواحی مختلف هیپوکامپ آشکار شدند (شکل ۵، ۴ و ۶).

با توجه به شکل، نسبت به گروه نرمال کاهش قابل ملاحظه‌ای در تراکم سلول‌ها در نواحی CA1، CA2، CA3 دیده می‌شود، ولی در مقایسه با گروه درمان نشده، میزان کاهش سلول‌ها کم‌تر است.

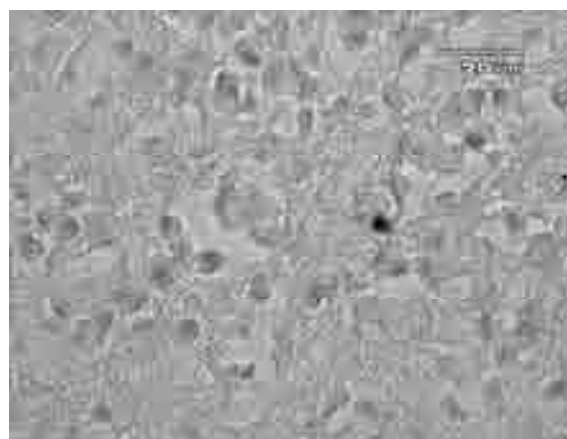
قشر آنتورینال (Entorhinal Cortex) یک مرکز مهم حافظه در مغز است و مسیر اصلی ورودی هیپوکامپ



شکل ۳: تصویر هیپوکامپ گروه درمان شده با رنگ آمیزی کریزیل ویوله در بزرگ‌نمایی X ۴۰۰.



شکل ۴: ناحیه CA1 از گروه درمان شده (تزریق سلول ۲۴ ساعت بعد از اولین حمله) تکنیک DAB بزرگ‌نمایی X ۴۰۰ سلول‌های نشاندار شده با BrdU با فلش مشخص شده‌اند و به طور پراکنده در لابه‌لای سلول‌های موجود در ناحیه CA1 دیده می‌شوند.



شکل ۵: ناحیه CA3 از گروه درمان شده (تزریق سلول ۲۴ ساعت بعد از اولین حمله) تکنیک DAB بزرگ‌نمایی X ۱۰۰۰

آنتی بادی نوروفیلانمنت ۲۰۰ رنگ شده است. بنابراین در نورون‌های بالغ به دلیل تداخل رنگ قرمز مربوط به هسته و سبز مربوط به سیتوپلاسم سلول‌های بالغ نارنجی رنگ می‌شوند.

بحث

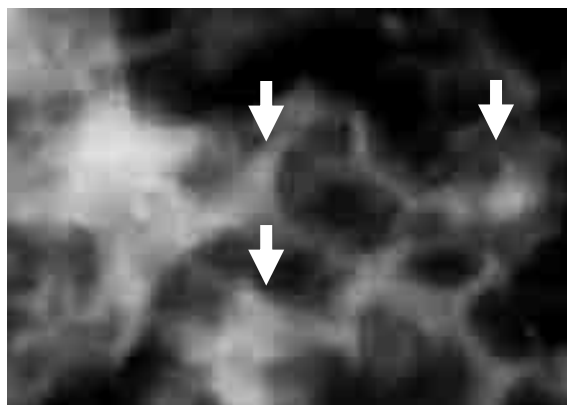
با توجه به شیوع روز افزون بیماری صرع و نارسایی روش‌های درمانی موجود، یافتن راه درمانی مناسب برای بیمارانی که نسبت به درمان‌های دارویی مقاومند و برای بیمارانی که حملات غیرقابل کنترل دارند همواره مورد توجه محققین بوده است. با توجه به نتایج مثبت به دست آمده از کاربرد سلول‌های بنیادی در درمان ضایعات عصبی، استفاده از این سلول‌ها برای درمان بیماری صرع نکته قابل توجهی است که در این تحقیق به آن پرداخته شده است. تنها گزارش ارائه شده درباره استفاده از سلول‌های بنیادی در درمان بیماری صرع مربوط به سال ۲۰۰۲ است که در این تحقیق از سلول‌های بنیادی موجود در ناحیه ساب و نتریکولار جنین ۱۵ هفته‌ای انسان استفاده کردند و سلول‌های به دست آمده را به موش‌های صحرایی صرعی مدل پیلوکارپین به طریق داخل وریدی تزریق کردند. نتایج به دست آمده از این تحقیق، نمایانگر کاهش تعداد حملات در موش‌های صحرایی و تمایز این سلول‌ها به سلول‌های بالغی بود که نوروترانسمیتر گابا ترشح می‌کردند. تحقیقی که ما انجام داده‌ایم دارای مزیت‌هایی نسبت به تحقیق قبلی است که عبارتند از: دستیابی آسان به سلول‌های مغز استخوان، امکان تهیه سلول از بیمار، و پیوند به خود بیمار.

در این تحقیق برای دستیابی به سلول‌های بنیادی مغز استخوان از روشی جدید استفاده شده که در مقایسه با روش متداول استخراج و کشت سلول‌های بنیادی، کلونی‌های بهتری به دست آمد. در روش معمول در ابتدا موش‌های صحرایی نر بالغ ۱۲ هفته‌ای نژاد Sprague Dawley توسط کلروفورم کشته می‌شوند و

است. قشر آنتورینال از راه الیاف خزه‌ای‌ها با ناحیه CA1 و CA3 ارتباط مستقیم برقرار می‌کند. الیاف ورودی از قشر آنتورینال از طریق مسیر پرفورانت (Perforant path) وارد شکنج دندان‌های می‌شوند و با دنددریت‌های سلول‌های گرانولی موجود در این ناحیه، ارتباط سیناپسی برقرار می‌کنند. بنابراین، کاهش تعداد سلول‌ها در نواحی CA1 و CA3 بسیار چشمگیر است و تقاضا برای مهاجرت سلول‌های بنیادی تزریق شده در این نواحی بسیار شدیدتر است.

بررسی تمایز سلول‌های مهاجر به نورون‌های بالغ

با استفاده از برش‌های انجمادی (کرایو برش) و تکنیک‌های ایمونوهیستوشیمیایی، بلوغ سلول‌های مهاجر به مناطق مختلف هیپوکامپ مورد ارزیابی قرار گرفت و مشاهده شد که سلول‌ها پیوند شده به مناطق ضایعه به نورون‌های بالغ تبدیل شده‌اند. در این روش از آنتی بادی نوروفیلانمنت ۲۰۰ استفاده شد، زیرا این آنتی بادی، نوروفیلانمنت‌های موجود در نورون‌های بالغ را آشکار می‌کند (شکل ۷).



شکل ۷ تصویر نورون‌های بالغ با استفاده از آنتی بادی نوروفیلانمنت ۲۰۰ و رودامین بزرگ‌نمایی X ۱۰۰۰

در تصویر هسته‌ها با رنگ قرمز (رودامین) و سیتوپلاسم با رنگ سبز دیده می‌شود. رنگ سبز مربوط به نوروفیلانمنت‌های موجود در سیتوپلاسم است که با

سپس استخوان‌های فمور و تیبیا از بدن حیوان جدا شده و به زیر هود منتقل می‌شوند. در زیر هود دو سر استخوان توسط قیچی استریل بریده می‌شود و توسط سرنگ حاوی محیط کشت محتویات درون کانال استخوانی به درون ظرف مخصوص کشت تخلیه می‌شود. در روش جدید، محتویات مغز استخوان در حالت بیهوشی به داخل سرنگ حاوی مدیوم تخلیه و سپس به زیر هود منتقل شد. در طی نتایج به دست آمده از این دو روش، سلول‌هایی که از روش درناژ مستقیم به دست آمده بود رشد بهتری داشتند و کلونی‌های بهتری تشکیل می‌دادند، زیرا فرصتی برای مرگ سلول‌ها از لحظه مرگ حیوان تا انتقال به محیط کشت وجود نداشت.

در گام بعدی برای ایجاد مدل صرع از میان مدل‌های موجود، مدل صرع پیلوکارپینی انتخاب شد؛ زیرا در این مدل، بیش‌ترین میزان مرگ سلولی (اینتر نوروها) در ناحیه هیپوکامپ ایجاد می‌شود که می‌تواند مدلی مناسب به منظور جایگزینی سلول‌های از دست رفته با سلول‌های استرومایی مغز استخوان باشد، ولی در سایر مدل‌ها، مرگ سلولی وجود ندارد. اینتر نوروها، سلول‌های تولیدکننده گابا هستند و به عنوان نوروهای مهاری در سیستم عصبی مرکزی CNS عمل می‌کنند. بنابراین، مرگ اینتر نوروها در مدل پیلوکارپین، منجر به ایجاد صرع مزمن در حیوانات مورد آزمایش می‌شود و همانند صرع در انسان است [۱۶]. برای ایجاد این مدل از موش‌های صحرایی نر و بالغ استفاده شد تا از تأثیرات هورمون‌های جنسی استروژن و پروژسترون در ایجاد صرع جلوگیری شود. پروژسترون باعث افزایش نوروترانسمیتر گابا در سیستم اعصاب مرکزی و استروژن باعث افزایش نوروترانسمیتر گلوتامات می‌شود. بنابراین در جریان ایجاد تحریکات هنگام تزریق داروی پیلوکارپین تأثیرات منفی خواهند داشت [۷۶].

به دنبال تزریق پیلوکارپین به دلیل خاصیت توکسیک دارو، سد خونی مغزی شکسته می‌شود و دارو

وارد بافت‌های مغزی از جمله هیپوکامپ، تالاموس، کورتکس مغزی و سایر نقاط بافت عصبی می‌شوند. به دلیل این‌که داروی پیلوکارپین مقلد موسکارینی کولینرژیک است هدف اصلی خود را در بافت‌هایی تأمین می‌کند که دارای گیرنده‌های کولینرژیک باشند و مهم‌ترین مکان حضور این گیرنده‌ها در ناحیه هیپوکامپ است. اتصال داروی پیلوکارپین به گیرنده‌های کولینرژیک موجود در بافت هیپوکامپ، باعث مرگ تعداد وسیعی از سلول‌ها در ناحیه CA1، CA3 و هیلوس CA4 هیپوکامپ می‌شود. با مرگ این سلول‌ها، جریانات الکتریکی و مدارهای ورودی و خروجی هیپوکامپ از تنظیم خارج می‌شود و مدل صرع مشابه با صرع در انسان ایجاد می‌گردد. به دنبال تزریق پیلوکارپین هیپوکسی اولیه در بافت مغزی ایجاد می‌شود و فرآورده‌های متابولیکی، میزان مونواکسید نیتروژن (NO)، رادیکال‌های آزاد و متابولیت‌های سمی در سلول‌های مغزی افزایش می‌یابد. در طی آزاد شدن متابولیت‌های سمی، میزان لاکتات و CO₂ در ناحیه بالا می‌رود و pH خون در این منطقه افت می‌کند و همین امر موجب تخریب سلول‌های اندوتلیال موجود در دیواره عروق و جداره‌های عروق و در نهایت وازودیلیشن در ناحیه می‌شود و در نتیجه، تخریب سد خونی مغزی اتفاق می‌افتد. میزان تخریب این سد با سن موش‌های صحرایی مورد آزمایش ارتباط مستقیم دارد، زیرا هر چه سن بیشتر باشد میزان تکامل عروق بیشتر است و انشعابات در عروق بیشتر دیده می‌شود [۵].

حملات صرعی باعث افزایش تحریک سیناپس‌ها و افزایش ترشح نوروترانسمیتر گلوتامات و در نتیجه، تحریک طولانی مدت غشای سلول پس سیناپسی می‌شود که این حالت را تحریکی یا (Exitotoxicity) می‌گویند. تحریک، منجر به مرگ سلول‌ها می‌شود، زیرا در وهله اول باعث جاری شدن یون کلر و سدیم، و در وهله دوم باعث افزایش کلسیم داخل سلولی می‌شود. کلسیم باعث فعال شدن فسفولیپاز A₂ و راه‌اندازی چرخه آراشیدونیک اسید می‌شود و به دنبال آن،

آنتورینال می‌روند و از آنجا به سایر قسمت‌های قشری منتقل می‌شوند [۱۹ و ۱۵]. بنابراین در جریان صرع‌زایی به واسطه پیلوکارپین مرگ در سلول‌های موجود در این نواحی باعث برهم زدن توازن در مدارات و مسیرهای موجود در هیپوکامپ می‌شود. در طی صرع‌زایی هیپوکامپی، سلول‌های ناحیه CA3 به عنوان یک ناحیه ضربان‌ساز برای تخلیه‌های انفجاری در ناحیه CA1 عمل می‌کنند و مدارهای بازگشتی تحریکی از ناحیه CA3 مهم‌ترین عامل برای ایجاد ضربان در این ناحیه محسوب می‌شوند. ظرفیت ذاتی نورون‌ها برای تخلیه به صورت انفجاری توسط اینتر نورون‌های مهارتی کنترل می‌شود و در هنگامی که از مواد تشنج‌زا استفاده می‌گردد این کنترل مهارتی، کفایت‌کننده نیست و توازن بین مهار و تحریک بر هم می‌خورد [۲۱ و ۲۰].

به طور کلی، تزیق داروی پیلوکارپین در موش‌های صحرایی باعث فعال شدن ژن‌ها، فعال شدن فاکتورهای رشد ژن‌ها، تغییر در گیرنده‌های گلوتامات، گلیوزیس و فعال شدن برخی از فاکتورهای بیان ژنی از جمله پروتئین کینازها می‌شود، کلیه این وقایع باعث تغییر در مدارات و جریان الکتریکی موجود در هیپوکامپ در هنگام بروز حمله می‌شود. همچنین در طی یک حمله صرعی، میزان گلوکز در سرم خون بالا می‌رود؛ زیرا در این زمان، سیناپس‌ها که بزرگ‌ترین منبع مصرف گلوکز در مغز هستند از بین می‌روند.

هر حمله صرع باعث مرگ تعدادی از سلول‌های مغزی می‌شود؛ زیرا افزایش نقل و انتقال نوروترانسمیترها در فضاهای سیناپتیک و به دنبال آن، جریان پیدا کردن یون کلسیم به خارج از سلول از راه کانال‌های وابسته به ولتاژ باعث اختلال در هموستازی یون کلسیم می‌شود [۲۲].

در تست رفتاری ۵ گروه آزمون، بهترین نتیجه درمانی در گروه ۲۴ ساعته گرفته شد، زیرا در گروه ۳۶ ساعته چنین به نظر می‌رسد که میزان نشت در سد خونی مغزی بعد از ۳۶ ساعت کم‌تر می‌شود و بنابراین،

رادیکال‌های آزاد از قبیل NO ایجاد می‌شوند که این رادیکال‌های آزاد باعث از هم گسیختن زنجیره DNA می‌گردند. در نهایت فعالیت فسفریلاسیون اکسیداتیو در میتوکندری‌ها مختل می‌شود و مرگ سلولی رخ می‌دهد. در این بیماری ممکن است قسمت‌های دیگری از مغز نیز درگیر باشند که عبارتند از: آمیگدال، سیستم لیمبیک، تالاموس و قشر آنتورینال [۱۰].

قشر آنتورینال (Entorhinal Cortex) یک مرکز مهم حافظه در مغز است و مسیر اصلی ورودی هیپوکامپ است. ورودی‌های اصلی به قشر آنتورینال از ناحیه قشر ارتباطی، قشر بویایی، هسته‌های تالاموسی و آمیگدال است. قشر آنتورینال از راه الیاف خزه‌ای‌ها با ناحیه CA1 و CA3 ارتباط مستقیم برقرار می‌کند. الیاف ورودی از قشر آنتورینال از طریق مسیر پرفورانت (Perforant path) وارد شکنج دندان‌های می‌شوند و با دندریت‌های سلول‌های گرانولی موجود در این ناحیه، ارتباط سیناپسی برقرار می‌کنند. مهم‌ترین میانجی در این مسیر، گلوتامات است. سلول‌های گرانولی موجود در این ناحیه به عنوان یک فیلتر برای ایمپالس‌های ورودی به هیپوکامپ عمل می‌کنند و اکسون آن‌ها الیاف خزه‌ای را تشکیل می‌دهند که وارد ناحیه CA3 می‌شوند و با سلول‌های هرمی در این ناحیه سیناپس می‌کنند. ایمپالس‌ها از طریق الیاف تحریکی راجعه (Excitatory Recurrent Pathway) به سلول‌های هرمی ناحیه CA1 منتقل می‌شوند و در تشدید حملات نقش بسیار عمده‌ای بازی می‌کنند [۱۷ و ۱۸].

سلول‌های هرمی، تحریکی هستند و میزان تحریکات در آن‌ها توسط اینتر نورون‌های موجود در منطقه به نام سلول‌های سبیدی شکل (Basket cells) کنترل می‌شود. این سلول‌ها در فعالیت‌های مهارتی سیستم CNS نقش دارند و مهم‌ترین نوروترانسمیتر مهارتی در آن‌ها ناحیه گابا GABA نام دارد. خروجی هیپوکامپ از سلول‌های پیرامیدی در ناحیه CA1 منشأ می‌گیرد و آلونوس را می‌سازند. ایمپالس‌ها از ناحیه‌ای به نام سایبیکولوم (Subiculum) هیپوکامپ را ترک می‌کنند و به قشر

است که در طی واکنش‌های التهابی آزاد می‌شود. هرچه ضایعه شدیدتر باشد پاسخ التهابی به آن نیز شدیدتر است و بنابراین، تعداد سلول بیش‌تری به این منطقه مهاجرت خواهند کرد [۲۵، ۲۶ و ۲۷].

برای بررسی بهتر جریان درمانی، بهتر است از سایر روش‌های تزریقی سلول‌های بنیادی، مانند تزریق مستقیم به هیپوکامپ و تزریق داخل بطنی (داخل CSF) نیز استفاده شود.

با توجه به نتایج حاصل از تکنیک‌های ایمونوهیستوشیمی و بررسی بلوغ سلول‌های ایمپلنت شده در نواحی آسیب‌دیده می‌توان بیان کرد که سلول‌های BMSC جایگزین سلول‌های آسیب‌دیده می‌شوند و چرخه عصبی را بازسازی می‌کنند و به عبارت دیگر، این سلول‌ها به سلول‌های اصلی بافت آزرده تبدیل می‌شوند و همچنین باعث تحریک سلول‌های آزرده برای شروع جریان ترمیم می‌گردند. سلول‌های BMSCs با تولید و ترشح فاکتورهای رشد متناسب با بافت میزبان، از قبیل فاکتورهای رشد اپیتلیالی، فاکتورهای رشد عصبی BDNF و هپاتوسیت گراس فاکتور باعث آنژیوژنیزس، نوروژنیزس، سیناپتوژنیزس، افزایش شاخه‌های دندریتی و کاهش فرایند آپوپتوز در حاشیه بافت‌های آزرده می‌شوند [۲۷].

نتیجه‌گیری

۱. تزریق درون وریدی سلول‌های استرومایی مغز استخوان، روشی مناسب به منظور پیوند این سلول‌ها است.
۲. تزریق درون وریدی سلول‌های بنیادی مغز استخوان باعث کاهش حملات در موش‌های صحرایی مصروع در مقایسه با گروه کنترل می‌شود.
۳. سلول‌های تزریق شده به گروه‌های مورد آزمون در ناحیه ضایعه دیده مهاجرت می‌کنند.
۴. سلول‌های مهاجرت کرده به منطقه ضایعه، تبدیل به نورون‌های بالغ می‌شوند.

میزان سلول‌هایی که به این منطقه مهاجرت می‌کنند کم‌تر است.

با توجه به نتایج مثبت به دست آمده از کاربرد سلول‌های استرومایی مغز استخوان برای درمان بیماری‌های سیستم عصبی به این نتیجه رسیدند که این سلول‌ها با ایجاد تروفیک فاکتورها در اثر کنش با سلول‌های میزبان و جایگزین شدن به جای سلول‌های آزرده بافتی، نقایص مربوط به هدایت سلول‌های عصبی را بهبود می‌بخشند. هنگامی که این سلول‌ها به درون سیستم وریدی تزریق می‌شوند به سمت بافت‌های ضایعه دیده به حرکت در می‌آیند و ترمیم بافت آزرده را آغاز می‌کنند. بنابراین به دلیل مرگ سلولی در ناحیه هیپوکامپ مخصوصاً در مناطق CA1، CA3 بیش‌ترین درخواست برای مهاجرت همین ناحیه است [۲۳]. سلول‌های استرومایی مغز استخوان توسط سیتوکین‌هایی که از سلول‌های آزرده رها می‌شوند به مکان ضایعه دیده فرا خوانده می‌شوند، زیرا گیرنده‌های این سیتوکین‌ها بر روی سلول‌های استرومایی مغز استخوان وجود دارد [۲۴].

تزریق وریدی نسبت به تزریق شریانی و مستقیم، کم‌تر تهاجمی است و امکان تکرار تزریق و بهبودی در طولانی مدت را برای مرض فراهم می‌کند.

گروه درمان شده با سلول به واسطه تکنیک‌های ایمونوهیستوشیمی مورد ارزیابی قرار گرفت و سلول‌های تزریق شده توسط هر دو تکنیک FITC، HRP مشاهده شد. بیش‌ترین حضور سلول‌های تزریق شده در نواحی CA1، CA3 مشاهده شد. همچنین درصدی از سلول‌های تزریق شده به سمت کلیه، طحال، مغز استخوان، کبد و ریه‌ها نیز مهاجرت می‌کنند که تنها در عروق ریز این ارگان‌ها مستقر می‌شوند و ممکن است تنها تعداد اندکی از این سلول‌ها وارد پارانشیم این ارگان‌ها شوند؛ ولی به دلیل عدم وجود مکانیسم التهابی، قادر به تکثیر و ایجاد کلونی نخواهند بود. مهاجرت انتخابی این سلول‌ها به بافت ضایعه دیده به دلیل پاسخ سلول‌های تزریق شده به سیتوکین‌هایی

11. Dube C, Boyet S, Marescaux C, Nehlig A. Relationship between neuronal loss and interictal glucose metabolism during the chronic phase of the lithium-pilocarpine model of epilepsy in the immature and adult rat. *Experimental Neurology*, 2001; 167:227-241.
12. Voutsinos-Porche B, Koning E, Kaplan H, Ferrandon A, Guenounou M, Nehlig A, Motte J. Temporal patterns of the cerebral inflammatory response in the rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiology Disease*, 2004; 17:385-402.
13. Glien M, Brandt C, Potschka H, Voigt H, Ebert U, Loscher W. Repeated low-dose treatment of rats with pilocarpine: low mortality but high proportion of rats developing epilepsy. *Epilepsy Research*, 2001; 46:111-119.
14. Chopp M, Zhang XH, Li Y, Wang L, Chen J, Lu D, Lu M, Rosenblum M. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuroreport*, 2000; 11:3001-3005.
15. Langmeier M, Fischer J, Mares J. Ultrastructural changes in cortical synapses shortly after termination of a seizure during kindling. *Physiologia Bohemoslovaca*, 1982; 3: 213-216.
16. Krivoshein AV, Hess GP. On the mechanism of alleviation by phenobarbital of the malfunction of an epilepsy-linked GABA (A) receptor. *Biochemistry*, 2006; 45:11632-11641.
17. Steffensen SC, Henriksen SJ. Effects of baclofen and bicuculline on inhibition in the fascia dentata and hippocampus regio superior. *Brain Research*, 1991; 538:46-53.
18. Pelletier MR, Wadia JS, Mills LR, Carlen PL. Seizure-induced cell death produced by repeated tetanic stimulation in vitro: possible role of endoplasmic reticulum calcium stores. *Journal of Neurophysiology*, 1999; 81:3054-3064.
19. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle Regeneration by Bone Marrow-Derived Myogenic Progenitors. *Science*, 1998; 72: 1528-1530.
20. Lopes da Silva FH, Witter MP, Boeijinga PH, Lohman AH. Anatomic organization and physiology of the limbic cortex. *Physiological Reviews*, 1990; 70:453-511.
21. Krivoshein AV, Hess GP. On the mechanism of alleviation by phenobarbital of the malfunction of an epilepsy-linked GABA (A) receptor. *Biochemistry*, 2006; 45:11632-11641.
22. Benardo LS, Pedley TA. Basic mechanisms of epileptic seizures. *Cleveland clinic quarterly*, 1984; 51:195-203.
23. Chen J, Li Y, Wang L, Zhang Z, Lu D, Lu M, Chopp M. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 2001; 32:1005-1011.
24. Chopp M, Li Y. Treatment of Neural Injury with Marrow Stromal Cells. *Lancet Neurology*, 2002; 1: 92-100.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از جناب آقای پور بیراوند و سرکار خانم ابراهیمی (کارشناسان محترم گروه علوم تشریح) و جناب آقای دکتر تقی الطریحی که در انجام این پروژه از هر گونه کمک به اینجانب مضایقه نکردند کمال تشکر و سپاس را دارم.

منابع

1. Browne TR, Holmes GL. Epilepsy. *Neurology England Medical*, 2001; 344:1145-1151.
2. Chawla S, Aneja S, Kashyap R, Mallika V. Etiology and clinical predictors of intractable epilepsy. *Pediatric Neurology*, 2002; 27:887-899
3. Bianco P, Gehron Robey P. Marrow Stromal Stem Cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 2000, 105: 1663-1668.
4. Scholer H, Michael A. Stem Cell Biology and Stem Cell Therapy. In: *Regenerative Medicine*, 2005; 16-18.
5. Leroy C, Roch C, Koning E, Namer JJ, Nehlig A. In the Lithium-Pilocarpine Model of Epilepsy, Brain Lesions are not Linked to Changes in Blood-Brain Barrier Permeability: an Auto radiographic Study in Adult and Developing Rats. *Experimental Neurology*, 2003; 182: 361-372.
6. Mohsin Raza, Shubhro Pal, Azhar Rafiq, Robert J. DeLorenzo. Long-term Alteration of Calcium Homeostatic Mechanisms in the Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy. *Brain Research*, 2001; 56:1-12.
7. Klitgaard H, Matagne A, Vanneste-Goemaere J, Margineanu DG. Pilocarpine induced epileptogenesis in the rat: impact of initial duration of status epilepticus on electrophysiological and neurophysiological alterations. *Epilepsy Research*, 2002; 51:93-107.
8. Black IB, Woodbury D. Adult rat and human bone marrow stromal stem cells differentiate into neurons. *Blood Cells Molecule & Disease*, 2001; 27:632-636.
9. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *The Journal of Neuroscience Research*. 2000; 61:364-370.
10. Rigoulot MA, Koning E, Ferrandon A, Nehlig A. Neuroprotective properties of topiramate in the lithium-pilocarpine model of epilepsy. *Journal of Pharmacological Experimental Therapy*, 2004; 308:787-795. 2004; 308:787-795.

26. Lu D, Mahmood A, Wang L, Li Y, Lu M, Chopp M. Adult bone marrow stromal cells administered intravenously to rats after traumatic brain injury migrate into brain and improve neurological outcome. *Neuroreport*, 2001; 12:559-563.
27. Chopp M, Li Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurology*. 2002; 1:92-100. Review.
25. Valente SG, Naffah-Mazzacoratti MG, Pereira M, Silva I, Santos NF, Baracat EC, Cavalheiro EA, Amado D. Castration in female rats modifies the development of the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Research*, 2002; 49:181-188.

Archive of SID