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

مهرداد نقی خانی[۱] *دکتر تقی طریحی[۲] دکترمنصوره موحدین[۳] دکتر علیرضا دلشاد[۴]

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 استرومایی 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 نیمی 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 BBBانجام شد و پس از پایان هفته پنجم قطعات نخاعی L۶ - L۴ برای مطالعات شمارش سلولی مورد استفاده قرارگرفت.

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 نرونهای حرکتی در نیمه قطع شده نخاع نسبت به نیمه سالم نشانگر کاهشی برابر با ۰٪ در گروه اول، ۶۴/۶٪ در گروه دوم، ۶۴/۶٪ در گروه سوم، ۴۷/۹٪ در گروه چهارم و ۵۳/۵٪ 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($P < ۰/۰۵$ و $P < ۰/۰۱$). 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 دانشگاه 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 ۳۸۹۵
E-mail: ttiraihi@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

دیدگاه استفاده از سلولهای جنینی دردهه 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 به‌اندازه ۲ تا۳ میلیمتر درمحل اتساع کمری نخاع موش صحرایی سلولهای جنینی E۱۴-E۱۵ رابه محل ضایعه تزریق نمودند و روندترمیم گانگلیون ریشه خلفی نخاع راپس از ۲ تا ۹ ماه مورد بررسی قراردادند. آنان ملاحظه کردند که گانگلیون ریشه خلفی نخاع ترمیم شده است(۲). در سال ۱۹۹۸ پیوند سلولهای بنیادی در درمان بیماریها مطرح شدکه 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 T۹ لامینکتومی‌کرد، سپس با رها کردن یک وزنه ۱۰ گرمی روی نخاع، در موش ضایعه نخاعی ایجاد نمود. بعد از آن سلولهای استرومای مغز استخوان[1](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 باهم 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). مغزاستخوان 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 پیوندBMSC به واسطه ژل فوم (به عنوان یک داربست برای سلولهای پیوندی) بر روند بهبود حرکتی متعاقب قطع نیمه نخاع در موش صحرایی نژاد اسپراگو ـ داولی انجام شده است. وجود و یا عدم ژل فوم و نوع و روش استفاده از آن و تکنیکهای بکار گرفته شده حالات مختلفی هستندکه 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 ـ داولی با سن ۲±۱۴ 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.

ـ گروه اول (گروه‌کنترل، 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.

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

ـ گروه سوم (گروه قطع نیمه نخاع + ژل فوم[2] 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.

ـ 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 λ محیط کشت و سرم حاوی پانصد هزار BMSC نیز در عرض ۵ دقیقه به محل ضایعه تزریق گردید.

ـ 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 λ 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[3]BBB انجام شد و نتایج حاصله ثبت گردید. سپس در پایان هفته پنجم همه حیوانات کشته شده قطعات نخاعی L۴-L۶ 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.

1 - Bone marrow stem cells
3- Basoo, Beatti, Bresnahan

۲- شرکت Brun Ren. No: 1069128

Archive of SID

www.SID.ir

روش جراحی قطع نیمه نخاع:

در ابتدا باتزریق 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 دمی 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 T_{13} 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 میکروجراحی 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 قرنیه خشک نشود. بر طبق دستورات حمایت از حیوانات آزمایشگاهی[1] به علت احتمال دفع مایع مغزی نخاعی ۲۵ml- ۱۵ سرم‌رینگرلاکتات 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 ـ 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 α- 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٪ CO_2 قرار داده شد. پس از ۴ پاساژ متوالی سلولهای BMSC توسط ۰/۵ ml Brdu نشان‌دار گردید و بعداز 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 می‌چسبد 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 ۶۰سانتی‌متر قرار داده شد. توسط یک دستگاه دوربین فیلم‌برداری 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 گراتیکول‌دار، 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 قرارگرفت. در هر گروه میانگین تعداد و انحراف معیار مشخص شد و معنی‌داری در حد ۰/۰۵ در نظرگرفته شد.

1- Laboratory Animal Welfare Act

Archive of SID
www.SID.ir

یافته‌ها

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:

ــ 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.

ــ گروه دوم (قطع نیمه نخاع بدون هیچ روش درمانی): میانگین نمره تست این گروه در روز اول پس از جراحی ۲/۱ ± ۲ بود که در پایان هفته اول به ۶/۴±۰/۵۴ و در پایان هفته پنجم به ۱۰/۴±۱/۵ افزایش یافت. اختلاف این گروه با گروه‌های اول، چهارم و پنجم معنادار (p<۰/۰۱) اما با گروه سوم غیر معنادار بود.

ــ گروه سوم (قطع نیمه نخاع +ژل فوم حاوی محیط کشت): میانگین نمره تست این گروه در روز اول پس از جراحی ۲±۲/۲ بود که در پایان هفته اول به ۶/۴±۰۵۴ و در پایان هفته پنجم به ۱±۱۱ افزایش یافت. اختلاف این گروه با گروه‌های اول، چهارم و پنجم معنادار (p <۰/ ۰۱)، اما با گروه دوم غیر معنادار بود.

ــ گروه چهارم (قطع نیمه نخاع + ژل فوم و تزریق BMSC): میانگین نمره تست این گروه در روز اول ۱/۹±۲/۲ بود که در پایان هفته اول به ۰/۷۰ ±۷ و در پایان هفته پنجم به ۰/۸۹ ± ۱۶/۶ افزایش یافت. اختلاف این گروه با گروه‌های اول تا سوم معنادار (p<۰/۰۱)، اما با گروه پنجم غیر معنادار بود.

ــ گروه پنجم (قطع نیمه نخاع + ژل فوم حاوی BMSC): میانگین نمره تست این گروه در روز اول ۱/۹±۲/۱ بودکه در پایان هفته اول به ۵/۸ ± ۹/۶ و در پایان هفته پنجم به ۴/۱±۱۶/۸ افزایش یافت. اختلاف این گروه با گروه‌های اول تاسوم معنادار (P< ۰/۰۱) 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 گروه های چهارم و پنجم (تحت درمان با BMSC) به مراتب بهتر ازگروه های دیگر بوده است.

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

جدول۱ــ میانگین نمره تست حرکتی گروه‌های مورد آزمایش در روزاول 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	۲۱±۰	۲۱±۰۰	۲۱±۰۰	۲۱±۰۰	۲۱±۰۰	۲۱±۰
دوم	۲± ۱ / ۲	٦/٤±۰/٥٤	۷/۲±۰/٤٤	۸/٤±۰/٥٤	۱۰/۲±۱/۷	۱۰/٤±۱/٥
سوم	۲/۲±۲	٦/٤±۰/٥٤	۷/٤±۰/٥٤	۸/٦±۰/٥٤	۱۱±۱	۱۱±۱
چهارم	۲/۲±۱/۹	۷±۰/۷۰	۱۱/٤۰±۰/٥٤	۱۳/۲±۱/۳	۱٦±۱	۱٦/٦±۰/۸۹
پنجم	۲/۱±۱/۹	۹/٦±٥/۸	۱۱/٤±۰/٥٤	۱۲/۸±٤/۷	۱٤±٤/۱	۱٦/۸±٤/۱

نتایج شمارش نورون‌های حرکتی آلفا

پس از تهیه و رنگ آمیزی برش‌های متوالی، بااستفاده از عدسی گراتیکول تعداد نورون‌های حرکتی شاخ قدامی قطعات L_6-L_4 در هر دو نیمه نخاع مورد شمارش قرارگرفت. ابتدا در هرگروه 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: درگروه اول مقایسه میانگین تعداد نورون‌های حرکتی هردو نیمه سالم نخاع اختلاف معناداری را نشان نداد، در حالی که در گروه های دوم تا پنجم مقایسه تعداد نورون‌های حرکتی نیمه قطع نخاع شده با نیمه سالم اختلافی معنادار نشان داد (P<۰/۰۵) که مؤید قطع صحیح نیمی از نخاع می‌باشد.

در مقایسه میانگین تعداد نورون‌های حرکتی نیمه سالم نخاع در گروههای مختلف، اختلاف گروه اول با گروه های دوم و سوم معنادار بود(P <۰/۰۵) و بین بقیه گروه‌ها اختلاف معناداری مشاهده نگردید.

در نیمه قطع شده نخاع بین گروه های دوم با سوم و نیز بین گروه های چهارم با پنجم اختلاف معناداری مشاهده نگردید، در حالی که اختلاف بین بقیه گروه‌ها معنادار بود(P< ۰/۰۵) .

میانگین نورون‌های حرکتی در دو نیمه نخاع و درصدکاهش آن در نیمه قطع شده نسبت به نیمه سالم در جدول ۲ آورده شده است.

A. of SID
www.SID.ir

جدول ۲ ـ میانگین تعداد نورون‌های حرکتی شاخ قدامی در قطعات L_4 - L_5 نخاع موش صحرایی در گروههای مورد آزمایش

گروه آزمایش	میانگین تعداد نورون‌های حرکتی نیمه سالم ± انحراف معیار	میانگین تعداد نورون های حرکتی نیمه قطع شده ± انحراف معیار	درصد کاهش
اول	۱۲۵۱/٦±٥٩/٥	۱۲٥۲/٤±٥٩/٤	–
دوم	۱۰۱٦±۹۳/٤	۳٥٥/۲±۳۷	٪٦٤/٦
سوم	۹۷۱/۲⊥٥٥/۸	۳٤٤⊥٦٦/۲	٪٦٤/٦
چهارم	۱۰۹۱±٦۲/۸	٥٦۹/۲±۱۰٤/۲	٪٤۷/۹
پنجم	۱۰۸۸/٤⊥۱۹/۹	٥۰٦/۸⊥٥۷/٥	٪٥۳/٥

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 پیش سازهای سرتونرژیک 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 می چسبند(۱۶). هافستتر و همکارانش در تحقیق خود ابتدا سلولهای BMSC را توسط GFP[1] 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 می چسبد(۱۷). راموس و همکارانش در سال ۲۰۰۰ سلولهای BMSC مغز استخوان حیوان و انسان را در دو محیط جداگانه کشت داده با استفاده از آنتی‌بادی ضد فیبرونکتین هویت BMSC این سلولها را تایید کردند(۱۸). در این پژوهش نیز با استفاده از آنتی‌بادی 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_9 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 قرارداده 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_8 - T_9 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

1 - Green Fluoresent Protein

Archive of SID
www.SID.ir

حیوانات را در مقایسه با دیگر گروه‌های آزمایش گزارش کردند(۱۵).
در پژوهش حاضر در پایان هفته پنجم بین نمره گروه 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 گروه های چهارم و پنجم با گروه های دوم و سوم نشان دهنده نقش مؤثر ترکیب ژل فوم و BMSC و بر بهبود عملکرد نخاع می‌باشد و عدم وجود اختلاف معنادار بین گروه های چهارم و پنجم با یکدیگر نشان می‌دهد که روشهای تزریق BMSC در محل ژل‌فوم و یا آغشته‌کردن ژل‌فوم به سلولهای BMSC تفاوت چندانی با یکدیگر ندارند. محققین دیگری نیز از ژل‌فوم در محل قطع نخاع، داربستی برای استفاده از مواد نوروتروفیک ایجادکرده و اثرات سودمند آنرا گزارش نمودند(۱۸-۱۶). 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 گروه های چهارم و پنجم که تعداد نورون‌های حرکتی با اختلافی معنادار بیشتراز گروه های 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 قدامی‌نخاع گزارش شده است(۱۹). با مقایسه این دوگزارش با نتایج پژوهش حاضر می‌توان نتیجه گرفت که سلولهای BMSC نیز احتمالاً بر روی نورون‌های حرکتی شاخ قدامی‌نخاع 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 بالا تر به پایین می‌آورند و همچنین مقدار زیادی از راههای صعودی و ارتباطی با مراکز بالا تر 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 بهبود 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 فاکتورهایی از قبیل (NGF)[1]، (GDNF)[2]، (BDNF)[3]، (BFGF)[4]و (VEGF)[5] 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 (Suprnatant) 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 صحرایی قطع نیمه نخاع می‌شود. در این پژوهش می‌توان به افزایش تعداد سلولهای حرکتی شاخ قدامی‌نخاع 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 نظرگرفت.

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

Archive of SID
www.SID.ir

تشکر وقدردانی

بدینوسیله از جناب آقای پوربیرانوند و سرکار خانم ابراهیمی کارشناسان محترم بخش علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی تربیت مدرس که در انجام این پروژه زحمات زیادی متحمل شدند تشکر و قدردانی می‌شود

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 degnereative 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 sromal cells. The lancent Neur 2002; 92-100.
7- Akiyama Y, Radtke C, Kocsis J D. Remyelination of the Rat spinal cord by Transplantion 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. Nearosur 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-tetrahydropropyridine 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 aduit 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 subcaltvieation 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 –Romas 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 rormation. 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 Pharmachothera 2000; 16: 271-283.
24-Chopp M, Li Y, Jiong N. Increase in apoptosis and concomitant reduction of ischemic lession 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.

Archive of SID
www.SID.ir