تأثیر تزریق سلول‌های استرومایی مغز استخوان در بهبود اثرات صرع ناشی از تزریق پیلوکارپین در موش صحرایی

*علیرضا عبدانی پور[1]، دکتر تقی طریحی[2]، دکتر سید جواد میرنجفی زاده[3]

چکیده

هدف: صرع با منشاء لوب گیجگاهی رایج‌ترین نوع صرع در انسان است و مهمترین مشخصه آن بروز حملات تکرار شونده در بیمار است. با توجه به عوارض ناشی از داروهای ضد صرع و خطرات ناشی از جراحی‌ها، در این تحقیق تأثیرات ناشی از تزریق سلول‌های استرومایی مغز استخوان در موش‌های صحرایی صرعی مدل پیلوکارپین مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی: در این تحقیق تجربی موش‌های صحرایی بطور تصادفی به ۵ گروه ۵ تایی تقسیم شدند: گروه کنترل (درمان نشده)، سه گروه درمان شده با تزریق ۲ الی ۳ میلیون سلول‌های استرومایی مغز استخوان نشان دار شده با BrdU بعد از ۱۲، ۲۴ و ۳۶ ساعت از شروع اولین حمله صرع و یک گروه به عنوان گروه شم که تنها نرمال سالین دریافت کردند. برای ارزیابی رفتاری، موش‌های صحرایی به مدت ۳ هفته در مرحله مزمن بیماری به صورت شبانه‌روزی مانیتورینگ شدند و برای این منظور از مقیاس Racine استفاده شد. شش هفته بعد از شروع اولین حمله موش‌های صحرایی کشته شدند و مغز آنها با روش پارافینی و کرایو مورد پردازش بافتی قرار گرفت. داده‌های حاصل با استفاده از آزمونهای آماری ویلکاکسون و توکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: میانگین تعداد حملات در طی ۳ هفته برای گروه کنترل ۱/۳± ۶/۲۵، گروه شم ۰/۸± ۶/۲، گروه درمان شده با سلول‌های استرومایی مغز استخوان بعداز ۲۴ و ۳۶ ساعت از اولین حمله به ترتیب ۰/۴± ۲ و ۰/۴۷± ۲/۲۵ بدست آمد و در گروه ۱۲ ساعته همه موش‌های صحرایی مردند. بین تعداد حملات در گروههای ۲۴ و ۳۶ ساعته با سایر گروهها تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($P< ۰/۰۱$). همچنین تعداد سلولها در بافتهای مورد بررسی در گروههای درمان شده (۲۴ و ۳۶ ساعته) نسبت به سایر گروهها افزایش معناداری نشان داد ($P< ۰/۰۱$).

نتیجه‌گیری: تزریق وریدی سلول‌های استرومایی مغز استخوان در کاهش حملات ناشی از صرع مدل پیلوکارپین مؤثر است. همچنین موجب جلوگیری از آسیب‌های دژنراتیو بافتی و کاهش سلولها ناشی از ایجاد تشنج می‌شود.

کلید واژه‌ها: سلول‌های استرومایی مغز استخوان / صرع / پیلوکارپین / تزریق درون وریدی

۱- کارشناس ارشد آناتومی، دانشگاه تربیت مدرس
۲- پاتولوژیست، استاد دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۳- فیزیولوژیست، استاد دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ دریافت مقاله: ۸۵/۱۲/۲۱
تاریخ پذیرش مقاله: ۸۶/۳/۱۲

* آدرس نویسنده مسئول:
تهران، پل نصر، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پرستاری، گروه علوم تشریح
تلفن: ۸۸۰۱۱۰۰۱ داخلی ۳۸۹۵
* Email: abdanipoor@modares.ac.ir

Archive of
www.SID.ir

مقدمه

بیماری صرع یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مغز و اعصاب است که درنتیجه تخلیه الکتریکی غیر طبیعی مکرر و هم زمان درگروهی از نورون‌های موجود در یک منطقه مغز ایجاد می‌شود و تظاهر آن در بیمار به شکل حمله یاSeizure نمایان می‌شود. شایعترین فرم این بیماری، صرع با منشاء لوب گیجگاهی[1] می‌باشد(۲، ۱).

عمده‌ترین روش‌های درمانی که برای کنترل بیماری صرع بکار می‌رود استفاده از داروهای ضد صرع، رژیم درمانی، جراحی واخیراً استفاده از ژن درمانی و تحریک عصب واگ می‌باشد(۲). اما با توجه به عوارض ناشی از داروها و تهاجمی بودن روش جراحی و نارسا بودن سایر راه‌های درمانی‌که برای درمان بیماری صرع درنظرگرفته می‌شود، همواره محققین در صدد روشی جدیدبرای درمان این بیماری هستند. با توجه به نتایج مثبت بدست آمده از تحقیقات، استفاده از سلول‌های بنیادی در بیماری‌های نورولوژیکی کاربرد فراوان پیداکرده است(۳).

سلولهای استرومایی مغز استخوان[2](BMSCs) به عنوان سلولهایی چسبنده به ظروف پلاستیکی مخصوص کشت درنظرگرفته می‌شوندکه قادر به تشکیل کلونی و ایجاد سلول‌هایی با قدرت تکثیر بالا هستند. این سلول‌ها متمایز نشده هستند و قادر به بازسازی خود (Self-Renewal) و انواع زیادی از سلولها می‌باشند. بنابراین ابزاری امید بخش برای جایگزینی بافتها و سلول‌های از دست رفته در بافتهایی هستندکه بطور طبیعی قدرت ترمیم ندارند. سلول‌های ایجاد شده در طی تکثیر سلول استرومایی مغز استخوان قادرند به انواع زیادی از سلول‌ها تبدیل شوند. بنابر این بعنوان سلول بنیادی یاStem Cell شناخته می‌شوند(۳).

هنگامی‌که این سلول‌ها بدرون سیستم وریدی تزریق می‌شوند، به واسطه سیتوکین‌هایی‌که 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 رشدگوناگون باعث جایگزینی سلول‌های از دست رفته و بهبود نقایص ایجاد شده و عملکرد بافتی می‌شوند(۴).

تزریق mg/kg ۴۰۰ پیلوکارپین هیدروکلراید به طریقه زیر جلدی در موش‌های صحرایی بعد از ۵ دقیقه منجر به ایجاد علائم‌کولینرژیکی از قبیل افزایش بزاق، افزایش فعالیت غدد اشکی و اسهال می‌شود و به طور متوسط بعد از ۳۰ الی ۶۰ دقیقه از زمان تزریق، باعث ایجاد حمله یا Seizure می‌شود(۵). پیلوکارپینPilocarpine یک ترکیب مقلد موسکارینیک کولینرژیک است که برای اولین بار توسط تارسکی و همکارانش در سال ۱۹۸۹ ارائه شد.این روش بهترین مدل به منظور بررسی و مطالعه جایگزینی سلول‌های از دست رفته با سلول‌های مغز استخوان می‌باشد، زیرا بیشترین میزان مرگ سلولی را در ناحیه هیپوکامپ باعث می‌شود و همچنین در این مدل صرعی مشابه با صرع در انسان با منشاء لوب گیجگاهی ایجاد می‌شود(۶). رفتار حیوانات مورد آزمایش با استفاده از مقیاس Racin (۱۹۷۲) ثبت می‌شودکه در این مقیاس درجه ۴ و ۵ بعنوان حمله نام‌گذاری شده است(۷).

از آنجاکه تا بحال‌کمتر مطالعه‌ای در زمینه تأثیر سلولهای بنیادی بر میزان حملات صرع درکشورمان انجام شده، لذا با القاء صرع ناشی از تزریق پیلوکارپین در موشهای صحرایی این موضوع مورد بررسی قرار گرفت، یعنی هدف از این تحقیق ارزیابی کاهش حملات ناشی از صرع بدنبال تزریق سلول‌های استرومایی مغز استخوان می‌باشد و اینکه آیا این سلول‌ها قادر خواهند بود بعد از مهاجرت به بخش‌های آسیب دیده مغز، به نورون‌های بالغی تبدیل شوندکه عمل سلول‌های از دست رفته را جبران‌کنند؟

روش بررسی

در این تحقیق تجربی ۲۵ موش صحرایی واجد شرایط از بین موشهایی‌که القاء صرع در آنها صورت گرفت، بطور تصادفی به ۵ گروه ۵ تایی تقسیم شدند و مراحل‌کار مطابق آنچه در زیر بیان شده انجام شد:

تهیه سلول‌های BMSC: موشهای صحرایی بالغ ۱۲ هفته ای نژاد Sprague Dawley توسط کلروفورم Chloroform کشته شدند، سپس استخوان‌های تیبیا و فمور از بدن حیوان جدا و عضلات چسبیده به استخوان نیز جداشدند و استخوان‌ها در داخل پتری دیش حاویPBS (نرمال سالین) و پودر پنیسیلین قرارگرفتند. پتری دیش داخل ظرف محتوی یخ قرارگرفت و به زیر هود منتقل شد. دوسر استخوان توسط وسایل استریل شده‌که از قبل در زیر هود قرار داده شده بودند قطع شدند و به وسیله سرنگ ۵ سی سی حاوی محیط کشت (۱۰٪FBS+MEMα) محتویات داخل کانال استخوان‌ها بداخل فلاسک مخصوص کشت تخلیه شد. فلاسک حاوی سلول در داخل انکیباتور با دمای ۳۷° و رطوبت ۹۵٪ و Co_2 ۵٪ قرارگرفت. پس از ۴۸ ساعت محیط کشت سلول‌ها تعویض شدند وسلولهایی که به‌کف ظرف پلاستیکی نچسبیده بودند، با تعویض محیط از فلاسک خارج شدند. بعد از ۲ الی ۳ روز سلول‌ها بر اثر تکثیرکف فلاسک را پرکردند و در این هنگام پاساژ اول برای کشت سلول انجام شدکه در طی این عمل با استفاده از محلول ترپسین /EDTA سلول‌ها ازکف فلاسک جداشدند. بوسیله پیپتاژکردن، سلول‌ها از همدیگر جدا شدند و بعد از این مرحله عمل سانتریفوژ سلول‌ها انجام شد. بعد از عمل سانتریفوژ محتویات روی تیوپ فالکون تخلیه شد و مقداری محیط کشت به داخل تیوپ حاوی سلول اضافه شد و مجدداً عمل پیپتاژ انجام شد. محتویات داخل تیوپ

1-Temporal
2-Bone Marrow Stromal Cells

Archive of SID
www.SID.ir

فالکن مجدداً بداخل فلاسک مخصوص کشت ریخته شد و در داخل انکیباتور ۳۷ درجه قرارگرفت. بعد از ۵ الی ۶ پاساژ مکرر سلول‌های کاملاً یکدست و بالغ در کف فلاسک باقی ماندند که آمادگی لازم برای تزریق را داشتند. برای مشخص شدن درصد سلول‌های زنده Viability test توسط رنگ‌آمیزی تریپان بلو انجام شد. در طی این عمل سلولهای مرده با رنگ آبی مشخص شدند که به همراه سلولهای زنده شمارش گردیدند(۹، ۸).

ایجاد مدل صرع توسط پیلوکارپین: کار با حیوانات آزمایشگاهی برطبق رعایت اصول و موازین اخلاقی تصویب شده درتاریخ ۲۴ نوامبر سال ۱۹۸۶ در انجمن حمایت از حیوانات در اروپا انجام شد. برای ایجاد مدل صرع در ابتدا به میزان ۱mg/kg متیل اسکوپالامین به روش زیر جلدی (۳۰ دقیقه قبل از تزریق پیلوکارپین) تزریق شد. بعد از ۳۰ دقیقه پیلوکارپین هیدروکلراید به میزان ۴۰۰mg/kg بطریق زیر جلدی تزریق شد. ۶۰ دقیقه بعد از شروع اولین حمله صرع به مقدار ۲/۵ mg/kg دیازپام زیرجلدی تزریق شد. تزریق دیازپام حملات را متوقف نمی‌کند، بلکه باعث کاهش Anxiety و ایجاد Relaxation در عضلات می‌شود و در کل به زنده‌ماندن حیوان مورد آزمایش کمک می‌کند(۱۲-۱۰).

بدلیل اینکه 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٪ به روش اینتراپریتونئال به آنها تزریق شد واز روز دوم به بعد از شیر خشک به مدت ۳ روز استفاده شد و در روز سوم موش صحرایی‌ها از غذایی که در اختیار آنها قرار داده شده بود استفاده کردند(۱۳).

تزریق درون وریدی سلول‌های استرومایی مغز استخوان: درابتدا سلول‌ها توسط تریپسین ازکف فلاسک محیط کشت جدا شدند. سپس بوسیله پیپتاژ کردن سلول‌ها از همدیگر جدا و سپس برای خنثی کردن اثر تریپسین مقداری محیط کشت به سلول‌ها اضافه شد و سلول‌ها بدرون تیوپ فالکون منتقل شدند. تیوپ فالکون در دستگاه سانتریفوژ با سرعت ۱۵۰۰ دور در ثانیه بمدت 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 مش نایلونی (Nylon mesh (Falcon عبور داده شدند. سلول‌های عبور داده شده از مش توسط لام نئوبار 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 شبانه روزی 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. برای این منظور ۵ گروه در نظر گرفته شد که هر گروه شامل ۵ عدد موش صحرایی بود:

ـ گروه کنترل

ـ گروهی که ۲۴ ساعت بعد از اولین حمله، نرمال سالین از راه وریدی دریافت کرده بودند (بعنوان گروه شم).

ـ گروهی که ۱۲ ساعت بعد از اولین حمله، سلول‌های استرومایی مغز استخوان از راه وریدی دریافت کرده بودند.

ـ گروهی که ۲۴ ساعت بعد از اولین حمله، سلول‌های استرومایی مغز استخوان از راه وریدی دریافت کرده بودند.

ـ 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 مانیتورینگ 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 شیشه ای قرار گرفته بودند به مدت ۳ هفته بصورت شبانه روزی توسط دوربین حساس به نور قرمز ثبت شد.

ارزیابی‌های بافتی: بررسی‌های بافتی بعد از ۴۲ روز از زمان شروع اولین حمله در فاز مزمن انجام شد و برای این منظور عمل پرفیوژن از طریق بطن چپ قلب به منظور فیکس اولیه انجام شد ومغز موش‌ها خارج شد. سپس در فیکساتیو پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرارگرفت(۱۴). بعد ازگذشت ۲۴ ساعت از مرحله فیکس اولیه پردازش بافتی Processing انجام شد. سپس سکشن‌های ۱۰ میکرومتری از ناحیه هیپوکامپ تهیه و با رنگ آمیزی کریزیل ویوله برای شمارش سلولی مورد بررسی قرارگرفت. در طی این رنگ آمیزی نورون‌ها با هسته‌های روشن و هستک مرکزی و اجسام نیسل بازوفیلی که بطور یکنواخت در سیتوپلاسم پراکنده شده‌اند مشاهده شدند. به منظور بررسی بافتی اثر سلولهای بنیادی 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 (میلی متر مربع) در هیپوکامپ واقعی (۲۸۰۰ الی ۳۸۰۰ میکرومتر فاصله از برگما بر طبق اطلس Paxinus) از فرمول $N_l = n_i \times t/(t+d-2b)$ استفاده شد(۱۵).

n_i ـ میانگین تعداد نورون‌های شمارش شده بر حسب شبکه

t ـ ضخامت سکشن

d ـ میانگین قطر سلول‌ها در هر فیلد

b ـ عدد ثابت که وابسته به وضوح عدسی است 40X (NA 0/95) =0/28µm

Archive of SID
www.SID.ir

داده‌های حاصل از مراحل مختلف تحقیق با استفاده از آزمونهای آماری توکی و ویلکاکسون مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

نتایج بدست آمده از کشت سلول: بعد از ۷۲ ساعت از شروع کشت، اکثریت سلول‌ها شروع به افتراق و تمایز می‌کنند و نمای دوکی و شبیه فیبرو بلاست بخود می‌گیرند و از پاساژ دوم به بعد شکل‌گیری کولونی‌ها به وضوح دیده می‌شود. در مجموع بیش از ۹۵ درصد از سلول‌های کشت داده شده زنده بودند.

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

در حدود ۱۵ الی ۲۰ دقیقه بعد از تزریق پیلوکارپین علائمی همچون حرکات سر (Head nobbing)، احساس خارش (Scratching) و حرکات فک (Chewing) در موش‌های مورد آزمون مشاهده شد. بعد از ۳۰ الی ۶۰ دقیقه از تزریق پیلوکارپین اولین حمله Seizure با مقیاس ۴ و ۵ Racin در موش‌های صحرایی مورد آزمون شروع شد. 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 الی ۱۲ ساعت ادامه داشت. موش‌هایی که حداقل ۳۵ الی ۴۰ دقیقه تشنج و حمله را نشان دادند بعنوان مدل برای ادامه تحقیق انتخاب شدند.

در تعدادی از موش‌ها بعد از ۲ الی ۳ بار تزریق حمله صرعی ایجاد نشد، بنابر این از روند تحقیق خارج شدند. همچنین موش‌هایی که حمله با درجه ۱ و ۲ و ۳ Racin را نشان دادند از روند 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 شد. ۳ الی ۶ روز بعد از اولین حمله، موش‌های صحرایی وارد دوره کمون یا Silence شدند و هیچ حمله‌ای از خود بروز ندادند.

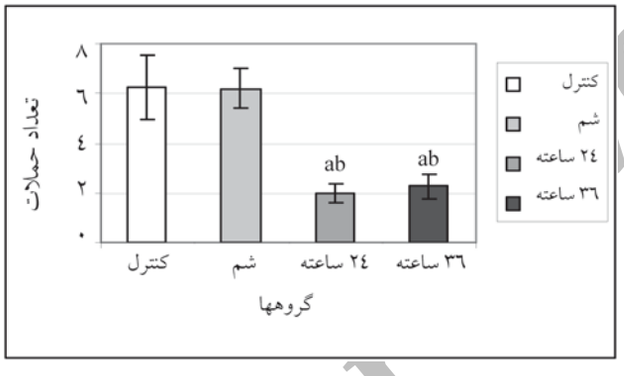
زمان شروع اولین حمله (درجه ۴ و ۵ Racine) از لحظه تزریق پیلوکارپین به طور میانگین در گروه کنترل ۷/۶± ۴۴ دقیقه، در گروهی که Pbs دریافت کرده بودند ۷/۱± ۴۲ دقیقه، در گروهی که بعد از ۱۲ ساعت سلول دریافت کردند ۱۲/۵±۴۶ دقیقه، در گروهی که بعد از ۲۴ ساعت سلول دریافت کرده بودند۸/۲±۴۰ دقیقه و در گروهی که بعد از ۳۶ ساعت سلول دریافت کرده بودند۹/۵± ۳۷ دقیقه بدست آمد.

در مجموع گروه‌های مورد آزمون، میزان تلفات در هنگام ایجاد مدل و در طی ۲۴ ساعت اولیه بعد از ایجاد مدل، ۴۶ عدد ثبت شد که ۱۹ مورد آن در هنگام ایجاد مدل و ۲۷ مورد آن در طی ۲۴ ساعت اولیه بعد از ایجاد مدل مشاهده شد.

در مجموع گروه‌های مورد آزمون تعداد ۱۱ عدد موش صحرایی نسبت به داروی پیلوکارپین مقاومت نشان دادند و حمله صرع در آنها دیده نشد.

نتایج بدست آمده در تست رفتاری: نتایج حاصل از تست‌های رفتاری انجام شده توسط سیستم دوربین مدار بسته با روش ویدئومانیتورینگ و تعداد حملات با مقیاس ۴ و ۵ Racine در فاز مزمن (از روز چهاردهم بعد از شروع اولین حمله تا مدت ۳ هفته به صورت شبانه روزی) در نمودار شماره ۱ نمایش داده شده است. همانگونه که دیده می‌شود، تعداد حملات در طی ۳ هفته برای گروه کنترل ۱/۳± ۶/۲۵، برای گروه Pbs ۰/۸±۶/۲، برای گروه ۲۴ ساعته ۰/۴±۲ و برای گروه ۳۶ ساعته ۰/۵±۲/۲۵ می‌باشد.

نمودار ۱ـ نمایش تعداد حملات در طی ۳ هفته (۲۱ روز) در فاز مزمن بیماری



a: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل (P<۰/۰۵)

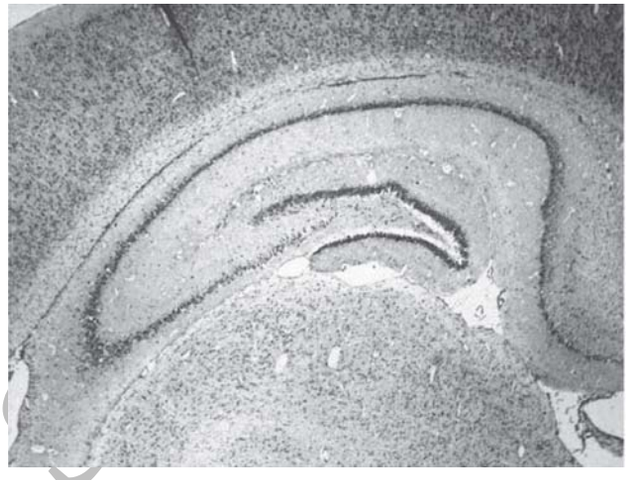
b: اختلاف معنی‌دار با گروه شم (P<۰/۰۵)

مطابق با نتایج بدست آمده تعداد حملات برای گروه درمان شده به طور محسوس کاهش یافته است و بهترین نتیجه درمانی مربوط به گروه ۲۴ ساعته می‌باشد. بر مبنای آزمون توکی تعداد حملات در گروه ۲۴ و ۳۶ ساعته در مقایسه با گروه کنترل و گروه Pbs دارای تفاوت معنی دار می‌باشند.

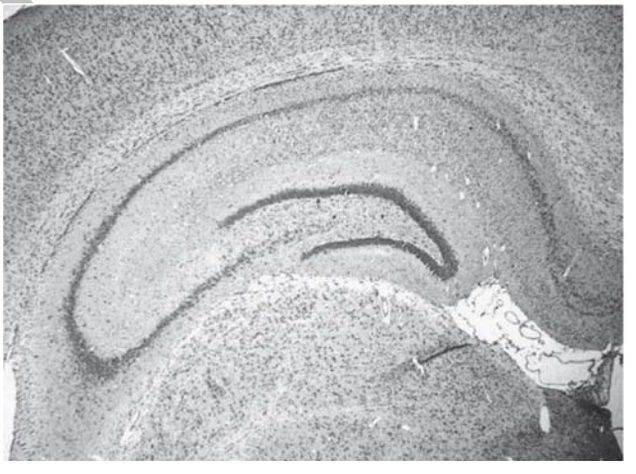
نتایج بدست آمده از شمارش سلول‌ها: در بررسی‌های بافتی تعداد سلول‌ها در نواحی مختلف هیپوکامپ در ۳ گروه نرمال، کنترل (درمان نشده) و درمان شده با سلول‌های استرومایی مغز استخوان مورد ارزیابی قرار گرفت و کاهش قابل ملاحظه‌ای در تعداد سلول‌های موجود در نواحی مختلف هیپوکامپ مشخص شد که در تصاویر شماره ۳-۱ قابل مشاهده است. همچنین نتایج بدست آمده از آنالیز آماری در جدول شماره ۱ و نمودار شماره ۲ مشخص شده است.

Archive of SID
www.SID.ir

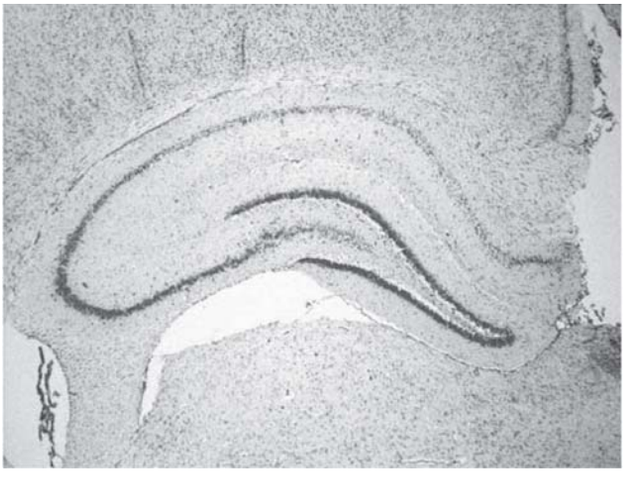
شکل ۱ ـ تصویر هیپوکامپ گروه نرمال با رنگ آمیزی کریزیل ویوله در بزرگنمایی ۴۰x، تراکم سلول‌ها در مناطق مختلف هیپوکامپ مشاهده می‌شود.



شکل ۲ ـ تصویر هیپوکامپ گروه درمان نشده با رنگ آمیزی کریزیل ویوله در بزرگنمایی ۴۰x



شکل ۳: تصویر هیپوکامپ گروه درمان شده با رنگ آمیزی کریزیل ویوله در بزرگنمایی ۴۰x



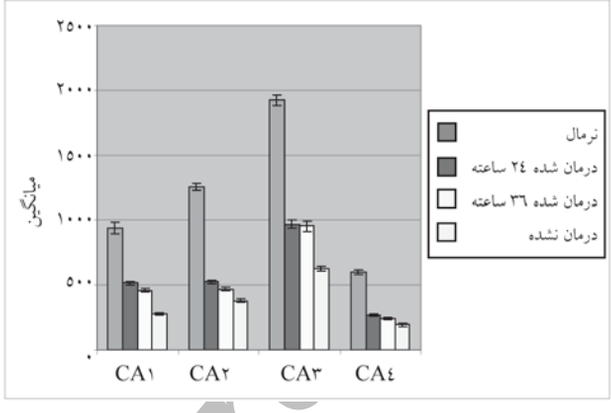
با توجه به شکل نسبت به گروه نرمال کاهش قابل ملاحظه ای در تراکم سلول‌ها در نواحی CA_1، CA_2، CA_3 دیده می‌شود ولی در مقایسه با گروه درمان نشده میزان کاهش سلول‌ها کمتر است.

جدول ۱- تعداد سلول‌ها بر حسب میلیمتر مربع در نواحی مختلف هیپوکامپ

گروه	CA_1	CA_2	CA_3	CA_4
نرمال	۹۳۸/۲±۴۴	۱۲۵۲/۴±۲۷	۱۱۹۲/۵ ±۴۰	۶۰۰/۳۲±۱۸
درمان نشده (کنترل)	۲۷۶/۵±۱۱	۳۷۶/۵۲ ±۱۳	۶۲۸/۸۱ ± ۱۹	۱۹۵/۶۳±۱۲
درمان شده (بعد از ۲۴ ساعت تزریق)	۵۱۸/۶۳ ±۱۴	۵۲۸/۳۶ ±۱۳	۹۷۱/۲۳ ±۲۸	۲۶۷/۱۶ ±۱۱
درمان شده (بعد از ۳۶ ساعت تزریق)	۴۵۹ ±۱۴	۴۶۹ ±۱۳	۹۵۷ ±۴۱	۲۳۸ ±۸

با توجه به آزمون آماری غیر پارامتری ویلکاکسون از نظر تعداد سلول‌ها در نواحی (CA_1، CA_2، CA_3، CA_4) بین گروه‌های درمان شده (۲۴ ساعته و ۳۶ ساعته)، درمان نشده و نرمال اختلاف معنی‌داری در بین همه آنها دیده شد ($P<0/01$ تا $P<0/001$).

نمودار ۲ ـ مقایسه تعداد سلول‌ها در نواحی مختلف هیپوکامپ



طبق نمودار بیشترین کاهش سلولی مربوط به گروه کنترل می‌باشد و همچنین تعداد سلول‌ها در نواحی مختلف در گروه ۲۴ ساعته از گروه ۳۶ ساعته بیشتر می‌باشد.

بحث

با توجه به شیوع روز افزون صرع در جوامع مختلف، شیوه‌های درمانی که برای این بیماری اعمال می‌شود نارسا بوده و قانع‌کننده نیست. بنابر این یافتن راه درمانی مناسب برای بیمارانی که نسبت به درمان‌های دارویی مقاوم شده‌اند و بیمارانی که حملات غیر قابل کنترل دارند، همواره مورد توجه محققین بوده‌اند. در این تحقیق با استفاده از تجارب سایر محققین داخلی و خارجی، برای اولین بار 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 قابل ملاحظه ای در تعداد

Archive of SID
www.SID.ir

حملات در موش‌های صحرایی مورد آزمایش دیده شد.

در اولین گام تحقیق، سلولهای استرومایی مغز استخوان با توجه به روش ارائه شده توسط وودبری در سال ۲۰۰۰ کشت داده شد(۹، ۸).

در طی انجام مراحل کشت سلول‌های استرومایی مغز استخوان این نتیجه بدست آمد که با افزایش میزان سرم بز Fetal Bovine Serum تا حد ۲۰ درصد تکثیر بهتری از سلول‌های استرومایی مغز استخوان بدست خواهد آمد. درگام بعدی مدل صرع پیلوکارپین با توجه به روشی که توسط تارسکی و همکاران در سال ۱۹۸۹ ارائه شده است انجام شد، زیرا در این مدل بیشترین میزان مرگ سلولی در ناحیه هیپوکامپ ایجاد می‌شود که می‌تواند مدلی مناسب به منظور جایگزینی سلول‌های از دست رفته با سلول‌های استرومایی مغز استخوان باشد و صرعی مشابه با صرع در انسان با منشاء لوب تمپورال ایجاد می‌شود(۶).

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 می‌شود و استروژن باعث افزایش نوروترانسمیتر گلوتامات می‌شود، بنابر این در روند ایجاد تحریکات هنگام تزریق داروی پیلوکارپین تأثیرات منفی خواهند داشت.

در این تحقیق از روش تزریق زیرجلدی پیلوکارپین استفاده شد. تزریق داخل صفاقی نیز روشی است که می‌توان برای ایجاد مدل صرع استفاده کرد ولی بدلیل اینکه در تزریق زیر جلدی سرعت جذب داروی تزریق‌شده کمتر است، میزان مرگ و میر در هنگام شروع حملات صرع کمتر خواهد شد. همچنین در مدل زیر جلدی زمان شروع اولین حمله نسبت به مدل داخل صفاقی کمی با تأخیر می‌باشد(۷). در روند ایجاد بیماری صرع توجه به میزان تزریق متیل اسکوپالامین بسیار ضروری است، زیرا میزان دوز زیاد این دارو باعث مسدود کردن گیرنده‌های کولینرژیکی خواهد شد و حتی با ۳ بار تزریق پیلوکارپین بیماری صرع ایجاد نخواهد شد. بدنبال تزریق پیلوکارپین بدلیل خاصیت توکسیک داروی پیلوکارپین سد خونی مغزی شکسته می‌شود واین دارو وارد بافت مغزی و مکان‌هایی که رسپتورهای کولینرژیکی وجود دارد می‌شود و باعث مرگ وسیعی از سلول‌ها در ناحیه CA_3، CA_1 و هیلوس CA_4 می‌شود و با مرگ سلول‌های این مناطق جریان الکتریکی و مدارهای ورودی و خروجی هیپوکامپ از تنظیم خارج می‌شود ومدل صرعی مشابه با صرع در انسان ایجاد می‌شود(۵).

اینتر نورون‌ها نوروترانسمیتری بنام گابا (گاما آمینوبوتیریک اسید) تراوش می‌کنندکه این میانجی منجر به ورود یون کلر به داخل غشاء سلول پس سیناپسی می‌شود و در کل باعث هیپرپلاریزاسیون غشاء پس سیناپسی و منفی‌تر شدن آن می‌شود. بنابراین اختلال در تراوش این میانجی و یا تخریب گیرنده‌های مربوط به این میانجی باعث ایجاد حملات صرعی می‌شود(۱۷).

حملات صرعی باعث افزایش تحریک سیناپس‌ها و افزایش ترشح نوروترانسمیترگلوتامات می‌شود و باعث تحریک طولانی‌مدت غشاء سلول پس‌سیناپسی می‌شود که این حالت را 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 داخل‌سلولی می‌شود. کلسیم باعث فعال شدن فسفولیپاز A_2 و راه‌اندازی چرخه آراشیدونیک اسید می‌شود و بدنبال آن رادیکال‌های آزاد از قبیل NO ایجاد می‌شود که این رادیکال‌های آزاد باعث از هم گسیختن زنجیره DNA می‌شود و در نهایت فعالیت فسفریلاسیون اکسیداتیو در میتوکندری‌ها مختل می‌شود و مرگ سلولی رخ می‌دهد(۱۸). در این بیماری ممکن است قسمت‌های دیگری از مغز نیز درگیر باشند که عبارتند از آمیگدال، سیستم لیمبیک، تالاموس و انتورینال‌کورتکس (۱۰). انتورینال‌کورتکس (Entorhinal Cortex) یک مرکز مهم حافظه در مغز است و مسیر اصلی ورودی هیپوکامپ است. ورودی‌های اصلی به انتورینال کورتکس از ناحیه قشر ارتباطی، قشر بویایی، هسته‌های تالاموسی و آمیگدال می‌باشد.

انتورینال کورتکس از راه موسی فایبرها با ناحیه CA_1 و CA_3 ارتباط مستقیم برقرار می‌کنند. بطورکلی الیاف ورودی از انتورینال‌کورتکس از طریق مسیر پرفورانت (Perforant path) وارد شکنج دندانه‌ای[1] می‌شوند و با دندریت‌های گرانول‌سل‌های موجود در این ناحیه سیناپس می‌کنند. مهمترین نوروترانسمیتر در این مسیر گلوتامات است. گرانول سل‌های موجود در این ناحیه بعنوان یک فیلتر برای ایمپالس‌های ورودی به هیپوکامپ عمل می‌کنند. اکسون گرانول سل‌ها الیاف خزه‌ای را تشکیل می‌دهند و وارد CA_3 می‌شوند و با سلولهای هرمی[2] در این ناحیه سیناپس می‌کنند و ایمپالس‌ها از طریق الیاف راجعه[3] به پیرامید سل‌های ناحیه CA_1 منتقل می‌شوند(۱۹).

پیرامید سل‌ها سلول‌های تحریکی هستند ولی در این ناحیه اینتر نورون‌هایی بنام Basket cells وجود داردکه در فعالیت‌های مهاری در سیستم CNS نقش دارند. مهمترین نوروترانسمیتر مهاری در ناحیه CA_1 نوروترانسمیتر گابا است. خروجی هیپوکامپ از سلول‌های پیرامیدی درناحیه CA_1 منشا می‌گیرد وآلوئوس را می‌سازند. ایمپالس‌ها از ناحیه

1 - Dentate Gyrus
2 - Pyramid Cells
3 - Excitatory Recurrent Pathway

Archive of SID
www.SID.ir

Subiculum هیپوکامپ را ترک می‌کنند و به انتورینال کورتکس می‌روند و از آنجا به سایر قسمت‌های کورتکس منتقل می‌شوند(۲۱، ۲۰).
بنابر این در روند صرع زایی بواسطه پیلوکارپین مرگ در سلول‌های موجود در این نواحی باعث برهم زدن توازن در مدارات و مسیرهای موجود در هیپوکامپ می‌شود. ظرفیت ذاتی نورون‌ها برای تخلیه بصورت انفجاری توسط اینتر نورون‌های مهاری کنترل می‌شود و در هنگامی‌که از مواد تشنج زا استفاده می‌شود این کنترل مهاری کفایت کننده نیست و توازن بین مهار و تحریک بر هم می‌خورد(۲۲).
بعد از ایجاد مدل صرع توسط پیلوکارپین، سلول‌های استرومایی مغز استخوان از راه ورید دمی به آرامی و در طی ۴ الی ۵ دقیقه تزریق شد، زیرا تزریق سریع این سلول‌ها بدلیل ایست تنفسی باعث مرگ موش‌ها می‌شود. درابتدا در حدود ۲ الی ۳ میلیون سلول بهمراه ۰/۴ میلی لیتر مدیوم محیط کشت به موش‌های صحرایی تزریق شد، ولی بدلیل سمی بودن این ترکیب، موش‌ها می‌مردند. در دفعات بعدی به جای مدیوم از نرمال سالین استفاده شد و موش‌ها زنده ماندند. در طی این تحقیق مشخص شد که افزایش حجم نرمال سالین تزریق شده به همراه سلول به موش‌ها نیز باعث بر هم زدن توازن و تعادل یونی موش‌ها و مرگ آنها می‌شود. هنگامی‌که این سلول‌ها بدرون سیستم وریدی تزریق می‌شوند، سریعاً به سمت بافتهای ضایعه‌دیده به حرکت در می‌آیند و ترمیم بافت آزرده را آغاز می‌کنند(۲۳). سلول‌های استرومایی مغز استخوان توسط سیتوکین‌هایی که از سلول‌های آزرده رها می‌شوند، به مکان ضایعه دیده فراخوانده می‌شوند، زیراگیرنده‌های 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 فراهم می‌کند.
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، بنابر این میزان سلول‌هایی که به این منطقه مهاجرت می‌کنند کمتر است. بدنبال تزریق پیلوکارپین یک هیپوکسی اولیه در بافت مغزی ایجاد می‌شود و بدنبال فرآورده‌های متابولیکی، میزان NO، رادیکال‌های آزاد و متابولیت‌های سمی در سلول‌های مغزی زیاد می‌شود. بدنبال آزاد شدن متابولیت‌های سمی میزان لاکتات و CO_2 در ناحیه بالا می‌رود و PH خون در این منطقه افت می‌کند و همین امر موجب اتساع در عروق شده و در نهایت سد خونی مغزی شکسته می‌شود. اینتر نورون‌ها سلول‌های تولید کننده گابا هستند و بعنوان نورون‌های مهاری در سیستم CNS[1] عمل می‌کنند. بنابر این مرگ اینتر نورون‌ها در مدل پیلوکارپین منجر به ایجاد صرع مزمن در حیوانات مورد آزمایش می‌شود. دراین مدل کاهش تراکم و ضخامت قشر هیپوکامپ، گشادی بطن‌ها و کاهش اندازه پیرامید سل‌ها دیده شده است. در زمانی که حمله صرع ایجاد می‌شود، میزان پتاسیم وگلوتامات در فضای خارج سلولی و در فضای سیناپتیک بافت مغزی افزایش می‌یابد و از طرفی میزان سدیم درون سلولی بالا می‌رود و این عدم تعادل یونی در محیط داخل و خارج سلولی باعث نکروز در سلول‌های مغزی و ایجاد ادم در ناحیه هیپوکامپ می‌شود(۵).
اما در توضیح بررسی‌های بافتی لازم به ذکر است برای شمارش سلول‌ها وجود هستک معیاری اشتباه است، زیرا بسیاری از سلول‌ها (در حدود ۴۰ ٪) دارای چندین هستک هستند. بنابر این تمام سلول‌های موجود در یک فیلد شمارش شدند. در برش‌های بافتی تهیه شده کاهش ضخامت در قشر هیپوکامپ، گشادی بطن‌ها و کاهش تعداد نورون‌ها بوضوح دیده شد. بیشترین حضور سلول‌های تزریق شده در نواحی CA_4، CA_3، CA_1 مشاهده شدند. هرچه ضایعه شدیدتر باشد، پاسخ التهابی به آن نیز شدیدتر است. بنابراین تعداد سلول بیشتری به این منطقه مهاجرت خواهند کرد(۲۶).
سلول‌های BMSCs با تولید و ترشح فاکتورهای رشد متناسب با بافت میزبان، از قبیل فاکتورهای رشد اپیتلیالی، فاکتور رشد سلول کبدی HGF[2] و فاکتورهای رشد عصبی مثل BDNF[3] و NGF[4] باعث آنژیوژنزیس، نوروژنزیس، سیناپتوژنزیس، افزایش شاخه‌های دندریتی و کاهش فرایند آپوپتوز در حاشیه بافت‌های آزرده می‌شوند(۲۷).

نتیجه‌گیری

براساس نتایج حاصل از این مطالعه و با توجه به اینکه تهیه و کشت سلول‌های استرومایی مغز استخوان روشی آسان و قابل دسترس است، از این روش می‌توان برای تهیه سلول‌هایی که قدرت تقسیم و تمایز بالایی دارند استفاده کرد. همچنین تزریق درون وریدی سلول‌های استرومایی مغز استخوان بهترین روش به منظور پیوند این سلول‌ها بوده، تزریق درون وریدی این سلول‌ها باعث کاهش حملات در موش‌های صحرایی مصروع در مقایسه با گروه کنترل می‌شود و سلول‌های تزریق شده در ناحیه ضایعه دیده آشکار شده و اکثراً تبدیل به نورون‌های بالغ می‌شوند.

تشکر و قدر دانی

بدینوسیله از جناب آقای پور بیراوند و سرکار خانم ابراهیمی کارشناسان محترم گروه علوم تشریح و سرکار خانم بهارموقر دانشجوی دوره دکترای تخصصی دانشگاه تربیت مدرس که در انجام این پروژه از هرگونه کمکی دریغ ننمودند، سپاسگزاری می‌شود.

1-Central Nervous System
2-Hepatocyte Growth Factor
3-Brain Derived Neurotrophic Factor
4-Neural Growth Factor

Archive of SID
www.SID.ir

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- Seshi B, Kumar S, Sellers D. Human Bone Marrow Stromal Cell: Co expression of Markers Specific for Multiple Mesenchymal Cell Lineages. Blood Cells Molecule and Disease 2000; 26: 234-246

4- Bianco P, Gehron Robey P. Marrow Stromal Stem Cells. The Journal of Clinical Investigation 2000; 105: 1663-1668

5- Leroy C, Roch C, Koning E, Namer IJ, 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- Shubhro Pal MR, Rafiq A, DeLorenzo R.J. 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 neurophisiological 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 Experiment Therapy 2004; 308:787-795.

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- 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

17- 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

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- 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

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

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

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- Bianco P, Gehron Robey P. Marrow Stromal Stem Cells. The Journal of Clinical Investigation 2000; 105: 1663-1668

Archive of SID

www.SID.ir