Archive of SID

فصلنامه علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
شماره پیاپی ۱۱، جلد ۴، شماره ۴، پاییز ۸۹، صفحه ۳۳ تا صفحه ۳۹

بررسی اثر تزریق سلول‌های بنیادی مغز استخوان به بطن طرفی مغز پس از ایجاد ضایعه طناب نخاعی در رت

مریم طهرانی پور

۱- استادیار، فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد. maryam_tehranipour@mshdiau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۹/٤/۲۰ تاریخ پذیرش: ۸۹/۹/۳

چکیده

شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد حوادث دژنراسیونی ایجادشده پس از ضایعه نخاعی می‌تواند دلیل خوبی برای مشکلات وآسیب‌های سیستم عصبی محیطی ومرکزی باشد.در این تحقیق اثرات تزریق سلول‌های بنیادی مغز استخوان بر روند دژنراسیون آلفا موتونورون‌های شاخ قدامی نخاع پس از ایجاد ضایعه نخاعی بررسی می‌شود.به این منظور ۲٤ راس رت نر نژاد ویستار به سه گروه (کنترل، شم، ضایعه دیده وآزمون) تقسیم می‌شوند.در گروه شم(ضایعه دیده) وآزمون به روش لامیناکتومی با اسکارپل شماره ۱۱ یک برش عرضی در نیمه راست نخاع مهره‌های T9، T8، به منظور ایجاد ضایعه نخاعی ایجاد شد. پس از هفت روز از ایجاد ضایعه در گروه آزمون سلول‌های بنیادی به کمک متد استرئوتاکسیک در بطن جانبی مغز تزریق شد.بعد از گذشت چهار هفته حیوانات بیهوش شده واز نخاع قطعات سینه‌ای نمونه‌برداری شد. پس از پاساژ بافتی، نمونه‌ها بلوکه گیری شده، برش‌های سریال تهیه وتوسط رنگ آبی تولیدین رنگ آمیزی شدند. با کمک متدهای استریولوژی دانسیته نورونی نورون‌های شاخ قدامی نخاع در گروه‌های مختلف محاسبه و مقایسه شدند. آنالیزهای آماری نشان داد در گروه آزمون که توسط سلول‌های بنیادی درمان شده بودند میزان تخریب نورونی بسیار کاهش یافته بود (P≤۰/۰۰۱).دانسیته نورونی در این گروه بسیار نزدیک به گروه کنترل بود. بنابراین این گونه نتیجه گیری می‌شود که تزریق سلول می‌تواند میزان تخریب نورون‌های آلفای نخاع را پس از ایجاد ضایعات نخاعی کاهش دهد.

کلید واژه: تخریب نورونی، سلول بنیادی، دانسیته نورونی.

مقدمه

کشف قدرت و توانایی سلول‌های بنیادی در ترمیم سلول‌های عصبی و پدیده رژنراسیون یک حادثه شگرف در علوم اعصاب بود(۱۵). شواهد اندکی از مدل‌های حیوانی وجود دارد که در آن‌ها سلول‌های بنیادی قادر به بهبود عملکردهای سیستم عصبی پس از ضایعه در طناب نخاعی می‌باشد اما نحوه عمل تاکنون نامشخص بوده است(۶). ترمیم خودبه‌خودی بافت‌های عصبی ضایعه دیده در سیستم عصبی مرکزی پستانداران بالغ بسیار محدود بوده است(۷) ولی این محدودیت با کشف سلول‌های بنیادی اولیه در پستانداران بالغ کمتر گردید(۸).تعدادی از استراتژی‌های درمانی، بر فعال سازی سلول‌های بنیادی اولیه موجود در بدن جاندار استوار است تا به کمک آن‌ها ضایعات سیستم عصبی که توسط سکته یا ضایعات طناب نخاعی ایجاد می‌شوند را ترمیم سازند(۱۳). سلول‌های بنیادی اولیه هم در مغز و هم در طناب نخاعی پستانداران شناخته شده‌اند (۹). آن‌ها دارای قدرت تکثیر هم برای تبدیل به سلول عصبی و یا سلول نوروگلیا می‌باشند. به همین دلیل پیشنهاد گردیده که این سلول‌ها برای ترمیم طناب عصبی با تولید سلول‌های جدید، یک محیط مناسب جهت ترمیم آکسون مفید می‌باشند(۱۲). در حال

www.SID.ir

Archive of SID

حاضر برای درمان ضایعات سیستم عصبی مرکزی به صورت وسیعی از پیوند سلول‌های بنیادی عصبی استفاده می‌شود(۱۱). در محیط In vitro سلول‌های بنیادی مغز استخوان به رده‌های مختلف سلول عصبی تمایز می‌یابند. اما این مسئله دلیل اصلی اثرات درمانی حاصل از پیوند این سلول‌ها به بافت‌های آسیب دیده نیست. مکانیسم‌های احتمالی که تحت اثر آن‌ها پیوند این سلول‌ها باعث بهبود ضایعات عصبی می‌شوند عبارتند از اثرات نورپروتکتیوی، ایجاد محیط مناسب برای پدیده‌های ترمیم، بیان یا سنتز فاکتورهای رشد و سایتوکاین‌ها، فاکتورهای عروقی و دوباره سازی میلین. این مکانیسم‌ها به تنهایی عمل نکرده و احتمالاً چندین مکانیسم هم زمان باعث بهبود یا کاهش اثرات ضایعه ایجاد شده می‌شوند. سلول‌های تزریق شده از طریق مایع مغزی نخاعی انتقال یافته و سپس به محل ضایعه مهاجرت کرده و درآن‌ها مستقر می‌شوند(۳). این مسئله نشان می‌دهد که تزریق سلول‌های بنیادی به مایع مغزی نخاعی یک راه موثر برای انتقال سلول‌های بنیادی به محل ضایعات طناب نخاعی است(۵). هدف از این تحقیق بررسی اثر تزریق سلول‌های بنیادی مغز استخوان به بطن طرفی مغز پس از ایجاد ضایعه طناب نخاعی در رت می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از ۲۴رت نر سه ماهه نژاد ویستار با وزن تقریبی ۳۰۰-۳۵۰ گرم که از بخش حیوانات مؤسسه سرم سازی رازی خریداری و در شرایط یکسان و استاندارد (۱۲ ساعت نور و ۱۲ تاریکی با رطوبت مناسب و دما ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد، دسترسی به آب و غذا کافی) در حیوان خانه دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد نگهداری شدند،استفاده گردید.رت‌ها به صورت تصادفی به سه گروه (۱-گروه کنترل: در این گروه برای ایجاد استرس جراحی درطرف راست ستون مهره‌ها مانند گروه‌های تجربی برشی ایجاد شد اما ضایعه ای در نخاع ایجاد نشد. ۲-گروه شم: در این گروه پس از بیهوشی کامل در نیمه راست نخاع به طور عرضی برشی جهت ضایعه نخاعی ایجاد شدو در آزمایش استرئو تاکسیک فقط حامل سلولیPBS تزریق شد.۳-گروه آزمون: در این گروه هفت روز پس از ایجاد ضایعه نخاعی سلول‌های بنیادی با تکنیک استرئو تاکسیک به داخل بطن جانبی مغز تزریق شد.) تقسیم شدند.

آماده سازی نوروسفر

برای استحصال و کشت سلول‌های مغز استخوان، از رت‌های نر نژاد ویستار دو ماهه، با میانگین وزنی حدود ۲۵۰ گرم استفاده شد. ابتدا حیوان با کلروفرم کشته شده و استخوان درشت نی آن از محل مفصل با استخوان‌های کف پا جدا گردید. با استفاده از استخوان شکن دو انتهای استخوان شکسته و روی شعله اندکی حرارت داده شد. سپس با یک سرنگ ۱۰ درجه سانتی‌گراد محیط کشت برداشته، سر سوزن را در لومن استخوان فرو برده و با فشار مغز استخوان را به درون فلاسک تخلیه شد. محیط کشتی که برای کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان استفاده شده است، محیط کشت DMEM (Sigma,۷۷۷۷)، حاوی ۱۵ درصد سرم جنینی گاو (FBS,Gibco) و ۰/۰۱ درصد آنتی بیوتیک (پنی سیلین استرپتومایسین، Gibco) است. پس از استحصال مغز استخوان و با استفاده از لام شمارش گر سلول‌های خونی (هموسایتومتر) سلول‌های هسته دار شمارش شدند تا تعداد اولیه آن‌ها در محیط کشت ثبت گردید. بدین ترتیب پس از کشت می توان سرعت رشد، تعداد دابلینگ سلولی و تکثیر سلول‌ها را مشخص نمود.فلاسک به انکوباتور (LAB-LINE-B۵۲۸-۰۱۱-۰۰) ۳۷ سانتی درجه گراد با ۵٪ CO_2 منتقل می شود. بعد از ۳ تا ۵ روز نوروسفرها ظاهر می‌شوند و پس از ۲ تا ۳ پاساژ برای تزریق آماده‌اند(۶).

ایجاد آسیب نخاعی

ابتدا حیوانات با مخلوطی از رامپون وکتامین به نسبت وزن بدن بیهوش شده سپس پوست و عضله پشت در ناحیه T۸ تاT۹ شکافته شده (لامیناکتومی) و با استفاده

www.SID.ir

Archive of SID

از اسکارپل بسیار ظریف برشی دریک طرف نخاع به صورت عرضی ایجاد شد.پس از بخیه زدن محل جراحت حیوانات تحت مراقبت قرار گرفت (۸).

جراحی استریوتاکسیک

از مجموع ۲۴ رت که در قالب سه گروه آزمون، کنترل و شم (sham) دسته بندی شد (n=۸)، رت‌های گروه آزمون و شم موارد جراحی قرار گرفتند. ابتدا حیوانات با مخلوطی از دو داروی کتامین هیدروکلراید (۶۰ میلی بر کیلوگرم) و زایلازین (۶ میلی بر کیلوگرم) بیهوش و در فریم استریوتاکس قرار داده شد. هدف از انجام جراحی استریوتاکسیک، دست یابی به بطن‌های جانبی مغز بود. در این مختصات بطن‌های جانبی با اطلس پاکسینوس و واتسون عبارتند از: ۰/۸میلی‌لیتر :AP، ۱/۶ میلی‌لیتر :ML، ۴ میلی‌لیتر :DV. بدین ترتیب، نقطه ی مورد نظر مشخص و علامت گذاری شد. ناحیه مورد نظر سوراخ و درگروه شم ۷ میکرولیترحامل سلولیPBS و در گروه آزمون ۲×۱۰^{۵} سلول به همراه ۷ میکرولیترحامل سلولیPBS به درون بطن‌های جانبی مغزتزریق گردید(۳). زمان نمونه برداری یک ماه پس از ایجاد ضایعه نخاعی بود.از قطعات نخاعی مربوطه نمونه برداری انجام شد. برای تثبیت بهتر از متد پرفیوژن استفاده شد(۴). پس ازتثبیت آن توسط فرمالین ۱۰٪ نمکی، نمونه‌ها وارد مراحل پاساژ بافتی شدند که پس از آب گیری با اتانل و مرحله شفاف کردن با بوتانل و تهیه بلوک‌های پارافینی از آن‌ها از برش‌های سریالی ۷میکرونی با میکروتوم (MiCROM و Germany) تهیه و وارد مراحل رنگ آمیزی شد. بدین صورت که ابتدا پارافین زدایی توسط زایلن وسپس آب‌دهی توسط سری‌های نزولی الکلی انجام شد. بعد از انتقال لام‌ها به محلول رنگ آبی تولوئیدین (pH=۴/۶۵) به مدت ۱۰ دقیقه و شستشو در محلول تامپون (حاوی ۱سی سی اسید استیک نرمال به همراه ۱سی سی استات سدیم نرمال که به حجم ۱۰۰ سی سی رسید) لام‌های حاوی نمونه‌های بافتی در محلول مولیبدات آمونیوم ۴٪ به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند. رنگ آمیزی ماتریکس توسط اریتروزین ۱٪ به مدت ۱دقیقه انجام شد. برای شمارش نورون‌های حرکتی شاخ قدامی، از نیمه راست برش‌های سریال پشت سر هم توسط فتومیکروسکوپ تحقیقاتی (Germany وZeiss) عکس برداری شده و توسط متد دایسکتور و استفاده از یک عدد تصادفی شمارش دانسیته نورونی انجام و دانسیته نورونی گروه شم، کنترل وآزمون با هم مقایسه شدند. برای آنالیز داده‌های کمی نیاز به پارامترهایی مانند: Numerical density ،Vdisector ،∑ frame،∑Q می‌باشد(۱۷).

$$ND=\frac{\sum Q}{frame\sum \times Vdisector}$$

آنالیز داده‌ها با نرم‌افزار MINITAP ۱۴، فرمان ANOVA و آزمون t_test واحتمال معنی‌داری $P<۰/۰۰۱$ انجام شد.

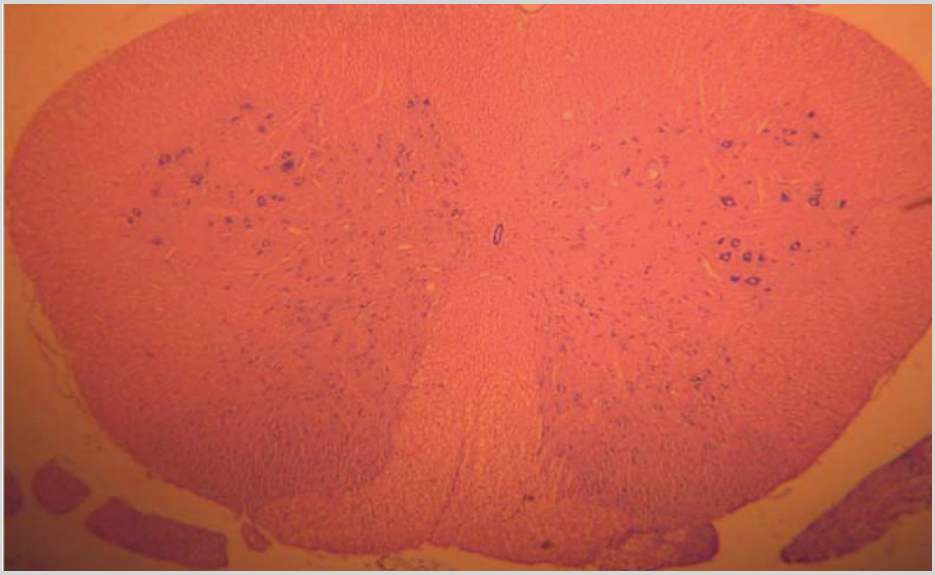
نتایج

مقایسه آماری میانگین دانسیته نورون‌های حرکتی آلفا بین گروه کنترل و گروه شم نشان داد که میانگین دانسیته نورون‌ها در گروه کنترل (۴۰۰±۱۱۰۰۰) نسبت به گروه شم یا ضایعه دیده(۱۵۰±۵۸۵۰) است($P<۰/۰۰۱$)این مطلب نشان می‌دهد که در گروه شم دانسیته نورونی بیش از ۵۰٪ کاهش یافته است(شکل ۱و۲).

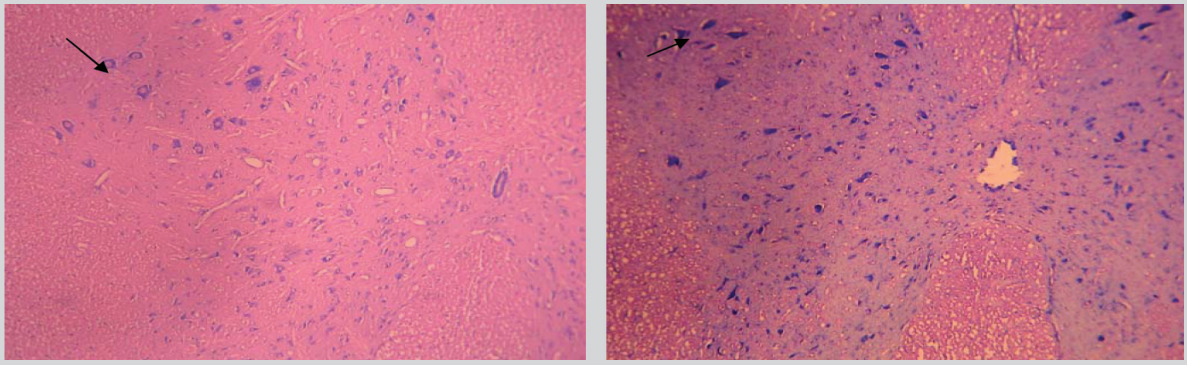
نتایج آنالیز داده‌ها در گروه تیمار با سلول‌های بنیادی نشان می‌دهد که بین دانسیته نورون‌های حرکتی آلفا در گروه آزمون و گروه شم(۲۵۶±۷۸۰۰) نیز اختلاف معنی داری وجود دارد($P<۰/۰۰۱$)یعنی تزریق سلول‌های بنیادی به میزان قابل قبولی می‌تواند از تخریب نورون‌های حرکتی آلفا جلوگیری کند به عبارت دیگر تعداد نورون‌های حرکتی آلفا در گروه آزمون بسیار نزدیک به گروه کنترل است (نمودار۱).

www.SID.ir

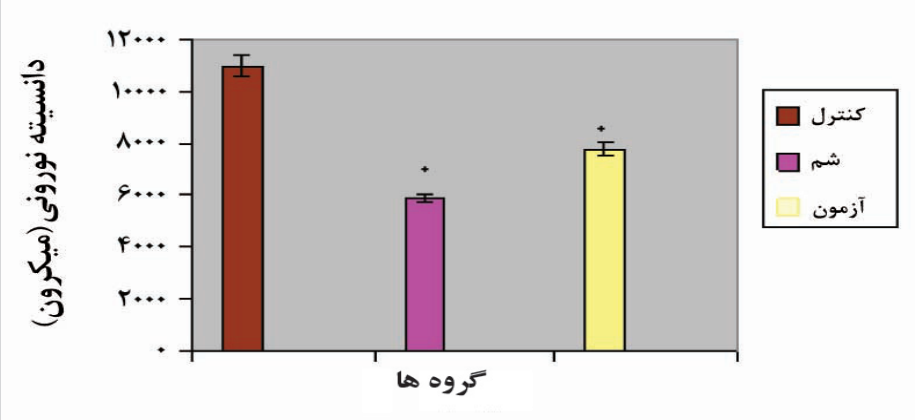
Archive of SID



شکل۱ - مقطع عرضی از نخاع گروه کنترل (رنگ آمیزی آبی تولوئیدین) در شت نمایی x۲۰۰



شکل۲- مقطع عرضی از نیمه راست نخاع گروه کنترل و شم، رنگ آمیزی آبی تولوئیدین- در شت نمایی x٤۰۰
نورون‌های آلفا با فلش مشخص شده‌اند. تصویر راست:شم-تصویر چپ:کنترل



نمودار۱- مقایسه دانسیته نورون‌های آلفای شاخ قدامی نخاع در گروه آزمون وشم و کنترل (n= ۸)

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه‌گیری

علیرغم پیشرفت‌های اولیه، پدیده مرگ نورونی تا سال‌های اخیر به فراموشی سپرده شده بود. در طی ۱۵-۱۰ سال گذشته پدیده مرگ نورونی مجدداً به عنوان یک پدیده جالب مورد بررسی قرار گرفت و بیولوژیست‌های مولکولی دو نوع مرگ سلولی نکروز و آپوپتوز را شرح دادند(۱۶).

پدیده مرگ سلولی علاوه بر این که یک ویژگی مهم در تکامل سیستم عصبی می باشد به عنوان علت بسیاری از بیماری‌های نورودژنراتیو مدنظر است. بسیاری از بیماری‌های نورولوژیک باعث از بین رفتن تدریجی دستجات به خصوصی از نورون‌ها و در نتیجه اختلالات حرکتی و اختلال درعملکرد سیستم عصبی مرکزی(CNS) می گردند(۲). آسیب نخاعی منجر به آپوپتوز و راه‌اندازی مسیرهای مرگ داخل سلولی می شود در پستانداران بیش از یک مسیر برای آپوپتوز وجود دارد. در فرایند آپوپتوز هم نورون‌ها وهم سلول‌های گلیا می میرند(۱۰). فعالیت کاسپازها در آپوپتوز بعد از آسیب نخاعی، در نخاع موش بالغ دیده می شود. پروتئاز فعال کننده فاکتور آپوپتوزیس، پروتئاز کاسپاز ۳و۹ است. فعالیت کاسپازها باعث خود خوری سلولی می شود. کاسپازها پروتئازهای قوی هستند و سلول را از درون تجزیه می کنند. پروتئین‌ها تجزیه شده و DNA به قطعاتی تبدیل می شود(۱۸). بر اساس این تحقیق و پس ازآنالیز داده‌ها نتایج بیان گر این بودند که آسیب نخاعی ایجاد شده بر طبق انتظار دانسیته تعداد نورون‌های شاخ قدامی نخاعی را کاهش داد، به طوری که اختلاف معنی داری بین دانسیته نورونی این گروه و گروه کنترل دیده می‌شود($P<۰/۰۰۱$). در بررسی‌های میکروسکوپی مشاهده شد که نورون‌های آلفای شاخ قدامی نخاع در گروه شم(ضایعه دیده) با ظاهری چند وجهی، سیتوپلاسم کاهش یافته، غشای چروکیده و هسته ای به کنار سلول کشیده شده، علائمی از مرگ سلولی را نشان می‌دهندکه در مقایسه با نورون‌های آلفای شاخ قدامی نخاع گروه کنترل با ظاهری درشت و نرمال، هسته ای در وسط، سیتوپلاسم شفاف کاملا متمایز می‌شود.درگروه آزمون نورون‌ها اشکالی حد واسط را نمایش می‌دهند عده ای ظاهری نرمال داشته که احتمالا اثرات فاکتورهای رشد آزاد شده از سلول‌های تزریق شده است و عده ای هم دچار مرگ سلولی شده‌اند که بیان‌گر اثر ضایعه نخاعی است. سلول‌های بنیادی درطول مسیرهای طولانی، سریع و دقیق و در فواصل طولانی در مکان‌های آسیب دیده درسیستم عصبی مرکزی مهاجرت می کنند. در نخاع آسیب دیده ترمیم از طریق پیوند سلول‌های بنیادی در محل آسیب قابل توجه است(۱۹). سلول‌های بنیادی از سلول‌های جنینی به دست می آید که با استفاده از تکنیک‌های ویژه می تواند در موتونورون‌های نخاع توسعه یابد. کشت همراه با فاکتورهای رشد و یا از طریق تزریق سلول‌های مغز استخوان همراه با فاکتورهای محرک کلونی ماکروفاژ، منجر به بهبود آسیب کامل نخاعی می‌شود (۱۴). این حقیقت که سلول‌های بنیادی می توانند به انواعی از سلول‌های تمایز یافته تکوین یابند، احتمال استفاده از سلول‌های مغز استخوان را در درمان اختلالات عصبی به وجود آورده است . از این رو در این تحقیق حدود ۲۰۰۰۰۰ سلول به همراه ۷ میکرولیترPBS درون بطن جانبی مغز رت‌ها ی گروه آزمون تزریق شد. احتمالا اثرات درمانی خوبی که از این تزریق حاصل شد نه تنها به علت سلول‌های تزریق شده است بلکه به علت فاکتورهای رشد آزادشده از سلول‌های تزریق شده می‌باشد. این فاکتورها از دژنراسیون نورون‌های آلفای در اثر ضایعه نخاعی جلوگیری کرده و شدت ضایعه را کاهش داده است، اهمیت فاکتورهای رشد در روندهای ترمیم سال‌هاست که به اثبات رسیده است.چنان چه در گروه آزمون دانسیته نورونی نسبت به گروه شم (ضایعه دیده) افزایش یاقته است($P<۰/۰۵$) .هر چند که هنوز اختلاف آشکاری بین دانسیته نورونی گروه آزمون وگروه کنترل

www.SID.ir

Archive of SID

وجود دارد ولی همین که تزریق سلول‌های بنیادی توانسته است تا حدی از شدت دژنراسیون نورون‌های آلفای شاخ قدامی بکاهد گام مفیدی در جهت کاهش اثرات پس از ایجاد ضایعات نخاعی است. بررسی‌های *in vivo* ,*in vitro* نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی از پاسخ‌های طبیعی آلوگرافت جلوگیری می‌کنند(۱). تعداد معدودی از بررسی‌های *in vivo* پیشنهاد می‌کنند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌توانند آنتی ژن‌های بیگانه را تحمل کنند. در مواجهه با لنفوسیت‌های آلوژنیک سلول‌های مزانشیمی از تکثیر سلول‌های T ممانعت می‌کنند(۲۰). از این رو، سلول‌های بنیادی مزانشیمی احتمالا سیستم ایمنی را سرکوب می‌کنند. این یافته‌ها چشم‌اندازی مثبت برای پیوند نامتجانس سلول‌های بنیادی مزانشیمی در موجودات مختلف می‌باشد.ضایعات نخاعی و سیستم عصبی از جمله آسیب‌هایی هستند که به دلیل اهمیت این سیستم موجب از کار افتادگی فرد یا اندام خاصی در او می‌شود.از دو دهه گذشته تکنیک‌های استفاده از سلول‌های بنیادی به دلیل اهمیت و ویژگی‌های منحصر به فردی که این سلول‌ها دارند رواج یافت، این زمینه تحقیقی جدید راهی برای درمان ضایعات وبیماری‌های ناعلاج را ممکن می‌ساخت. مدل‌های حیوانی نتایج مثبتی را نشان داده است به طوری که در این تحقیق نیز مشاهده شد که تزریق سلول‌های بنیادی به حیواناتی که دچار ضایعه نخاعی شده‌اند توانسته است شدت ضایعه را به طور معنی داری کاهش دهد. این مشاهدات بار دیگر قابلیت‌های چندگانه سلول‌های بنیادی مزانشیمی تائید می‌کند.نتایج حاصل از این تحقیق نوید بخش است زیرا تزریق سلول بدون استفاده از سرکوب گر ایمنی انجام شد، لذا بدون نگرانی از واکنش‌های التهابی احتمالی این روش می‌تواند موجب ترمیم ضایعات عصبی مرکزی شود و از شدت ضایعات ایجادی بکاهد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد صورت گرفت. بدین وسیله از تمام همکاران گروه زیست، مدیریت گروه سرکار خانم دکتر جعفری و ریاست محترم دانشکده علوم آقای دکتر ایزدیان جهت همکاری‌های بی دریغشان تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1.Alhadalaq, A., Mao, J.J.(2004). Mesenchymal Stem cells: Isolation and therapeutics. Stem cells and development,13;436-448.

2.Bahadori, M.H., Al-Tiraihi, T., Rezazadeh-Valojerdi, M. (2001). Sciatic nerve transection in neonatal rats induces apoptotic neuronal death in L5 dorsal root ganglion. Neurocytology,30(2);125-130.

3.Bai, H., Suzuki, Y., Noda, T., W u, S., Kataoka, K., Kitada, M. (2003). Dissemination and proliferation of neural stem cells on the spinal cord by injection into the fourth ventricle of the rat: a method for cell transplantation.J Neurosci Methods, 15;124(2);181-7.PMID: 12706848

4.Behnam-Rasoli, M., Nikravesh, M., Mahdavi-Shahri, N., Tehranipour, M. (2000). Post-operative time effects after sciatic nerve crush on the number of alfa motoneurons , using a stereological counting method. Iranian Biomadical, 4(1); 45-49.

5.Bouhy, D., Malgrange, B., Multon, S., Poirrier, A.L., Scholtes, F., Schoenen, J., Franzen, R. (2006). Delayed GM-CSF treatment stimulates axonal regeneration and functional recovery in paraplegic rats via an increased BDNF expression by endogenous macrophages.FASEB J, 20(8);1239-

6.Coutts, M., Keirstead, H.S. (2008).

www.SID.ir

Stem cells for the treatment of spinal cord injury. Exp Neurol,209(2);368-77.PMID: 17950280

7.Hayashi, R., Yamato, M., Saito, T., Oshima, T., Okano, T., Tano, Y., Nishida, K. (2007). Enrichment of corneal epithelial stem/progenitor cells using cell surface markers, integrin alpha6 and CD71.Biochem Biophys Res Commun, 7;367(2);256-63. PMID: 18155160

8.Hayashi, K., Ohta, S., Kawakami, Y., Toda, M. (2009). Activation of dendritic-like cells and neural stem/progenitor cells in injured spinal cord by GM-CSF. Neurosci Res, 64(1);96-103. PMID: 19428687

9.Horner, P.J., Power, A.E., Kempermann, G., Kuhn, H.G., Palmer, T.D., Winkler, J., (2000). Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord.J. Neurosci,15;20(6);2218-28.PMID: 10704497

10. Kashihara, Y., Kuno, M., Miyata, Y. (1987). Cell death of axotomized motoneurones in neonatal rats and its prevention by peripheral reinnervation. J Physiol, (386);135-148.41.PMID: 16636109

11. Louro, J., Pearse , D.D. (2008). Stem and progenitor cell therapies: recent progress for spinal cord injury repair. Neurol Res, 30(1);5-16. PMID: 18387258

12. Lu, P., Jones, L.L., Snyder, E.Y., Tuszynski, M.H.(2003). Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. Exp Neurol,181(2);115-29.PMID: 12781986

13. McDonald, J.W., Becker, D., Holekamp, T.F., Howard, M., Liu, S., Lu, A., (2004). Repair of the injured spinal cord and the potential of embryonic stem cell transplantation. J Neurotrauma, 21(4);383-93. PMID: 15115588

14. Minguel, J.J., Erices, A., Conget, P.(2001). Mesenchymal Stem cells.Exp Biol Med,226(6);507-520.

15. Nandoe Tewarie, R.S., Hurtado, A., Bartels, R.H., Grotenhuis, A., Oudega ,M.M.(2009). Stem cell-based therapies for spinal cord injury. J Spinal Cord Med, 32(2);105-14. PMID: 19569457

16. Nona, S., Cronly-Dillon, J., Stafford, C., Ferguson, M.(1992). Development and regeneration of the nervous system. Chapman & Hall.

17. Sterio, D.C.(1984) . The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the dissector. J. Microscopy, 134; 127-136.

18. Sun, J.,Huang, SH.(2005). Effect of purified herbal extract of *Salvia miltiorriza* on ischemic rat myocardium after acute myocardial infarction .Life Sci, (76);2849-2860.

19. Wang, L., Xiong, Z.Y.,Wang, G.(2004) . Systematic assessment on randomized controlled trails for treatment of stable angina pectoris by compound *Salvia pellet*. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi,24(6);500-504.

20. Tuan, S.R., Boland, G., Tuli, R.(2003). Adult mesenchymal stem cells and cell based tissue engineering.Arthritis Research and Therapy,5(1);32-45.

www.SID.ir