

رژنراسیون عصب سیاتیک در لوله پیژوالکتریک: تأثیر فاکتور رشد عصب و فاکتور شبه انسولین - ۱

دکتر غلامحسین فرجاه^۱، دکتر محمد تقی جغتایی^۲

تاریخ دریافت ۸۴/۰۴/۲۳، تاریخ پذیرش ۸۵/۰۱/۳۰

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: محدودیت دسترسی به محل‌های دهنده مناسب برای پیوند عصب، ضرورت تحقیق جهت یافتن جانشین مناسب برای پیوند عصب را توجیه می‌کند.

مواد و روش‌ها: این تحقیق یک مطالعه تجربی است که از ۴۸ سر موش صحرایی نر (۲۵۰-۲۰۰ gr) استفاده شد. پس از قطع عصب سیاتیک، ۱ سانتیمتر از عصب برداشته و شکاف حاصله توسط یکی از ۴ روش زیر ترمیم شد (مجرای پلی وینیلیدین فلوراید یا PVDF با فاکتور رشد عصب و فاکتور رشد شبه انسولین ۱، اتوگرافت، شم و کنترل). همه حیوانات در روزهای ۷، ۲۱، ۳۵، ۴۹، ۶۰ و ۹۰ بعد از جراحی توسط تست‌های حسی و شاخص فعالیت عصب سیاتیک (SFI) و در روز ۹۰ به وسیله الکتروفیزیولوژی ارزیابی شدند. عصب سیاتیک در روز ۲۸ و ۹۶ به وسیله میکروسکوپ نوری و الکترونی مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: در روز ۹۰ پس از جراحی، اختلاف معنی‌داری از لحاظ حسی در گروه‌های آزمایش مشاهده نشد ($p=0/07$). میانگین SFI در روز ۵۶ و در گروه اتوگرافت نسبت به گروه فاکتورهای رشد PVDF+ افزایش دارد ($p<0/01$). اختلاف میانگین سرعت هدایت عصب حرکتی در گروه‌های آزمایش از لحاظ آماری معنی‌دار نیست ($p=0/05$). در روز ۲۸ پس از ترمیم، بافت عصب تشکیل شده داخل مجرای PVDF به شکل گرد است و تعداد آکسون‌های میلیون‌دار در گروه‌های آزمایش اختلاف معنی‌داری ندارد ($p=0/05$). در روز ۹۶ پس از ترمیم، میانگین تعداد آکسون‌های میلیون‌دار در گروه فاکتورهای رشد+PVDF نسبت به گروه اتوگرافت کمتر است ($p<0/01$).

بحث نتیجه‌گیری: این مطالعه پیشنهاد می‌کند که با توجه به اثرات مثبت فاکتورهای رشد همراه با مجرای PVDF بر روی ترمیم عصب، استفاده از مجرای PVDF ممکن است جهت ترمیم ضایعات عصب محیطی مفید باشد.

کل واژگان: ترمیم عصب، عصب سیاتیک، فاکتور رشد عصب، فاکتور رشد انسولین ۱، پلی وینیلیدین فلوراید

مجله پزشکی ارومیه، سال هفدهم، شماره سوم، ص ۲۱۸-۲۰۹، پاییز ۱۳۸۵

آدرس مکاتبه: ارومیه، ص پ- ۱۶۸۳-۵۷۱۳۵، تلفن: ۰۹۱۴۳۴۶۵۴۴۸ E-mail: hfarjah@hotmail.com

مقدمه

ساختمان و اندازه بافت، روش ایده‌آل محسوب نمی‌شود (۲). همچنین تشکیل نوروما و بافت اسکار شایع است (۳). بنابراین تلاش جهت پیدا کردن جانشین مناسب برای اتوگرافت ادامه دارد. کانال‌های راهنمای عصب^۳ یا، NGCs^۴ لوله‌های طبیعی یا مصنوعی هستند که شکاف بین دو انتهای عصب بریده شده را پل می‌زنند و علاوه بر کمک به رشد آکسون، تشکیل بافت اسکار را

به دنبال قطع اعصاب محیطی و پس از دژنراسانس والرین، عناصر مختلفی در موفقیت رژنراسیون موثر هستند (۱). اگر چه پیوند اتوگرافت عصب یا روش طلایی^۳ برای ترمیم شکاف عصبی به کار می‌رود، ولی به دلیل محدودیت دسترسی به بافت عصب، خطر گسترش بیماری، تغییر شکل ثانویه و اختلاف پتانسیل در

^۱ استادیار گروه آناتومی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

^۲ استاد گروه آناتومی دانشگاه علوم پزشکی ایران

^۳ Gold Standard

^۴ Nerve Guidance Channel

دارند (۱۱). NGF بر روی رشد نورون‌های حسی و سمپاتیک موثر است. اسلاک^۴ و همکاران پیشنهاد نمودند که از عضله، ماده‌ای تولید می‌شود که در اصطلاح آن را Motor NGF نامیدند. این ماده بر روی ترمیم و نگهداری عصب تاثیر دارد (۱۲). تحقیقات دیگر نشان می‌دهد که NGF ترمیم نورون‌های حرکتی را تسریع می‌نماید (۱۳، ۱۴). NGF سبب تکامل شاخه‌های جانبی آکسون‌های حسی قطع شده (۱۵) و افزایش آنژیوژنز می‌شود (۱۶). تجویز NGF سبب افزایش تعداد آکسون‌های میلین دار، ضخامت میلین و بلوغ بیشتر لایه‌های اندوتلیال می‌گردد (۱۷). همچنین تحقیقات دیگر نشان می‌دهد که کاربرد موضعی NGF سبب تحریک ترمیم عصب محیطی له شده می‌شود (۱۸).

تسای^۵ و همکارانش مشاهده نمودند که NGF نه تنها ترمیم را تسریع می‌کند بلکه سبب توقف مرگ نورون‌ها می‌شود (۱۹). غلظت‌های فیزیولوژیک فاکتور شبه انسولین-۱^۶ در نورون‌های حرکتی، پاراسمپاتیک و حسی منجر به رشد آکسون می‌شود. GF-I در ترمیم عصب محیطی، جوانه زدن انتهای عصب حرکتی و تشکیل سیناپس نقش دارد (۲۰). همچنین تحریک کننده قوی برای تزیاید و تمایز سلول‌های شوان است (۲۱). تحقیقات نشان می‌دهد که تجویز IGF-1 در محل ضایعه عصب، سبب تقویت جوانه زدن آکسون‌ها در هنگام ترمیم عصب می‌گردد (۲۲). تجویز موضعی IGF-I پس از له شدن عصب، ترمیم آن را تسریع می‌نماید ولی استفاده سیستماتیک آن نمی‌تواند سبب بهبودی ترمیم پس از قطع آکسون شود (۲۳).

IGF-I پس از ضایعه عصب محیطی، نقش مهمی در آنژیوژنز دارد و سبب تحریک تشکیل رشته‌های عضلانی و افزایش ترمیم عصب می‌شود (۲۴). ترکیب NGF و IGF-I اثر مضاعفی بر میزان ترمیم نورون‌های حسی موش بالغ دارند (۲۵). هنگامی که ترکیبی از NGF و IGF-I استفاده می‌شود، ترمیم آکسون‌های صدمه دیده نسبت به استفاده مجزای آنها بیشتر افزایش می‌یابد (۲۶).

بررسی‌های انجام شده توسط نویسندگان مقاله نشان می‌دهد که گزارشی مبنی بر تاثیر استفاده توأم فاکتورهای رشد عصب و خاصیت پیروالکترونیک کانال PVDF تاکنون ارائه نشده است. مقصود از این تحقیق ارزیابی رژنراسیون عصب سیاتیک با استفاده

به حداقل می‌رسانند (۳) و کشش را در ناحیه ترمیم عصب کاهش می‌دهند (۴). NGCs از مواد طبیعی (کلاژن، ورید و...) و یا مواد مصنوعی (سیلیکون، پلی اورتان و...) ساخته می‌شوند. خواص فیزیکی NGCs بر کیفیت و کمیت ترمیم تاثیر دارد. اگر ابعاد کانال خیلی کوچک باشد، عصب در هنگام ورود به داخل آن صدمه می‌بیند و اگر ابعاد آن خیلی بزرگ باشد، سبب نفوذ فیبروبلاست‌ها به داخل مجرا می‌گردد. خلل و فرج^۱ دیواره مجرا نیز در انتشار مواد غذایی و فاکتورهای رشد از بافت‌های اطراف به داخل مجرا کمک می‌کند و از نفوذ ملکول‌های مهار کننده نیز جلوگیری می‌نماید (۳). پلی وینیلیدین فلوراید^۲ یک مجرای مصنوعی است که علاوه بر انتشار گازها و مایعات به داخل مجرا، از نفوذ ملکول‌های مهار کننده جلوگیری می‌نماید و با تولید شارژ سطحی، نقش مهمی در تمایز و تحریک انواع سلول‌ها از جمله شوان و رشد آکسون دارد. مواد پیروالکترونیک همانند PVDF، ترمیم عصب محیطی را تقویت می‌نمایند. کانال PVDF قطبی نسبت به غیر قطبی آن، سبب بهبودی بیشتری در افزایش کمی و کیفی ترمیم می‌شود (۵). شارژ الکتریکی تولید شده از مجرای پیروالکترونیک سبب تقویت ترمیم اعصاب محیطی می‌شود (۶). لوله‌های قطبی شده PVDF نسبت به تغییرات مکانیکی حساس تر می‌باشند و به طور معنی داری حتی در تغییرات کم فیزیکی، شارژ سطحی تولید می‌کنند. همچنین تعداد آکسون میلین دار و ضخامت میلین در لوله‌های قطبی مثبت، نسبت به لوله‌های قطبی منفی بیشتر است (۷). زوائد نورون‌های کشت داده شده بر روی صفحات PVDF قطبی شده بیشتر از PVDF غیر قطبی رشد می‌نمایند (۸). تحقیقات نشان می‌دهد که ترکیب محرک‌های بیولوژیکی و استفاده از کانال راهنمای عصب از جنس مواد پیروالکترونیک، ممکن است برای تقویت ترمیم عصب و کسب نتایج بهتر مفید باشند (۳).

فاکتور رشد عصب^۳ اولین فاکتور تغذیه کننده عصب است که حدود ۵۰ سال پیش کشف گردید (۹). مقادیر خیلی کم NGF در عصب محیطی حیوان سالم یافت می‌شود. به دنبال له شدن یا قطع عصب سیاتیک، میزان تولید NGF افزایش می‌یابد (۱۰). NGF در سلول‌های اپی تلیال، عضله صاف، فیبروبلاست‌ها و شوان تولید می‌شود. ماکروفاژهای فعال شده نقش مهمی در تنظیم ترشح NGF

⁴ Slack

⁵ Tsai

⁶ Insulin Like Growth Factor 1 (IGF-I)

¹ Porosity

² Polyvinylidene Fluoride (PVDF)

³ Nerve Growth Factor (NGF)

عصب را ۱۸۰ درجه جابه‌جا نموده و به دو انتهای بریده عصب توسط نخ ۰-۱۰ بخیه شد. در گروه شاهد (Sham)، عصب سیاتیک را نمایان کرده ولی قطع نگردید. پس از عمل جراحی، بخش‌های بریده عضله و پوست توسط اتیکون ۰-۵ بخیه شد.

روش قطبی نمودن لوله PVDF: پلی وینیلیدین فلورایدیک پلی‌مر نیمه کریستالین با فرمول شیمیایی $[CH_2CF_2]_n$ می‌باشد، که حاوی ملکول‌های دو قطبی است. هنگامی که این ملکول‌ها از لحاظ موقعیت در جهت صحیح قرار بگیرند، خاصیت پیژوالکتریک^۳ از خود نشان می‌دهند، یعنی به دنبال تغییر مکانیکی، شارژ سطحی تولید می‌کنند.

به منظور قطبی نمودن لوله PVDF، میله فلزی به قطر ۱/۶mm را که به عنوان الکترود داخلی محسوب می‌شود و به زمین اتصال دارد، داخل مجرا و الکترود خارجی را که با سطح خارجی لوله تماس دارد، به قطب مثبت منبع تولید کننده ولتاژ بالا مرتبط می‌شود. ولتاژ را به تدریج در مدت ۲ ساعت تا ۲۱ کیلوولت بالا برده و سپس به مدت ۱۲ ساعت در این حالت نگه داشته می‌شود(۶).

روش‌های اندازه‌گیری ترمیم عصب

الف - تست حسی: موش‌ها در روزهای ۷، ۲۱، ۳۵، ۶۰ و ۹۰ بعد از جراحی تحت بررسی حسی قرار گرفتند. برای این کار حیوان در بالای ظرف آب گرم ۵۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد، سپس پای جراحی شده را در ظرف آب فرو برده به طوری که کف پای حیوان با کف ظرف در تماس باشد. زمان شروع تماس و بیرون کشیدن پا از آب ثبت شد(۲۷).

ب - ارزیابی راه رفتن^۴: در روزهای ۷، ۲۱، ۳۵، ۶۰ و ۹۰ پاهای عقب موش را با جوهر (Stamp pad) رنگی شد، سپس اجازه داده شد که بر روی کاغذ سفیدی که در کف راهرویی به ابعاد ۲۵×۲۵×۱۳۰ سانتی‌متر قرار دارد و در انتها به اتاقک تاریکی منتهی می‌شود، راه برود. شاخص فعالیت عصب سیاتیک یا SFI^۵ را براساس فرمول باین^۶ و همکاران برای پای جراحی شده و پای

از کانال PVDF و فاکتورهای رشد عصب (NGF+IGF-I) در مقایسه با روش اتوگرافت می‌باشد.

مواد و روش کار

تحقیق حاضر بر روی ۴۸ سر موش صحرایی نر بالغ، نژاد Sprague-Dawley به وزن تقریباً ۲۵۰-۲۰۰ گرم انجام گرفت. موش‌ها در خانه تحت شرایط یکسان و چرخه ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و در دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. آب و مواد غذایی به صورت یکسان در اختیار حیوانات قرار داشته است. حیوانات را به صورت تصادفی به چهار گروه ۱۲ تایی تقسیم شدند: گروه PVDF با فاکتورهای رشد NGF و IGF-I، گروه اتوگرافت، گروه Sham، گروه کنترل.

روش جراحی: موش‌ها توسط ماده بی‌هوشی Ketamin (۹۰mg/kg) و Xylazine (۱۰mg/kg) به صورت داخل صفاقی بی‌هوش شدند. پس از تراشیدن موی پای چپ حیوان، پوست ناحیه ران توسط محلول بتادین و الکل تمیز شد. پس از ثابت نگه داشتن دست و پاهای حیوان توسط مکان‌های مشخص شده بر روی تخت عمل جراحی، برشی در پوست ناحیه خلفی خارجی ران ایجاد شد. عضله و فاسیا را به آرامی کنار زده و عصب سیاتیک در فاصله بین بریدگی سیاتیک تا محل دو شاخه شدن آن نمایان شد. در حد واسط بین دو نقطه فوق و در محل یکسان برای همه گروه‌های آزمایشی، قطعه‌ای از عصب به اندازه ۱۰mm قطع شد. در گروه فاکتورهای رشد عصب + PVDF از یک قطعه لوله PVDF^۱ قطبی مثبت استریل با قطر داخلی ۱/۶mm و به طول ۱۴mm در محل شکاف استفاده شد. دو انتهای بریده عصب را به صورت تلسکوپی داخل لوله قرار داده و با نخ نایلون ۰-۱۰ به دیواره لوله بخیه شد. تمام مراحل فوق در زیر میکروسکوپ جراحی^۲ با بزرگ‌نمایی ۲۰ و تحت شرایط استریل انجام شد(۲۷).

۰/۳ میلی لیتر از محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار حاوی ۱۰۰ng NGF و IGF-I (Roche) از طریق یک سرنگ یک میلی لیتری با سوزن شماره ۲۵ و قبل از محکم نمودن بخیه اپی‌نوریال به داخل لوله تزریق شد. در گروه اتوگرافت قطعه بریده شده

³ Piezo electric

⁴ Gait Analysis

⁵ Sciatic Functional Index

⁶ Bain

¹ Harvard Apparatus.Ltd

² Olympus, SZX12, Japan

سالم محاسبه گردید (۲۸).

$$SFI = -38/3 \left(\frac{EPL - NPL}{NPL} \right) + 109/5 \left(\frac{ETS - NTS}{NTS} \right) + 13/3 \left(\frac{EIT - NIT}{NIT} \right) - 8/8$$

طول کف پا (Foot print Length (PL): طول اثر کف پا در سمت آزمایش (Experimental) و طبیعی (Normal) بر حسب میلی‌متر

فاصله بین انگشتان ۱ و ۵ Total spreading (TS): خطی که فاصله بین مرکز انگشت پنجم را به مرکز انگشت اول متصل می‌کند (بر حسب میلی‌متر)

فاصله بین انگشتان ۲ و ۴ Intermediary Toes (IT): خطی که فاصله بین مرکز انگشت دوم را به مرکز انگشت چهارم متصل می‌کند (بر حسب میلی‌متر)

ج - مطالعات الکتروفیزیولوژی: در آخر هفته دوازده، شش موش از هر گروه از طریق داخل صفاقی به طور کامل بی‌هوش شدند. پس از نمایان شدن عصب سیاتیک، الکتروود سوزنی دو قطبی استریل به آرامی به داخل عضله گاستروکنمیوس، یک سانتی‌متر زیر برجستگی تیبیا فرو برده شد. ابتدا از عضله گاستروکنمیوس در حالت استراحت، الکترومیوگرافی به دست آمد (جواب‌گیری مستقیم). سپس سرعت هدایت عصب حرکتی و حسی یا SNCV، و MNCV^۱ محاسبه شد. همچنین پتانسیل عمل حرکتی^۲ و پتانسیل عمل حسی^۳ جهت تعیین زمان جواب‌گویی (زمان تاخیر) Latency و دامنه پتانسیل فعالیت (Amplitude) جهت بررسی و تجزیه و تحلیل توسط دستگاه (Toennies, Duoliner, England) ثبت گردید.

د - مطالعات بافت‌شناسی: شش موش از هر گروه در پایان هفته چهارم و بقیه موش‌ها پس از انجام الکتروفیزیولوژی در پایان هفته دوازدهم جهت مطالعه بافت‌شناسی پرفیوژن شدند. در تمام موارد پس از پرفیوژن، عصب سیاتیک را ۱ میلی‌متر قبل و ۱ میلی‌متر بعد از محل ترمیم (لوله PVDF یا اتوگرافت) بریده و نمونه تمام شب در ثابت کننده گلوئوتارالدهید ۲/۵ درصد و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. سپس هر نمونه را به سه قسمت ابتدایی،

میانی و دیستال تقسیم نموده و پس از استفاده از تتراکسید ۱ درصد به مدت ۱/۵ ساعت، مراحل تهیه بلوک (TAAB Araldite (۵۰۲/۸۱۲) برای میکروسکوپ الکترونی انجام گرفت. بلوک‌های تهیه شده توسط اولترامیکروتوم^۴ به اندازه ۵۰۰ نانومتر (۰/۵ میکرون) برش و با محلول تولوئیدین بلو ۱٪ به مدت ۳-۲ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند (۲۷). نمونه‌های نیمه نازک^۵ توسط میکروسکوپ پیشرفته تحقیقاتی^۶ در بزرگ‌نمایی‌های مختلف مطالعه شد و توسط دوربین دیجیتالی^۷ متصل به کامپیوتر عکس گرفته شد. به طوری که ابتدا سطح مقطع عصب، ضخامت اپی‌نوریوم و مساحت عروق خونی تشکیل شده محاسبه شد^۸. سپس سطح مقطع عصب را به نواحی ۱۵۰۰ میکرومتر مربع تقسیم کرده و سه ناحیه به صورت تصادفی در همه مقاطع انتخاب گردید. پس از شمارش آکسون‌های میلیون‌دار، قطر رشته عصب و ضخامت میلین محاسبه شد. پس از تهیه برش نیمه نازک و مشخص نمودن محل مناسب برای مطالعه میکروسکوپ الکترونی، با استفاده از اولترا میکروتوم به اندازه ۵۰ نانومتر برش زده شد. سپس برش‌ها را بر روی شبکه (Grid) قرار داده و توسط میکروسکوپ الکترونی (Leo ۹۰۶) برای شمارش آکسون‌های بدون میلین مطالعه شد. یافته‌ها جهت تجزیه و تحلیل آماری، به وسیله نرم‌افزار spss و (ANOVA و t-test) مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

جراحی به خوبی توسط موش‌ها تحمل گردید و همه زخم‌ها در مراحل اولیه ترمیم شدند و هیچ علائمی مبنی بر عفونت و درد در جریان ترمیم مشاهده نگردید. هیچ حیوانی نمرد، ولی خود خواری^۹ در پای تعدادی از حیوانات (۱۰ درصد) مشاهده گردید، که توسط نمونه‌های جدید جایگزین شدند. در هنگام برداشتن نمونه‌ها از بدن حیوان جهت مطالعه میکروسکوپی، هیچ اختلاف ماکروسکوپی در گروه‌های مختلف آزمایشی مشاهده نگردید.

⁴ leica, ultracut

⁵ Semithin

⁶ Olympus, PROVIS Ax70, Japan

⁷ Olymus, DP11, Japan

⁸ OLYSIA Biorefort, Olympus, Japan تصاویر توسط برنامه کامپیوتری مورد

مطالعه قرار گرفت

⁹ Autophage

¹ Motor and sensory Nerve Conduction Velocity

² Motor Action Potential (MAP)

³ Sensory Action Potential (SAP)

ج - الکتروفیزیولوژی: در انتهای هفته ۱۲، از تعداد شش سر موش از هر گروه الکترومیوگرافی به عمل آمد. علائمی دال بر بی‌عصبی^۱ مشاهده نشد، که این نشانه برقراری ارتباط عصب با عضله است و راه عصبی سالم می‌باشد. میانگین MNCV و SNCV عصب سیاتیک طبیعی به ترتیب $45 \pm 2/7$ و $43/1 \pm 1/7$ متر بر ثانیه است. اختلاف میانگین MNCV بین گروه فاکتورهای رشد PVDF+ ($25/1 \pm 4/7$ m/s) و گروه اتوگرافت ($3/9 \pm 28/4$ m/s) از لحاظ آماری معنی‌دار نیست ($p=0/05$). میانگین SNCV در گروه اتوگرافت ($31/9 \pm 4/1$) بیشتر از گروه فاکتورهای رشد PVDF+ ($28/2 \pm 2/7$) است، ولی این اختلاف معنی‌داری نیست ($p=0/06$).

د - مطالعه میکروسکوپی

برش‌های نیمه نازک Semi-thin: در پایان هفته چهارم، عصب‌های ترمیم شده در داخل لوله PVDF به شکل مدور^۲ می‌باشد، که توسط ژل غلیظ و چسبناک بدون سلولی احاطه می‌شوند. عصب رشد کرده باریک بوده و در ناحیه میانی لوله، نسبت به دو انتهای ابتدایی و انتهایی نازکتر است. میانگین سطح مقطع عصب ترمیم شده در گروه فاکتورهای رشد + PVDF، $11/3 \pm 0/7 \times 10^4 \mu m^2$ است. نسبت ضخامت اپی‌نوریوم به سطح عصب ترمیم شده (بر حسب درصد)، در گروه فاکتورهای رشد + PVDF، $1/5 \pm 0/7$ است، که نسبت به گروه اتوگرافت ($0/45 \pm 0/7$) اختلاف معنی‌داری دارد ($p < 0/001$). سطح خارجی عصب ترمیم شده در داخل لوله PVDF، توسط تعدادی ماکروفاژ احاطه شده است. این ماکروفاژها تعداد فراوانی پاهای تیغه‌ای دارند، که بیانگر فعالیت آنها در بیگانه خواری است. انشعاباتی از اپی‌نوریوم به داخل بافت عصب کشیده می‌شوند، که دسته‌های تازه تشکیل شده را از هم مجزا می‌نمایند.

اختلاف مساحت عروق خونی به سطح کل بافت عصب ترمیم شده در گروه فاکتورهای رشد + PVDF ($8/3 \pm 2$) نسبت به گروه اتوگرافت ($4/3 \pm 0/8$) به طور معنی‌داری بیشتر است ($p < 0/001$). تعداد آکسون‌های میلین‌دار در گروه اتوگرافت (4290 ± 314) نسبت به گروه فاکتورهای رشد + PVDF (3701 ± 215) اختلاف معنی‌داری ندارد ($p=0/06$). میانگین ضخامت میلین در گروه

الف - تست حسی: میانگین تاخیر پاسخ حسی پای طبیعی به تحریک حرارتی دردناک، $2/2 \pm 0/9$ ثانیه است. تاخیر حسی عصب سیاتیک در گروه ترمیم شده با فاکتورهای رشد + PVDF و اتوگرافت به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود ($p < 0/001$). در آخر هفته پنجم (روز ۳۵) پس از ترمیم، اختلاف میانگین تاخیر پاسخ حسی در گروه فاکتورهای رشد + PVDF ($9/24 \pm 2/7$) نسبت به گروه اتوگرافت ($7/47 \pm 2/21$) از لحاظ آماری معنی‌دار است ($p < 0/005$). در آخر هفته دوازدهم پس از ترمیم، هیچ اختلاف معنی‌داری بین گروه فاکتورهای رشد + PVDF و اتوگرافت مشاهده نشد ($p=0/07$). ولی در مقایسه با گروه کنترل و شاهد، اختلاف معنی‌دار بود ($p < 0/003$).

ب - تست حرکتی: بعد از قطع عصب سیاتیک هیچ کدام از حیوانات توانایی راه رفتن بر روی کف پای آسیب دیده را نداشتند. توانایی راه رفتن در پای جراحی شده از هفته سوم شروع شد. به هر حال برگشت به حالت طبیعی (حد فاصل ۱۱+ و ۱۱-) در هیچ حیوانی مشاهده نگردید (شکل ۱). تا انتهای هفته سوم (روز ۲۱) پس از ترمیم، از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های آزمایشی مشاهده نشد ($p=0/06$).

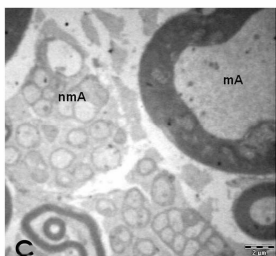
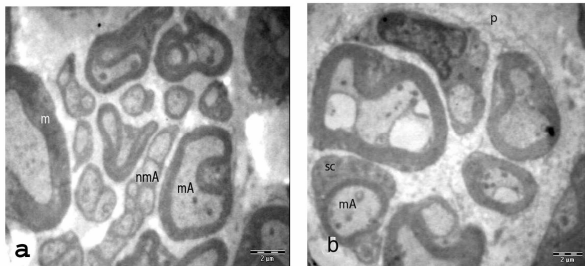


شکل شماره ۱: تصویر اندام عقب (Toes print) موش‌های گروه‌های مختلف هنگام راه رفتن جهت اندازه گیری SFI، دوازده هفته پس از ترمیم a) NGF + IGF-I b) Autograft c) Control انگشت شست پا (داخل ترین انگشت) انگشت شماره اول می‌باشد.

¹ Denervation

² Circular

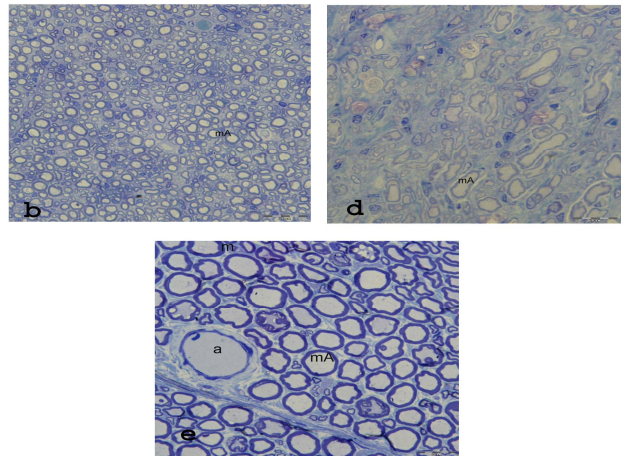
برش‌های نازک **Ultrathin**: در میکروسکوپ الکترونی مشاهده شد که آکسون‌های فاقد میلین در نودان‌های عمیق موجود در سطح سلول‌های شوان قرار می‌گیرند. برای تعیین تعداد آکسون‌های بدون میلین، غشای پایه و حضور نوروفیلانت‌ها ملاک تشخیص قرار گرفت. اگر چه میانگین آکسون‌های بدون میلین در پایان هفته چهارم پس از ترمیم، در گروه فاکتورهای رشد PVDF+ (۹۰۴۳±۶۷۰) نسبت به گروه اتوگرافت (۸۱۱۱±۴۱۷) بیشتر بود، ولی این اختلاف معنی‌داری نیست ($p=0/05$). میانگین آکسون‌های بدون میلین در پایان هفته دوازدهم پس از ترمیم، در گروه فاکتورهای رشد PVDF + (۱۳۹۷۱±۵۱۱) نسبت به گروه اتوگرافت (۱۷۲۸۰±۷۶۰) کمتر است ($p<0/01$).



شکل شماره ۳: تصویر میکروسکوپ الکترونی، از عصب رژنره در ناحیه میانی لوله PVDF، در مقایسه با اتوگرافت و عصب طبیعی، ۱۲ هفته پس از ترمیم (۳۵۹۷×)

(a) گروه NFG+IGF-I (b) گروه Autograft (c) عصب Normal
 nmA: آکسون بدون میلین دار mA: آکسون میلین دار
 Sc: سلول شوان P: پری نوریوم 2 μm

فاکتورهای رشد PVDF+ (۳۸۱±۲۱nm) نسبت به گروه اتوگرافت (۵۱۰±۶۹ nm) به طور معنی‌داری کمتر است ($p<0/01$).



شکل شماره ۲: برش عرضی رنگ‌آمیزی شده با تولوئیدین - بلو،

از عصب رژنره شده در ناحیه میانی لوله PVDF در مقایسه با گروه اتوگرافت، ۴ هفته پس از ترمیم (×100)

(a) گروه NFG+IGF-I (d) گروه Autograft (c) گروه Normal

m: میلین a: شریان mA: آکسون میلین‌دار

20 μm

در پایان هفته دوازدهم، قطر عصب ترمیم شده داخل لوله PVDF به دلیل افزایش میلین‌دار شدن آکسون‌ها و افزایش قطر رشته‌های عصبی و ضخامت میلین در گروه‌های آزمایشی افزایش می‌یابد. میانگین سطح مقطع عصب ترمیم شده در گروه فاکتورهای رشد PVDF+ ($767/4 \pm 7 \mu m^2$) می‌باشد. نسبت ضخامت اپی‌نوریوم به سطح عصب ترمیم شده (بر حسب درصد)، در گروه فاکتورهای رشد PVDF + (۰/۵۵±۰/۲) است که نسبت به گروه اتوگرافت (۰/۴۵±۰/۱) اختلاف معنی‌داری ندارد ($p=0/05$). اندازه فاسیکل‌ها نسبت به هفته چهارم بزرگتر شده و حدود آنها به راحتی قابل تشخیص است. نسبت مساحت عروق خونی به سطح کل بافت عصب ترمیم شده در گروه فاکتورهای رشد PVDF + (۶/۲±۱/۴) به طور معنی‌داری بیشتر از گروه اتوگرافت (۳/۱±۰/۴) می‌باشد ($p<0/01$). در همه گروه‌های آزمایشی تعداد آکسون‌های میلین‌دار در بخش پروگزیمال محل ترمیم عصب بیشتر از ناحیه میانی و دیستال آن است. میانگین تعداد آکسون‌های میلین‌دار در گروه فاکتورهای رشد PVDF+ (۸۳۲۱±۲۱۱) نسبت به گروه اتوگرافت

بحث

اگر چه پیوند اتوگرافت در حال حاضر به عنوان روش طلایی برای ترمیم شکاف عصبی به کار می‌رود، ولی بازگشت فانکشنال به طور کامل نادر است. فقدان یک روش استاندارد و شناخت ناکافی اصول مکانیسم‌های ترمیم عصب از جمله دلایل قصور در تحقیقات NGCs می‌باشند. به عنوان مثال اندازه شکاف ایجاد شده در عصب محیطی، خواص فیزیکی و شیمیایی NGCs به کار برده شده، ویژگی‌های ماتریکس داخل لوله، ترکیب فاکتورهای رشد عصب که به لوله اضافه می‌شوند و یا تحت فشار قرار دادن عصب (بدون ایجاد شکاف در آن) بر میزان ترمیم تاثیر دارند. با توجه به روش‌های مختلف ارزیابی توسط محققان مختلف، مقایسه بین این تحقیقات سخت و دشوار است (۲۷). استفاده از پلی مرهای شارژ شده همانند PVDF، ممکن است نکات بیشتری را درباره نقش جریان الکتریکی در کنترل ترمیم روشن نمایند (۲۹). کانایا^۱ و همکاران پس از تحت فشار قرار دادن (Crush) عصب سیاتیک موش صحرایی (بدون قطع نمودن آن)، از محلول NGF به مقدار ۱mg به صورت موضعی جهت تسریع در روند ترمیم استفاده نمودند و میانگین تاخیر پاسخ حسی دردناک را در هفته پنجم پس از ضایعه $5/1 \pm 3$ ثانیه گزارش کردند (۳۰). هنگامی که عصب تحت فشار (Crush) قرار می‌گیرد، پوشش‌های اپی نوربوم و پری نوربوم آن سالم هستند و نیازی برای بخیه زدن وجود ندارد، در نتیجه ترمیم عصب به راحتی و سریعتر انجام می‌گیرد و کاهش میانگین تاخیر پاسخ حسی دردناک در هنگام له شدن عصب نسبت به تحقیق ما توجیه پذیر است. ارزیابی دقیق تست حسی میسر نمی‌باشد، و به دلیل همپوشانی عصب دهی و غیرمستقیم بودن، از اعتبار کمتری نسبت به سایر روش‌های ارزیابی برخوردار است.

هری^۲ و همکاران با مطالعه بر روی ترمیم عصب سیاتیک موش صحرایی، پس از ایجاد برش در عصب و ترمیم آن مشاهده نمودند که بیشتر نتایج بهبودی فانکشنال در هفته ۲ تا ۱۲ اتفاق می‌افتد (۳۱). پو^۳ و همکاران نیز پس از ایجاد شکاف یک سانتی‌متری عصب سیاتیک و استفاده از ورید رانی حاوی 100 ng فاکتور رشد

عصب، مشاهده نمودند که مقدار SFI، پنج هفته پس از ترمیم در هیچ گروهی به حد طبیعی نرسید. تحقیق حاضر نشان می‌دهد که استفاده توأم IGF-I، NGF، ترمیم آکسون را افزایش می‌دهند (۲۷). مقدار SFI تا هفته نهم افزایش می‌یابد و بعد از آن تغییر زیادی ملاحظه نمی‌گردد. این عدم افزایش SFI پس از هفته نهم، احتمالاً به دلیل کوتاهی عضلات و سفتی مفاصل در اندام جراحی شده می‌باشد که انجام حرکات طبیعی را با مشکل روبرو می‌نماید و دامنه حرکات را کاهش می‌دهد. بر این اساس پیشنهاد می‌گردد که انجام حرکت درمانی و توانبخشی در دست‌یابی به نتایج بهتر، ممکن است مفید باشد.

هی^۴ و همکاران با استفاده از لوله سلیکون حاوی NGF، شکاف عصبی به طول ۵ میلی‌متر را در موش صحرایی ترمیم نمودند و گزارش کردند که ۶ هفته پس از جراحی، سرعت هدایت عصب حرکتی (MNCV) $22/04 \pm 8/76 \text{ m/s}$ و دامنه $4/81 \pm 0/73 \text{ mv}$ می‌باشد (۱۳).

وانگ^۵ و همکاران نیز پس از له کردن (Crush) عصب سیاتیک و استفاده از NGF به طور موضعی جهت تسریع روند ترمیم، ملاحظه نمودند که MNCV چهار هفته پس از ترمیم، در گروه با NGF برابر $31/78 \pm 15/32 \text{ m/s}$ و در گروه بدون NGF، $21/5 \pm 4/82 \text{ m/s}$ می‌باشد (۲۹). لی^۶ نیز با استفاده از گرافت ورید رانی حاوی 100 ng NGF، شکاف یک سانتی‌متر از عصب سیاتیک موش صحرایی را ترمیم نمود و نتیجه گرفت که MNCV در هفته پنجم برابر با $8/6 \pm 4/7 \text{ m/s}$ است (۲۷). در تحقیق حاضر میانگین سرعت هدایت عصب حرکتی ۹۰ روز پس از ترمیم در گروه فاکتورهای رشد $21/5 \pm 4/7 \text{ m/s}$ می‌باشد. این نتایج از آن جهت حائز اهمیت است که طول شکاف عصب به یک سانتیمتر افزایش یافته است. بافت عصب در ناحیه مرکز لوله PVDF قطبی شده تشکیل می‌شود. آکسون‌ها به دلیل شارژ تولید شده توسط خاصیت پیژوالکتریک لوله PVDF به طرف مرکز لوله هدایت می‌شوند. به نظر می‌رسد که شکل عصب ترمیم یافته به خواص شیمیایی و فیزیکی کانال‌های راهنمای عصب وابسته است. هنگامی

⁴ He

⁵ Wang

⁶ Lee

¹ Kanaya

² Hare

³ PU

کشش قرار بگیرد و مجرای با قطر مورد نیاز، مطابق با قطر عصب ایجاد نماید (۲۷).

نتیجه گیری

در تحقیق حاضر نیز همانند سایر تحقیقات انجام شده مشاهده گردید که تعداد آکسون‌های میلین دار در ناحیه انتهایی محل ترمیم کمتر از ناحیه ابتدایی می‌باشد زیرا تعدادی از آکسون‌ها (به دنبال انتخاب مسیر غلط) نوروما تشکیل می‌دهند. در پیوند اتوگرافت از آنجایی که پوشش‌های اپی نورویوم و پری نورویوم سالم هستند و سلول‌های شوان به مقدار فراوان وجود دارد، علائم ترمیم نسبت به استفاده از کانال راهنمای عصب زودتر بروز می‌نماید. کانال راهنمای عصب نیازمند زمان لازم جهت تکثیر سلول‌های شوان از دو انتهای بریده عصب و مهاجرت آنها به داخل کانال می‌باشد. وجود خاصیت پیزوالکتریک و حضور فاکتورهای رشد در مسیریابی صحیح آکسون‌های ترمیم شده موثر است.

تحقیقات فراوانی در زمینه ترمیم اعصاب محیطی انجام شده، ولی هنوز سوالات زیادی بدون جواب باقی مانده است، از جمله:

الف - ترکیب ایده‌آل برای فاکتورهای تحریک کننده عصب که موجب ترمیم رشد آکسون‌ها می‌شوند، کدامند؟

ب - مقدار این فاکتورهای تحریک کننده عصب را چگونه تنظیم نماییم؟

ج - آیا می‌توانیم فاکتورهای تحریک کننده یا مهار کننده رشد عصب را در مراحل تکامل جنین بیابیم؟

د - نقش تیغه پایه در تسهیل ترمیم آکسون چیست؟

تلاش جهت پاسخ‌گویی به سوالات بالا، ضرورت انجام تحقیقات بیشتر را درباره ترمیم اعصاب نشان می‌دهد.

که از لوله PVDF جهت ترمیم عصب سیاتیک استفاده می‌کنیم، تعدادی ماکروفاژ سطح خارجی کابل عصب تازه تشکیل شده را احاطه می‌کنند. این ماکروفاژها با ایجاد بستر قلبی شکل بافت عصبی را به بافت‌های اطراف و پلی‌مر لوله مرتبط می‌کنند و از جداسازی آن جلوگیری می‌نمایند. بعلاوه با ترشح فاکتورهای رشد، سبب تقویت ترمیم عصب می‌شوند. وجود واکوئل‌های فراوان در داخل سیتوپلاسم ماکروفاژها، بیانگر عمل بیگانه خواری آنها می‌باشد، ولی هنوز سوالات زیادی در مورد اهمیت ماکروفاژها در روند ترمیم عصب وجود دارد. در تحقیق حاضر ملاحظه گردید که در گروه اتوگرافت و در مناطق ترمیم، بافت اسکار شدیدتری تشکیل می‌شود. این موضوع احتمالاً به این دلیل است، هنگامی که از لوله جهت ترمیم شکاف عصبی استفاده می‌کنیم، با توجه به محدود بودن تعداد فیبروبلاست‌ها، از تشکیل کلاژن اضافه و بافت اسکار اجتناب می‌شود. در حالیکه در ترمیم اتوگرافت، بخصوص در محل خط بخیه، بافت اسکار بیشتری ممکن است تشکیل گردد. والتاین^۱ با استفاده از لوله پیزوالکتریک شارژ شده حاوی محلول فیزیولوژیک، تعداد آکسون‌های میلین‌دار را در پایان هفته چهارم ۲۳۰۱±۲۰۶ اعلام نمود و مشاهده کرد که آکسون‌ها با شکل‌های نامنظم تشکیل می‌گردند (۶). در تحقیق حاضر ملاحظه گردید که تعداد آکسون‌های میلین دار در بخش دیستال ناحیه ترمیم کمتر از بخش پروگزیمال می‌باشد که این امر ممکن است به دو دلیل باشد، اول تعدادی از آکسون‌ها (به دنبال انتخاب مسیر غلط) نوروما تشکیل می‌دهند، دوم ممکن است زمان بیشتری جهت رشد آکسون‌ها و رسیدن آنها به انتهای کانال راهنمای عصب نیاز باشد.

پو^۲ و همکاران از ورید رانی موش صحرایی جهت ترمیم شکاف عصبی استفاده نمودند، آنها بیان داشتند که ورید می‌تواند تحت

References:

01. Chen YS, Wang-Bennett LT, Coker NJ. Facial nerve regeneration in the silicon chamber: The influence of nerve growth factor. *Exp Neurol* 1989; 103(1):52-60.
02. Evans GR. Challenges to nerve regeneration. *Semin Surg Oncol* 2000; 19(3): 312-8.
03. Hudson TW, Evans GR.D, Schmidt CE. Engineering strategies for peripheral nerve repair. *Clin Plast Surg* 1999; 26(4): 617-628.
04. Strauch B. Use of nerve conduits in peripheral nerve repair. *Hand Clin* 2000; 16(1): 123-130.

¹ Valentini

² Pu

05. Aebischer P, Valentini RF, Dario P, Domenici C, Galletti PM. Piezoelectric guidance channels enhance regeneration in the mouse sciatic nerve after axotomy. *Brain Research* 1987; 436: 165-168.
06. Valentini RF, Sabatini AM, Dario P. Polymer electret guidance channels enhance peripheral nerve regeneration in mice. *Brain Research* 1989; 480: 300-304.
07. Fine EG, Valentini RF, Bellamkonda R, Aebischer P. Improved nerve regeneration through piezoelectric vinylidene fluoride trifluoroethylene copolymer guidance channels. *Biomaterials* 1991; 12: 775-780.
08. Valentini RF, Vargo TG, Gardella JA JR, Aebischer P. Electrically charged polymeric substrates enhance nerve fiber outgrowth in vitro. *Biomaterials* 1992; 13(3): 183-90.
09. Grill RJ, Tuszynski M H. CNS regeneration, Axonal responses to injury. California: Academic Press; 1999. P. 27-52.
10. Seniuk NA. Neurotrophic factors: Role in peripheral neuron survival and axonal repair. *J Reconst Microsug* 1992; 8(5): 399-404.
11. Thoenen H, Bandtlow C, Heumann R, Lindholm D, Meyer M, Rohrer H. Nerve growth factor: Cellular localization and regulation of synthesis. *Cell Mol Neurobiol* 1988; 8(1): 35-40.
12. Slack JR, Hopkins WG, Pocket S. Evidence for a motor nerve growth factor. *Muscle Nerve* 1983; 6(4): 243-52.
13. He C, Chen Z, Chen Z. Enhancement of motor nerve regeneration by nerve growth factor. *Microsurgery* 1992; 13(3): 151-4.
14. Ernfors P, Henschen A, Olson L, Persson H. Expression of nerve growth factor receptor mRNA is developmentally regulated and increased after axotomy in rat spinal cord motoneurons. *Neuron* 1989; 2(6): 5-13 160.
15. Doubleday B, Robinson PP. The role of nerve growth factor in collateral reinnervation by cutaneous C-fibres in the rat. *Brain Res* 1992; 593 (2): 179-84.
16. Santos PM, Winterowd JG, Allen GG, Bothwell MA, Rubel EW. Nerve growth factor: Increased angiogenesis without improved nerve regeneration. *Oto Laryngol Head Neck Surg* 1991; 105(1): 12-25.
17. Chamberlain LJ, Yannas JV, Hsu HP, Spector M. Connective tissue response to tubular implants for peripheral nerve regeneration: the role of myofibroblasts. *J Comp Neurol* 2000; 417 (4): 415-30.
18. Chen ZW, Wang MS. Effects of nerve growth factor on crushed sciatic nerve regeneration in rats. *Microsurgery* 1995; 16(8): 547-51.
19. Tsai CC, Lu MC, Chen YS, Wu CH, Lin CC. Locally administered nerve growth factor suppresses ginsenoside R b1-enhanced peripheral nerve regeneration. *Am J Chin Med* 2003; 31(5): 665-73.
20. Ischii DN, Glazner GW, PU SF. Role of insulin-like growth factors in peripheral nerve regeneration. *Pharmacol Ther* 1994; 62 (1-2): 125-44.
21. Stewart HG, Weber M, Eisen A, Andersen PM. Regulation of rat schwann cell expression and DNA synthesis by insulin-like growth factors in vitro. *Eur J Neurosci* 1996; 8(3): 553-64.
22. Fortes WM, Noda EM, Liuzzi FJ, Terzis JK. End - to side neurorrhaphy: Evaluation of axonal response and upregulation of IGF-I and IGF-II in a non injury model. *J Reconst Microsurg* 1999; 15(6): 449-57.
23. Lutz BS, Wei FC, Ma SF, Chuang DC. Effects of insulin-like growth factor - I in motor nerve regeneration after nerve transection and repair VS. Nerve crushing injury in the rat. *Acta Neuro Chir (Wien)* 1999; 141 (10): 1101-6.
24. Rabinovsky ED, Draghia-Akli R. Insulin-like growth factor I plasmid therapy promotes in vivo angiogenesis. *Mol Ther* 2004; 9(1): 46-55.
25. Fernyhough P, Willars GB, Lindsay RM, Tomlinson DR. Insulin and insulin-like growth factor I enhance regeneration in cultured adult rat sensory neurons. *Brain Res* 1993; 607 (1-2): 117-24.
26. Kimpinski K, Mearow K. Neurite growth

- promotion by nerve growth factor and insulin-like growth factor-I in cultured adult sensory neurons. *J Neuroscience Research* 2001; 63: 486-499.
27. Pu LL, Syed SA, Reid M, Patwa H, Goldstein JM, Forman DL, Thomson JG. Effects of nerve growth factor on nerve regeneration through a vein graft across a gap. *Plastic and Reconstructive Surgery* 1999; 104(5), 1379-1385.
28. Bain J, Mackinnon S, Hunter D.A. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg* 1989; 83: 129.
29. Wang K, Nemeth IR, Seckel BR, Chakalis DP, Swann DA, Kuo JW, et al. Hyaluronic acid enhances peripheral nerve regeneration in vivo. *Microsurgery* 1998; 18: 270-275.
30. Kanaya F, Breidenbach WC, Firrell JC. Sciatic function index nerve conduction tests, muscle contraction, and axon morphometry as indicators of regeneration. *Plast Reconstr Surg* 1996; 98 (7): 1264-1271.
31. Hare G.M.T, Evans P.J, Mackinnon S.E, Best J.J, Bain J.R, Szalai J.P, et al. Walking track analysis: A long – term assessment of peripheral nerve recovery. *Plastic and Reconstructive Surgery* 1992; 89 (2): 251-258.

Archive of SID