Archive of SID

ارزیابی قابلیت القای تولید بافت عصبی توسط عصاره مغز گوساله جنینی در عضلات موش صحرایی

امین بیغم صادق[1*]، احمد عریان[2]، رحمت‌الله فتاحیان دهکردی[3]، هاجر صادقی‌نژاد[4]

۱.استاد، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد- شهرکرد- ایران.
۲.استاد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز- شهرکرد- ایران.
۳.استادیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد- شهرکرد- ایران.
۴.دانش‌آموخته دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد- شهرکرد- ایران.

دریافت: ۶ مهر ماه ۹۳ **پذیرش:** ۹ دی ماه ۹۴

چکیده

هدف از پژوهش حاضر بررسی توانایی عصاره خام مغز گوساله جنینی در القای شکل‌گیری سلول‌های نورونی سیستم عصبی مرکزی در بین ماهیچه‌های دیواره شکم و صفاق موش صحرایی است. در این مطالعه از ۱۰ موش صحرایی بالغ استفاده شد. خط میانی شکم ضدعفونی شد. بعد از بی‌هوشی پوست و خط سفید شکم برش داده شد و ۱ میلی‌لیتر از عصاره خام مغز تهیه شد و سپس بین صفاق و عضلات عرضی دیواره شکم تزریق گردید، در پایان پوست و خط سفید شکم به روش رایج، بخیه زده شدند. هر هفته ۲ موش صحرایی به روش انسانی کشته و نمونه‌های بافتی از محل تزریق عصاره برداشته می‌شد. رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین و ایمنوهیستوشیمی برای ارزیابی مورد استفاده قرار گرفتند. رنگ‌آمیزی اختصاصی ایمنوهیستوشیمی (Neuron Specific Enolase (NSE)) و (Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)) را مثبت نشان داد. همچنین رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین حضور سلول‌های عصبی را آشکار ساخت. عقیده بر این است که در مطالعه حاضر حضور فاکتورهای رشدِ به دست آمده از تزریق عصاره خام مغز گوساله جنینی در بین صفاق و عضلات عرضی دیواره شکم توانسته است منجر به شکل‌گیری سلول عصبی شود. اگرچه برای مطالعات پیش‌رو پیشنهاد می‌شود که از عصاره به دست آمده از پروتئین‌های اختصاصی مغز جنینی استفاده شود لیکن می‌توان القای بافت عصبی را با تکنیک‌های بیان ژنی نیز مورد بررسی قرار داد.

واژه‌های کلیدی: موش صحرایی، گوساله جنینی، عصاره مغز، القای عصبی.

مقدمه

بدیهی است که مغز و نخاع پستانداران بالغ پس از آسیب بازسازی نمی‌شوند، اما یافته‌های تازه، تجدید نظر در این اصل پذیرفته شده را اجباری کرده است. پیشرفت در شناخت ما از چگونگی رشد مغز، طرحی اولیه فراهم کرده است که منجر به امکان بازسازی مغز آسیب دیده می‌شود. مطالعات در عصب‌شناسی پیشرفته، پیام‌رسان‌های خارج سلولی و ایمنی‌شناسی مربوط به عصب، منجر شده است که زمینه بازسازی عصبی به موفقیت نزدیک‌تر شود (۸).

به دلیل ناتوانایی سلول‌های عصبی مرکزی در اتصالات صحیح آکسونی و دندریتی، آسیب به سیستم عصبی مرکزی بالغ، مخرب خواهد بود. پیامد آسیب وارده تنها یک وقفه در ارتباط بین سلول‌های عصبی سالم نیست،

* پست الکترونیک نویسنده‌ی مسؤول: dr.bigham@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

بلکه مجموعه‌ای از حوادث است که می‌تواند منجر به دگرگونی نورونی و مرگ سلول شود. برخلاف ماهیان، دوزیستان، اعصاب محیطی پستانداران و اعصاب مرکزی در حال تکامل، در سلول‌های عصبی مرکزی پستانداران بالغ آکسون‌های عملکردی پس از آسیب دوباره رشد نمی‌کنند. ناتوانی نورون‌های بالغ برای رشد دوباره پس از آسیب را نمی‌توان به طور کامل به تفاوت ذاتی بین سیستم عصبی مرکزی (Central Nervous System (CNS)) بالغ و همه دیگر سلول‌های عصبی نسبت داد. یافته‌ها نشان می‌دهد شکست در بازسازی نورون‌های CNS، تنها یک کمبود ذاتی نورون نیست، بلکه یک ویژگی از محیط پیرامونی آسیب دیده است که یا حمایت نمی‌کند و یا مانع از بازسازی می‌شود. در طی بیست سال گذشته، پیشرفت‌های زیادی در شناسایی برخی عناصر صورت گرفته است که پاسخ‌گوی تفاوت بین محیط‌های CNS بالغ و اعصاب محیطی (Peripheral Nervous System (PNS)) است (۸).

هر ساله هزاران نفر در سراسر جهان دچار آسیب‌های سیستم عصبی می‌شوند. تنها در ایالات متحده سالیانه ۵۵۰۰ نفر بر اثر آسیب‌های مغزی می‌میرند و ۸۵۰۰ نفر دچار ناتوانی‌های دائم حسی- حرکتی می‌شوند (۱۲).

نقطه مشترک همه آسیب‌های عصبی بروز ناتوانی یا کم‌توانی است که به دلیل توانایی اندک سیستم عصبی در ترمیم عصب ایجاد می‌شود و بسته به شدت آسیب و مکان آن، زندگی طبیعی فرد را متأثر می‌سازد. به این دلیل امروزه بیشتر تحقیقات پایه علوم عصب در زمینه آسیب‌های عصبی، بر بازسازی (Regeneration) عصب متمرکز شده است (۹).

با وجود چالش‌های فراوانی که در ترمیم CNS آسیب‌دیده وجود دارد، پیشرفت‌های قابل توجهی هم در وسایل تکنولوژی و هم در درک سازوکارهای پاتولوژیکی آسیب وجود دارد که اجازه توسعه مداخلات جدید را می‌دهد. در حال حاضر آزمایش‌های بالینی فراوان و امیدوار کننده‌ای برای آسیب‌های طناب نخاعی ((Spinal Cord Injury (SCI) در حال انجام است، که شامل مواردی همچون بیان مولکول‌های خنثی کننده، سلول‌های بنیادی و سلول‌های گلیال بویایی غلاف‌دار ((OEGs) (Olfactory Ensheathing Gelial) و حتی زیست‌ماده (به عنوان مثال، پلی‌اتیلن گلیکول (PEG)(Polyethylene glycol)) هستند؛ این در حالی است که جوامع علمی و پزشکی به دنبال این آزمایش‌های بالینی، بسیار شگفت‌زده شده‌اند، به راه‌کارهایی ترکیبی شامل استفاده از سلول‌ها، زیست‌ماده و پروتئین‌ها، تعهد شده است. ارائه سلول‌ها در زیست‌ماده‌های (biomaterials) مناسب ممکن است به زنده ماندن سلول اهدا کننده و در نهایت، به نتیجه بهتر منجر شود. به احتمال زیاد راه‌بردهای آینده شامل عواملی است‌که هم در بهبود حمایت عصبی و هم فراهم کردن محیط مناسب برای بازسازی، نقش خواهند داشت (۱۳).

بیماری‌های عصبی از دسته بیماری‌هایی هستند که به تازگی برای درمان با سلول‌های بنیادی، مورد توجه قرار گرفته‌اند. سرنوشت سلول‌های بنیادی که در آسیب‌های عصبی پیوند می‌شوند به دو عامل نحوه تیمار آن‌ها در محیط آزمایشگاه و ریزمحیط بافت میزبان بستگی دارد. سلول‌های بنیادی را می‌توان پس از کشت و افزایش شمار، برای پیوند به کار برد و یا آن‌ها را تحت القای عصبی قرار داده و در وضعیتی که درجات متفاوتی از القا را بپذیرند، پیوند زد (۱۴).

چندین دهه است که وجود فاکتورهای رشد در سیستم عصبی به اثبات رسیده است. در سال ۱۹۵۱ اولین فاکتور رشد سیستم عصبی، تحت عنوان فاکتور رشد نورونی (Nerve growth factor (NGF)) به صورت تصادفی کشف شد. پژوهش‌ها نشان دادد که در حین تکامل سیستم عصبی، NGF در بقای نورون‌های حسی محیطی و اعصاب سمپاتیک نقش دارد (۹).

سه دهه پس از کشف NGF، تصور عمومی بر این

www.SID.ir

Archive of SID

باور بود که نقش فاکتورهای رشد در سیستم عصبی به بقای نورون‌ها در دوران تکامل محدود است و سیستم اعصاب مرکزی افراد بالغ به این فاکتورها پاسخ نمی‌دهند. در ۱۵- ۱۰ سال گذشته، دست‌یابی به فاکتورهای رشد سیستم عصبی مرکزی افراد بالغ و نیز توانایی آن‌ها در جلوگیری از مرگ جمعیت‌های مشخص نورونی به دنبال آسیب‌های عصبی، نسبت به فرضیه قبلی متحول گردید. همچنین مشخص شد که این فاکتورها می‌توانند در تغییر برخی عملکردهای سیستم عصبی از جمله عملکرد سیناپس‌ها و میانجی‌های عصبی (Neurotransmitters) نقش ایفا کنند (۹). بنابراین فاکتورهای رشد امیدهای زیادی را در درمان آسیب‌های عصبی به وجود آورده که نه تنها امکان جبران آسیب‌های پس از رخداد آن‌ها وجود داشته باشد بلکه حتی بتوان از آن‌ها برای پیش‌گیری از آسیب عصبی استفاده کرد. همچنین با توجه به این که فاکتورهای رشد چه به صورت طبیعی و چه پس از اضافه شدن به محیط آزمایشگاه رشد آکسون‌ها را تحریک می‌کنند، می‌توان آن‌ها را به عنوان عاملی برای بازسازی اعصاب مرکزی و برقراری جریان‌های الکتریکی در CNS بالغ در نظر گرفت (۹).

مواد و روش کار

در این مطالعه تعداد ۱۰ سر موش صحرایی نر Sprague-Dawley در محدوده‌ی وزنی ۳۰۰ تا ۳۵۰ گرم انتخاب شد. برای سازگاری و تطبیق ابتدایی حیوانات، دو هفته قبل از آغاز دوره، درون قفس‌های استاندارد آزمایشگاهی برای تطبیق با محیط جدید در کلینیک دامپزشکی دانشگاه شهرکرد نگهداری شدند.

به منظور تهیه نمونه بافت مغز از گوساله جنینی با مراجعه به کشتارگاه دام شهرکرد، نخست گوساله جنینی انتخاب و تمامی بافت مغز به شکل استریل از بافت‌های اطراف جدا و خارج شد. ۲۰ گرم از کل بافت مغز پس از خرد شدن، در ظروف پلاستیکی استریل در فریز با دمای حدود ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد.

برای تهیه عصاره نخست بافت مغز فریز شده، درون هاون چینی با اضافه کردن نیتروزن مایع به شکل پودر درآمد، سپس با اضافه کردن بافر نمکی فسفات (PBS) به طور کامل یک‌دست شد. با متلاشی شدن ساختار بافتی و سلولی، محلولی غلیظ و کش‌دار به دست آمد.

بی‌هوشی با تزریق عضلانی کتامین ۴۰ *mg/kg* و آسپرومازین ۵ *mg/kg* القا شده ادامه یافت. موش‌های بی‌هوش شده روی میز جراحی در وضعیت پشتی فیکس شدند. محل جراحی مشخص و با بتادین اسکراپ و الکل ضدعفونی شد. پوست و خط سفید شکم برش داده شد و سطح داخلی دیواره شکم در معرض دید قرار گرفت. ۱ میلی‌لیتر از عصاره خام مغز تهیه شده، بین صفاق و ماهیچه‌ی عرضی دیواره شکم تزریق شد، سپس پوست و خط سفید شکم به روش رایج بخیه زده شدند.

مراقبت‌های پس از جراحی به صورت آنتی‌بیوتیک‌درمانی و با تزریق یک میلی‌لیتر انروفلوکسازین (۱۰ در صد، شرکت بایر آلمان) با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در هر کدام از موش‌های صحرایی به شکل زیرپوستی صورت گرفت.

در این مطالعه ارزیابی هیستولوژیک نیز انجام شد. این مرحله شامل تهیه لام‌های بافتی و روش رنگ‌آمیزی نمونه‌های بافتی بود. به مدت ۵ هفته، هر هفته ۲ موش صحرایی به روش انسانی کشته شد و نمونه‌های بافتی از محل تزریق عصاره برداشت و در فرمالین ۱۰ درصد نگهداری شد و برای ارزیابی بافت‌شناسی به آزمایشگاه ارسال گردید. برای ارزیابی رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین و ایمنوهیستوشیمی استفاده شد.

علاوه بر رنگ‌آمیزی هماتوکسین- ائوزین، در این مطالعه از سایر رنگ آمیزی‌های اختصاصی بافت عصب نیز استفاده شد که شامل دو روش (Neuron Specific NSE (Enolase و (Glial Fibrillary Acidic

www.SID.ir

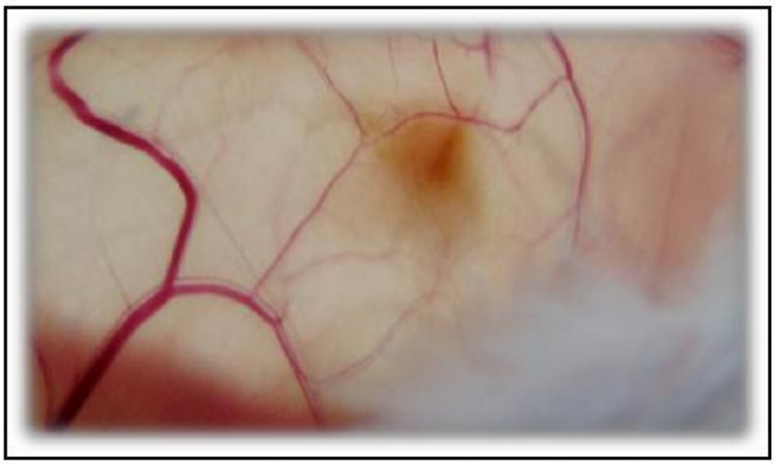
Archive of SID

GFAP(Protein Glial Fibrillary Acidic Protein) (GFAP) یک پروتئین اصلی سیتواسکلتال (Cytoskeletal) از فیلامنت‌های گلیال است. پروتئین Anti-GFAP، که یک آنتی‌بادی پلی‌کلونال به دست آمده از خرگوش است، فیلامنت‌های واسطه‌ای را در اشکال مختلف آستروسیت‌ها و بعضی از سلول‌های اپاندیمال (Ependymal) در مغز و طناب نخاعی را به رنگ قهوه‌ای مشخص می‌کند.

این آنتی‌بادی گزینه مورد استفاده برای تشخیص کیفی در آزمایشگاه، با روش‌های ایمنوهیستوشیمی (IHC) با میکروسکوپ نوری برای سلول‌های آستروسیت (Astrocyte) و اپاندیمال در بافت‌های طبیعی و نئوپلاستیک (Neoplastic) است.

نتایج

نتایج حاصل از یافته‌های ماکروسکوپیک نشان داد که عارضه چسبندگی و یا عفونت مشخصی در محل تزریق مشاهده نشد. این نتایج نیز نشان داد که در محل تزریق تغییر مختصری به رنگ کرم نمایان می‌شود (شکل ۱).



شکل ۱– محل تزریق عصاره‌ی مغز جنین گوساله (فلش سفید) در زمان برداشت نمونه، روز ۳۰

نتایج حاصل از بررسی میکروسکوپی به دو روش رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین- ائوزین و روش ایمونوهیستوشیمی مطالعه شد. شکل‌های ۲ تا ۶ مربوط به روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین و شکل ۷ مربوط به رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی است.

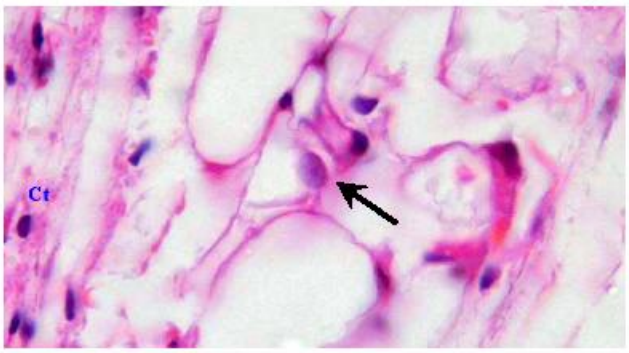
نتایج حاصل از بررسی میکروسکوپی نشان داد که در همه نمونه‌های مورد مطالعه در هفته‌های اول تا پنجم، سلول‌های عصبی در بافت عضلانی دیواره شکم آشکارا قابل مشاهده بود. هسته سلول‌های عصبی به شکل کروی تا بیضی شکل بود و در رنگ‌آمیزی معمولی به صورت تقریباً یوکروماتین تا هتروکروماتین (کم) مشاهده می‌شدند همچنین هستک مرکزی در برخی از نمونه‌ها به ویژه در هفته‌های دوم (شکل ۲) و چهارم (شکل ۴) به خوبی مشخص بود. این هسته‌ها در اندازه‌های متنوع بسته به اندازه‌ی جسم سلولی در دیوراه عضلانی شکم مشاهده گردیدند. در اطراف سلول‌ها بافت هم‌بندی سست به رنگ ائوزینوفیل آشکارا دیده می‌شد. بافت عضلانی صاف دیواره‌ی شکم در برخی مقاطع بافتی قابل مشاهده بود (شکل ۵). علاوه بر آن سلول‌های آماسی نیز در بافت هم‌بند اطرافی وجود داشت و بخش بیشتری از ساختار بافتی مقطع عرضی را به خود اختصاص می‌داد.

یافته‌های به دست آمده از ارزیابی ایمونوهیستوشیمی

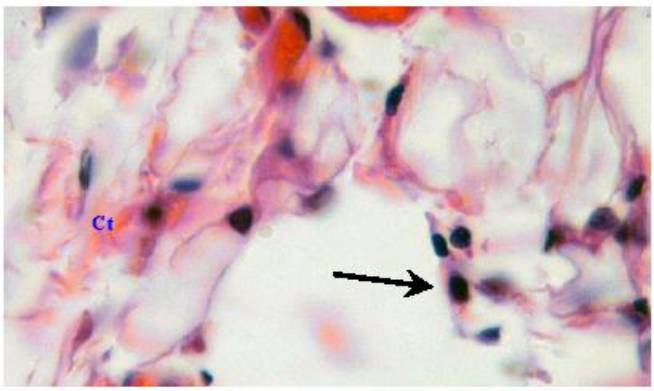
www.SID.ir

Archive of SID

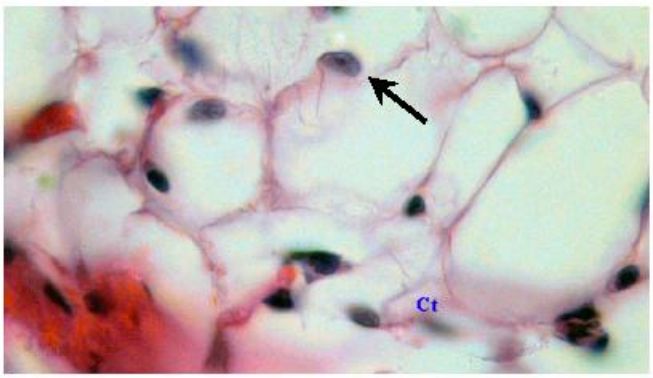
در پژوهش حاضر، نشان داد که پس از تزریق عصاره مغز جنین گوساله در دیواره شکم هسته سلول عصبی در بافت هم‌بند زمینه، به رنگ قهوه‌ای تیره از سایر بافت‌های اطراف به خوبی مجزا شده است؛ هسته تقریباً بیضی شکل است (شکل ۷) و به واسطه رنگ‌پذیری ایمونوهیستوشیمی، ماهیت این سلول از سلول‌های اطراف تأیید می‌گردد.



شکل ۲- ساختار بافتی دیواره شکم؛ هفته‌ی اول بعد از تزریق عصاره مغز جنین گوساله؛ هسته سلول عصبی (فلش مشکی) در بافت هم‌بند (Ct) مشاهده شود؛ هسته‌ای تا حدودی بیضی‌شکل که هستک کوچکی را دربرگرفته است (هماتوکسیلین- ائوزین، ۱۰۰×).



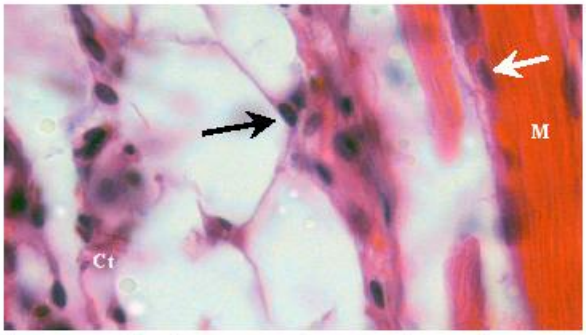
شکل ۳- ساختار بافتی دیواره شکم؛ هفته دوم بعد از تزریق عصاره مغز جنین گوساله؛ هسته سلول عصبی (فلش مشکی) در بافت هم‌بند (Ct) آشکارا قابل تشخیص است. هسته‌ای تا حدودی بیضی‌شکل (کمی کشیده) که تقریباً رنگ هماتوکسیلین بیشتری به خود گرفته است (هماتوکسیلین- ائوزین، ۱۰۰×).



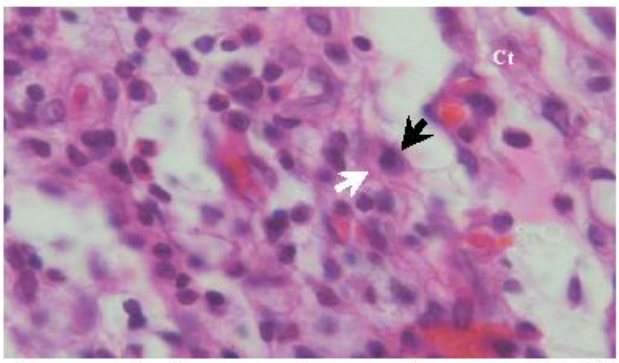
شکل ۴- ساختار بافتی دیواره شکم؛ هفته‌ی سوم بعد از تزریق عصاره مغز جنین گوساله؛ هسته سلول عصبی (فلش مشکی) در بافت هم‌بند اطرافی (Ct) کاملاً مشخص است. هسته‌ای تقریباً بیضی‌شکل با هستک مشخص در مرکز هسته مشاهده می‌گردد (هماتوکسیلین- ائوزین، ۱۰۰×).

www.SID.ir

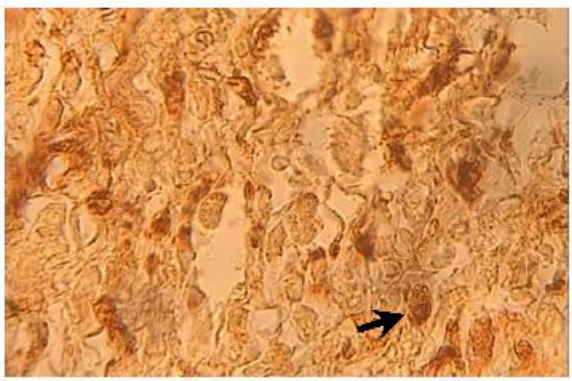
Archive of SID



شکل ۵- ساختار بافتی دیواره شکم؛ هفته چهارم بعد از تزریق عصاره مغز جنین گوساله؛ هسته‌ی سلول عصبی (فلش مشکی) در بافت هم‌بند اطرافی (Ct) کاملاً مشخص است. هسته‌ای تقریباً بیضی شکل کمی هتروکروماتین قابل تشخیص است. ساختار بافتی سلول عضلانی صاف (M) با هسته‌های دوکی‌شکل و کسشیده (فلش سفید) در مقطع عرضی برش کاملاً مشخص است (هماتوکسیلین- ائوزین، ۱۰۰×).



شکل ۶- ساختار بافتی دیواره شکم؛ هفته پنجم بعد از تزریق عصاره مغز جنین گوساله؛ هسته سلول عصبی (فلش مشکی) در بافت هم‌بند اطرافی (Ct) کاملاً مشخص است. هسته‌ای تا حدودی کروی شکل قابل تمایز است، با رنگ‌آمیزی معمولی تا حدی دیواره جسم سلولی مشخص شده است ("پلاسمالما"، فلش سفید)، (هماتوکسیلین- ائوزین، ۱۰۰×).



شکل ۷- ساختار بافتی دیواره شکم؛ هفته پنجم بعد از تزریق عصاره مغز جنین گوساله؛ هسته سلول عصبی (فلش مشکی) از بافت‌های اطرافی کاملاً مجزا گردیده است. هسته‌ای تقریباً کروی شکل بوده قابل تمایز است و با این روش ماهیت آن مورد تأیید است (ایمونوهیستوشیمی، ۱۰۰×).

بحث

نورون‌ها از جمله سلول‌های انتهایی هستند، بدین معنی که پس از بلوغ دیگر قادر به تقسیم سلولی نیستند، از این‌رو آسیب به این سلول‌ها بسته به نوع نورون آسیب‌دیده می‌تواند موجب ناتوانی دائم حسی یا حرکتی گردد، به این منظور تلاش برای دست‌یابی به راه‌کارهایی

www.SID.ir

Archive of SID

برای بهبود ترمیم عصبی در حال انجام است. ویژگی القای استخوان‌سازی در کاشت بین‌ماهیچه‌ای پودر صفحه رشد جنینی ما را بر آن داشت تا توانایی القای عصب، با مغز جنینی را بررسی کنیم (۳).

یافته‌های تازه در زمینه جنبه‌های مولکولی فرایند القای عصبی در بدن، ایده تقلید این فرایندها با سلول‌های بنیادی در محیط آزمایشگاه را ارائه کرده است. برای القای عصبی سلول‌های بنیادی می‌توان از القاگرهای سنتتیک استفاده و یا سلول‌های بنیادی را همراه با بافت‌های عصبی کشت کرد؛ هم‌کشتی (Co-Culture) (۱۰). یکی از نخستین رده‌هایی که به دنبال القای سلول‌های بنیادی جنینی در آزمایشگاه به دست آمد، رده عصبی بود. Evans و همکاران در سال ۱۹۸۱ سلول‌های بنیادی را به چند رده از جمله رده عصبی متمایز کردند (۶). Darmon و همکاران در سال ۱۹۸۲ با حذف سرم از محیط کشت، تمایز عصبی را در رده سلولی کارسینومایی جنینی کردند (۴)؛ از آن پس تلاش‌های گسترده‌ای برای تمایز انواع سلول‌های بنیادی به رده‌های عصبی صورت گرفت.

در مطالعه حاضر مشخص شد که در همه هفته‌های مورد مطالعه و در تمام نمونه‌ها، وجود سلول عصبی در بین عضلات دیواره شکم کاملاً مشهود بود. این نتایج نشان داد که با تزریق عصاره مغز جنین گوساله و پیگیری آن در مدت ۵ هفته بعد از تزریق، وجود سلول‌های عصبی با رنگ‌آمیزی معمول مورد تأیید قرار گرفت. با توجه به اینکه نیاز به تشخیص تفریقی و تأیید وجود ماهیت اصلی سلول‌های عصبی در بافت عضلانی دیواره شکم خصوصاً در بین دو لایه عضلات حلقوی داخلی و طولی خارجی بود، با روش تفریقی ایمونوهیستوشیمی این موضوع محقق شد و وجود آن‌ها اثبات گردید.

Hemmati و همکاران در سال ۱۹۹۴، Anderson و همکاران در سال ۲۰۰۲ به ترتیب پیام‌های بازدارنده ناگین (Noggin)، فولیستاتین (Follistatin) و کوردین (Chordin) را کشف کردند (۱ و ۷). این پروتئین‌ها با سازمان دهنده (organizer) ساخته می‌شوند و به عنوان آنتاگونیست‌های سیگنالینگ ((BMPs (Bone Morphogenic Proteins) عمل می‌کنند. بر اساس این مدل، سلول‌های اکتودرمی زمانی که (به دلیل وجود سیگنال‌های بازدارنده ناگین، کوردین، فولستاتین) سیگنال‌های BMPs را که با بخش شکمی بلاستولا (اندودرم) ترشح می‌شود دریافت نکنند، سرنوشت عصبی پیدا می‌کنند؛ لیکن در صورت دریافت BMPs، این سلول‌ها به اپیدرم تمایز می‌یابند. پژوهش‌های بیشتر نشان داد که برای دستیابی به سرنوشت عصبی، تنها ممانعت از سیگنالینگ BMP کافی نیست و نقش فاکتورهای دیگر از جمله فاکتور رشد فیبروبلاستی FGF (Fibroblast Growth Factor) و SHH (Sonic Hedgehog) قابل توجه است (۱).

Streit و همکاران در سال ۲۰۰۰ نشان دادند که مهار سیگنالینگ FGF در جنین دوزیستان و جوجه، القای عصبی را به طور کامل مهار می‌کند؛ همچنین چند گروه پژوهشی از جمله Lamb و همکاران در سال ۱۹۹۳، نشان دادند که FGF می‌تواند به طور مستقیم سرنوشت عصبی را در جنین دوزیستان و جوجه القا کند؛ اما بیشتر عقیده بر این است که این موضوع در مورد جنین مهره داران درست نیست؛ یعنی گرچه FGFs در القای عصبی نقش دارد اما به طور مستقیم قادر به القای عصب نیست. دو عضو از شناخته شده‌ترین فاکتورهای رشد فیبروبلاستی عبارتند از: bFGF و FGF8 (۱۱ و ۱۵).

در مطالعه حاضر از عصاره خام مغز جنینی استفاده شد و در بعضی روزها شواهدی بر شکل‌گیری سلول‌های مغزی مشاهده گردید می‌توان احتمال داد که این شکل‌گیری می‌تواند به دلیل حضور پروتئین‌های القا کننده عصبی در عصاره مغز دانست لیکن برای اثبات قطعی این پروتئین‌ها نیاز به خالص‌سازی این پروتئین‌ها در عصاره مذکور است که البته در این مطالعه خالص‌سازی انجام

www.SID.ir

Archive of SID

نگرفته است.

Davies و همکاران در سال ۱۹۹۷ با تکنیک پیوند میکروسکوپی، محلولی از نورون‌ها و سلول‌های اقماری از گانگلیون ریشه پشتی جنین موش صحرایی را به مغز یک موش صحرایی بالغ تزریق کرده و نتیجه آن مشاهده تعداد قابل ملاحظه‌ای آکسون بازسازی شده و الحاق سریع آن‌ها به ناحیه گلیال میزبان با روش ایمنوهیستوشیمی بود (۵). این مطالعه می‌تواند نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر را بیشتر تقویت کند؛ چرا که از بافت جنینی برای پیوند استفاده شده و اثرات مثبت آن را گزارش کرده‌اند.

Behnam-Rasouli و همکاران در سال ۲۰۰۱ برای ارزیابی اثرات تجویز موضعی عصاره استخراج شده از مغز جنین بر روی عصب محیطی آسیب‌دیده، ۱۵ موش صحرایی ویستار (Wistar) را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه عصاره حاصله از جنین موش صحرایی در اطراف عصب سیاتیک آسیب دیده در عضلات اطرافی تزریق شده بود. نتایج پژوهش مذکور نشان داد که تجویز عصاره استخراج شده به شکل چشم‌گیری سرعت بازسازی عصب سیاتیک را در مرحله ابتدایی دوره ترمیم، بهبود می‌بخشد (۲). چنان که پیداست مشهود است نتایج این پژوهش مجدد با نتایج بهنام- رسولی حاکی از قدرت القاکنندگی عصبی عصاره مغز جنینی را به اثبات می‌رساند.

چندین دهه است که وجود فاکتورهای رشد در سیستم عصبی به اثبات رسیده است. فاکتورهای رشد، امیدهای زیادی را در درمان آسیب‌های عصبی به‌وجود آوردند که نه تنها امکان جبران آسیب‌های پس از وقوع آن‌ها وجود دارد بلکه از آن‌ها می‌توان برای پیش‌گیری از آسیب‌های عصبی بهره برد (۹).

تاکنون حدود ۳۰ فاکتور رشد عصب شناسایی شده‌اند، از جمله انواع نوروتروفین‌ها، فاکتورهای رشد سایتوکینی، فاکتورهای رشد فیبروبلاستی، فاکتورهای رشد شبه انسولینی، فاکتورهای رشد خانواده TGF-β، فاکتور رشد اپیدرمی و سایر فاکتورهای رشد که به تفصیل در بخش کلیات بررسی شدند. نقش این فاکتورها در جریان تکامل سیستم عصبی به اثبات رسیده است (۹).

در مطالعه حاضر عصاره‌ی خام از جنین ۴/۵ ماهه گوساله تهیه و بین عضلات و صفاق موش صحرایی تزریق گردید، در بررسی میکروسکوپی سلول‌هایی مشابه سلول عصبی در لام‌های تهیه شده با رنگ‌آمیزی H&E دیده شد. به منظور تأیید نهایی یافته‌های جدید، روش ایمنوهستوشیمی مورد استفاده قرار گرفت؛ که شامل دو نوع رنگ‌آمیزی GFAP و NSE (مثبت) بود؛ لیکن پیشنهاد می‌شود برای اطمینان بیشتر در مطالعات بعدی از تکنیک‌های تشخیصی نظیر بیان ژنی بهره جست تا یافته‌ی جدید علمی تأیید شود. نتیجه جالب توجه دیگری که طی در این مطالعه به دست آمد این بود که در هیچ‌یک از موش‌های صحرایی واکنش آماسی مزمن گرانولوماتوزی دیده نشد و این دلیل بر آن است که زیست‌ماده تهیه شده از مغز جنین خنثی است و ایجاد واکنش آماسی نمی‌کند.

منابع

1- Anderson, R.M; Lawrence, A.R; Stottmann R.W; Bachiller, D. and Klingensmith, J; Chordin and noggin promote organizing centers of forebrain development in the mouse. Development; 2002; 129: 4975-4987.

2- Behnam-Rasouli, M; Nikravesh, M; Mahdavi-Shahri, N. and Fazel, A.R; The effects of local fetal brain extract administration on the electromyogram of crushed sciatic nerve in rat. Iranian Biomedical

www.SID.ir

Archive of SID

1994; 77: 283-295.

8- Horner, P.J. and Gage, F.H; Regenerating the damaged central nervous system. Nature; 2000; 407: 963-970.

9- Joghtai, M. and Nikbakht, F; Central nervous system healing. 1 ed: University of Social Welfare and Rehabilation Sciences Publisher, Iran; 2003; pp: 1-140.

10- Keirstead, H.S; Stem cell transplantation into the central nervous system and the control of differentiation. Journal of Neuroscience Research; 2001; 63: 233-236.

11- Lamb, T.M; Knecht, A.K; Smith W.C; Stachel, S.E; Economides, A.N; Stahl, N; Yancopolous G.D. and Harland R.M; Neural induction by the secreted polypeptide noggin. Science (New York, NY); 1993; 262: 713.

12- Moscato, B.S; Trevisan, M. and Willer, B.S; The prevalence of traumatic brain injury and co-occurring disabilities in a national household survey of adults. Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences; 1994; 6: 134-134.

13- Shoichet, M.S; Tate, C.C; Baumann, M.D. and LaPlaca, M.C; Strategies for Regeneration and Repair in the Journal; 2001; 5: 73-77.

3- Bigham, A.S; Shadkhast, M; Bigham Sadegh, A; Shafiei, Z; Lakzian, A. and Khalegi, M.R; Evaluation of osteoinduction properties of the demineralized bovine foetal growth plate powder as a new xenogenic biomaterial in rat. Research in Veterinary Science; 2011; 91: 306-310.

4- Darmon, M; Stallcup, W.B. and Pittman, Q.J; Induction of neural differentiation by serum deprivation in cultures of the embryonal carcinoma cell line 1003. Experimental cell research; 1982; 138: 73-78.

5- Davies, S.J.A; Fitch, M.T; Memberg, S.P; Hall, A.K; Raisman, G. and Silver, J; Regeneration of adult axons in white matter tracts of the central nervous system. Nature; 1997; 390: 680-683.

6- Evans, M.J; and Kaufman, M.H; Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature; 1981; 292: 154-156.

7- Hemmati-Brivanlou, A; Kelly, O.G. and Melton, D.A; Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity. Cell;

www.SID.ir

Archive of SID

Injured Central Nervous System In: Reichert W.M, ed. Indwelling Neural Implants, Strategies for Contending with the In Vivo Environment, Frontiers in Neuroengineering. North Carolina: Taylor & Francis Group, LLC, 2008; pp: Part IV.

14- Silva, G.V; Litovsky, S; Assad, J.A.R; Sousa, A.L.S; Martin, B.J; Vela, D; Coulter, S.C; Lin, J; Ober, J. and Vaughn, W.K, Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. Circulation, 2005; 111: 150-156.

15- Streit, A; Berliner, A.J; Papanayotou, C; Sirulnik, A. and Stern C.D; Initiation of neural induction by FGF signalling before gastrulation. Nature, 2000; 406: 74-78.

www.SID.ir

Archive of SID

Evaluation of nervous system regeneration induction properties of calf fetal brain extract in abdominal muscles in rat model

Bigham-Sadegh, A.[1*]; Oryan, A.[2]; Fatahian-Dehkordi, R.[3]; Sadeghinezhad, H.[4]

1. Professor, Department of Veterinary Surgery and Radiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
2. Professor, Department of Veterinary Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz- Iran.
3. Assistant Professor, Department of Veterinary Histology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
4. DVM, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.

Recieved: 28 September 2014 ***Accepted:*** 30 December 2015

Summary

In the present study we investigate the properties of calf foetal brain pure extract on induction of CNS neuronal cells regeneration between the abdominal wall muscles and peritoneum of rat model.Ten adult rats were used in this study. Ventral abdominal midline was clipped and prepared aseptically for surgery. Anaesthesia was induced and maintained with ketamin 40 mg/kg and acepromazine 5 mg/kg with intramuscular injection. Skin and linea alba was incised and medial aspect of abdominal wall was exposed. 1 ml of prepared brain pure extract was injected between peritoneum and transverse muscle layer. Linea alba and skin incision were sutured routinely. Every week for a long of 5 weeks 2 rats were euthanized and samples included injection sites were harvested and stored in 10% formalin and referred to histopathological evaluation. Immunohistochemistry and H&E staining techniques were used for evaluations. In all specimens immunohistochemistry showed positive results for Neuron Specific Enolase and Glial Fibrillary Acidic Protein. Also, H&E staining revealed the presence of neuronal cells in the injected site. Recent studies showed that growth factors play important roles in evolution of central nervous system and also in response to injury. These growth factors include fibroblastic growth factor, insulin like growth factors and transforming growth factor- alpha. We proposed that there are many growth factors in feotal brain pure extract that lead to neuronal cell formation between muscles and peritoneum of rats. It is suggested that in further studies, induction of neuronal cell formation should be detected with gene expression.

Keywords: Nervous system regeneration, Fetal brain extract, Rat model.

* Corresponding Author E-mail: dr.bigham@gmail.com

www.SID.ir