فصلنامه (علمی)

زیست شناسی تکوینی

سال چهاردهم، شماره ۴، پاییز ۱۴۰۱ ص.۲۸-۱۹

مقاله پژوهشی

تاثیر سلول‌های استرومایی بند ناف و عصاره کاسنی بر روند ترمیم عصب سیاتیک قطع شده در موش صحرایی نر نژاد ویستار (مطالعه رفتاری و الکتروفیزیولوژی)

امیرحسین فضلعلی[۱*]، نسیم حیاتی رودباری[۲]، غلامرضا کاکا[۳]، کاظم پریور[۴]، سید همایون صدرایی[۵]

[۱] دانشجوی دکتری زیست شناسی سلولی تکوینی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران

[۲] دانشیار گروه زیست شناسی سلولی تکوینی دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران

[۳] استاد گروه آناتومی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بقیه اله، تهران، ایران

[۴] استاد گروه زیست شناسی سلولی تکوینی دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران

[۵] دانشیار گروه آناتومی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بقیه اله، تهران، ایران

[*] (نویسنده مسئول مکاتبات): ahfazlali@yahoo.com

تاریخ دریافت: تیر ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: دی ۱۴۰۰

چکیده

این مطالعه اثر درمانی سلول‌های خون بند ناف همراه عصاره کاسنی بر ترمیم عصب سیاتیک قطع شده موش صحرایی نر نژاد ویستار توسط بررسی رفتاری، الکتروفیزیولوژی ارزیابی شد. بعدِ قطع عصب سیاتیک، موش‌های صحرایی نر در ۴ گروه ۷ تایی تقسیم شدند. رت‌های سالم، رت‌هایی قطع عصب سیاتیک بدون مداخله درمانی، رت‌هایی با سلول‌های خون بند ناف همراه عصاره کاسنی در محل قطع عصب، رت‌هایی با تزریق سلول‌های خون بند ناف در محل آسیب درمان شدند. میزان بهبودی بوسیله فعالیت حسی حرکتی عصب سیاتیک، مطالعات الکتروفیزیولوژی ارزیابی گردید. ارزیابی حرکتی عصب سیاتیک، گروه کنترل بازگشتِ حالت طبیعی در هفته هشتم مشاهده نشد، گروه سلول درمانی همراه عصاره کاسنی در هفته هشتم ترمیم شد. میزان AMP هفته هشتم بعدِ ترمیمِ گروه سلول درمانی با شیب ملایم نشانه روند بهبودی گروه سلول درمانی است. شمارش تعداد رشته‌های عصبی در سطحی برابر ۱۰۰۰ میکرومتر مربع، تعداد رشته‌های عصبی گروه‌های سلول درمانی هفته هشتم بعد ترمیم، مقایسه با گروه کنترل و گروه غشاءPLGA افزایش داشت. پایان هفته هشتم شاخص فعالیت حسی عصب سیاتیک (تست Hot Plate)، روند ترمیم گروه سلول درمانی همراه عصاره کاسنی به سایر گروه‌ها مشهودتر بود. پیوند سلول خون بند ناف سبب ترمیم عصب سیاتیک و عصاره کاسنی همراه سلول‌های خون بند ناف موجب تسریع ترمیم عصب سیاتیک می‌شود.

کلیدواژه‌ها: سلول‌های خون بند ناف، عصاره کاسنی، عصب سیاتیک، موش صحرایی.

مقدمه

عوارض جبران ناپذیر آسیب به سیستم اعصاب محیطی، از مشکلاتی است که جوامع بشری اعم از صنعتی و غیرصنعتی، با آن مواجهند [۱]، که باعث تحمیل هزینه‌های بالا و از دست رفتن کارایی فرد می‌شود [۲].

این آسیب از شایع‌ترین آسیب‌ها در جوامع امروزی است.

آسیب اعصاب محیطی یک مسئله کلینیکی است که ممکن است منجر به نقص عملکرد عضو در طولانی مدت شود [۳].

با وجود پیشرفت‌هایی که در تکنیک‌های جراحی‌های کوچک صورت گرفته است، نتیجه عملکردی ضربه‌های اعصاب محیطی به ندرت رضایت بخش بوده است و نیازمند پژوهش‌های گسترده برای بهبود روش‌های ترمیم است. مدل عصب سیاتیک موش صحرایی به طور گسترده برای ارزیابی ترمیم اعصاب محیطی مورد استفاده بوده است و روش‌های ارزیابی متعددی با توجه به ترمیم برای آن توصیف شده اند که انتخاب آن برای پژوهش گر بسیار تعیین کننده است.علت انتخاب عصب سیاتیک به این دلیل بوده که ترمیم عصب سیاتیک کارا و سریع می‌باشد و علاوه بر این روشی نسبتاً ارزان محسوب می‌شود. در واقع انتخاب مدل عصب سیاتیک به عنوان عصبی با عملکرد ترکیبی علاوه بر امکان تکرار آسیب‌هایی که در اعصاب انسان ایجاد می‌شود، زمینه‌ای برای ارزیابی ترمیم با تکنیک‌های متعدد می‌باشد [۴].

از اصول اساسی علوم اعصاب برای چندین دهه این بوده است که سیستم عصبی محیطی بدنبال آسیب قادر به بازسازی خود است در صورتی که سیستم عصبی مرکزی این ظرفیت را ندارد. در سیستم اعصاب مرکزی به علت وجود فاکتورهای بازدارنده و مهاری که توسط سلول‌های پشتیبان اعصاب مرکزی ترشح می‌شود، ترمیم اکسون‌ها پس از چنین ضایعاتی متوقف می‌گردد. چنین فاکتورهای بازدارنده‌ای را در سیستم اعصاب محیطی کمتر می‌توان یافت به همین علت پتانسیل ترمیم نسبتا بالایی را در اکسون‌های سیستم اعصاب محیطی می‌توان مشاهده کرد. توانایی خاص اعصاب محیطی برای رشد دوباره به سمت هدف به خصوصیت بازسازی گلیای آن یعنی سلول شوان بر می‌گردد. اعصاب محیطی بالغ فاقد جمعیت سلول بنیادی برای تولید گلیای جدید هستند. به جای آن سلول‌های شوان بالغ تمایز یافته دارای درجه بالای پلاستیسیتی در طول زندگی بالغ بوده و با ایجاد آسیب، غلاف میلین را از دست داده و با تمایززدایی به حالت مشابه سلول‌های بنیادی یا پروژنیتور بر می‌گردند [۵].

سلول‌های شوان تمایز زدایی شده، به دو دلیل، کلید ترمیم عصب هستند. اول اینکه آنها جای بافت آسیب دیده یا از بین رفته را پر می‌کنند. دوم اینکه آنها با ایجاد محیط مناسب برای رشد دوباره آکسون به پاکسازی مواد زائد میلین کمک کرده و مسیری را برای رشد سلولی ایجاد می‌کنند که به نام مسیر بونگر خوانده می‌شوند که آکسون را به سمت هدف شان هدایت می‌کنند [۶].

عوارض این آسیب‌ها به عنوان یک مشکل کاملا جدی در جراحی ترمیمی است. هدف اصلی در درمان ضایعاتی که باعث قطع کامل اعصاب محیطی شده‌اند برقراری مجدد امتداد عصب است تاعصب قادر به رشد مجدد به سمت بخش دیستال و برقراری ارتباط فیزیولوژیک با این بخش باشد [۷].

بهبودی اعصاب آسیب دیده روند پیچیده ای است که توسط فاکتورهای موضعی و سیستمیک مختلفی تنظیم می‌شود. ظرفیت بالای ترمیم آکسونی در PNS آنرا از CNS متمایز میسازد. محیطی که در آن آکسون‌های PNS ترمیم میشوند حاوی سلول‌های شوان و غشا پایه آنها ـ فیبروبلاست‌ها ـ کلاژن و سلول‌های فاگوسیتیک است [۸].

دانشمندان دریافتند که در طول تکوین در سلول‌های شوان ژن‌هایی بیان می‌شوند که همان ژن‌ها پس از آسیب عصب نیز بیان می‌گردند و به این نتیجه رسیدند که احتمالا روند ترمیم عصب خلاصه ای از روند تکوین آن است [۷].

سلول‌های بنیادی سلول‌هایی هستند که قادر به بازسازی خود و انواعی دیگر از سلول‌ها می‌باشند. این سلول‌ها از لحاظ منشا تولید دارای انواع گوناگونی هستند که از آن جمله می‌توان به سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی بالغ نام برد.

اگر چه مغز استخوان منبع اصلی سلول‌های بنیادی مزانشیمی است اما به دلیل امکان تهاجمی بودن جداسازی آن، بروز عفونت‌های ویروسی و کاهش قابلیت تکثیر و تعداد سلول‌های بنیادی با افزایش سن فرد، استفاده از آن با محدودیت روبه رو است [۹].

در سال‌های اخیر بند ناف انسان، اندامی که پس از تولد به دور انداخته می‌شود، مورد توجه فراوانی قرار گرفته است. سلول‌های بنیادی موجود در بند ناف انسان از نوع چند توان بوده، قدرت تکثیر زیاد و ظرفیت خود نوزایی داشته وحد واسط سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی بالغ هستند [۱۰]. برای اولین بار در سال ۲۰۰۶ سلول‌های بنیادی از ژله وارتون بند ناف انسان جداسازی و تخلیص شد [۱۰]. یک سال بعد محققین توانستند سلول‌های بنیادی مزانشیمی را از ماتریکس بند ناف اسب جدا ساخته و به سلول‌های عصبی تمایز دهند [۱۱]. نشان

داده شده که سلول‌های بنیادی بند ناف، مولکول‌های نوروتروفیکی مثل فاکتور رشد عصب، فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز و فاکتور نوروتروفیک سیلیاری را ساخته و ترشح می‌کنند [۱۲].

Cichorium intybus به عنوان کاسنی شناخته شده است، یک گیاه چند ساله از خانواده Asteraceae است. که در سال‌های اخیر، علاقه رو به رشدی با توجه به اقدام دارویی گسترده کاسنی در پرورش آن وجود دارد، ازجمله خواص ضدباکتری، ضد التهاب، آنتی اکسیدان، ضدکبدی، ضدتومور، ضد هیپرلیپیدمی، اثرات کاهنده قندخون وغیره را می‌توان نام برد [۱۳-۱۷].

کاسنی متعلق به گروه دارویی phytoconstituents است، که به‌طور عمده متعلق به آلکالوئیدها، اسید فنولیک، ترپن لاکتون، ترکیبات آلیفاتیک و مشتقات آنها، فلاونوئید، و کلاس‌های پلی‌ساکارید، و غیره می‌باشد [۱۸-۱۹].

از لحاظ تاریخی، کاسنی توسط مصریان باستان به عنوان یک گیاه دارویی مورد استفاده بوده است [۱۸]. امروزه برگ و ریشه آن هم مورد استفاده قرار می‌گیرد.

مطالعات ثابت کرده است که خواص درمانی فراوان کاسنی دلیل اصلی استفاده این گیاه در اکثر نقاط جهان هم به عنوان یک غذای گیاهی و هم به عنوان داروی گیاهی می‌باشد [۲۰].

به عنوان مثال، در هند، عصاره کاسنی برای درمان اختلالات کبدی، نقرس و روماتیسم مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۸].

در تحقیقات ساختار فیتوشیمیایی، مشخص شدکه برگ کاسنی دارای مقادیر بالایی از فلاونوئیدها و اسیدهای فنلی می‌باشد. غربالگری فیتوشیمیایی حضور تانن، ساپونین، فلاونوئیدها، در برگ‌های این گیاه را تایید می‌کند [۲۱].

مطالعات بر روی موش نشان داده است که C. intybus دارای خواص مفیدی در سم زدایی از کبد و فعالیت ضد دیابت است [۲۲].

همچنین گزارش شده است که C. intybus دارای خاصیت ضد باکتری [۲۱]، و ضد التهابی است [۲۳].

مواد و روش کار:

در این تحقیق از ۲۸ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار به وزن ۲۵۰-۲۳۰ گرم استفاده شد که از انستیتو پاستور تهران تهیه شدند.حیوانات به صورت تصادفی به ۴ گروه کنترل، نرمال، گروه سلول درمانی و گروه سلول درمانی به همراه عصاره کاسنی تقسیم گردیدند. در مدت تحقیق حیوانات در حیوان خانه دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات در شرایط نور، آب، غذای مناسب و قفس‌های پلاستیکی نگهداری شدند. در این تحقیق تمامی اصول اخلاقی کار با حیوان بر اساس ویژه نامه علمی اخلاق پزشکی دانشگاه بابل و مقالات اخلاق در پزشکی و کار با حیوان چاپ شده در SID ازجمله مقاله مباشر و همکاران [۲۴] رعایت شده است.

آماده کردن حیوان آزمایشگاهی:

مشاهده پلاك موکوسی (پلاك واژ نی یا پلاك تاریخ گذاری) در ابتدای واژن روز صفر در نظر گرفته و موش‌های حامله در روزهای آخر، به طور معمول بالای روز ۱۸، جراحی و جنین‌ها بیرون آورده شدند.

- جدا کردن سلول‌های بنیادی استرومای بندناف و کشت اولیه آنها:

۱- جنین‌ها در داخل پتری دیش استریل حاوی محلول Dissection Balanced salt solution (DBSS) قرارگرفتند.

۲- بندناف‌ها تا حد امکان به قطعه‌های ۳ میلی‌متری قطعه قطعه شدند و قطعه‌های ریز شده به پتری دیش حاوی Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) (BI.R.D Baharafshan) منتقل گردیدند.

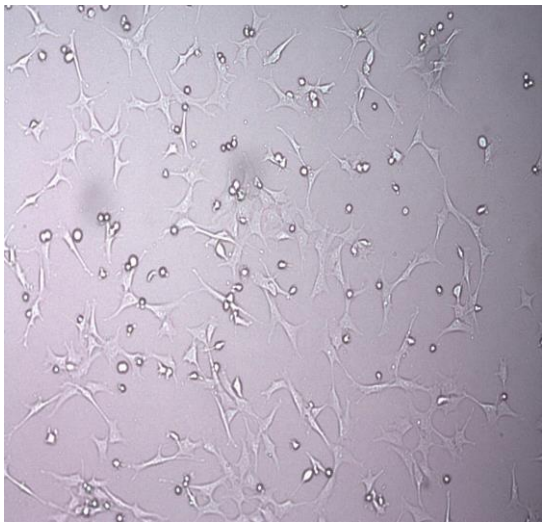
۳- ۲ سی سی محلول آنزیم کلاژناز (Sigma-Aldrich, St IA Louis, USA) بر روی تکه‌های بافت ریخته شد و بعد از۵ دقیقه عمل پیپت کردن Pipetting انجام گرفت (جدا کردن مکانیکی سلول‌ها).

۴- سلول‌ها با غلظت‌های 105 ×2 سلول در هر سانتی‌متر مربع (۱۰۶ ×۵ سلول در یك فلاسك T- 25) از فلاسك T-25 (Greiner bio-one) بدون پوشش پلی- D - لیزین حاوی محیطکشت Dulbecoo's Modified Eagle's Medium (DMEM) و دارای L-glutamine و سدیم بی‌کربنات (Sigma-Aldrich, St Louis,

(USA) و یك درصد پنی‌سیلین/ استرپتومایسین (Gibco) بهمراه ۱۰ درصد Sigma- Fatal bovine serum (FBS) (Aldrich, St Louis, USA) کشت داده شدند و فلاسك‌های کشت در انکوباتور دارا ی رطوبت و با 5% CO_2 و دمای ۳۷°c نگهداری شدند.

شناسایی سلول‌های بنیادی در محیط کشت:

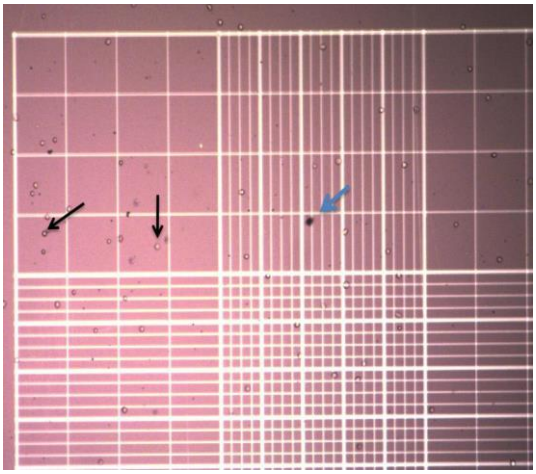
در این مطالعه بعد از پاساژ اول، از کیت شناسایی برای (CHEMICON) فعالیت آلکلین فسفاتازی نشان دادن سلول‌های بنیادی تمایز نیافته استفاده گردید. (شکل ۱).



شکل ۱. تصویر میکروسکوپی سلول‌های خون بند ناف ۲۴ ساعت بعد از پاساژ ۲ .(بزرگنمایی ۱۰۰)

طریقه شمارش سلول‌های BMSC در سوسپانسیون حاوی سلول‌های BMSC به کمک لام نئوبار:

با استفاده از سمپلر مقدار ۱۰ لاندا از سوسپانسیون حاوی سلول BMSC برداشته و با ۱۰ لاندا تریپان بلو ترکیب شده .سپس ۱۰ لاندا از محلول بدست آمده جهت شمارش سلولی در زیر لام نئوبار قرار گرفت، سلول‌ها در هر ۴ مربع ۱۶ خانه ای لام نئوبار شمارش شده و پس از میانگین گرفتن از تعداد سلول‌ها عدد بدست آمده در ۲۰۰۰۰ ضرب گردید تا تعداد سلول‌ها در حجم ۱ سی سی محیط کشت به دست آید (شکل ۲).



شکل۲. تصویر میکروسکوپی سلول‌های خون بند ناف در لام نیوبار (بزرگنمایی ۴۰۰)

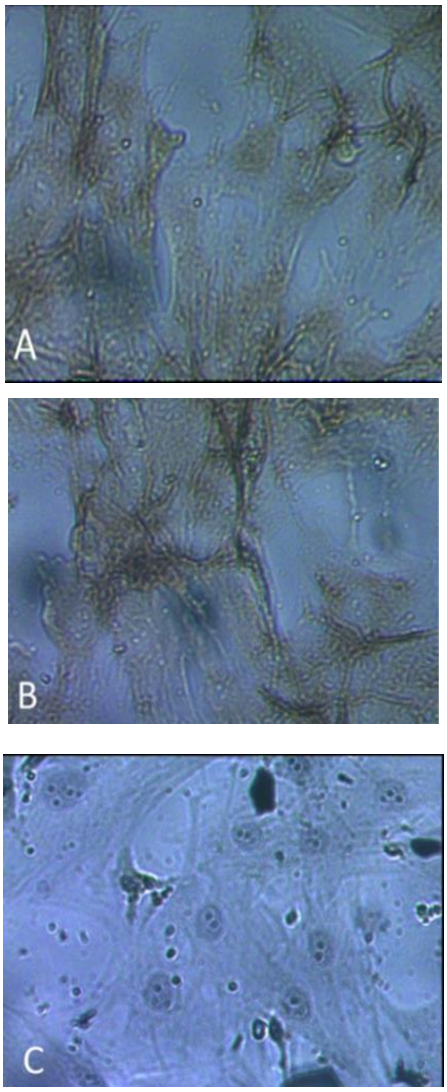
پیکان سیاه رنگ BMSC زنده، پیکان آبی رنگBMSC مرده رنگ گرفته با تریپان بلو

بررسی خلوص سلول‌های خون بند ناف:

در این ارزیابی از رنگ آمیزی ایمونوسایتوشیمی انجام شد و برای این منظور از آنتی بادی اولیه فیبرونکتین و CD44 استفاده گردید. ابتدا پلیت‌های مورد نظر با PBS به مدت ۵ دقیقه شست و شو داده شد، سپس سلول‌ها محلول ۴% پارافرمالدئید به مدت نیم ساعت ثابت شده و پس از شست و شوی مجدد با PBS و افزودن محلول بلاک کننده به مدت یک ساعت در دمای اتاق و شست و شوی مجدد، آنتی بادی اولیه به مدت یک شب بر روی سلول‌ها ریخته شد. پس از شست و شوی آنتی بادی ثانویه بیوتین اویدین متصل به آنزیم Peroxidase و رنگ DAB برای رنگ آمیزی سلول‌ها استفاده و در انتها، شست و شو با PBS انجام شد (شکل ۳).

پس از قطع عصب سیاتیک پای راست حیوان موش‌ها به طور تصادفی در ۴ گروه تقسیم شدند:

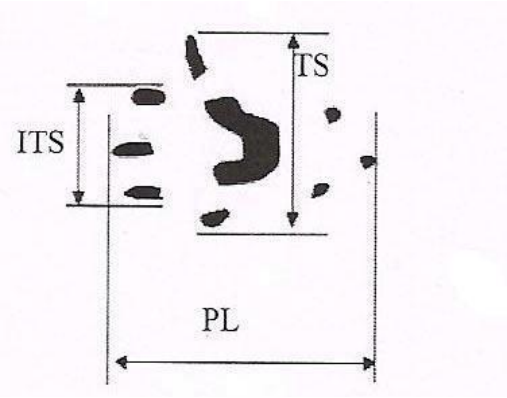
۱. گروه نرمال : بدون هیچ آسیبی به عصب سیاتیک
۲. گروه کنترل: قطع عصب سیاتیک بدون هیچ مداخله ای
۳. گروه تجربی۱: تزریق ۱۰۰ هزار سلول خون بند ناف توسط سرنگ همیلتون در محل قطع عصب
۴. گروه تجربی ۲ : تزریق ۱۰۰ هزار سلول خون بند ناف در محل ضایعه به همراه تزریق داخل صفاقی عصاره کاسنی



شکل۳. تصویر میکروسکوپی سلول‌های خون بند ناف، پس از انجام ایمونوسیتوشیمی با بزرگنمایی ۴۰۰ +A، B ، C به ترتیب مربوط به آنتی‌بادی اولیه فیبرونکتین، آنتی CD44 و کنترل منفی سلول‌های تمایز نیافته BMSC در پایان پاساژ دوم.

ارزیابی حرکتی با تست فوت پرینت:

در پایان هفته‌های دوم، چهارم، ششم و هشتم بعد از عمل جراحی، به منظور ارزیابی میزان بهبود حرکتی تست رفتاری foot print انجام شد. این آزمون روشی در جهت ارزیابی بالینی میزان بازگشت عملکرد حرکتی عصب ترمیم شده می‌باشد که در ابتدا کف پای مربوط به عصب قطع شده حیوان با جوهر رنگی شده است، سپس حیوان بر روی کاغذ سفیدی که در کف راهرویی به ابعاد ۶۰ ×۲۰×۷ سانتی متر راه می‌رود، سپس SFI بر اساس فرمول زیر برای پای جراحی شده و پای سالم محاسبه گردید.



شکل ۵ - نمایش کف پای رت

$$SFI = -38.5\left(EPL - \frac{NPL}{NPL}\right) + 109.5\left(ETS - \frac{NTS}{NTS}\right) + 13.3\left(EIT - \frac{NIT}{NIT}\right) - 8.8$$

PL نشان دهنده طول کف پا، TS نشان دهنده فاصله بین سرانگشتان ۱و ۵، IT نشان دهنده فاصله بین سرانگشتان ۲و ۴ (شکل ۵)

اعداد بین ۱۰۰- الی ۱۰- مسیر بهبودی حرکتی را نشان می‌دهند، عدد ۱۰۰- به معنای قطع کامل عصب و نتایج اعداد بین ۱۰- تا ۱۰+ علامت طبیعی بودن حرکت پای حیوان می‌باشد. این روش بهترین ارزیابی برای سنجش رفتار حرکتی می‌باشد.

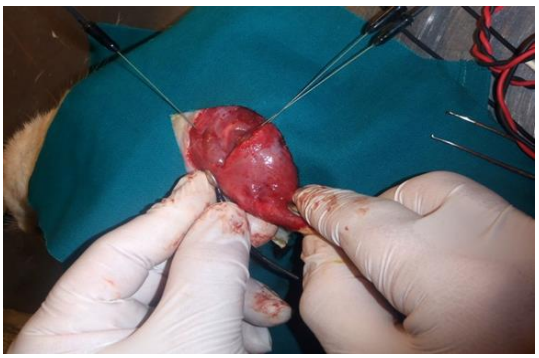
ارزیابی شاخص عملکرد حسی عصب سیاتیک:

در هفته‌های ۲ و ۴ و ۶ و ۸ بعد از عمل جراحی، جهت ارزیابی حسی عصب سیاتیک از تست رفتاری (Hot Plate) که روشی برای سنجش درک حس درد در حیوانات می‌باشد، استفاده شد. دستگاه مورد استفاده (Heater) ساخت شرکت پارس آزما - اصفهان-ایران بود. که با یک پیچ تنظیم درجه حرارات آن در ۴۸ درجه سانتیگراد ثابت گردید. در این روش رت روی صفحه قرار گرفت. مدت زمانی که طول کشید تا حیوان پای مجروح خود را ار روی سطح بلند کند به عنوان زمان پاسخ در نظر گرفته شد. این عمل برای هر حیوان سه بار به طور جداگانه و به فواصل ده دقیقه‌ای انجام گرفت و میانگین این سه بار به عنوان پاسخ حیوان ثبت شد [۲۵].

مطالعات الکترومیوگرافی:

در پایان هفته هشتم موش‌های هر گروه از طریق داخل صفاقی کاملا بیهوش شدند. در طول دوره بیهوشی دمای بدن موش‌ها با استفاده از لامپ حرارتی در حد دمای اطاق (۳۰ درجه سانتی‌گراد) کنترل شد. پس از برش پوست و بافت‌های عضلانی عصب سیاتیک را در سمت جراحی شده مشاهده شد. ضمن تست نمودن دستگاه ثبت الکترومیوگرافی، تحریک کننده سوزنی روی تنه عصب (بالاتر از محل ضایعه اصلی) قرار گرفت. برای ثبت تغییرات پتانسیل ناشی از تحریک، دو الکترود کفه ای، یکی بر روی عضله گاستروکنیموس و دیگری یک سانتیمتر زیر برجستگی تیبیا فرو برده شد. برای ثابت نگه داشتن فاصله بین الکترودهای سوزنی و کفه ای به دقت اندازه‌گیری شد. با روشن نمودن دستگاه تغییرات پتانسیل دریافتی به هر نمونه پس از عبور از تقویت کننده توسط نوسان نگار ثبت گردید. ابتدا از عضله گاستروکنیموس - سولیوس در حالت استراحت الکترومیوگرافی بدست آمد. وقتی عضله از لحاظ عصب گیری سالم باشد هیچ گونه فعالیت الکتریکی در حالت استراحت در آن وجود ندارد که اصطلاحا به آن سکوت الکتریکی می‌گویند.

سرعت هدایت پیام عصبی (NCV) و دامنه پتانسیل فعالیت حرکتی (AMP)، جهت بررسی و تجزیه و تحلیل ثبت گردید (شکل ۶).



شکل ۶ - الکترومیوگرافی بر روی پای جراحی شده رت.

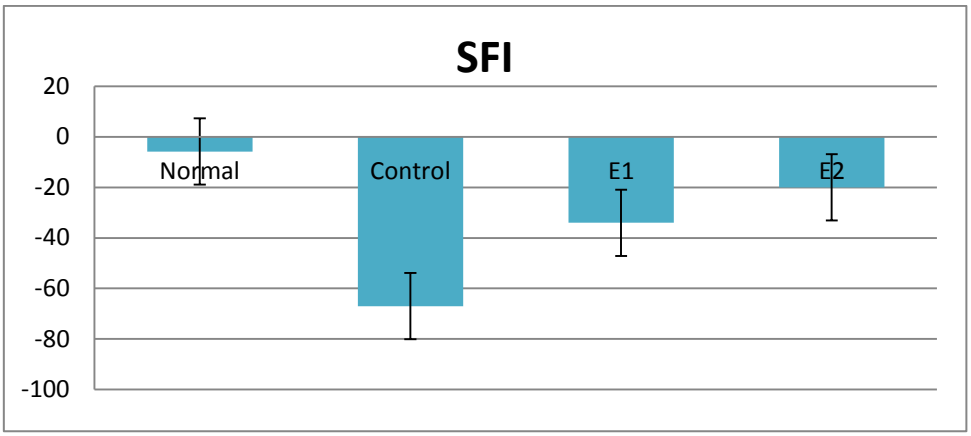
تجزیه و تحلیل داده‌ها:

نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS 23 و آنالیز واریانس دو طرفه (One-Way Anova) و تست Tukey مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و $P<0.05$ به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد و نیز نمودارهای مربوطه با نرم‌افزار Microsoft 2017 Excel ترسیم شدند.

نتایج:

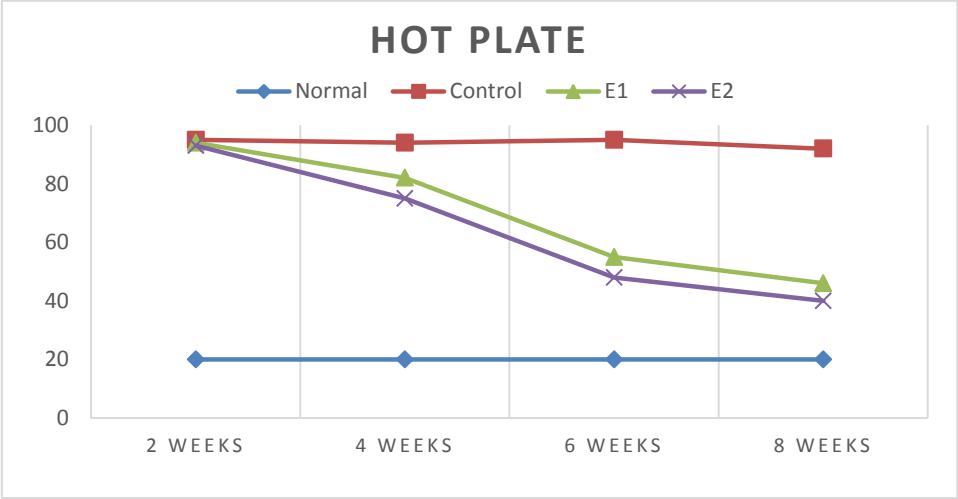
در تحقیق حاضر بعد از قطع عصب سیاتیک، هیچ کدام از حیوانات توانایی راه رفتن بر روی کف پای آسیب دیده را نداشتند. در ارزیابی حرکتی عصب سیاتیک براساس قانون Beain و همکاران، ۱۰۰- به معنای قطع کامل عصب و ۱۰- تا ۱۰+ نمونه طبیعی می‌باشد. در گروه کنترل با توجه به اعداد بدست آمده، بازگشت به حالت طبیعی در پایان هفته هشتم مشاهده نشده است، اما در گروه سلول درمانی به همراه عصاره کاسنی ترمیم در پایان هفته هشتم حاصل گردید، در مقایسه با گروه کنترل، در واقع روند بهبودی در گروه سلول درمانی به همراه عصاره کاسنی در مقایسه با گروه سلول درمانی بدون عصاره کاسنی در پایان هفته هشتم سریع تر بوده است (نمودار شماره ۱). میانگین تاخیر پاسخ حسی در پایان هفته هشتم پس از ترمیم در گروه‌های سلول درمانی نسبت به گروه کنترل در مقایسه با گروه نرمال از نظر عددی روند مثبتی را نشان داد، که این اتفاق بیانگر روند ترمیم و بازگشت عملکرد حسی عصب سیاتیک در گروه‌های سلول درمانی در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد (نمودار شماره ۲). همچنین در پایان هفته هشتم از تمام گروه‌های مورد آزمایش سنجش الکتروفیزیولوژی به عمل آمد، همانطور که می‌دانیم با استفاده از میزان AMP می‌توان مقدار تخریب و ترمیم آکسون‌ها را به دست آورد. همچنین با توجه به میزان عددی NCV می‌توان میزان بهبودی در روند میلین سازی را به دست آورد.

میزان عددی AMP در هفته هشتم پس از ترمیم، در گروه سلول درمانی دارای شیب ملایمی است این امر نشان دهنده روند بهبودی در گروه سلول درمانی است، روند بهبودی در گروه سلول درمانی به همراه عصاره کاسنی نسبت به گروه کنترل و گروه سلول درمانی فاقد عصاره کاسنی بهتر بوده و به نمونه نرمال نزدیک تر شده است (نمودار شماره ۳). همچنین اتفاقی مشابه به نتایج بررسی AMP در بررسی آماری NCV مشاهده گردید. با توجه به میزان عددی نتایج NCV در بررسی الکتروفیزیولوژی، گروه سلول درمانی به همراه عصاره کاسنی نسبت به سایر گروه‌ها ترمیم بهتری در میلین سازی رشته‌های عصبی مشاهده گردید (نمودار شماره ۴).



نمودار ۱. ارزیابی شاخص عملکرد حرکتی عصب سیاتیک (sfi = sciatic function index) در پایان هفته هشتم بعد از ترمیم در گروه‌های مورد آزمایش.

در پایان هفته هشتم پس از ترمیم، میزان عددی SFI در گروه‌های سلول درمانی در مقایسه با گروه کنترل نشان از روند بهبودی و نزدیک شدن به حالت طبیعی (SFI در حد فاصل 10+ و 10−) و گروه نرمال می‌باشد. توانایی راه رفتن در پای جراحی شده در گروه سلول درمانی (E1)، علی الخصوص در گروه سلول درمانی به همراه عصاره کاسنی (E2) در پایان هفته هشتم ایجاد گردید. گروه سلول درمانی دارای اختلاف معنی دار با گروه نرمال می‌باشد که این اختلاف معنی دار در گروه سلول درمانی با عصاره کاسنی با گروه نرمال وجود ندارد.



نمودار۲. آزمون حسی با استفاده از تست Hot Plate در گروه‌های مورد آزمایش در پایان هفته‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ بعد از جراحی.

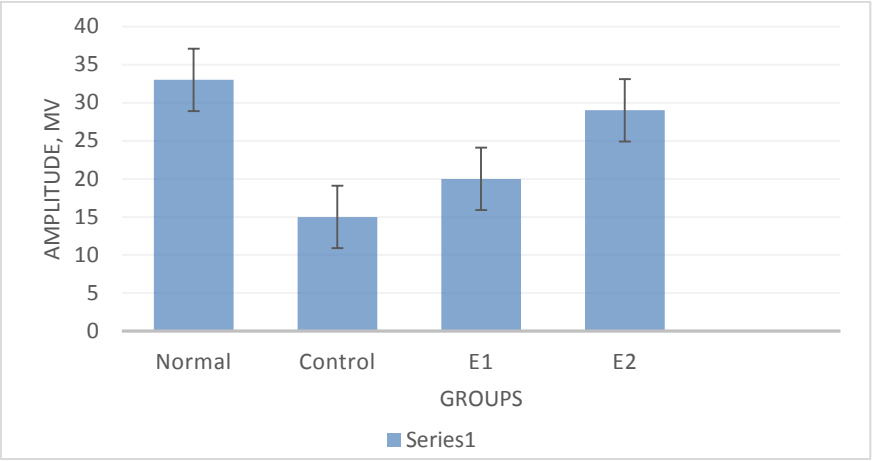
با افزایش زمان میزان درک حس حرارت در گروه‌های سلول درمانی(E1) در مقایسه به گروه کنترل بیشتر شده است. یا به عبارت دیگر آستانه تحمل با گذشت زمان کاهش یافته است. در گروه سلول درمانی همراه عصاره (E2) مقدار آستانه تحمل بهتر شده است و به عدد نرمال نزدیک تر است.

محور افقی زمان (هفته‌های ۲و۴و۶و۸) و محور عمودی میزان واکنش ۴ گروه مورد آزمایش نسبت به تست گرما (HOT PLATE) را نشان می‌دهد.

بحث

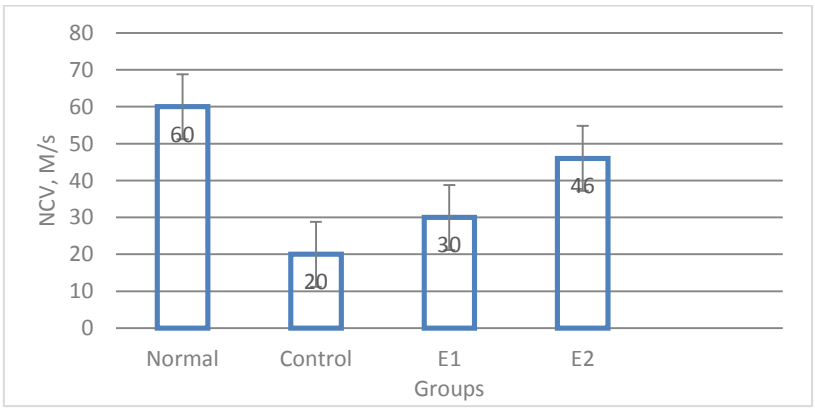
در تحقیق حاضر نشان داده شد که در پایان هفته هشتم ترمیم و انجام الکترومیوگرافی بر روی حیوانات مقدار AMP در گروه سلول درمانی رشد قابل ملاحظه ای در مقایسه با گروه کنترل داشته و این میزان به نمونه نرمال در حال نزدیک شدن می‌باشد که این اتفاق می‌تواند در مورد ترمیم عصب قطع شده در هفته هشتم پس از ترمیم، در ترمیم آکسون‌ها حائز اهمیت باشد.

هم چنین اندازه‌گیری AMP می‌تواند اطلاعاتی در مورد کانال‌های سدیم و پتاسیم در عصب ارائه دهد. به طور حتم میزان AMP با محل و میزان سدیم در کانال‌های موجود در عصب مرتبط است و با استفاده از میزان AMP می‌توان مقدار تخریب و ترمیم آکسون‌ها را مشاهده کرد [۲۵]. در این رابطه می‌توان به پژوهش‌های معظمی و همکاران [۲۵] و تاجیک و همکاران [۲۶] اشاره کرد که در هر دو مورد در گروه سلول درمانی در پایان هفته هشتم پس از ترمیم، مقدار AMP به نمونه نرمال نزدیک شده که این خود بیانگر روند ترمیم عصب آسیب دیده و ترمیم آکسون‌ها می‌باشد.



نمودار ۳. نتایج AMP(Amplitude Muscle Action Potential) (دامنه پتانسیل فعالیت حرکتی)در هفته هشتم پس از جراحی در گروه‌های مورد آزمایش.

با توجه به نمودار و مقدار عددی AMP، میزان ترمیم آکسون در گروه‌های سلول درمانی همراه با عصاره کاسنی (E2) نسبت به سایر گروه‌ها بهتر می‌باشد.محور افقی نوع گروه‌ها و محور عمودی میزان تغییرات عددی در تست AMP را نشان می‌دهد. (E1) نیز مشابه نمودارهای قبلی نشانه گروه سلول درمانی است.



نمودار ۴. نتایج سرعت هدایت عصبی (Nerve conduction velocity)NCV در هفته هشتم پس از ترمیم ئر گروه‌های مورد آزمایش.

با توجه به نمودار و مقدار عددی NCV، میزان ترمیم میلین در گروه‌های سلول درمانی نسبت به گروه کنترل بهتر می‌باشد. از لحاظ آماری بین گروه کنترل و نرمال اختلاف معنی دار وجود دارد. اما هیچ اختلاف معنی داری بین گروه‌های سلول درمانی(E1) با سایر گروه‌ها دیده نشد. روند ترمیم میلین در گروه سلول درمانی به همراه عصاره کاسنی(E2) نسبت به گروه سلول درمانی بدون تزریق عصاره کاسنی بهتر می‌باشد.

محور افقی نشانه گروه‌ها و محور عمودی میزان هدایت عصبی در چهار گروه را نشان می‌دهد.

سلول‌های بنیادی بند ناف، فاکتور رشد عصب، فاکتور نوروتروفیک عصبی سیلیاری را ساخته و ترشح می‌کنند.

UCMSC همچنین قادر است به طور غیر مستقیم بیان انتقال دهنده‌های عصبی مانند BDNF و نوروتروفین ۳ (NTF3) را افزایش دهد. این دو فاکتور در بازسازی عصبی کمک کند [۳۱].

هم چنین LOPEZ و همکاران در طی تحقیقی تاثیر مثبت سلول‌های خون بند ناف در روند ترمیم عصب سیاتیک و افزایش تعداد آکسون‌ها نسبت به گروه کنترل را نشان دادند [۳۲]. افزایش AMP نشان از ترمیم آکسون‌ها در عصب سیاتیک آسیب دیده می‌باشد که مطالعه بافت شناسی و هم چنین شمارش تعداد رشته‌های عصبی این مطلب را تأیید می‌کند. در تحقیق حاضر در پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC)، با توجه به خواص بازسازی و ظرفیت بسیار تکثیر آنها، به عنوان یک گزینه درمانی امیدوار کننده برای بازسازی عصب محیطی ارائه شده است [۲۷]. MSC سلول‌های تمایز نیافته و چند توانی هستند که می‌توانند از مکان‌های متعدد موجود در بدن شامل مغز استخوان، بافت چربی، پالپ دندان، مایع آمنیوتیک و بند ناف برداشته می‌شوند [۲۷-۲۹].

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بند ناف (UCMSC) می‌توانند یک سلول‌های شوان را تولید کنند و قادر به تقویت بازسازی آکسون و بازسازی عملکرد عصب محیطی از این طریق هستند [۳۰].

نتیجه‌گیری

با توجه به شواهد بدست آمده می‌توان نتیجه گرفت که پیوند سلول خون بند ناف سبب ترمیم عصب سیاتیک قطع شده می‌شود و هم چنین عصاره کاسنی به همراه سلول‌های خون بند ناف موجب تسریع در روند ترمیم عصب سیاتیک می‌شود که با مطالعات الکتروفیزیولوژی و بررسی رفتاری SFI و بررسی شاخص حسی عصب سیاتیک (Hot Plate) آن را نشان داد.

منابع

[1] He C, Chen Z, Chen Z. Enhancement of motor nerve regeneration by nerve growth factor. *Microsurgery 1992;* 13(3): 151-154.

[2] Wilson ADH, Hart A, Brannstrom T, Wiberg M, Terenghi G. Primary sensory neuronal rescue with systemic acetyl-L-carnitine following peripheral axotomy. A dose-response analysis.*British Journal of Plastic Surgery.2003*; 56:732-739.

[3] Cuevas P., Carceller F., Dujovny M., Gomez IG., Cuevas B., et al. Peripheral nerve regeneration by bone marrow stromal cells. *Neurol. Res., 2002*; 24: 634-638.

[4] Nichols CM, Myckatyn TM, Rickmana SR, Fox IK, Hadlock T and Mackinnon SE. Choosing the correct functional assay: a comprehensive assessment of functional tests in the rat. *Behav Brain Res 2005*;163:143-158

[5] Kruger, G.M., Mosher, J.T., Bixby, S., Joseph, N., Iwashita, T., and Morrison, S.J. Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergochanges in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron. 2002*; 35, 657–669.

[6] Zochodne, D.W. (2008). Neurobiology of Peripheral Nerve Regeneration, *First Edition* (New York: Cambridge University Press).

[7] Araki T., Nagarajan R. and Milbrandt J. Identification of genes induced in peripheral nerve after injury .*The J Biol Chem., 2001*; 276: 34131- 34141

[8] Dezawa M., Takahashi I., Esaki M., Takano M. and Sawada H. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone marrow stromal cells. *Eur J Neurosci., 2001*; 14: 1771-1776.

[9] Cao Fu, Feng Shi. Human umbilical cord mesenchymal stem cells and the treatment of spinal cord injury. *Chin Med J 2009*; 22(2);225-31.

[10] Gang JE, Hong SH, Jeong JA, et al. In vitro msengenic potential of human umbilical cord blood derived mesenchmal stem cells. *BiochemBiophy Res Commun 2004*; 321(1); 102-8.

پایان هفته هشتم پس از جراحی تعداد رشته‌های عصبی در گروه سلول درمانی در مقایسه با گروه کنترل افزایش داشته، اما در مقایسه با گروه نرمال اختلاف معنی‌دار وجود دارد. افزایش تعداد رشته‌های عصبی در پایان هفته هشتم بیانگر روند ترمیم در گروه سلول درمانی نسبت به سایر گروه‌ها می‌باشد. مطالعات رفتاری و الکتروفیزیولوژی نیز این مسئله را تأیید می‌کند که با گذشت زمان روند ترمیم در گروه سلول درمانی پیشرفت بهتری نسبت به گروه‌های دیگر دارد. DEZANA و همکاران نشان دادند که با انتقال سلول‌های خون بند ناف به محل عصب قطع شده، ترمیم عصب انجام می‌گیرد و تعداد رشته‌های عصب افزایش پیدا می‌کند [۳۳].

بر اساس داده‌های مقاله‌های مذکور حضور سلول بنیادی بند ناف در کنار عصاره کاسنی موجب بازسازی عصب سیاتیک و نزدیک شده داده‌ها به گروه طبیعی می‌شود.

کاسنی با داشتن فلاونوئیدهای فراوان موجب کاهش التهاب در محل آسیب دیده و افزایش کارآیی سلول‌های بنیادی بند ناف در محل قطع شده می‌شود.

همانطور که در نتایج اشاره شد ؛ در نمودار شماره ۱، عملکرد حرکت عصب (SFI) در گروه همزمان سلول درمانی همراه با عصاره کاسنی (E2) نسبت به گروه سلول درمانی به تنهایی (E1) به گروه نرمال نزدیک‌تر است.

در نمودار شماره ۲ هم میزان اثر عصاره بر سلول درمانی قابل مشاهده است به نحوی که آستانه تحمل و درک حسی در آزمایش گرما(HOT PLATE) در گروه عصاره همراه با سلول درمانی عددی نزدیک تر به گروه نرمال را نشان می‌دهد.

در نمودار شماره ۳ نیز میزان پتانسیل فعالیت حرکتی(AMP) در گروه سلول درمانی همراه بت عصاره کاسنی (E2) به گروه نرمال نزدیک شده که نشانه مثبتی از تاثیر عصاره کاسنی در کاهش التهاب و افزایش تاثیر سلول‌های بنیادی بند ناف جهت بازسازی عصب آسیب دیده دارد.

در نمودار شماره ۴ نیز میزان سرعت هدایت عصبی (NCV) در گروه سلول درمانی همراه با عصاره کاسنی (E2) نسبت به گروه‌های دیگر بیشتر است و این قابلیت به دلیل اثر مثبت عصاره کاسنی بر بازدهی بیشتر سلول درمانی و بازسازی بهتر محل عصب است.

[11] Seshareddy K, Troyer D, Weiss ML. Method to isolate mesenchymal stromal cells under hypoxi.*Int J BiolSci 2010*;6(5); 499-512

[12] Peng J. Wang Y, Zhang L, et al. Human umbilical cord wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells differentiate into a schwann- cell phenotype and promote neuriteoute growth in vitro. *Brain Res Bull 2011*;84(3);235-43.

[13] Papetti, A.; Mascherpa, D.; Carazzone, C.; Stauder, M.; Spratt, D.A.; et al. Identification of organic acids in Cichorium intybus inhibiting virulence-related properties of oral pathogenic bacteria. *Food Chem. 2013*, 138, 1706–1712.

[14] Rozpądeka, P.; Wężowicza, K.; Stojakowskab, A.; Malarz, K. Mycorrhizal fungi modulate phytochemical production and antioxidant activity of Cichorium intybus L. (Asteraceae) under metal toxicity. *Chemosphere 2014*, 112, 217–224.

[15] Saini, M.; Khani, A.A.; Bala, M.; Abding, M.Z.; Farooqi, H. Development of a validated HPTLC method for quantification of Esculin in different fractions of Cichorium intybus leaf extract. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci. 2014*, 6, 278–282.

[16] Shalini, S.; Mohamed, I.S.; Nahla, Z. Ameliorating effect of chicory (Chichorium intybus L(.fruit extract against 4-tert-octylphenol induced liver injury and oxidative stress in male rats.*Food Chem. Toxicol. 2014*, 72, 138–146.

[17] Rasmussen, M.K.; Klausen, C.L.; Ekstrand, B. Regulation of cytochrome P450 mRNA expression in primary porcine hepatocytes by selected secondary plant metabolites from chicory (Cichorium intybus L.). *Food Chem. 2014*, 146, 255–263.

[18] Street, R.A.; Sidana, J.; Prinsloo, G. Cichorium intybus: Traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology. Evid. -Based Complement. *Altern. Med. 2013, 2013*, 1439–1457.

[19] Carazzone, C.; Mascherpa, D.; Gazzani, G.; Papetti, A. Identification of phenolic constituents in red chicory salads (Cichorium intybus) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Food Chem. 2013*, 138, 1062–1071.

[20] Rammal, H.; Younos, C.; Bouayed, J.; Chakou, A.; Bedouhene, S.; Soulimani, R. Aperçu ethnobotanique et phytopharmacologique sur Cichorium intybus L. *Phytotherapie 2008, 6, 184–186.*

[21] Nandagopal, S., Ranjitha kumari, B.D., 2007. Phytochemical and antibacterial studies of chicory (Cichorium intybus L.) – a multipurpose medicinal plant. Adv. *Biol. Res. 1* (1-2), 17–21.

[22] Saggu, S., Sakeran, M.I., Zidan, N., Tousson, E., Mohan, A., Rehman, H., 2014. Ameliorating effect of chicory (Chichorium intybus L.) fruit extract against 4-tert-octylphenol induced liver injury and oxidative stress in male rats. *Food Chem. Toxicol. 72C*, 138–146.

[23] Cavin, C., Delannoy, M., Malnoe, A., Debefve, E., Touche, A.; et al., 2005. Inhibition of the expression and activity of cyclooxygenase-2 by chicory extract. Biochem. Biophys. *Res. Commun. 327* (3), 742–749.

[24] Mobasher M., Aramesh K., Ale Davous S.J., Ashraf Gangoie N., Divsalar K., Philips C.J.C., Ardeshir Larijani Mohamad Bagher Proposing A Nathional Ethical Framwork For animal reserch in iran .iranian journal of public health january 2008 , *Volume 37 , Number 1(supplementary isuue on bioechics); Page(s) 39 To 46.*

[25] Moazami, J Mazand Univ Med Sci 2013; 23(102): 96-105 (Persian).

[26] Tajik,Birjand Univ Med Sci 2013; 4 (20), (Persian).

[27] Christine Bojanic, Kendrick To, Bridget Zhang, Christopher Mak, Wasim S Khan *2020.* Human umbilical cord derived mesenchymal stem cells in peripheral nerve regeneration.

[28] Ma Y, Dong L, Zhou D, Li L, Zhang W, .; et al .Extracellular vesicles from human umbilical cord mesenchymal stem cells improve nerve regeneration after sciatic nerve transection in rats. *J Cell Mol Med 2019;* ***23****: 2822-2835 [PMID: 30772948 DOI:*

[29] Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, .; et al; International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy 2005; 7: 393-395. [PMID: 16236628 DOI: 10.1080/14653240500319234]*.

[30] Wakao S, Hayashi T, Kitada M, Kohama M, Matsue D ; et al. Long-term observation of auto-cell transplantation in non-human primate reveals safety and efficiency of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol 2010; 223: 537-547 [PMID: 20153320 DOI:10.1016/j.expneurol.2010.01.022]*.

[31] Dasari VR, Spomar DG, Gondi CS, Sloffer CA, Saving KL; et al . Axonal remyelination by cord blood stem cells after spinal cord injury. *J Neurotrauma 2007; 24: 391-410 [PMID:17376002 DOI: 10.1089/neu.2006.0142]*.

[32] Pereira Lopes FR, Camargo de Moura Campos L, Dias Correa J, Balduino A, Lora S, Langone F, etal. Bone marrow stromal cells and resorbable collagen guidance tubes enhance sciatic nerve regeneration in mice. *Exp Neurol 2006; 198: 457-468.*

[33] Dezawa M, Takahashi I, Esaki M, Takano M, Sawada H. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone marrow stromal cells. *Eur J Neurosci 2001; 14: 1771-76.*

The effect of umbilical cord stromal cells and chicory extract on the repair process of amputated sciatic nerve in male Wistar rats (Behavioral and electrophysiological study)

Fazlali A. H.[1*], Hayati Rodbari N.[2], Kaka GH.[3], Privar K.[4], Sadrai H.[5]

[1] PhD student of Cell Biology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran.
[2] Professor, Department of Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran.
[3] Associate Professor of Anatomy, Baqiyatallah University of Medical Sciences - Tehran, Iran
[4] Professor, Department of Cellular Developmental Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran
[5] Associate Professor of Anatomy, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* (Corresponding author): ahfazlali@yahoo.com

Received: July 2021 Accepted: December.2021

Abstract

In this study, the therapeutic effect of umbilical cord blood cells with chicory extract on repair of severed sciatic nerve in adult male Wistar rats was evaluated by behavioral, electrophysiological study. After sciatic nerve amputation, adult male rats were randomly divided into 4 groups of 7. Healthy rats, rats with sciatica without treatment intervention, rats with umbilical cord blood cells treated with chicory extract at the site of amputation, rats with umbilical cord blood cells injected at the site of injury. The rate of recovery was assessed by sensory motor activity of the sciatic nerve, electrophysiological studies.Sciatic nerve motor evaluation, no control group returned to normal in the eighth week, cell therapy group was restored with chicory extract in the eighth week. The level of AMP in the eighth week after the restoration of the cell therapy group with a gentle slope indicates the recovery process of the cell therapy group. Counting the number of nerve fibers at an area of 1000 μm, the number of nerve fibers in the cell therapy groups increased in the eighth week after repair, compared with the control group and the PLGA membrane group. By the end of the eighth week, the sciatic nerve index (Hot Plate test), the healing process of the cell therapy group with chicory extract was more evident to other groups.Cord blood cell transplantation repairs sciatic nerve and chicory extract along with umbilical cord blood cells accelerates sciatic nerve repair.

Keywords: Cord blood cells, Chicory extract, Sciatic nerve, Rat.