

مطالعه استریولوژیک اثر هیدروژل آلژینات - کیتوزان حاوی اریتروپویتین بر ضایع نخاع سینه ای T9 در موش صحرایی

مهدی غلامی^۱، حسن گیلانپور^{۱*}، جواد صادقی نژاد^۲

چکیده

بهداشتی است. از نظر اتیولوژیکی، بیش از ۹۰ درصد موارد SCI ناشی از حوادثی مانند تصادفات رانندگی، خشونت، ورزش یا زمین خوردن هستند. نسبت مرد به زن برای SCI معادل ۲:۱ بوده و در بزرگسالان بیشتر از کودکان اتفاق می افتد (۱). سطح گردنی ستون فقرات شایع ترین بخش آسیب در کشورهای توسعه یافته و توسعه نیافته می باشد. میزان شیوع SCI در کشورهای مختلف متفاوت است اما به طور میانگین در جهان معادل ۱۹۵/۴-۳/۶ در هر یک میلیون نفر برآورد شده است (۲). میزان مرگ و میر ناشی از SCI در کشورهای توسعه یافته ۲۲/۳-۳/۱ و در کشورهای در حال توسعه بین ۲۰/۰-۱/۴ برآورد شده است (۳). درمان فعلی برای SCI متیل پردنیزولون است که داروی مورد تایید FDA بوده و در فاز حاد با دوز بالا به مدت ۴۸ ساعت تجویز می شود.

علاوه بر متیل پردنیزولون ترکیبات متعددی در درمان SCI مورد استفاده قرار گرفته است از جمله methylprednisolone sodium succinate، تیریلازاد مسیلات، نالوکسان، گانگلیوزید GM-1، lazarooids، حذف کننده های رادیکال های آزاد و آسیب ثانویه را محدود کنند (۴، ۵). یکی از امیدوارکننده ترین گزینه ها اریتروپویتین (Erythropoietin, EPO) است، یک فاکتور رشد خونساز که عمدتاً توسط کلیه و کبد جنین تولید می شود، که تکثیر و تمایز سلول های پیش ساز اریتروئید را تحریک می کند.

آسیب طناب نخاعی (SCI) یک وضعیت عصبی ناتوان کننده است. در ابتدا با روش استریولوژی، حجم کلی نخاع سینه ای موش صحرایی سالم محاسبه شد. سپس حجم نخاع سینه ای در ناحیه T9، حجم ماده خاکستری، ماده سفید، واکوئل، اسکار و عملکرد حرکتی حیوان با تست BBB در موش ضایعه دیده، ارزیابی گردید. اریتروپویتین (EPO) از طریق فعال کردن مسیرهای پیامرسانی باعث محافظت از سلول ها در انواع بافت ها از جمله نخاع می شود. هدف از این مطالعه بررسی نقش هیدروژل کیتوزان آلژینات حاوی EPO بر آسیب طناب نخاعی می باشد. یافته های حاصل از تست BBB نشان داد استفاده از هیدروژل حاوی EPO پس از ۲۰ روز می تواند عملکرد حرکتی حیوان را به شکل معناداری بهبود بخشد. تخمین های ناشی از مطالعات استریولوژیک ناحیه سینه ای نشان می دهد که حجم کل ماده خاکستری در ناحیه سینه ای موش صحرایی میانگین ۱۲۶،۲۸۸۶ میلی متر مکعب (mm³) و همچنین حجم کل ماده سفید در ناحیه سینه ای میانگین ۲۹۵،۱۹۱۴ mm³ می باشد. میانگین بدست آمده از شاخ پشتی در ناحیه سینه ای ۵۲،۳۵۰۲۸ mm³ و شاخ شکمی ۶۰،۷۹۶۳۸ mm³ می باشد و یا به عبارتی میانگین حجم کل نخاع سینه ای در موش صحرایی ۵۱۴،۰۶ mm³ محاسبه گردید. در گروه های درمان شده با هیدروژل حاوی EPO، میزان واکوئل و اسکار در بافت نخاع نسبت به گروه کنترل منفی به طور معناداری کاهش پیدا کرده است. هیدروژل حاوی ۱۰۰۰ واحد اریتروپویتین می تواند به طور قابل توجهی ترمیم بافت و ظاهر بافت شناسی نخاع را در محل آسیب بهبود بخشد.

واژگان کلیدی: آسیب طناب نخاعی، استریولوژی، هیدروژل، آلژینات، کیتوزان، اریتروپویتین، بخش سینه ای نخاع

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۳/۲۰

مقدمه

آسیب طناب نخاعی (Spinal Cord Injury, SCI) یک وضعیت عصبی ناتوان کننده با تأثیر اجتماعی و اقتصادی فوق العاده بر افراد آسیب دیده و سیستم مراقبت های

۱- گروه علوم پایه، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (gilanpourhassan@gmail.com)

۲- گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

های آلزینات سدیم برای بازسازی آکسون بعد از SCI مفید است (۹). با این حال، داربست کامپوزیتی کیتوزان و آلزینات سدیم به ندرت برای بازیابی SCI استفاده شده است.

طناب نخاعی به صورت ماکروسکوپی و میکروسکوپی تحت تاثیر سن و بیماری ها قرار می گیرد. ارزیابی های مورفومتریک آن با استفاده از روش های استاندارد تعیین حجم حائز اهمیت فراوان است. تعیین تغییرات حجمی قطعات مختلف می تواند در گسترش دانش نورولوژی کمک کننده باشد و اطلاعات پایه ای مفیدی را در اختیار محققین قرار دهد. از طرف دیگر تغییرات پاتولوژیکی ایجاد شده در طناب نخاعی می تواند در درک درست این بیماری و اتخاذ روش های مناسب مفید باشد. دستاوردهای این تحقیق می تواند به عنوان الگویی استاندارد جهت استفاده در ارزیابی های مورفومتریک طناب نخاعی در مطالعات تجربی بیماری ها، داروها و ... نیز مورد استفاده قرار گیرد. هدف از مطالعه حاضر، بررسی استریولوژیک نخاع سینه ای در موش صحرایی و بازسازی آن بعد از ایجاد ضایعه در قطعه T9 با استفاده از هیدروژل حاوی اریتروپویتین می باشد.

مواد و روش کار

مواد مورد استفاده

نمک سدیم اسید آلزینیک (با ویسکوزیته متوسط)، کیتوزان (با وزن مولکولی متوسط، درجه استیلاسیون ۸۵٪-۷۵) و کربوکسی متیل سلولز (Carboxymethyl cellulose, CMC ، با ویسکوزیته متوسط) از شرکت سیگما خریداری گردید. اریتروپویتین از شرکت CinnaGen (تهران، ایران) خریداری شد. نمک بافر فسفات (PBS)، گلیسرول، از شرکت Merck (آلمان) تهیه شدند.

استریولوژی سیستم سنجشی متشکل از نقاط سنجشی یا خطوط سنجشی بر روی یک محدوده معین است که از کولیس یا میکرومتر استفاده نمی کند. در این مطالعات از روش جابجایی مایع و یا روش کاوالیه برای تعیین دقیق حجم استفاده می شود. کاوالیه نشان داد با استفاده از برش های تصادفی یکنواخت و موازی و با فاصله مشخص می توان حجم نمونه را محاسبه نمود. با این روش ها میتوان حجم یک شیء با شکل نامنظم را با استفاده از جمع بندی سطح مقاطع (که به روش Unbiased Systemic Random Sampling تهیه شده اند) به دست آورد. اندازه سطوح را هم می توان به روش شمارش نقطه ای برآورد کرد و بدین ترتیب بدون هیچگونه اندازه گیری مستقیمی میتوان حجم شیء را بدست آورد. با این روش می توان حجم ساختارها یا بافت هایی را که درون بافت های دیگری قرار دارند نیز اندازه گرفت (۶).

هیدروژل ها گروهی از مواد پلیمری با ساختار شبکه ای هستند که به دلیل وجود گروههای عاملی آب دوست، قابلیت تورم و جذب آب بالایی دارند. این ویژگی هیدروژل ها را از سایر ساختارهای پلیمری متمایز می کند.

در میان پلیمرهای رایجی که در ساخت هیدروژل از آنها استفاده می شود، استفاده از پلیمرهای طبیعی نتایج درخشان تری داشته است. کیتوزان و آلزینات مناسب ترین آنها هستند. خصوصیات، زیست سازگاری و سمیت کم کیتوزان باعث شده است تا از آن برای انتقال ترکیبات درشت مولکول نظیر پپتیدها، پروتئین ها، آنتی ژن ها، الیگو نوکلئوتیدها و ژن ها بهره برداری شود این ویژگی ها کیتوزان را برای تحقیقات مهندسی بافت مفید می سازد، و مطالعات نشان داده اند که کاشت مواد کیتوزان بعد از SCI می تواند بازسازی آکسون را تقویت کند (۷). آلزینات سدیم را می توان به یک داربست سه بعدی برای حمایت از رشد سلولی تبدیل کرد (۸). مطالعات نشان داده اند که کاشت داربست

۲-۲ ساخت هیدروژل کیتوزان آلژینات (EPO-CH/AL) حاوی اریتروپویتین

محلول کیتوزان (4% w/v) با حل کردن پودر کیتوزان در محلول آبی اسید استیک (1% v/v) به مدت ۴۸ ساعت تهیه شد. پودرهای آلژینات و CMC به طور جداگانه در آب دیونیزه حل شدند تا محلول های ۰.۴٪ و ۰.۱٪ (w/v) بدست آید. اریتروپویتین (۱۰۰۰ واحد بر کیلوگرم) به محلول آلژینات اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه هم زده شد. سپس محلول آلژینات (با یا بدون اریتروپویتین) و کیتوزان با نسبت حجمی (۱:۱) با استفاده از همزن مغناطیسی به مدت ۲ ساعت برای تهیه محلول همگن مخلوط شدند. پس از آن، برای هیدروژل به دست آمده، محلول CMC با نسبت حجمی (۱:۱) تحت هم زدن شدید به مدت ۱ ساعت به محلول فوق اضافه شد. با استفاده از اسپکتروسکوپی FTIR برهمکنش های الکترواستاتیک بین CMC، سدیم آلژینات و کیتوزان در فرمولاسیون مورد بررسی قرار گرفت. همچنین خصوصیات مورفولوژیکی هیدروژل ساخته شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی SEM مورد مطالعه قرار گرفت (۱۰) و پس از تایید مطالعات استریولوژیکی انجام شد.

مطالعه حیوانی

در این مطالعه از ۳۲ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار (در ۴ گروه ۸ تایی) و در محدوده وزنی ۲۵۰ تا ۲۸۰ گرم (انستیتو پاستور، تهران، ایران)، استفاده گردید. حیوانات در قفس های مخصوص، به صورت گروه های دو تایی نگه داری شده و آب و غذا به مقدار کافی در دسترس قرار می گرفت. و محیط نگه داری حیوانات تحت شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، بدون هرگونه سر صدا و آلودگی صوتی بود. مجریان در کلیه مراحل به اصول اخلاقی کار با حیوانات متعهد بودند. و تمامی مراحل مطالعه حیوانی مطابق با دستورالعمل های کمیته

اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی و پس از کسب کد اخلاق (IR.IAU.SRB.REC.1398.195) صورت گرفت.

۲-۳-۱ ایجاد ضایعه نخاعی

جهت سازش با یک هفته قبل از انجام جراحی و آزمایشات حیوان ها به محل حیوان خانه آزمایشگاه انتقال داده شدند. برای ایجاد ضایعه نخاعی از دستگاه NYU impactor استفاده شد. با تزریق ترکیب کتامین با دوز ۱۰۰ میلی گرم در هر کیلوگرم و زایلازین با دوز ۵ میلی گرم در هر کیلوگرم حیوانات بیهوش شدند جهت انجام لامینکتومی، پس از اطمینان از بیهوش شدن جانور، مهره ی مورد نظر را کنار زده و توسط رترکتور ثابت می شود. سپس بوسیله ی رنژو لامین آن مهره را برداشته و با استفاده از مته، استخوان مهره ی روی نخاع تراشیده می شود به حدی که نخاع و عروق نخاعی قابل مشاهده باشند و پس از آن توسط قیچی فنری چشم پزشکی به آرامی لامین روی نخاع را برداشته تا نخاع به طور کامل رویت شده و دایره ای به اندازه ی وزنه ی دستگاه ایمپکتور بر روی نخاع ایجاد شود. سپس حیوان را به زیر دستگاه ایمپکتور منتقل کرده و پس از ثابت کردن مهره های شماره ی ۹ و ۱۱ توسط گیره های پایدار کننده ی دستگاه ایمپکتور و اطمینان از عدم قرار گرفتن وزنه بر روی استخوان های اطراف نخاع، وزنه ی ۱۰ گرمی از ارتفاع ۲۵ میلیمتر بر روی نخاع رها شده تا ضایعه ی نخاعی شدید ایجاد شود (نگاره ۱) و پس از آن پوست و بافت همبند را بخیه زده، و اجازه داده شد تا حیوان به هوش آید. پس از جراحی نرمال سالیین به حجم ۵ میلی لیتر و آنتی بیوتیک انروفلوکساسین به صورت زیرپوستی به موش تزریق شد.

تست حرکتی (BBB) Basso, Beattie and Bresnahan

این تست به جهت بررسی میزان بهبود عملکرد حرکتی اندام های خلفی مورد استفاده قرار میگیرد. برحسب نحوه ی

۴- گروه درمان (هیدروژل حاوی ۱۰۰۰ واحد اریتروپویتین)

تهیه نمونه های استریولوژی

روش کاوالیه جهت برآورد حجم مورد استفاده قرار گرفت (۱۱). در این روش هر قطعه طناب نخاعی به قطعات مساوی تقسیم و با استفاده از نمونه گیری سیستماتیک تصادفی برش ها جمع آوری شدند. پس از آن پاساژ بافتی قطعات برش داده شده (شامل مراحل آب گیری، شفاف سازی، آغشته سازی به پارافین) انجام گرفت و قالب های پارافینی تهیه شد. عمل برش گیری قالب ها به وسیله میکروتوم انجام گرفت. از تمام قالب های پارافینی مربوط به یک قطعه نخاعی برش هایی با فاصله مساوی به ضخامت ۷ میکرومتر تهیه شد و براساس نمونه گیری سیستماتیک تصادفی برش ها انتخاب شدند و در مجموع از هر قطعه ۲۰-۱۲ برش بافتی تهیه شد.

برش های تهیه شده با استفاده از هماتوکسیلین-ائوزین و روش رنگ آمیزی گیمسا تغییر یافته رنگ آمیزی شدند (۱۲).

گسترش های بافتی توسط دستگاه اسکنر (Slide scanner, OpticLab H850) مورد مطالعه قرار گرفت و عکس برداری انجام شد. وزن قطعات نخاعی با ترازوی دیجیتال اندازه گیری و براساس جرم حجمی نخاع، حجم آن محاسبه شد. در ادامه کار گرید به صورت تصادفی بر روی تصویر انداخته شده و نقاط قابل قبول برخورد را شمارش و براساس فرمول زیر دانسیته حجمی پارامترهای مختلف (ماده خاکستری، ماده سفید، اسکار و واکوئل برای قطعه نخاعی سینه ای نهم و ماده خاکستری، ماده سفید، شاخ پشتی و شکمی نخاع برای سگمنت سینه ای) محاسبه شد (۱۳):

$$V_v = \frac{\sum P(\text{parameter})}{\sum P(\text{total})}$$

$\sum P(\text{parameter})$: تعداد نقاط برخورد به پارامتر مورد

محاسبه

قرارگیری اندام های حرکتی عقبی شامل دم و پاها رتبه های مختلفی از صفر به معنای عدم حرکت اندام های عقبی و ۲۱ راه رفتن طبیعی موش، به جانور داده می شود.



نگاره ۱- برای ایجاد شایعه نخاعی پس از قرار گرفتن موش در زیر دستگاه NYU impactor و فیکس شده مهره ها توسط گیره های مخصوص، وزنه ۱۰ گرمی از ارتفاع ۲۵ میلی متری رها شد (A). نمایی از مهره ی باز شده در ناحیه ی سینه ای نخاع T9 (B)

مطالعه استریولوژی و مورفومتری طناب نخاعی سینه ای

در این بخش از مطالعه بخش سینه ای طناب نخاعی موشهای صحرائی با میانگین وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم جدا شد. نخاع های جدا شده به مدت ۴۸ ساعت در فرمالین ۱۰ درصد جهت فیکس شدن نگهداری شد پس از توزین نخاع ، هر نخاع با فواصل معین به ده قسمت مساوی تقسیم گردید سپس مراحل رنگ آمیزی بر روی قطعات بافت نخاع انجام گردید سپس با استفاده از اسکنر لامهای تهیه شده عکس برداری شده تا سایر مراحل اندازه گیری حجم در طول قطعه سینه ای محاسبه گردد.

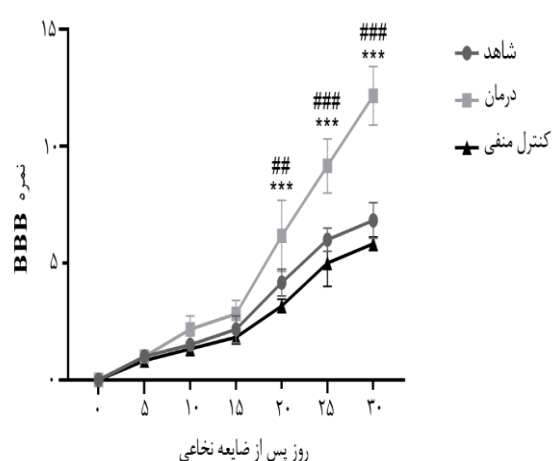
جهت بررسی استریولوژی نمونه ها از دوز موثر استفاده شد، پس از انجام جراحی و ایجاد له شدگی نخاع و اطمینان از صفر شدن رتبه ی رفتاری جانور ، موش ها بصورت تصادفی در ۴ گروه تقسیم شدند. این گروه ها شامل:

۱- گروه کنترل منفی

۲- گروه شاهد

۳- گروه سالم

حجم کل طناب نخاعی در حیوانات بدون دریافت هیچ نوع تیمار بر اساس سیستم شماره دهی (۱ تا ۵) در جدول شماره ۱ نمایش داده شده است. اعداد بر حسب میلی متر مکعب (mm^3) می باشد. علاوه بر این داده های مربوط به توزین نخاع در گروههای مختلف (جدول ۲) و تصاویر استریولوژی مربوط به آنها در شکل ۲ نشان داده شده است.



نگاره ۱. نتایج تست BBB در گروه دریافت کننده هیدروژل کیتوزان آلژینات حاوی EPO در مقایسه با گروه شاهد و گروه کنترل منفی در رت های نژاد ویستار. پس از ایجاد ضایعه (SCI) حیوانات به مدت ۳۰ روز مورد ارزیابی قرار گرفتند و داده های حاصل مورد ارزیابی قرار گرفت. *** بیانگر تفاوت آماری معنادار بین گروه درمان (هیدروژل کیتوزان آلژینات حاوی EPO) و گروه کنترل منفی ($p < 0.001$). ### بیانگر تفاوت آماری معنادار بین گروه درمان (هیدروژل کیتوزان آلژینات حاوی EPO) و گروه شاهد ($p < 0.01$). #### بیانگر تفاوت آماری معنادار بین گروه درمان (هیدروژل کیتوزان آلژینات حاوی EPO) و گروه شاهد ($p < 0.001$)

ΣP (total): تعداد نقاط برخورد به کل نخاع

همچنین حجم پارامترهای مورد بررسی نیز از رابطه زیر بدست آمد:

$$V \text{ (parameter)} = V_v \text{ (parameter)} \times V \text{ (total)}$$

در این رابطه V_v دانسیته حجمی می باشد که از ضرب کردن آن در هر یک از پارامترهای مورد نظر (ماده سفید، ماده خاکستری، اسکار و واکوئل) می توان حجم پارامتر مورد نظر V را تعیین کرد.

آنالیز آماری

تمام آزمایشات با سه تکرار انجام شد و مقادیر میانگین برای تجزیه و تحلیل آماری استفاده شد. از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) برای تعیین وجود هر گونه تفاوت معنی دار استفاده گردید. تفاوت بین گروه ها با استفاده از post test، توکی تعیین شد. مقادیر p کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج BBB و یا تست راه رفتن در فضای باز بیانگر اختلاف معنادار در گروه دریافت کننده هیدروژل کیتوزان آلژینات حاوی EPO در مقایسه با گروه کنترل منفی و گروه شاهد در روزهای ۲۰، ۲۵ و ۳۰ بعد از ایجاد ضایعه ی نخاعی بود. نگاره ۱ نتایج تست BBB را نشان می دهد.

مورفومتری و تعیین حجم کل قطعه سینه ای در طناب نخاعی موش صحرایی سالم

اندازه حجم ماده خاکستری، حجم ماده سفید حجم شاخ پشتی و شاخ شکمی در قطعه سینه ای به همراه ضریب خطا محاسبه شده و بطور کلی بازه ضریب خطا نشانگر اطمینان داده ها، روش نمونه گیری و تعیین حجم می باشد. اعداد

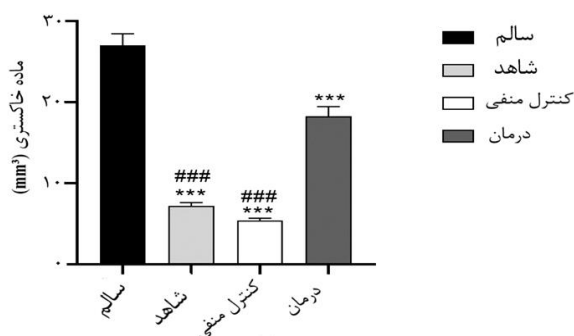
جدول ۱ - مقایسه حجم بخشهای مختلف طناب نخاعی بر حسب میلی متر مکعب (mm³) در حیوانات بدون دریافت تیمار (از حیوان شماره ۱ تا شماره ۵)

شماره حیوان	۱	۲	۳	۴	۵	میانگین	انحراف معیار
حجم نسبی ماده خاکستری (درصد)	۲۴۸۵	۲۳۸۸	۲۴۹۲	۲۲	۲۱۸۸	۲۳۰۰۶	۱۳۳۰
حجم ماده خاکستری (میلی متر مکعب)	۱۲۹۰۵	۱۳۲۰۴۸۸	۱۵۷۰۴۲۷	۱۰۸۰۵۱۹	۱۰۳۰۵۰۹	۱۲۶۰۲۸۸	۱۹۰۲۵۱
حجم نسبی شاخ پشتی (درصد)	۸۰۴۷	۱۳۰۷۲	۸۰۵	۹۰۳۳	۸۰۸۳	۹۰۷۷	۱۰۹۹۹
حجم شاخ پشتی (میلی متر مکعب)	۴۴۰۱۴۱	۷۶۰۱۱۹	۵۳۰۶۹۷	۴۶۰۰۲۰	۴۱۰۷۷۲	۵۲۰۳۵۰	۱۲۰۵۳۸
حجم نسبی شاخ شکمی (درصد)	۱۰۰۸۵	۹۰۲۶	۱۱۰۳۴	۱۱۰۹۶	۱۳۰۸۳	۱۱۰۴۴۸	۱۰۴۸۹
حجم شاخ شکمی (میلی متر مکعب)	۵۶۰۵۴۵	۵۱۰۳۷۷	۷۱۰۶۳۸	۵۸۰۹۹۴	۶۵۰۴۲۶	۶۰۰۷۹۶	۷۰۰۵۷
حجم نسبی ماده سفید (درصد)	۵۵۰۸	۵۳۰۱۱	۵۵۰۱۸	۵۶۰۶۹	۵۵۰۴۴	۵۵۰۲۴۴	۱۰۱۸۲
حجم ماده سفید (میلی متر مکعب)	۲۹۰۰۸۰۳	۲۹۴۰۶۵۸	۳۴۸۰۵۸۹	۲۷۹۰۶۳۴	۲۶۲۰۲۷۳	۲۹۵۰۱۹۱	۲۸۰۹۷۰
حجم کل	۵۰۰۰۹۵۱	۵۳۳۰۳۱۰	۶۰۷۰۰۶۸	۴۷۴۰۲۰۰	۴۵۴۰۷۸۹	۵۱۴۰۰۶۴	

جدول ۲ - توزین طناب نخاعی بر حسب گرم در موشهای مختلف

شماره حیوان	۱	۲	۳	۴	۵
کنترل منفی	۰/۰۷۴	۰/۰۶۷	۰/۰۶۷	۰/۰۷۵	۰/۰۷۲
شاهد	۰/۰۷۳	۰/۰۶۹	۰/۰۶۳	۰/۰۶۴	۰/۰۵۶
سالم	۰/۰۵۲	۰/۰۵۲	۰/۰۶۱	۰/۰۶۱	۰/۰۴۸
درمان	۰/۰۵۳	۰/۰۵۶	۰/۰۴۴	۰/۰۳۲	۰/۰۲۹

گروه

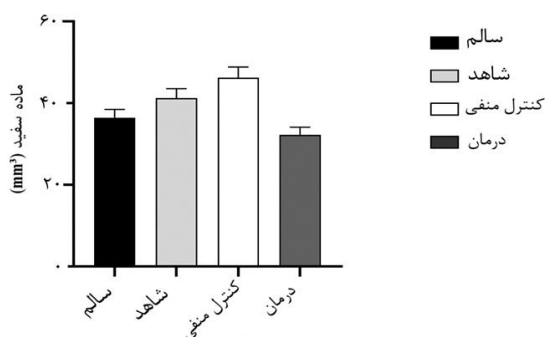


نگاره ۳. حجم کل ماده خاکستری در گروه دریافت کننده هیدروژل کیتوزان آلژینات حاوی EPO (1000 IU/kg) در مقایسه با گروه شاهد، کنترل منفی و سالم پس از ایجاد ضایع (SCI) در قطعه T9 سینه ای در رت های نژاد ویستار. *** بیانگر تفاوت آماری معنادار بین گروه های مختلف با گروه سالم ($p < 0.001$). ### بیانگر تفاوت آماری معنادار بین گروه درمان (هیدروژل کیتوزان آلژینات حاوی EPO) و گروه های شاهد و کنترل منفی ($p < 0.001$)

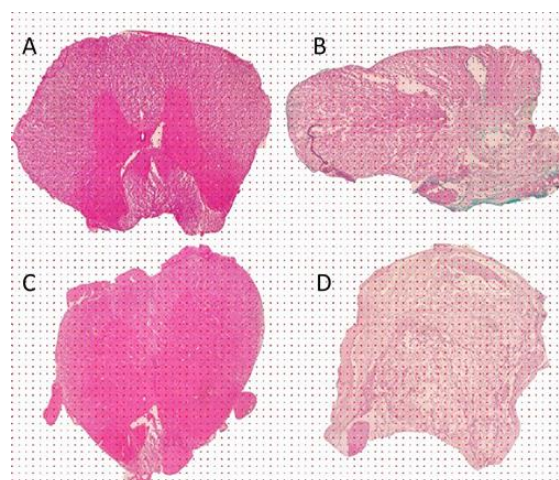
مقایسه حجم کل ماده سفید قطعه ۹ سینه ای (T9)

طناب نخاعی در گروه های مختلف

همانطور که در نگاره ۴ قابل مشاهده است تفاوت آماری معناداری در بین گروه های مختلف از نظر حجم کل ماده سفید در قطعه سینه ای ۹ وجود نداشت ($p > 0.05$)



نگاره ۴. حجم کل ماده سفید در گروه دریافت کننده هیدروژل کیتوزان آلژینات حاوی EPO (1000 IU/kg) در مقایسه با گروه شاهد، کنترل منفی و سالم پس از ایجاد ضایع (SCI) در قطعه T9 سینه ای در رت های نژاد ویستار



نگاره ۲- پوینت های شمارش شده در قطعه سینه ای موش صحرایی در گروه های سالم (A)، کنترل منفی (B)، درمان (C) و شاهد (D).

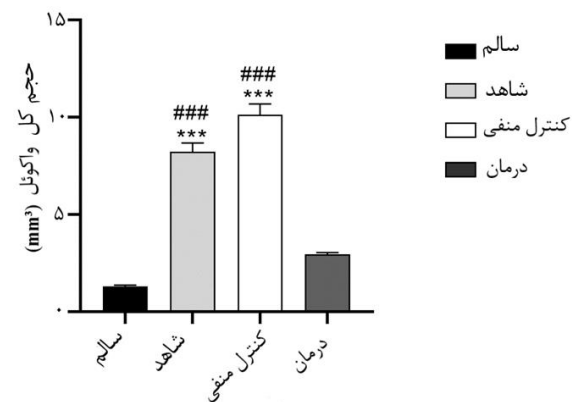
نتایج استریولوژی قطعه ۹ سینه ای (T9) گروه های درمان با هیدروژل حاوی اریتروپویتین در موش های ضایع نخاعی

مقایسه حجم کل ماده خاکستری قطعه ۹ سینه ای (T9) طناب نخاعی در گروه های مختلف در موش های آسیب دیده

مقایسه آماری حجم کل ماده خاکستری در قطعه ۹ سینه ای بین گروه های درمان، کنترل منفی، شم با گروه کنترل سالم تفاوت معنی دار را نشان داده است. اختلاف معنی داری بین گروه های کنترل منفی و شم با گروه سالم وجود داشت ($p < 0.001$) علاوه بر آن، اختلاف معنی داری بین گروه های سالم و درمان نیز مشاهده گردید ($p < 0.05$)؛ همچنین بین گروه های کنترل منفی و درمان نیز اختلاف معنی دار وجود دارد ($p < 0.001$) (نگاره ۳).

مقایسه حجم کل واکوئل های قطعه ۹ (T9) سینه ای طناب نخاعی در گروه های مختلف

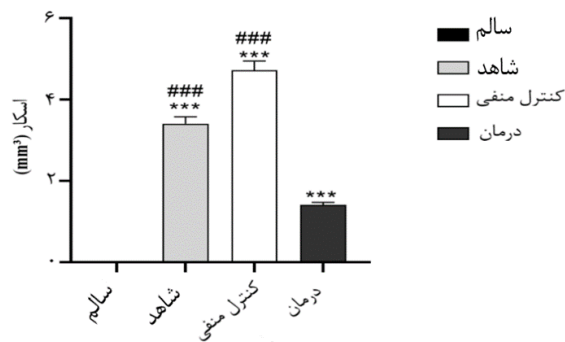
نتایج نشان داد که حجم کل واکوئل ها در قطعه ۹ سینه ای در بین گروه های درمان، کنترل منفی، سالم و شاهد تفاوت معنی دار با یکدیگر دارند. بین گروه های کنترل منفی و شاهد با گروه سالم وجود داشت ($p < 0/001$) علاوه بر آن، اختلاف معنی داری بین گروه های کنترل منفی و درمان و همچنین بین گروه های شاهد و شاهد نیز مشاهده گردید ($p < 0/001$) (نگاره ۵).



نگاره ۵. حجم کل واکوئل در گروه دریافت کننده هیدروژل کیتوزان آلژینات حاوی EPO (1000 IU/kg) در مقایسه با گروه شاهد، کنترل منفی و سالم پس از ایجاد ضایعه (SCI) در قطعه T9 سینه ای در رت های نژاد ویستار. *** بیانگر تفاوت آماری معنادار بین گروه های مختلف با گروه سالم ($p < 0/001$). ### بیانگر تفاوت آماری معنادار بین گروه درمان (هیدروژل کیتوزان آلژینات حاوی EPO) و گروه های شاهد و کنترل منفی ($p < 0/001$).

مقایسه حجم کل اسکار قطعه ۹ (T9) سینه ای طناب نخاعی در گروه های مختلف

مقایسه آماری نشان داد که از نظر حجم کل اسکار در قطعه ۹ سینه ای، بین گروه های درمان، کنترل منفی، سالم و شاهد تفاوت معنی داری وجود دارد. بین گروه های کنترل منفی، شاهد با گروه سالم وجود داشت تفاوت معناداری مشاهده گردید ($p < 0/001$) علاوه بر آن، اختلاف معنی داری بین گروه های کنترل منفی و درمان نیز مشاهده گردید ($p < 0/001$) (نگاره ۶).



نگاره ۶. حجم کل اسکار در گروه دریافت کننده هیدروژل کیتوزان آلژینات حاوی EPO (1000 IU/kg) در مقایسه با گروه شاهد، کنترل منفی و سالم پس از ایجاد ضایعه (SCI) در قطعه T9 سینه ای در رت های نژاد ویستار. *** بیانگر تفاوت آماری معنادار بین گروه های مختلف با گروه سالم ($p < 0/001$). ### بیانگر تفاوت آماری معنادار بین گروه درمان (هیدروژل کیتوزان آلژینات حاوی EPO) و گروه های شاهد و کنترل منفی ($p < 0/001$).

بحث

برای تخمین درصد حجم نسبی، حجم کل در نواحی خاکستری، سفید و شاخ پشتی و شاخ شکمی طناب نخاعی سینه ای از روش استریولوژی استفاده شد. تخمین های Stereological ناحیه سینه ای نشان می دهد که حجم کل ماده خاکستری در ناحیه سینه ای موش صحرائی میانگین ۱۲۶,۲۸۸۶ میلی متر مکعب و همچنین حجم کل ماده سفید در ناحیه سینه ای موش صحرائی میانگین

اگرچه SCI می تواند منجر به پروليفراسيون سلولهای بنیادی عصبی (NSC) می شود اما بیشتر سلولهای تازه تشکیل شده به آستروسیت تمایز پیدا می کنند و به ندرت نوروں ها را شکل می دهند. با این وجود مشخص شده است که سیگنالینگ EPO می تواند تمایز به نوروں را القا کند و هم در شرایط فیزیولوژیک و هم در شرایط پاتولوژیکی منجر به تولید الیگودندریست های جدید در مغز رت های بالغ شود. Zhang و همکاران در مطالعه خود نشان دادند که EPO در تمامی زمانهای پس از SCI و الیگودندریسیست ها در روزهای ۸ و ۱۴ پس از SCI به طور معناداری افزایش پیدا می کنند (۱۵). نگرانی عمده ای که در رابطه با اریتروپویتین وجود دارد مربوط به خطر ترومبوز پس از تجویز دوزهای متعدد از این گلیکوپروتئین می باشد. برای رفع این مشکل نیز مشتقات متفاوتی از آن تولید شده اند. EPO نوترکیب انسانی (rhEPO) و مشتقات غیر اریتروپوئیتیک آن، پتانسیل ضد آپوپتوز و ضد التهابی قدرتمندی دارند. EPO کاربامیله (CEPO) و آسیالو اریتروپویتین (AsialoEPO) مشتقات ساختاری EPO هستند که هیچ تأثیری بر توده گلبول قرمز ندارند در حالی که اثرات محافظت عصبی خود را حفظ می کنند (۱۶).

یک رویکرد درمانی موثر برای یافتن یک درمان قطعی برای بیماران SCI سالهاست که در بین محققان یک شکست ثابت است. آسیب پذیری شدید سلول های عصبی در برابر آسیب های خارجی و ناتوانی در بازسازی آنها و همچنین ماهیت خود تخریب ضایعات نخاعی ، دستیابی به نتیجه بالینی مطلوب را کاملاً چالش برانگیز کرده است. در حال حاضر ، تنها داروی مورد تایید بالینی، که در اینجا استفاده می شود ، متیل پردنیزولون است. اگرچه اثرات مفیدی برای این کورتیکواستروئید معروف توصیف شده است، اما تجویز آن هیچ پیشرفت چشمگیری در عملکرد ایجاد نمی

۲۹۵،۱۹۱۴ میلی متر مکعب می باشد. میانگین بدست آمده از شاخ پشتی در ناحیه سینه ای موش صحرایی ۵۲،۳۵۰۲۸ میلی متر مکعب و شاخ شکمی ۶۰،۷۹۶۳۸ میلی متر مکعب می باشد. مطالعات انجام شده حجم ماده ی خاکستری و سفید در ناحیه ی گردنی گربه، خرگوش و انسان مشخص شده است. و همینطور اثبات شده است تفاوت بین حجم نمونه در یک گونه به علت روش های استفاده شده برای تخمین می باشد (۱۳).

در انسان، گوسفند، موش، خرگوش، اسب، گربه و رت بخش توراسیک همواره بلند ترین بخش نخاع است و به ترتیب بعد از آن بخش های سرویکال، لامبار و ساکرال قرار دارند (۱۴). طبق مطالعه ی حاضر میانگین حجم نخاع سینه ای در موش صحرایی ۵۱۴،۰۶ میلی متر مکعب است. در مقایسه، با مطالعات انجام شده بر روی نخاع سینه ای در انسان، حجم کل نخاع در انسان در همین بخش عدد ۷۹۱،۸۱ می باشد. حجم ناحیه ی سینه ای نخاع جز در رت و انسان تاکنون مقایسه نشده است.

یافته های حاصل از تست BBB به وضوح نشان داد استفاده از هیدروژل کیتوزان آلزینات حاوی EPO پس از ۲۰ روز می تواند عملکرد حرکتی حیوان را در مقایسه با گروههای شاهد و کنترل منفی به شکل معناداری بهبود بخشد. برای ارزیابی حجم کل، درصد حجم نسبی در نواحی خاکستری و سفید، واکول و اسکار در قطعه ۹ سینه ای در موش های صحرایی دارای ضایعه نخاعی از تکنیک استریولوژی استفاده شد. تست های استریولوژی نشان می دهند که حجم ماده ی خاکستری در گروه درمان به طرز معنی داری افزایش داده است ولی حجم ماده ی سفید بین گروه ها تغییراتی نشان نداده است. علاوه بر این، در گروه دریافت کننده هیدروژل حاوی EPO میزان واکوئل و اسکار در مقایسه با گروه کنترل منفی به نحو قابل توجهی کاهش نشان داد.

های قبلی در مورد اثرات مفید EPO برای درمان SCI و محدودیت های مطالعات قبلی (۱۱)، ما تلاش کردیم تا EPO را در دوزهای مختلف در داربست هیدروژل آلزینات کیتوزان ادغام کنیم تا (۱) از انتشار پایدار دارو پشتیبانی کند. (۲) خطر تجویز سیستمیک آن را کاهش دهد و در نهایت (۳) اثرات احیا کننده کیتوزان را با اثرات در مکانیسم های آسیب ثانویه ترکیب کند.

آسیب طناب نخاعی (SCI) یک وضعیت عصبی ناتوان کننده است. در ابتدا با روش استریولوژی، حجم کلی نخاع سینه ای موش صحرایی سالم محاسبه شد. سپس حجم نخاع سینه ای در ناحیه T9، حجم ناحیه خاکستری، سفید، واکوئل، اسکار و عملکرد حرکتی حیوان با تست BBB در موش ضایعه دیده، ارزیابی گردید. اریتروپویتین (EPO) از طریق فعال کردن مسیرهای پیامرسانی باعث محافظت از سلول ها در انواع بافت ها از جمله نخاع می شود. هدف از این مطالعه بررسی نقش هیدروژل کیتوزان آلزینات حاوی EPO بر آسیب ناشی از SCI می باشد. یافته های حاصل از تست BBB نشان داد استفاده از هیدروژل حاوی EPO پس از ۲۰ روز می تواند عملکرد حرکتی حیوان را به شکل معناداری بهبود بخشد. تخمین های Stereological ناحیه سینه ای نشان می دهد که حجم کل ماده خاکستری در ناحیه سینه ای موش صحرایی میانگین ۱۲۶،۲۸۸۶ میلی متر مکعب (mm³) و همچنین حجم کل ماده سفید در ناحیه سینه ای میانگین ۲۹۵،۱۹۱۴ mm³ می باشد. میانگین بدست آمده از شاخ پستی در ناحیه سینه ای ۵۲،۳۵۰۲۸ mm³ و شاخ شکمی ۶۰،۷۹۶۳۸ mm³ می باشد و یا به عبارتی میانگین حجم کل نخاع سینه ای در موش صحرایی ۵۱۴،۰۶ mm³ محاسبه گردید. در گروه های درمان شده با هیدروژل حاوی EPO، میزان واکوئل

کند و محدودیت هایی مانند عوارض جانبی جدی دارد و تنها در مرحله ی حاد آسیب، تاثیرگذاری مثبت نشان داده است.

اگرچه پیشگیری از دلایل اصلی SCI مانند تروما به طور کلی غیرممکن و خارج از کنترل است، درمان موفقیت آمیز آن را می توان از دو طریق به دست آورد: اول، ارتقا توانایی (ability) بازسازی سلول های عصبی آسیب دیده و دوم، مهار مکانیسم های اساسی ثانویه جراحی. در راستای رویکرد اول، تلاشهای زیادی برای ارتقا بازسازی و ترمیم عصب با استفاده از سلول درمانی و مداخلات جراحی انجام شده است. در پی دستیابی به عوامل موثر برای جلوگیری از پیشرفت آسیب ثانویه، EPO توجه بسیاری از محققان این حوزه را پس از روشن شدن نقشهای محافظتی خود، در سیستم عصبی مرکزی جلب کرد. به زودی مشخص شد که EPO، به عنوان یک عامل محافظت از نورون، نه تنها می تواند مکانیسم های آسیب ثانویه را مهار کند، بلکه باعث بهبود قابل توجه عملکرد حرکتی در مدل های تجربی SCI می شود. القای اتوفازای فعال شده توسط AMP، ارتقا بیان آدرنومدولین، آپوپتوز و تضعیف التهاب و همچنین اثرات فراخوان سلولی در ترکیب با سایر روشهای درمانی سلولی از اثرات مفیدی است که به EPO در زمینه SCI نسبت داده شده است (۱۷).

اکثریت قابل توجه از مطالعات، برای بررسی اثرات EPO در SCI از تجویز داخل صفاقی (I.P) استفاده کرده اند اما این مسیر به دلیل اثر گذر اول (First pass effect) ممکن است دارای تاثیر محدودی باشد (۱۸) و همچنین ممکن است عوارض جانبی جدی تری ایجاد کند. از طرف دیگر، علی رغم یافته های قبلی در مورد اثرات ضد آپوپتوتیک EPO در مغز و سایر مکان های سیستم عصبی، هیچ مطالعه ای به طور انحصاری اثرات آپوپتوتیک آن را با توجه به SCI تجربی بررسی نکرده است. با تأیید یافته

8. Yao Z-a, Chen F-j, Cui H-l, Lin T, Guo N, Wu H-g. Efficacy of chitosan and sodium alginate scaffolds for repair of spinal cord injury in rats. *Neural regeneration research*. 2018;13(3):502.
 9. Prang P, Müller R, Eljaouhari A, Heckmann K, Kunz W, Weber T, et al. The promotion of oriented axonal regrowth in the injured spinal cord by alginate-based anisotropic capillary hydrogels. *Biomaterials*. 2006;27(19):3560-9.
 10. Gholami M, Gilanpour H, Sadeghinezhad J, Asghari A. Facile fabrication of an erythropoietin-alginate/chitosan hydrogel and evaluation of its local therapeutic effects on spinal cord injury in rats. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021;29(2):255-65.
 11. Acar N, Karakasli A, Karaarslan A, Mas NN, Hapa O. The reliability of Cavalier's principle of stereological method in determining volumes of enchondromas using the computerized tomography tools. *Journal of Orthopaedic Surgery*. 2017;25(1):2309499016684503.
 12. Khodabandeh Z, Mehrabani D, Dehghani F, Gashmardi N, Erfanizadeh M, Zare S, et al. Spinal cord injury repair using mesenchymal stem cells derived from bone marrow in mice: A stereological study. *Acta histochemica*. 2021;123(5):151720.
 13. Sadeghinezhad J, Nyengaard JR. Morphometry of cervical spinal cord in cat using design-based stereology. *Anatomia, Histologia, Embryologia*. 2021;50(4):746-55.
 14. Sadeghinezhad J, Zadsar N, Hasanzadeh B. Morphometric changes in the spinal cord during prenatal life: a stereological study in sheep. *Anatomical Science International*. 2018;93(2):269-76.
 15. Zhang H, Fang X, Huang D, Luo Q, Zheng M, Wang K, et al. Erythropoietin signaling increases neurogenesis and oligodendrogenesis of endogenous neural stem cells following spinal cord injury both
- و اسکار در بافت نخاع نسبت به گروه کنترل منفی به طور معناداری کاهش پیدا کرده است. هیدروژل حاوی ۱۰۰۰ واحد اریتروپویتین می تواند به طور قابل توجهی ترمیم بافت و ظاهر بافت شناسی نخاع را در محل آسیب بهبود بخشد.

فهرست منابع

1. Alizadeh A, Dyck SM, Karimi-Abdolrezaee S. Traumatic Spinal Cord Injury: An Overview of Pathophysiology, Models and Acute Injury Mechanisms. *Front Neurol*. 2019;10:282.
2. Jazayeri SB, Beygi S, Shokraneh F, Hagen EM, Rahimi-Movaghar V. Incidence of traumatic spinal cord injury worldwide: a systematic review. *Eur Spine J*. 2015;24(5):905-18.
3. Kang Y, Ding H, Zhou H, Wei Z, Liu L, Pan D, et al. Epidemiology of worldwide spinal cord injury: a literature review. *Journal of Neurorestoratology*. 2018;6(1):3.
4. Apuzzo ML. Pharmacological therapy after acute cervical spinal cord injury. *Neurosurgery*. 2002;50(3 Suppl):S63-S72.
5. Kaptanoglu E, Solaroglu I, Okutan O, Surucu HS, Akbiyik F, Beskonakli E. Erythropoietin exerts neuroprotection after acute spinal cord injury in rats: effect on lipid peroxidation and early ultrastructural findings. *Neurosurgical review*. 2004;27(2):113-20.
6. Marcos R, Monteiro RA, Rocha E. The use of design-based stereology to evaluate volumes and numbers in the liver: a review with practical guidelines. *Journal of anatomy*. 2012;220(4):303-17.
7. Cho Y, Shi R, Borgens RB. Chitosan produces potent neuroprotection and physiological recovery following traumatic spinal cord injury. *Journal of experimental biology*. 2010;213(9):1513-20.

- in vivo and in vitro. *Molecular Medicine Reports*. 2018;17(1):264-72.
16. Mofidi A, Bader A, Pavlica S. The use of erythropoietin and its derivatives to treat spinal cord injury. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 2011;11(9):763-70.
17. Costa DD, Beghi E, Carignano P, Pagliacci C, Faccioli F, Pupillo E, et al. Tolerability and efficacy of erythropoietin (EPO) treatment in traumatic spinal cord injury: a preliminary randomized comparative trial vs. methylprednisolone (MP). *Neurological Sciences*. 2015;36(9):1567-74.
18. Nekoui A, Tresierra VDCE, Abdolmohammadi S, Shedid D, Blaise G. Neuroprotective effect of erythropoietin in postoperation cervical spinal cord injury: case report and review. *Anesthesiology and pain medicine*. 2015;5(6).