

## مقاله پژوهشی

# بررسی مطالعه رفتاری و الکتروفیزیولوژی در استفاده از پیوند سلول‌های استرومایی مغز استخوان به همراه عصاره زیتون در ترمیم عصب سیاتیک قطع شده در موش صحرایی

مصطفی معظمی گودرزی<sup>۱</sup>، نسیم حیاتی رودباری<sup>۲</sup>، غلامرضا کاکا<sup>۳</sup>، کاظم پریور<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری زیست‌شناسی سلولی تکوینی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

<sup>۲</sup> دانشیار گروه زیست‌شناسی سلولی تکوینی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

<sup>۳</sup> دانشیار گروه آناتومی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بقیه اله، تهران، ایران

<sup>۴</sup> استاد گروه زیست‌شناسی سلولی تکوینی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

\* (نویسنده مسئول مکاتبات): nasimhayati@yahoo.com

تاریخ پذیرش: مرداد ۱۴۰۲

تاریخ دریافت: فروردین ۱۴۰۲

## چکیده

**سابقه و هدف:** در این مطالعه تاثیر درمانی سلول‌های استرومایی مغز استخوان به همراه عصاره زیتون در ترمیم عصب سیاتیک قطع شده در موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار توسط بررسی رفتاری، الکتروفیزیولوژی ارزیابی شد. **مواد و روش‌ها:** پس از قطع کردن عصب سیاتیک، موش‌های صحرایی نر بالغ، به طور تصادفی در ۴ گروه ۷ تایی تقسیم شدند.

گروه نرمال، رت‌های سالم بدون ایجاد آسیب، گروه کنترل رت‌هایی با قطع عصب سیاتیک بدون مداخله درمانی. گروه پیوند، رت‌هایی که توسط سلول‌های استرومایی مغز استخوان به همراه عصاره زیتون در محل قطع عصب سیاتیک درمان شدند. گروه تجربی، رت‌هایی که با تزریق سلول‌های استرومایی مغز استخوان در محل آسیب درمان شدند. میزان بهبودی توسط شاخص فعالیت حسی و حرکتی عصب سیاتیک و مطالعات الکتروفیزیولوژی ارزیابی گردید.

**یافته‌ها:** در ارزیابی حرکتی عصب سیاتیک، 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 زیتون ترمیم در پایان هفته هشتم حاصل گردید. میزان عددی AMP در هفته هشتم پس از ترمیم، در گروه سلول درمانی دارای شیب ملایمی است که این امر نشان دهنده روند بهبودی در گروه سلول درمانی است. نتایج حاصل از شمارش تعداد رشته‌های عصبی در سطحی برابر با ۱۰۰۰ میکرومتر مربع، تعداد رشته‌های عصبی در گروه‌های سلول درمانی در هفته هشتم پس از ترمیم، در مقایسه با گروه کنترل و گروه غشاء کیتوسان - ژلاتین افزایش داشته است. در پایان هفته هشتم بر اساس شاخص فعالیت حسی عصب سیاتیک (تست Hot Plate)، روند ترمیم در گروه سلول درمانی به همراه عصاره زیتون نسبت به سایر گروه‌ها مشهودتر بود.

**نتیجه گیری:** با توجه به شواهد بدست آمده می‌توان نتیجه گرفت که پیوند سلول استرومایی سبب ترمیم عصب سیاتیک قطع شده می‌شود و هم چنین عصاره زیتون به همراه سلول‌های استرومایی موجب تسریع در روند ترمیم عصب سیاتیک می‌شود.

**کلیدواژه‌ها:** سلول‌های استرومایی مغز استخوان، عصاره زیتون، عصب سیاتیک، ترمیم، موش صحرایی.

## مقدمه

امروزه یکی از معضلات اصلی در سراسر جوامع بشری اعم از صنعتی و غیرصنعتی با آن روبرو هستند، آسیب به سیستم اعصاب محیطی است [۱، ۲]. جراحات‌های ناشی از عوارض جنگ، حوادث رانندگی، سوانح شغلی، بلایای طبیعی مانند سیل، زلزله و مصدومیت‌های ورزشی که منجر به آسیب اعصاب محیطی می‌گردد، علاوه بر هزینه‌های سنگین درمان، پیامدهای ناگواری چون قطع عضو، معلولیت‌های مادام‌العمر، از دست دادن شغل و موقعیت اجتماعی را به همراه دارند. با توجه به تحقیقات انجام شده، سالانه بیش از ۹۰ هزار نفر در سراسر دنیا دچار آسیب‌های ناشی از سیستم‌های عصبی می‌شوند [۱]. تخمین زده می‌شود که حداقل ۱۰ هزار نفر از این تعداد به نوعی دچار آسیب به فیبرهای عصبی می‌شوند [۲]. ساده‌ترین روش درمانی برای ترمیم صدمات ناشی از قطع عصب، اتصال دو انتهای عصب قطع شده توسط بخیه و یا چسب فیبرین است. اما این روش همیشه با موفقیت همراه نیست [۳ و ۴]. به این ترتیب راه حل کاملاً رضایت بخشی برای حل این مسئله به گونه‌ای که شرایط بعد از ترمیم و در حد کاملاً طبیعی باشد وجود ندارد [۵]. البته در سیستم عصبی محیطی بر خلاف سیستم عصبی مرکزی، رشته‌های عصبی محیطی قادر به بازسازی و عصب‌دهی هدف‌های دیستال می‌باشند و این فرآیند بلافاصله بعد از جراحی آغاز می‌شود [۵ و ۶]. یکی از اهداف تحقیق بر روی سلول‌های استرومایی مغز استخوان<sup>۱</sup> استفاده از آن‌ها در کلینیک و جهت درمان بیماری‌ها و ضایعات مختلف بر بافت‌های بدن می‌باشد. اینکه این سلول‌ها چگونه در بافت میزبان می‌توانند سبب بهبود و رفع آسیب بافت‌ها گردند، در بین محققان مورد اختلاف است، برخی معتقدند که این سلول‌ها این عمل را توسط تولید برخی از فاکتورهایی که برای تحریک ترمیم بافت ضروری هستند، انجام می‌دهند [۷]. امروزه مشخص شد که حضور برخی مواد شیمیایی مرسوم به عوامل نوروتروفیک در اطراف محل ضایعه سبب تقویت رشد آکسون و هدایت آن در مسیر صحیح می‌گردد. از این عوامل می‌توان به فاکتور رشد عصب<sup>۲</sup>، فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز<sup>۳</sup> اشاره نمود [۵، ۷]. بر اساس یافته‌ها دیده شده است

که زیتون در حفاظت از طناب نخاعی موش با آسیب ثانویه به دلیل افزایش در نفوذ نوتروفیل موثر است [۶]. تحقیقات نشان می‌دهد پلی‌فنل‌های روغن زیتون دارای خواص آنتی‌اکسیدان و ضد التهابی است [۵].

همچنین در این تحقیقات دیده اند که پلی‌فنول زیتون در موش در روند التهاب به عنوان زیر ساختاری از TNF- $\alpha$  و IL-10 نقش دارد. اثر محافظت نوروئی روغن زیتون (VOO) مربوط به پلی‌فنل‌هایی است که خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند. هیدروکسی تیروزول، اتیل اتر (HTEE)، تیروزول اتر اتیل (TEE)، هر سه ترکیبات، اثرات محافظت نوروئی مشابه دارند [۷].

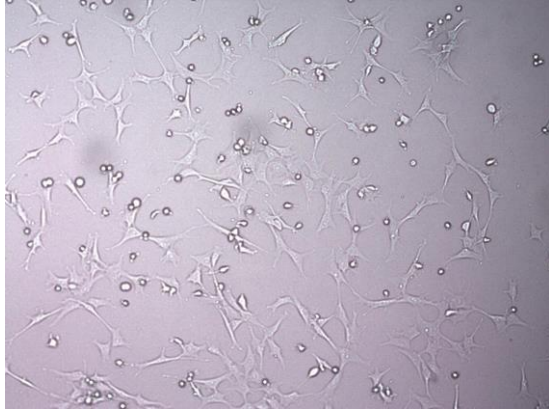
همچنین دیده شده که اسید oleanolic، ماسلینیک اسید، uvaol و erythrodol سه ماده اصلی در زیتون، برگ درخت زیتون و روغن زیتون است. این سه ماده، خواص مختلفی، از جمله فعالیت ضد تومورالی، فعالیت ضد التهابی و حفاظت از آنتی‌اکسیدان را دارند (در سال‌های اخیر محققین سعی دارند از پیوندهای سلولی جهت جایگزینی بافت از دست رفته استفاده کنند. در این راستا از سلول‌های مختلف مانند سلول‌های قرمز مغز استخوان، فیبروبلاست‌ها، سلول‌های بنیادی فولیکول مو و سلول‌های شوان استفاده شده است [۸-۱۰]. عصب سیاتیک بلندترین و بزرگترین عصب بدن است. این عصب بعد از خروج از لگن در پشت باسن و ران به سمت پایین آمده و حس پوست پشت ران را تأمین می‌کند. کمی بالاتر از زانو به دو شاخه تیبیال و پروتئال تقسیم شده و این شاخه‌ها تمامی حس و حرکت زانو پایین تر از آن را تأمین می‌کنند. سلول‌های بنیادی به دلیل توانایی در تولید انواع سلول‌های جدید و بازسازی و ترمیم بافت‌ها در زمینه مهندسی بافت مورد توجه بسیاری از دانشمندان قرار گرفته است [۱۲]. صدمه به دستگاه عصبی محیطی (PNS) باعث هدایت فرایند سلولی است که منجر به فروپاشی کامل بخش دیستال عصب در محل زخم، به نام والرین دژنریشن می‌شود. انحطاط والرین به طور معمول باعث ایجاد یک واکنش التهابی قوی در سلول‌های شوان می‌شود. سلول‌های شوان که در تماس نزدیک با عصب هستند جزو اولین بخش‌هایی است که به آسیب عصب واکنش نشان می‌دهند. آن‌ها تولید سیتوکین‌های التهابی را مانند TNF و IL-1a و IL-1B در عرض چند ساعت بعد از آسیب

<sup>1</sup> Bone Marrow Stromal Cell (BMSC)

<sup>2</sup> Nerve Growth Factor (NGF)

<sup>3</sup> Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)

درصد کف فلاسک رسید، توسط Trypsin 0.025% و EDTA 0.04% پاساژ داده شده‌اند، این عمل تا دو پاساژ ادامه یافت، در این شرایط سلول‌ها از یک مرفولوژی دوکی شکل یکسانی برخوردار شده‌اند (شکل ۱).



شکل ۱. تصویر میکروسکوپی سلول‌های استرومایی مغز استخوان ۲۴ ساعت بعد از پاساژ ۲. بزرگنمایی  $\times 100$

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 خانه‌ای لام نئوبار شمارش شده و پس از میانگین گرفتن از تعداد سلول‌ها عدد بدست آمده در  $20000$  ضرب گردید تا تعداد سلول‌ها در حجم ۱ سی سی محیط کشت به دست آید (شکل ۲).

جهت بررسی خلوص سلول‌های استرومایی مغز استخوان: در این ارزیابی از رنگ آمیزی ایمونوسایتوشیمی انجام شد و برای این منظور از آنتی‌بادی 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، آنتی‌بادی اولیه به مدت یک شب بر روی سلول‌ها ریخته شد. پس از شست و شوی آنتی‌بادی ثانویه بیوتین اویدین متصل به آنزیم Peroxidase و رنگ DAB برای

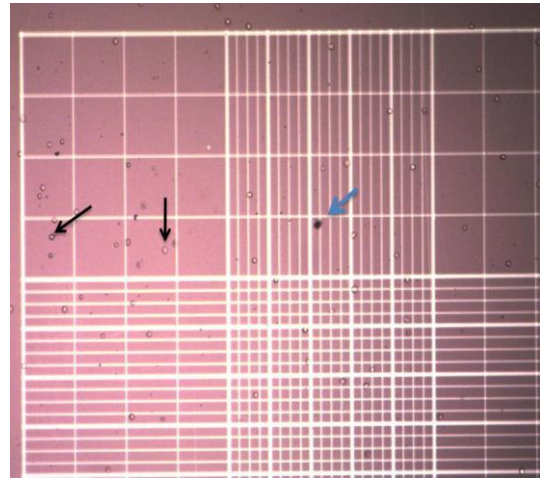
عصب القا می‌کنند. این مواد باعث القای بیان مواد واسطه دیگری به نام‌های IL-6، IL-10، GM-CSF، هم در سلول‌های شوان و هم فیبروبلاست‌ها می‌گردد عصاره زیتون با داشتن موادی مثل پلی فنول در کاهش التهاب عصب آسیب دیده می‌تواند موثر باشد (۹). هدف از این مطالعه ارزیابی استفاده از پیوند سلول‌هایی مغز استخوان به همراه عصاره زیتون در ترمیم عصب سیاتیک قطع شده در موش صحرایی پس از قطع و اتصال مجدد دو ناحیه پروگزیمال و دیستال عصب می‌باشد.

### مواد و روش کار

در این تحقیق از ۲۸ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار به وزن تقریبی 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 زیتون 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 رعایت شده است.

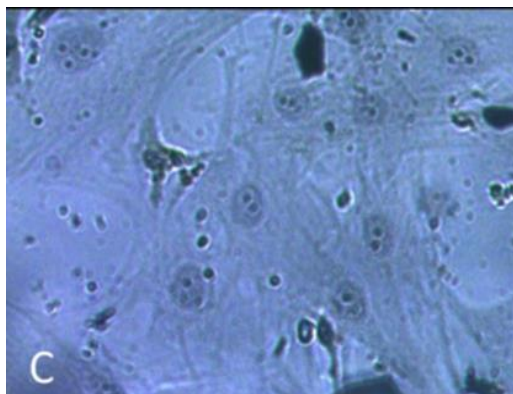
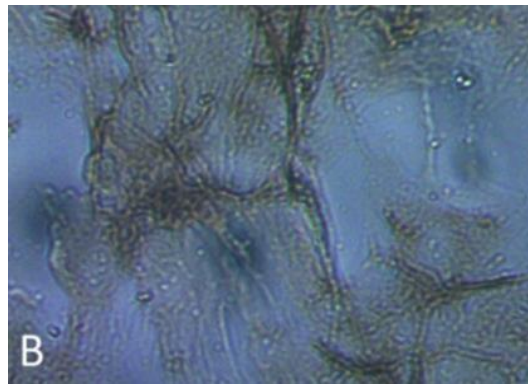
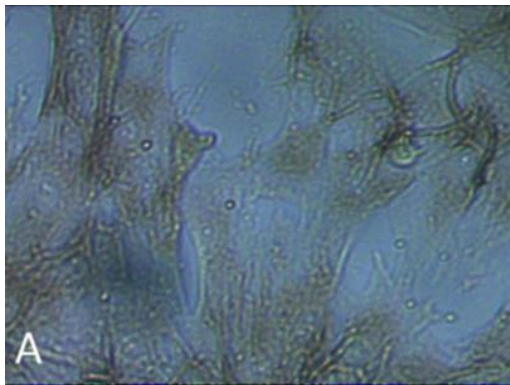
جدا سازی و کشت سلول‌های استرومایی مغز استخوان: ابتدا موش‌های صحرایی بالغ نر به صورت تصادفی انتخاب شدند و پس از القاء بیهوشی توسط مخلوطی از کتامین به مقدار  $90 \text{ mg/kg}$  و زایلازین به مقدار  $10 \text{ mg/kg}$  و تثبیت حیوان بر روی سینی تشریح و برش پوست استخوان ران پای چپ حیوان نمایان شد. سپس توسط مته با قطر ۱ میلی متر سوراخی در سطح خارجی استخوان ران ایجاد شد و با کمک سرنگ ۵ میلی لیتری حاوی ۱ میلی لیتر محیط Apha-MEM و سرم جنین گاوی (FBS) ۱۰ درصد و یک سوزن 18G مغز استخوان را از هر دو طرف انتهای پروگزیمال و دیستال استخوان آسپیره کرده و تمام محتویات سرنگ را به درون یک فلاسک ۲۵ سی سی تخلیه کرده و در انکوباتور  $\text{PH}: 7.2$  با دمای  $37$  درجه سانتی‌گراد و میزان  $\text{CO}_2$  ۵ درصد و شرایط رطوبت برای مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. هنگام تعویض محیط توسط PBS استریل انجام گردید، پس از آن تعویض محیط هر ۲ تا ۳ روز با تخلیه کامل سلول‌های خونی و خونساز و پرشدن بیش از ۸۰ درصد کف فلاسک اولیه ادامه یافت. هنگامی که تراکم سلول‌ها به ۸۰

رنگ‌آمیزی سلول‌ها استفاده و در انتها، شست و شو با PBS انجام شد (شکل ۳).



شکل ۲. تصویر میکروسکوپی سلول‌های استرومایی مغز استخوان در لام نیویار با بزرگنمایی ۴۰۰. پیکان سیاه رنگ BMSC زنده، پیکان آبی رنگ‌های BMSC مرده رنگ گرفته با تریپان بلو.

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 مداخله‌ای، ۳. گروه تجربی ۱: تزریق ۱۰۰ هزار سلول استرومایی مغز استخوان توسط سرنگ همپلتون در محل قطع عصب، ۴. گروه تجربی ۲: تزریق ۱۰۰ هزار سلول استرومایی مغز استخوان در محل ضایعه به همراه تزریق داخل صفاقی عصاره زیتون ارزیابی حرکتی با تست فوت پرنیت: 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. [۱۳] 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.



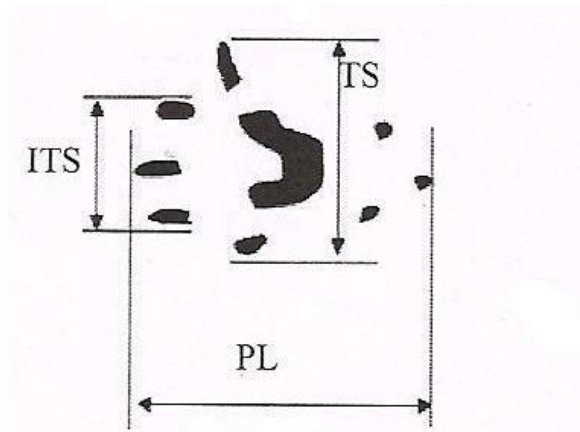
شکل ۳. تصویر میکروسکوپی سلول‌های استرومایی، پس از انجام ایمونوسیتوشیمی با بزرگنمایی ۴۰۰× A، B، C به ترتیب مربوط به آنتی بادی اولیه فیبرونکتین، آنتی CD44 و کنترل منفی سلول‌های تمایز نیافته BMSC در پایان پاساژ دوم.

مطالعات الکترومیوگرافی: در پایان هفته هشتم موشهای هر گروه از طریق داخل صفاقی کاملاً بیهوش شدند. در طول دوره بیهوشی دمای بدن موش‌ها با استفاده از لامپ حرارتی در حد دمای اتاق (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 (بالتر از محل ضایعه اصلی) قرار گرفت. برای ثبت تغییرات پتانسیل ناشی از تحریک، دو الکتروکده‌ای، یکی بر روی عضله گاستروکنیموس و دیگری یک سانتیمتر زیر برجستگی تیبا فرو برده شد. برای ثابت نگه داشتن فاصله بین الکترودهای سوزنی و کده‌ای 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 عصب‌گیری سالم باشد هیچ گونه فعالیت الکتریکی در حالت استراحت در آن وجود ندارد که اصطلاحاً به آن سکوت الکتریکی می‌گویند.

سرعت هدایت پیام عصبی (NCV) و دامنه پتانسیل فعالیت حرکتی (AMP)، جهت بررسی و تجزیه و تحلیل ثبت گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها: نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS 23 و آنالیز واریانس یک 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 نرم افزار Microsoft Excel 2017 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 درماتی به همراه عصاره زیتون ترمیم در پایان هفته هشتم حاصل گردید، در مقایسه با گروه کنترل، در واقع



شکل ۵- نمایش کف پای رت

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

PL نشان دهنده طول کف پا، TS نشان دهنده فاصله بین سرانگشتان ۱ و ۵، IT نشان دهنده فاصله بین سرانگشتان ۲ و 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. (۱۷، ۱۶، ۱۵، ۱۴، ۱۳ معظمی و همکاران).

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 حرارت 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 از 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. (معظمی و همکاران)



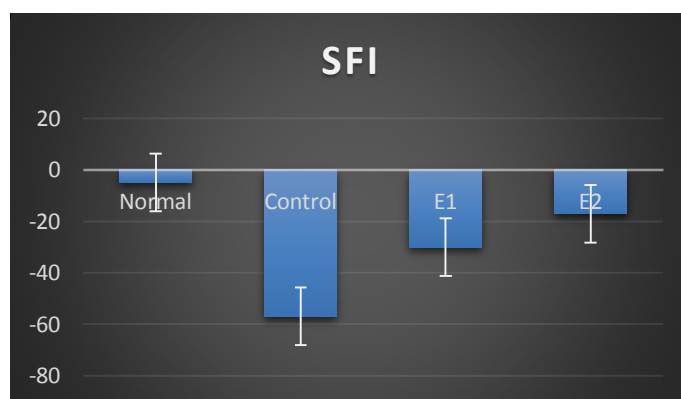
بهتری در میلین‌سازی رشته‌های عصبی مشاهده گردید (نمودار شماره ۴).

### بحث

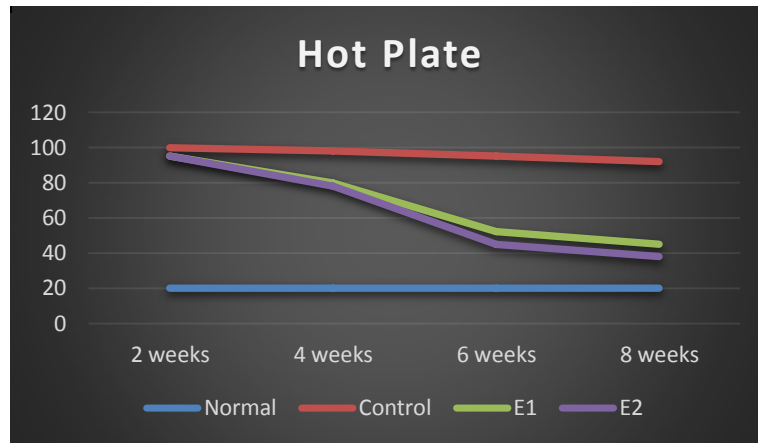
در تحقیق حاضر نشان داده شد که در پایان هفته هشتم ترمیم و انجام الکترومیوگرافی بر روی حیوانات با بررسی میزان AMP مشاهده شد که، مقدار AMP در گروه سلول درمانی رشد قابل ملاحظه‌ای در مقایسه با گروه کنترل داشته و این میزان به نمونه نرمال در حال نزدیک شدن می‌باشد که این اتفاق می‌تواند در مورد ترمیم عصب قطع 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 [۱۷]. در این رابطه می‌توان به پژوهش‌های معظمی و همکاران [۱۷] و تاجیک و همکاران [۱۸] 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. در بررسی ترمیم اعصاب محیطی، تعداد آکسون‌های ترمیم شده از لحاظ تعداد، میلین دار شدن و بررسی کیفیت غلاف میلین ترمیم شده مد نظر قرار می‌گیرد [۳۴ و ۲۹]. cueras و همکاران نشان دادند که در

روند بهبودی در گروه سلول درمانی به همراه عصاره زیتون در مقایسه با گروه سلول درمانی بدون عصاره زیتون 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 میلین‌سازی را به دست آورد.

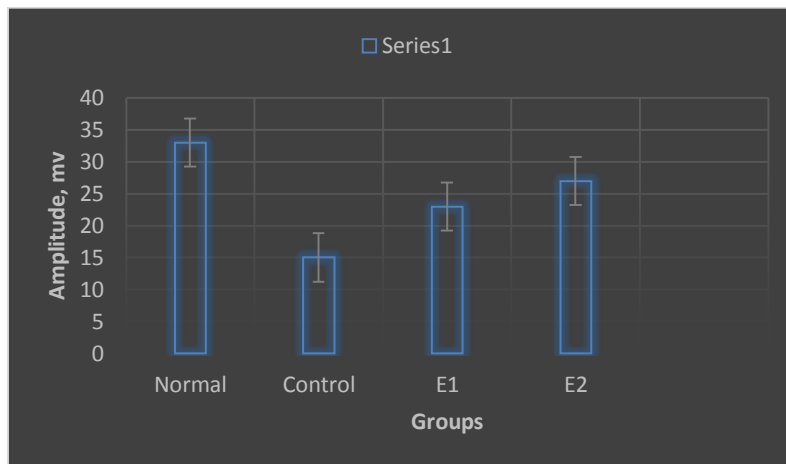
میزان عددی AMP در هفته هشتم پس از ترمیم، در گروه سلول درمانی دارای شیب ملایمی است این امر نشان دهنده روند بهبودی در گروه سلول درمانی است، روند بهبودی در گروه سلول درمانی به همراه عصاره زیتون نسبت به گروه کنترل و گروه سلول درمانی فاقد عصاره زیتون بهتر بوده و به نمونه نرمال نزدیک تر شده است (نمودار شماره 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 زیتون نسبت به سایر گروه‌ها ترمیم



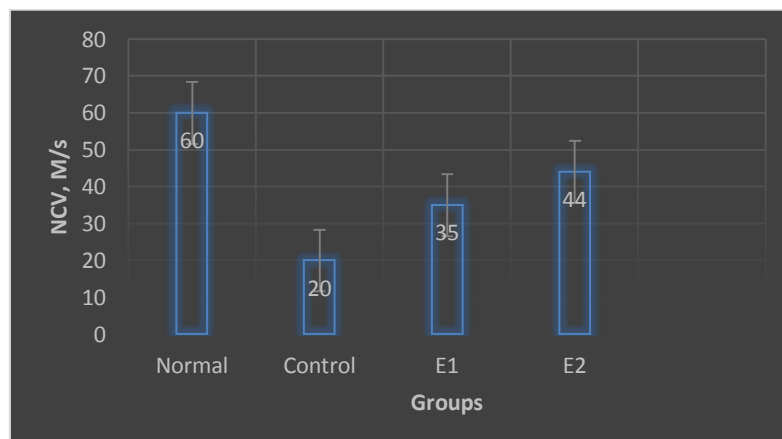
نمودار ۱.  $p < 0.05$  ارزیابی شاخص عملکرد حرکتی عصب سیاتیک در پایان هفته هشتم بعد از ترمیم در گروه‌های مورد آزمایش (آزمون حرکتی یا SFI). همانطور که نمودار نشان می‌دهد، در پایان هفته هشتم پس از ترمیم، میزان عددی SFI در گروه‌های سلول درمانی در مقایسه با گروه کنترل نشان از روند بهبودی و نزدیک شدن به حالت طبیعی (SFI در حد فاصل +10 و -10) و گروه نرمال می‌باشد. توانایی راه رفتن در پای جراحی شده در گروه سلول درمانی، علی‌الخصوص در گروه سلول درمانی به همراه عصاره زیتون 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 زیتون با گروه نرمال وجود ندارد.



نمودار ۲.  $p < 0.05$  آزمون حسی با استفاده از Hot Plate در گروه‌های مورد آزمایش در پایان هفته‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ بعد از جراحی. همانطور که نمودارها در هر گروه نشان می‌دهد با افزایش زمان میزان درک حس حرارت در گروه‌های سلول درمانی در مقایسه به گروه کنترل بیشتر شده است. یا به عبارت دیگر آستانه تحمل با گذشت زمان کاهش یافته است.



نمودار ۳. نتایج AMP 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 زیتون نسبت به سایر گروهها بهتر می‌باشد.



نمودار ۴- نتایج NCV در هفته هشتم پس از ترمیم نر 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 با سایر گروه‌ها دیده نشد. روند ترمیم میلین در گروه سلول درمانی به همراه عصاره زیتون نسبت به گروه سلول درمانی بدون تزریق عصاره زیتون بهتر می‌باشد.

### نتیجه‌گیری

با توجه به شواهد بدست آمده می‌توان نتیجه گرفت که پیوند سلول استرومایی سبب ترمیم عصب سیاتیک قطع شده می‌شود و هم چنین عصاره زیتون به همراه سلول‌های استرومایی 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 undergo changes 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.

صورت تزریق سلول‌های BMSC تمایز نیافته به محل عصب سیاتیک قطع شده در صدی از این سلول‌ها به سلول میلین ساز تبدیل شده و در ترمیم بافت آسیب دیده کمک می‌نماید و میلین سازی در میزان NCV و ترمیم آکسون‌ها و میزان AMP حائز اهمیت است [۲۱]. هم چنین LOPEZ و همکاران در طی تحقیقی تاثیر مثبت سلول‌های استرومایی مغز استخوان در روند ترمیم عصب سیاتیک و افزایش تعداد آکسون‌ها نسبت به گروه کنترل را نشان دادند [۲۲]. 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 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. در این رابطه معظمی و همکاران با تزریق سلول‌های استرومایی مغز استخوان در عصب آسیب دیده نتیجه گرفتند که سلول BMSC می‌تواند باعث افزایش تعداد رشته‌های عصبی در عصب له شده باشد. هم چنین DEZANA و همکاران نشان دادند که با انتقال سلول‌های استرومایی مغز استخوان به محل عصب قطع شده، ترمیم عصب انجام می‌گیرد و تعداد رشته‌های عصب افزایش پیدا می‌کند [۲۳]. HOU و همکاران بیان کردند که پیوند سلول‌های استرومایی مغز استخوان که توسط ترکیبی از فاکتورهای رشد از جمله فاکتور رشد گلیال متمایز شده باشد به محل عصب قطع شده‌ای که ۲ سر آن توسط لوله‌ای که محتوی رشته‌های پلیمری به هم متصل شده باشد می‌تواند سبب ترمیم عصب دو ناحیه قطع شده گردد [۲۴]. پیوند سلولی، به عنوان یک رویکرد درمانی جدید برای نقایص عصب محیطی شناخته می‌شود. سلول‌های پیوندی ایده آل باید به آسانی قابل دسترس بوده، در کشت تکثیر شده و با تحمل ایمنولوژیکی، در بافت میزبان ادغام شوند [۱۷] پیوند سلولی، موجب رشد و تحریک بازسازی رگ‌های خونی و جوانه‌های عصبی می‌شود [۱۰]



- [10] Gang JE, Hong SH, Jeong JA, et al. In vitro mesengenic potential of human umbilical cord blood derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 321(1): 102-8.
- [11] Seshareddy K, Troyer D, Weiss ML. Method to isolate mesenchymal stromal cells under hypoxia. *Int J Biol Sci* 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 neurite outgrowth 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] Rozpądek, P.; Węzowicz, K.; Stojakowski, 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 (*Cichorium 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 phytothérapeutique 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] Saggiu, S., Sakeran, M.I., Zidan, N., Tousson, E., Mohan, A., Rehman, H., 2014. Ameliorating effect of chicory (*Cichorium 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 National Ethical Framework For animal research in iran. *iranian journal of public health* january 2008, *Volume 37* , *Number 1 (supplementary issue on bioethics)*; *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: 10.1080/14653240500319234].
- [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, et al. 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 stromal cells and olive extract on the healing process of severed sciatic nerve in male Wistar rats (behavioral and electrophysiological study)

Moazami Goodarzi M.<sup>1</sup>, Hayati Roodbari N.<sup>2\*</sup>, Kaka Gh.<sup>3</sup>, Parivar K.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> PhD student in Developmental Cell Biology - Islamic Azad University, Research Sciences Unit - Tehran, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor, Department of Developmental Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Research Sciences Unit, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Professor of Anatomy Department, Baqiyat Elah University of Medical Sciences and Health Services - Tehran, Iran

<sup>4</sup> Professor, Department of Developmental Cell Biology, Faculty of Basic Sciences - Islamic Azad University, Research Sciences Unit - Tehran, Iran

\* (Corresponding author): nasimhayati@yahoo.com

Received: February 2023

Accepted: September 2023

### Abstract

**Background and purpose:** 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.

**Materials and Methods:** 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.

**Results:** 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  $\mu\text{m}$ , 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.

**Conclusion:** Cord blood cell transplantation repairs sciatic nerve and chicory extract along with umbilical cord blood cells accelerates sciatic nerve repair.

**Keywords:** umbilical cord blood cells, chicory extract, sciatic nerve, rat.