مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره چهاردهم، شمارهٔ ۴، تیر ۱۳۹۱، صفحه ۲۹-۲۲

# توانایی درمان سلول های بنیادی خون بند ناف بر آسیب مغزی مدل حیوانی

محمد رضا نیکروش(PhD)[۱]، حسینعلی غفاری پور(MD)[۲]، مهدی جلالی(PhD) *[۱]، داریوش حمیدی علمداری(PhD)[۳]، جواد سنچولی(MSc)[۴]، معصومه ثقه الاسلام(MSc)[۱]

۱- گروه علوم تشریحی و بیولوژی سلولی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۲- گروه کودکان، دانشگاه علوم پزشکی زابل
۳- گروه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۴- گروه ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی زابل

دریافت: ۹۰/۶/۱۹، اصلاح: ۹۰/۸/۱۸، پذیرش: ۹۰/۱۱/۱۹

## خلاصه

**سابقه و هدف:** خون بند ناف منبع غنی از سلول های بنیادی است اثر درمانی سلولهای بنیادی در درمان بیماری های مختلف شناخته شده است. این مطالعه به منظور بررسی اثر این سلول ها در درمان مدل سکته مغزی ایسکمیک موش صحرایی انجام گردید.

**مواد و روشها:** این مطالعه آزمایشگاهی بر روی ۳۰ سر رت نر نژاد ویستار ۱۵۰-۱۰۰ گرمی که به ۳ گروه تقسیم شدند، انجام گردید، در دو گروه تجربی و شم، شریان کاروتید راست برای ۳۰ دقیقه مسدود گردید. حیوانات ۷ روز پس از جراحی، $۲\times۱۰^{۵}$ سلول تک هسته ای خون بند ناف نشاندار شده با بروموديزوکسی یوریدین از طریق تزریق به ورید دمی دریافت نمودند و در گروه شم، تزریقی صورت نگرفت. گروه کنترل دست نخورده باقی ماند. برای مدت ۱۴ روز حیوانات با استفاده از دو آزمون Limb placing, Corner turn از لحاظ اختلال حرکتی بررسی شدند و وجود سلول های نشاندار نیز در محل ضایعه با استفاده از ایمنوهیستوشیمی ردیابی شد.

**یافته ها:** بررسی نتایج بدست آمده در روز ۷ افزایش معنی داری در بهبود حرکتی رفتاری گروه تجربی (۱۲/۷±۰/۲۶) نسبت به گروه شم (۱۰±۰/۴) نشان داد. این اختلاف در روز ۱۴ پس از جراحی واضح تر شد و امتیاز در گروه تجربی به ۱۵/۳±۰/۳۱ در مقایسه با گروه شم (۱۱/۹±۰/۵۳) رسید (p<۰/۰۵). وضعیت تعادل حرکتی نیز در روزهای ۷ و ۱۴ در گروه تجربی (۰/۷۵±۳/۰۷ و ۰/۵۹±۳/۱۴) و شم (۰/۹۶±۲/۲۱ و ۰/۹۷±۲/۱۳) با هم اختلاف معنی داری داشتند (p<۰/۰۵). بعلاوه حجم ناحیه آسیب دیده در گروه تجربی به طور معنی داری (۳/۲±۲۱/۴) کاهش یافت (p<۰/۰۵).

**نتیجه گیری:** نتایج مطالعه نشان داد که تزریق وریدی سلول های بنیادی خون بند ناف، توانایی بهبود بخشیدن اختلالات حرکتی ناشی از سکته مغزی ایسکمیک را داشته و حجم ناحیه ضایعه دیده را نیز کاهش می دهد. بنابراین می تواند به عنوان منبع سلولی مناسبی در درمان سکته مغزی ایسکمیک به کار رود.

**واژه های کلیدی: سلول بنیادی، هیپوکسی ایسکیمی، آسیب مغزی.**

## مقدمه

در حال حاضر سکته مغزی سومین علت مرگ و اولین عامل از کار افتادگی فرد در جامعه می باشد و حدود نیمی از تمام موارد سکته‌های مغزی بر اثر بسته شدن یک شریان مغزی با یک لخته خون که به آن اصطلاحا ترومبوز مغزی گفته می‌شود، ایجاد می‌گردد. اگر خونرسانی به قسمتی از مغز دچار اختلال شده و متوقف گردد، این قسمت از مغز دیگر نمی‌تواند عملکرد طبیعی خود را داشته باشد که این وضعیت را اصطلاحاً سکته مغزی می‌نامند. درمان اولیه پس از وقوع یک سکته مغزی استفاده از داروهای ترومبولیتیک جهت حل کردن لخته مسدود کننده رگ می باشد و اگر چه درمان‌های توانبخشی مثل فیزیوتراپی و گفتار

▣ این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۸۸۴۱۶ مشترک بین دانشگاه علوم پزشکی زابل و مشهد می باشد.

* مسئول مقاله:
آدرس: مشهد، مقابل پارک ملت، پردیس دانشگاه، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، تلفن: ۰۵۱۱-۸۰۰۲۴۹۰
e-mail: jalalim@mums.ac.ir

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.4.3.5 ]

درمانی برای بهبود حرکتی تمام انواع ایـن بیمـاری ضـروری اسـت، ولـی درمـان کاملی محسوب نمی شود (۱). بنابراین جهت درمان ایـن اخـتلال عصـبی شـایع، جامعه پزشکی به یک استراتژی ترمیمی کار آمد نیازمند می باشد و در حال حاضـر با توجه به تحقیقات گسترده ای که بر روی اثـر درمـانی سـلول هـای بنیـادی در نواحی مختلف بدن و خصوصا بر روی بیماریهای سیستم عصبی در سـطح جهـانی انجام می شود، سلول درمانی می تواند یکی از راههای اصلی درمان سکته مغـزی در نظر گرفته شود. سلول های بنیادی سلول های نامتمایزی هسـتند کـه توانـایی تکثیر و تولید سلول های پیش ساز را در خود حفظ می کنند، در نتیجه مـی تواننـد در پاسخ به تحریکات خاص به انواع سلول های موجود در بدن تمایز یابنـد. اخیـرا چشم اندازهای جدیدی در رابطه با استراتژیهای ترمیمی مغز در جریان بیماریهـای حادی نظیر سکته مغزی ایسکیمیک و صدمه مغزی و همچنین بیماریهای مزمنـی نظیر پارکینسون، کره هانتینگتون، اسکلروزیس آمیوتروفیک طرفـی، اسـکلروزیس مولتیپل و آلزایمر پیش روی ما قرار گرفته است (۵-۲). انواع سـلولهای بنیـادی در سرتاسر دوره تکامل پستانداران تولید می شوند و چندین منبع برای این سلول هـا وجود دارد که ممکن است در درمان ایسکمی مغزی مفید باشـند. ایـن سـلول هـا شامل: سلول های بنیادی جنینی (۶)، سلول های بنیادی عصبی موجود در نـواحی در حال تکامل خاصی از مغز پستانداران بالغ (۷) و سلولهای بنیادی مشتق از مغـز استخوان، خون بند ناف و بافت چربی می باشند (۸). خون بند ناف یکـی از منـابع سلول های بنیادی و پیشساز می باشد که در حال حاضر به عنوان یـک جـایگزین مغز استخوان در درمان اختلالات خونی و جایگزین دوزهای بالای شیمی درمـانی در سرطان ها مورد استفاده قرار می گیرد (۹) خصوصا اینکه سلول های مشـتق از آن در مقایسه با سلول های مزانشیمال مغـز اسـتخوان کمتـر ایمنوژنیـک بـوده و مولکـول MHC II (Major Histocompatibility Complex,) را بیان نکرده و در نتیجه برای پیوند آنها به بدن حیوان میزبان نیاز به سرکوب ایمنی نمی باشد (۱۰). طی مطالعات انجام شده، مشخص گردید در این منبع سلولی انواع سلول های بنیادی خونساز وجود دارند که توانایی بالقوه تبدیل شدن به سلول های عصبی را دارا هستند (۱۱).

Chen و همکاران، اثر محافظتی تزریق سلول های بنیادی خون بند ناف را بر روی موش های صحرایی مدل سکته مغزی ایسکمیک ناشی از گرما بررسی نمودند. در این مطالعه، آنها به حیوانات ضایه دیده یک روز پس از ایجاد ایسکمی، تعداد $۵\times۱۰^{۶}$ سلول به صورت وریدی تزریق کرده و با بررسی ایمنوهیستوشیمی نشان دادند که این سلول ها در محل ضایعه جمع شده و در مقایسه با گروه تزریق نشده مانع از تخریب بافتی ناشی از ایسکمی شده اند (۱۲).

در مطالعه ای دیگر، Ou و همکاران از سلول های +CD34 مشتق از خون بند ناف که جزء جمعیت سلول های خونساز بند ناف می باشند در موشهای صحرایی مدل سکته مغزی ایسکمیک استفاده کردند تا نشان دهند که تزریق وریدی تعداد$۱۰^{۷}$ سلول ۶ ساعت پس از ایجاد ضایعه توانایی بهبود اختلالات حرکتی ناشی از ایسکمی را در حیوانات تحت تزریق داشته و همچنین حجم ناحیه آسیب دیده مغز را کاهش می دهد (۱۳). در ادامه مطالعات قبلی، در طراحی این تحقیق سعی شد تا با استفاده از سلول های بنیادی مشتق از بند ناف و انتقال آنها به بدن مدل آزمایشگاهی سکته مغزی ایسکمیک پس از گذشت ۷ روز از ضایعه، میزان بهبود حرکتی و جایگزینی این سلولها در بافت دچار ایسکمی با استفاده از تست های رفتاری و ایمنوهیستوشیمی بررسی گردد.

## مواد و روشها

این مطالعه آزمایشـگاهی بـر روی ۳۰ سـر رت نـر نـژاد ویسـتار ۱۵۰-۱۰۰ گرمی که به سه گروه تجربی، شم و کنترل تقسیم گردیدند، انجام شد.

**الف- جمع آوری خون بند ناف و جداسازی سلول های تک هسته ای و نشاندار کردن آنها بـا (Bromo Deoxiuridin, BrdU) :** خـون بند ناف از بند ناف مادران ۲۰ تا ۴۰ ساله مراجعه کننده به زایشگاه بیمارستان قائم که سـابقه بیمـاری خاصـی نداشـته و سـیگاری و الکلـی نبودنـد در کیسـه هـای مخصوص جمع آوری خون حاوی دکستروز آدنین سیترات فسفات با رعایت حقوق بیماران جمع آوری گردید و در مـدتی کمتـر از ۸ سـاعت نمونـه هـای خـون بـه نسبت۱:۱ با بافر (PBS فاقد کلسیم و منیزیوم) رقیق شـد و سـپس خـون رقیـق شده به نسـبت ۸:۳ در لولـه هـای سـانتریفوژ ۱۵ ml بـا Ficoll-Paque در دمای اتاق باسرعت ۸۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شده و سپس لایه سلولی جدا شده بالای Ficoll-Paque و زیر پلاسما (Buffy Coat) به آهستگی و دقت با استفاده از پیپت جدا شده و به لوله های جدید مخروطی منتقل گردید و پس از دو بار شستشو با بافر PBS از طریق سانتریفوژ بـا دور ۸۰۰ g و در مـدت زمان۱۰ تا ۲۰ دقیقه ، سلول های جمع آوری شده در ته لوله ها با ۱ میلی لیتـر از سرم جدا شده از خون بند ناف معلق شد و سپس این سلول های تـک هسـته ای به داخل فلاسک های کشت حاوی محیط کشـت RPMI غنـی شـده بـا سـرم گاوی ۱۰٪ و آنتی بیوتیک منتقل گردید و در نهایت جهت نشاندار کردن آنهـا بـه ازای هر یک میلی لیتر از محلول حاوی سلول، ۳ میکرو گرم مـاده بروموديزوکسـی یوردین (BrdU) که یک نوکلئوزید سنتتیک است و در واقع آنالوگ باز تیمیدین بوده که می تواند جهت نشاندار کردن سلول ها به کار برده شود، به فلاسک های کشت اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوباتور حـاوی گـاز دی اکسـید کربن ۵٪ به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. در ضمن ارزیابی زنده بودن سـلولهای تک هسته ای جدا شده از خون بند ناف با استفاده از لام نئوبار و تریپان بلو انجـام گرفت.

**ب- ایجاد مدل حیوانی سکته مغزیای اسکمیک:** با تزریق داخل صـفاقی ۳۰ mg/kg کتـامین ۱ درصـد و ۴mg/kg زایلازیـن ۲۰ سـر از حیوانـات (گروههای تجربی و شم) تحت بیهوشی عمیـق قـرار گرفتـه و بـه منظـور ایجـاد هیپوکسـی ناشـی از ایسـکمی، مطـابق روش Taniguchi و همکـاران شـریان کاروتید راست آنها به مدت ۳۰ دقیقه بسته شد (۱۴). این کار بـا برشـی در ناحیـه طرفی میانی گردن انجام گردید و پس از دستیابی به غلاف کاروتیـد و آزاد کـردن کاروتید مشترک از نسوج اطراف آن، شریان کاروتید با استفاده از نخ بخیـه (۰۶) و پس از آن شریان آزاد شده و پوست محل برش تحت شرایط استریل بخیه گردید و حیوانات تا زمان به هوش آمدن تحت نظر قرار گرفتند.

سپس در روز هفتم بعد از آسیب هیپوکسی- ایسکمی، حیوانات گروه تجربی (تعداد ۱۰) مجددا تحت بیهوشی قرار گرفته و از طریق ورید دمی تعداد $۲\times۱۰^{۵}$ سلول بنیادی معلق در یک میلی لیتر نرمال سالین به هر یک از آنان تزریق گردید. به حیوانات گروه شم (تعداد ۱۰) فقط یک میلی لیتر نرمال سالین تزریق گردید. ضمنا ۱۰ حیوان سالم بدون آنکه دچار هیپوکسی شده باشند بعنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند.

**ج- بررسی تغیرات حرکتی، رفتاری و بافتی:** دو آزمون رفتاری جهت ارزیابی عملکرد چگونگی حرکت حیوان و وجود اختلالات حرکتی و هماهنگی

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.4.3.5 ]

حرکات و نقایص حسی- پیکری در روزهای ۱ و ۷ و ۱۴ بعد از تزریق سلول های بنیادی برای حیوانات انجام گردید.

در آزمون اول، یعنی Modified limb placing test به گزارش De Ryck و همکارانش (۱۵) حیوانات در شرایطی بررسی شدند که کاملا در دست نگهداشته شده و بی حرکت بودند و از هر حیوان آزمون های مجزا جهت بررسی کشش رو به جلو، دور شدن و نزدیک شدن طرفی اندام ها گرفته شد. علاوه بر این، برای بررسی قرار دادن اندام به دنبال تحریک بینایی، حیوان در فاصله ۱۰ سانتیمتری از سطح میز به صورت معلق از دم نگهداشته شد و کم کم به سطح میز نزدیک گردید عملکرد هر یک از اندام های جلویی و عقبی در هر سمت بدن به صورت مجزا در ۶ تست ارزیابی شده و برای هر آزمون یک امتیاز صفر (عدم وجود پاسخ حرکتی یک اندام) ،۱ (پاسخ حرکتی ناکامل و یا با تاخیر بیشتر از ۲ ثانیه یک اندام) و ۲ (پاسخ حرکتی سریع و کامل اندام) که در مجموع ۱۶ امتیاز برای یک موش سالم است در نظر گرفته شد. در آزمون دوم، Corner turn testing score، مطابق روش Hua و همکارانش(۱۶) حیوانات در گوشه ای رها شدند و سپس تعداد برگشت های آنها از سمت چپ و راست در ۱۰ نوبت جداگانه شمارش گردید و به صورت درصد بیان شد. اگر میزان برگشت های موش از هر دو سمت یکسان بود، سالم و اگر تمایل به گردش به یک سمت در حیوان بیشتر بود، نشانگر صدمه مغزی یک طرفه حیوان در نظر گرفته شد.

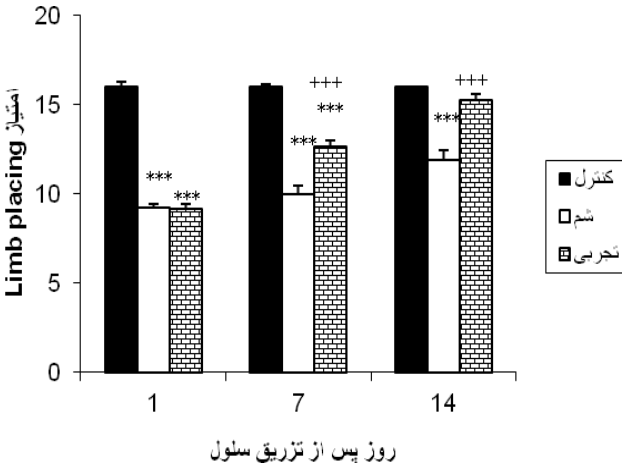
جهت بررسی تغییرات بافتی و درصد ضایعه بافت استریاتوم در مغز موشها، در روز ۱۴ پس از انجام آخرین مرحله آزمون های حرکتی، تمام حیوانات بیهوش گردیده و پس از پرفیوژن با ۱۰۰ میلی لیتر نرمال سالین سرد و ۱۰۰ میلی لیتر پارافرمالدئید ۴ درصد در PBS ۰/۱ mol/l مغز آنها از جمجمه خارج شده و برای ۲۴ ساعت داخل فیکساتیو پارافرمالدئید نگهداری شد. پس از آن از هر مغز بلوک های پارافینی تهیه کرده، سپس با استفاده از میکروتوم روتاری برش های کرونال به ضخامت ۶ میکرون از بلوک ها تهیه گردید و به ازای هر ۴۰ برش ۶ میکرونی یک برش را انتخاب کرده و با H&E رنگ آمیزی نموده و سپس درصد ضایعه بافتی ناحیه استریاتوم ایسکمیک در مقایسه با استریاتوم سمت مقابل به کمک سیستم آنالیز تصویری (Data Translation, Marlboro, MA) در هر مقطع بافتی محاسبه گردید.

جهت مشاهده سلول های بنیادی جایگزین شده در استریاتوم ، بافت مغزی ناحیه آسیب دیده جهت انجام آزمایشات ایمنوهیستوشیمی و ردیابی سلول های نشاندار شده با BrdU، مورد استفاده قرار گرفت. به این ترتیب که ابتدا آنتی بادی اولیه ضد BrdU را روی مقاطع ریخته و سپس آنتی بادی ثانویه نشاندار شده با پروکسیداز را به آن متصل نموده و در نهایت به کمک DAB مقاطع رنگ آمیزی شده و سلول های نشاندار در ناحیه بررسی شدند. ضمنا جهت ایجاد کنتراست، از رنگ هماتوکسیلین برای رنگ آمیزی سایر سلول ها استفاده شد. تمام داده های اندازه گیری شده، با استفاده از آزمون تحلیل واریانس و با آزمون چند دامنه Duncan تجزیه و تحلیل و $p<0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

## یافته ها

**بهبود حرکتی رفتاری:** در آزمون Limb Placing توانایی حرکت اندام های جلویی و عقبی هر دو طرف حیوان مورد بررسی قرار گرفت و امتیازهای بدست آمده از حیوانات گروه تجربی (۹/۲±۰/۲۵) و شم (۹/۲±۰/۲) در روز اول پس از تزریق سلول، با یکدیگر اختلاف معنی داری نداشتند. در حالی که تا روز ۷ پس از تزریق، امتیازهای هر دو گروه افزایش یافته و این افزایش امتیاز در گروه تجربی (۱۲/۷±۰/۲۶) در مقایسه با گروه شم (۱۰±۰/۴۷) بارزتر بود ($p<0/05$) این اختلاف تا روز ۱۴ پس از تزریق واضح تر گردید و امتیاز در گروه تجربی به ۱۵/۳±۰/۳۱ و در گروه شم به ۱۱/۹±۰/۵۳ رسید ($p<0/05$).

در گروه کنترل در هر سه نوبت نتایج حاصل از این آزمون برای آنها امتیاز ۱۶ بود. با توجه به امتیاز های بدست آمده از دو گروه تجربی و شم که در بالا ذکر گردید، در روز اول و هفتم پس از تزریق، این گروه با هر دو گروه اختلاف معنی دار داشت و اگرچه که این اختلاف با گروه شم تا روز ۱۴ همچنان ادامه یافت ولیکن با گروه تجربی نتیجه این گونه نبوده و بین این دو گروه اختلاف معنی داری وجود نداشت (نمودار ۱).




**نمودار ۱. تاثیر تزریق سلول های بنیادی مشتق از خون بند ناف بر روی امتیاز حاصل از تست Limb Placing در موش های صحرایی دچار سکته مغزی ایسکمیک.**

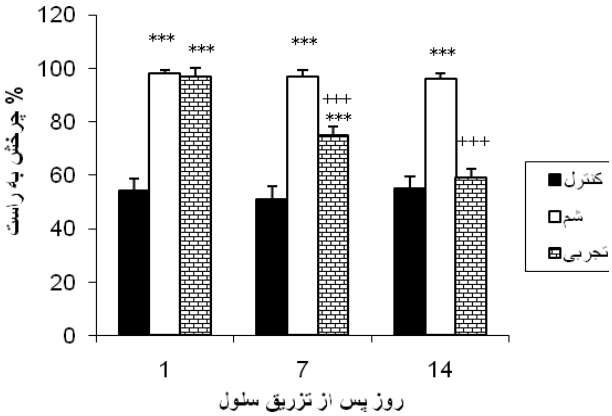
***p<0.001 vs control

+++p<0.001 vs Sham

در آزمون Corner Turn وضعیت تعادل حرکتی مرتبط با تماس حسی ویبروزای موش های صحرایی با ثبت تعداد چرخش های حیوان به سمت راست که دچار هیپوکسی مغزی شده بودند بررسی گردید و به صورت در صد گزارش شد. در دو گروه تجربی (۳±۹۷٪) و شم (۱/۳±۹۸٪) در روز اول پس از تزریق با یکدیگر اختلاف معنی داری نداشت ولی تا روز ۷ پس از تزریق، (۳/۰۷±۷۵) برای گروه تجربی و (۲/۱۳±۹۷٪) برای گروه شم، اختلاف بین این دو گروه معنی دار شد و این معنی دار بودن تا روز ۱۴ نیز ادامه یافت [گروه تجربی (۳/۱۴±۵۹٪) و گروه شم (۲/۲۱±۹۶٪)] ($p<0/05$).

از طرف دیگر در گروه کنترل نتایج بدست آمده در روز های ۱، ۷ و ۱۴ پس از تزریق به ترتیب، ۴/۵۲±۵۴٪، ۴/۸۲±۵۱٪ و ۴/۵۳±۵۳٪ بود. در روزهای ۱ و ۷ مشخص گردید که با یکدیگر اختلاف معنی دار دارند ولیکن در روز ۱۴ در مورد گروه تجربی این اختلاف معنی دار از بین رفت (نمودار ۲).

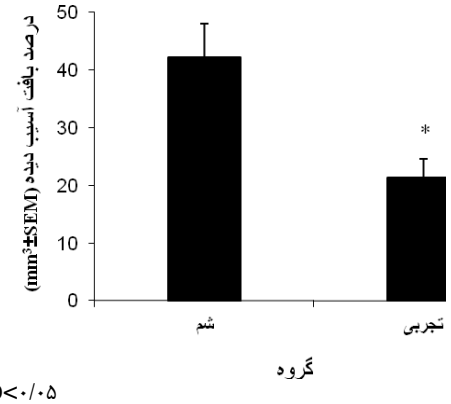
[ DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.4.3.5 ]




**نمودار ۲. تاثیر تزریق سلول های بنیادی مشتق از خون بند ناف برروی درصد چرخش به راست حاصل از تست Corner Turn در موش های صحرایی دچار سکته مغزی ایسکمیک.**

***p<0.001 vs control, +++p<0.001 vs sham

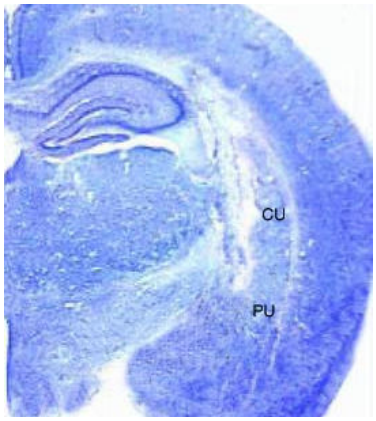
**بررسی درصد بافت آسیب دیده مغز:** نتایج بدست آمده از بررسی بافت آسیب دیده مغز در سمت راست در مقایسه با سمت چپ آن در دو گروه تجربی و شم ۳ هفته پس از عمل جراحی منجر به هیپوکسی مغزی، نشان داد که درصد بافت آسیب دیده در گروه تجربی (۳/۲±۲۱/۴) که یک هفته پس از جراحی سلول دریافت کرده بودند در مقایسه با گروه شم (۵/۷۳±۴۲/۲) که به آنها سلول تزریق نشده بود به طور معنی داری کاهش یافته است (p<۰/۰۵) (نمودار ۳)



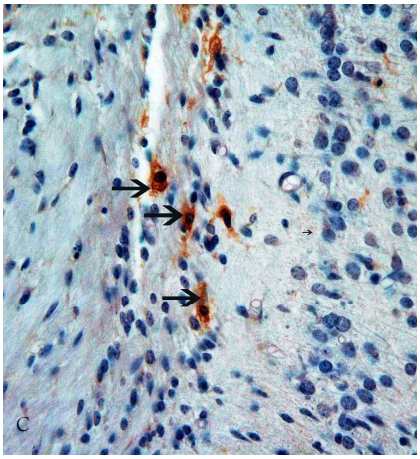

* p<۰/۰۵

**نمودار ۳. مقایسه بافت آسیب دیده مغز در دو گروه تجربی و شم**

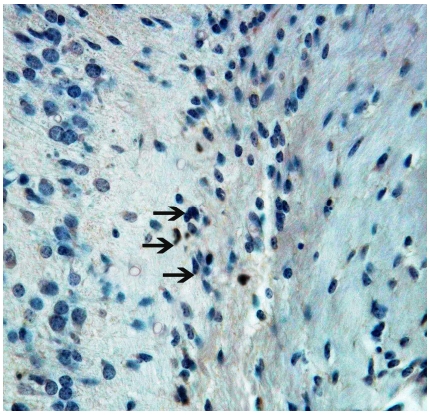
**جایگزینی سلول های بنیادی نشاندار در ناحیه آسیب دیده:** جهت بررسی وجود سلول های بنیادی نشاندار تزریق شده، ابتدا مغز حیوانات گروه مختلف پس از آماده سازی بافتی بصورت کرونال برش خورده و نقاط مورد نظر با رنگ زمینه (هماتوکسیلین) مشخص گردید (شکل ۱). سپس بر روی مقاطع یاد شده نظر رنگ آمیزی ایمنو هیستوشیمی انجام گرفت و مشاهده گردید که مهاجرت و جایگزینی سلول های +BrdU به صورت سلول هایی با هسته های گرد یا بیضی که کروماتین موجود در آنها DAB را جذب کرده و با هاله ای از سیتوپلاسم قهوه ای پر رنگ در ناحیه آسیب دیده مغز از رنگ زمینه بنفش ناشی از هماتوکسیلین قابل تفکیک هستند (شکل ۲). در حالیکه در در گروه درمان هیپوکسی درمان نشده پدیده ی کروماتولیز و مرگ سلولی به وضوح در ناحیه پوتامن و هسته دمدار دیده می شود (شکل ۳).




**شکل ۱: برش کرونال مربوط به یک نیمکره مغز رت ۲۱ روزه از گروه کنترل با درشتنمایی کم که ناحیه هسته دمدار (cu) و پوتامن (pu) مشخص شده است (رنگ آمیزی هماتوکسیلین، scale bar=40 µ).**



**شکل ۲: برش مربوط به ناحیه هسته دمدار و پوتامن مغز رت ۲۱ روزه از گروه تجربی درمان شده با سلول های بنیادی نشاندار که به رنگ قهوه ای (در محل پیکانهای نشانه) جایگزین سلول های از دست رفته شده اند. (scale bar=200 µ).**



**شکل ۳: برش مربوط به ناحیه هسته دمدار و پوتامن مغز رت ۲۱ روزه از گروه تجربی ضایعه دیده و بدون درمان (گروه شم) که تعدادی از سلولهای پیکنوتیک و در حال مرگ با پیکانهای نشانه مشخص شده اند (scale bar=200 µ).**

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.4.3.5 ]

## بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه فعالیت حرکتی طبیعی برای حیوانات سالم امتیاز ۱۶ را داشت در حالیکه امتیازهای بدست آمده از دو گروه تجربی و شم در روزهای اول و هفتم پس از تزریق سلول با گروه کنترل اختلاف معنی داری داشتند ولیکن تا روز ۱۴ این اختلاف در مورد گروه تجربی که تحت درمان با سلول قرار گرفته بود از بین رفت. بعلاوه در تست دوم نیز که معیار سالم بودن حیوان گردش اتفاقی به سمت راست و چپ می باشد، درصد چرخش به راست حیوان در گروه کنترل در حدود ۵۰٪ بود. نتایج حاصل از دو گروه دیگر که در روز اول پس از تزریق تمایل به چرخش به راست حیوانات نزدیک به ۱۰۰٪ است، اختلاف معنی داری بین آنها مشخص می شود که به تدریج در مورد گروه تجربی تا روز ۱۴ این اختلاف از بین می رود و عدد بدست آمده ار درصد چرخش های این گروه به ۵۰ ٪ نزدیک می شود. بعلاوه، بررسی های بافتی نشان داد که درصد بافت آسیب دیده نیمکره سمت راست در حیوانات گروه تجربی به طور معنی داری در مقایسه با گروهی که تحت تزریق قرار نگرفته اند، کاهش یافته و همچنین نتایج ایمنوهیستوشیمی نشان داد که سلولهای بنیادی نشاندار به ناحیه ایسکمی مهاجرت کرده و در محل تثبیت گردیده اند.

مطالعات اخیر بر روی پتانسیل درمانی پیوند سلولی در سکته مغزی ناشی از ایسکمی متمرکز شده اند و از انواع زیادی از سلول های بنیادی مشتق از بافتهای انسانی به صورت آزمایشگاهی برروی مدل های سکته مغزی ایسکمیک استفاده شده که همگی منجر به بهبود رفتار حرکتی در حیوانات شده اند (۲). سلول های انسانی که تاکنون در این گونه مطالعات بررسی شده اند شامل: سلولهای بنیادی عصبی کشت داده شده از بافت جنینی Neural stem/progenitor cells (NPCs) (۱۸و ۱۷)، رده های سلول های عصبی نامیرا (۲۰و۱۹)، پیشساز سلول های خونساز و اندوتلیال جدا شده از مغز استخوان (۲۲و۲۱)، خون بندناف (۲۴و۲۳) و خون محیطی (۲۵) و سلول های استرومایی مشتق از بافت چربی (۲۶) می باشند.

Chen و همکاران، با توجه به اینکه می دانستند خون بند ناف انسان منبع غنی از سلول های پیشساز و بنیادی است، جهت اثبات ورود این سلول ها به مغز، زنده ماندن، متمایز شدن و بهبود فعالیت های عصبی- حرکتی در مدل آزمایشگاهی، در موش های صحرایی سکته مغزی نوع ایسکمیک را القا کرده و سپس تعداد $۳ \times ۱۰^{۵}$ سلول مشتق از خون بند ناف انسان را به ترتیب ۲۴ ساعت و ۷ روز پس از جراحی از طریق وریدی وارد بدن حیوانات نمودند. در ضمن آنها برای تمامی گروه ها آزمون های رفتاری Rotarod و Modified Neurological Severity Score [mNSS] را انجام داده و رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی نیز جهت بررسی سلول ها در ناحیه ایسکمیک صورت گرفت.

در این مطالعه نتایج حاصل از تست های رفتاری نشان داد که تزریق سلول ۲۴ ساعت پس از جراحی منجر به افزایش امتیاز های هر دو آزمون می شود در حالی که تزریق پس از ۷ روز فقط در امتیازهای بدست آمده از mNSS تغییرات معنی داری ایجاد می کند. بعلاوه بررسی ایمنوهیستوشیمی مقاطع بافتی ناحیه ایسکمیک، بیان پروتئین های رده های سلولی عصبی و گلیال توسط سلول های مهاجرت یافته به مغز را نشان داد که این موضوع در یافته های دیگران نیز به ثبت رسیده است (۲۷).

در مطالعه مشابهی Willing و همکاران، ۲۴ ساعت پس از ایجاد مدل آزمایشگاهی سکته مغزی ایسکمیک، سلول های بنیادی مشتق از خون بند ناف انسانی را به دو صورت تزریق وریدی و تزریق مستقیم بداخل بافت استریاتوم، وارد بدن حیوانات کرده و نتایج بدست آمده را با بررسی بهبود رفتار حرکتی حیوانات به این صورت بیان کردند که، در بهبود فعالیت خودبخودی حیوان، هر دو نوع پیوند سلول کارآمد بوده ولی در مورد تست رفتاری قدم زدن (Stepping test)، فقط در صورت تزریق وریدی سلول نتایج در گروه تحت درمان در مقایسه با گروه کنترل بهبود حرکتی را نشان می دهد. بنابراین آنها نتیجه گرفتند که تزریق وریدی این سلول ها از تزریق مستقیم آن بداخل بافت آسیب دیده بهتر عمل می کند (۲۸). در ادامه بررسی بهبود حرکتی ناشی از تزریق سلول های بنیادی مشتق از خون بند ناف در مدل آزمایشگاهی سکته مغزی ایسکمیک، محققین بر آن شدند تا از دوز های متعدد این سلول ها به صورت تزریق وریدی استفاده نمایند و نهایتا علاوه براینکه به نتایج حاصل از مطالعات قبل دست یافتند، این نتیجه را گرفتند که بهبود رفتار حرکتی در این حیوانات وابسته به تعداد سلول می باشد (۲۹). یافته های حاصل از مطالعه حاضر و مطالعات قبلی، بر این امر دلالت دارند که تزریق وریدی سلول های مشتق از خون بند ناف می توانند منجر به بهبود رفتار حرکتی در مدل آزمایشگاهی شوند و بعلاوه، نتایج بدست آمده از کاهش درصد بافت آسیب دیده در نیمکره دچار هیپوکسی و همچنین قرارگیری سلول های نشاندار شده در ناحیه آسیب دیده این پیش فرض را تایید می کند که جهت درمان سکته مغزی ناشی از هیپوکسی، می توان از سلول های بنیادی خون بند ناف استفاده نمود. البته این موضوع را نیز باید همواره مد نظر قرار داد که هیپوکسی ایسکیمی ایجاد شده طبعا ملزم به ایجاد ضایعه در ناحیه هیپوکامپ، پوتامن و هسته دمدار نبوده و بقیه قسمت های مغز مثل قشر حرکتی را نیز در بر می گیرد. بنابراین تست های رفتاری انجام شده و بهبود و یا عدم بهبود های حرکتی ممکن است به بخش های دیگر مغز مربوط شود. بنابراین یاد آور می شود که در این بخش از مطالعه آزمون های انجام شده بصورت عام و رنگ آمیزی و بررسی تغییرات سلولی بصورت خاص در ناحیه هسته دمدار و پوتامن صورت گرفته است.

لذا با تکیه بر این حقیقت که سلولهای تزریق شده داخل وریدی نتایج امیدوار کننده ای را برای درمان های کلینیکی نشان می دهند، بنظر می رسد شانس پیوند داخل وریدی در مطالعات بالینی بتواند راهگشای مناسبی برای آندسته از نوزادانی باشد که در زایمانهای سخت دچار هیپوکسی مغزی شده و در معرض ضایعات مغزی غیر قابل جبران قرار دارند. لازم به ذکر است که برای کاربرد بالینی این سلولها آزمایشات بیشتری مثل تعیین دوز سلول تزریقی و یا ارزیابی فواید عملکردی در مدتهای طولانی مورد نیاز است.

## تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاههای علوم پزشکی مشهد و زابل به دلیل حمایت مالی از تحقیق و همچنین از خدمات تکنیکی خانم متجدد در آزمایشگاه تخصصی بافت شناسی دانشکده پزشکی مشهد، بخش زنان و زایمان بیمارستان قائم (عج) و مساعدت های پرسنل آزمایشگاه کشت سلولی دانشکده پزشکی مشهد تشکر و قدردانی می گردد.

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.4.3.5 ]

# Therapeutic Potential of Cord Blood Stem Cell in Brain Damage of an Animal Model

**M.R. Nikravesh (PhD) [1], H.A. Ghaffaripour (MD)[2], M. Jalali (PhD) [*1], D. Hamidi Alamdari (PhD)[3], J. Sanchooli (MSc) [4], M. Seghatoleslam (MSc) [1]**

1. Department of Anatomy and Cell Biology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
2. Department of Pediatrics, Zabol University of Medical Sciences, Zabol, Iran
3. Department of Biochemistry, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
4. Department of Immunology, Zabol University of Medical Sciences, Zabol, Iran

**J Babol Univ Med Sci; 14(4); Jul 2012; pp: 22-29.**
**Received: Sep 6th 2011, Revised: Nov 9th 2011, Accepted: Feb 8th 2012.**

## ABSTRACT

**BACKGROUND AND OBJECTIVE:** Human umbilical cord blood (HUCB) is a rich source of stem cells. The aim of this study was the investigation of the therapeutic effects of these cells on cerebral ischemia in rat.

**METHODS:** This study was carried out on 30 male Wistar rats (100-150 g). They were divided into three groups. Firstly, to create a laboratory model of ischemic stroke, right carotid artery of animals was occluded for 30 minutes in two groups of experimental and sham. Then, mononuclear cells of cord blood were isolated and labeled using bromodeoxyuridine (BrdU) and then $2\times10^5$ cells were injected into the experimental group via the tail vein seven day after surgery. Rats in sham group didn't receive any injection. Control group considered as intact animals. The animals were evaluated for 14 days with modified limb placing and corner turn tests. The transplanted HUCB cells were also detected by immunohistochemistry.

**FINDINGS:** Seven days after surgery, there was a significant recovery in the behavioral performance in the experimental group (12.7± 0.26) compared with sham group (10±0.4) and this significant difference continued by the day 14 (15.3±0.31 vs. 11.9±0.53, $p<0.05$). Postural and motor asymmetries, at the days 7 and 14 the experimental group showed a significant decrease in the percentage of right turns in comparison to the sham group (75%±3.07 and 59%±3.14 vs. 96%±2.21 and 97%±2.13, $p<0.05$). In addition, injured volume measurements disclosed a significant decrease in the experimental group compared with sham group ($p<0.05$).

**CONCLUSION:** Intravenously transplanted HUCB stem cell can accelerate neurological function recovery and diminish the lesion size after the hypoxic ischemia. Thus these cells may provide a potential cell candidate for cell-based therapy in stroke.

**KEY WORDS:** *Stem Cell, Hypoxic ischemia, Brain damage.*

[*] **Corresponding Author;**
**Address:** Department of Anatomy and Cell Biology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
**Tel:** +98 511 8002490
**E-mail:** Jalalim@mums.ac.ir

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.4.3.5 ]

## References

1.Zivin JA, Choi DW. Stroke therapy. Sci Am 1991;265(1):56-63.

2.Bliss T, Guzman R, Daadi M, Steinberg GK. Cell transplantation therapy for stroke. Stroke 2007;38 (2):817-26.

3.Schouten JW, Fulp CT, Royo NC, et al. A review and rationale for the use of cellular transplantation as a therapeutic strategy for traumatic brain injury. J Neurotrauma 2004;21(11):1501-38.

4.Harris DT. Cord blood stem cells: A review of potential neurological applications. Stem Cell Rev 2008;4(4):269-74.

5.Ormerod BK, Palmer TD, Caldwell MA. Neurodegeneration and cell replacement. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2008;363(1489):153-70.

6.Broderick JP, Brott T, Tomsick T, Huster G, Miller R. The risk of subarachnoid and intracerebral hemorrhages in blacks as compared with whites. N Engl J Med 1992;326(11):733-6.

7.Kornblum HI. Introduction to neural stem cells. Stroke 2007;38(Suppl 2):810-16.

8.Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2004;95(5):209-14.

9.Nan Z, Grande A, Sanberg CD, Sanberg PR, Low WC. Infusion of human umbilical cord blood ameliorates neurologic deficits in rats with hemorrhagic brain injury. Ann N Y Acad Sci 2005;1049:84-96.

10.Andres RH, Guzman R, Ducray AD, et al. Cell replacement therapy for intracerebral hemorrhage. Neurosurg Focus 2008;24(3-4):E10.

11.Sanberg PR, Willing AE, Garbuzova-Davis S, et al. Umbilical cord blood-derived stem cells and brain repair. Ann N Y Acad Sci 2005;1049:67-83.

12.Chen SH, Chang FM, Tsai YC, Huang KF, Lin CL, Lin MT. Infusion of human umbilical cord blood cells protect against cerebral ischemia and damage during heatstroke in the rat. Exp Neurol 2006; 199 (1):67-76.

13.Ou Y, Yu S, Kaneko Y, et al. Intravenous infusion of GDNF gene-modified human umbilical cord blood CD34+ cells protects against cerebral ischemic injury in spontaneously hypertensive rats. Brain Res 2010;1366:217-25.

14.Taniguchi H, Mohri I, Okabe-Arahori H, et al. Prostaglandin D2 protects neonatal mouse brain from hypoxic ischemic injury. J Neurosci 2007;27(16):4303-12.

15.De Ryck M, Van Reempts J, Borgers M, Wauquier A and Janssen PA. Photochemical stroke model: flunarizine prevents sensorimotor deficits after neocortical infarcts in rats. Stroke 1989;20(10):1383-90.

16.Hua Y, Schallert T, Keep R F, Wu J, Hoff J T, Xi G. Behavioral tests after intracerebral hemorrhage in the rat. Stroke 2002;33(10):2478-84.

17.Ishibashi S, Sakaguchi M, Kuroiwa T, et al. Human neural stem/progenitor cells, expanded in long-term neurosphere culture, promote functional recovery after focal ischemia in mongolian gerbils. J Neurosci Res 2004; 78(2):215-23.

18.Kelly S, Bliss TM, Shah AK, et al. Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101(32):11839-44.

19.Saporta S, Borlongan CV, Sanberg PR. Neural transplantation of human neuroteratocarcinoma (hNT) neurons into ischemic rats: a quantitative dose-response analysis of cell survival and behavioral recovery. Neuroscience 1999; 91(2):519-25.

20.Bliss TM, Kelly S, Shah AK, et al. Transplantation of hNT neurons into the ischemic cortex: cell survival and effect on sensorimotor behavior. J Neurosci Res 2006;83(6):1004-14.

21.Chen J, Zhang ZG, Li Y, et al. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. Circ Res 2003;92(6):692-9.

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.4.3.5 ]

22.Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. Exp Neurol 2002; 174(1):11-20.

23.Borlongan CV, Hadman M, Sanberg CD, Sanberg PR. Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required for neuroprotection in stroke. Stroke 2004;35(10):2385-9.

24.Xiao J, Nan Z, Motooka Y, Low WC. Transplantation of a novel cell line population of umbilical cord blood stem cells ameliorates neurological deficits associated with ischemic brain injury. Stem Cells Dev 2005;14(6):722-33.

25.Shyu WC, Lin SZ, Chiang MF, Su CY, Li H. Intracerebral peripheral blood stem cell (CD34+) implantation induces neuroplasticity by enhancing beta1 integrin-mediated angiogenesis in chronic stroke rats. J Neurosci 2006;26(13):3444-53.

26.Kang SK, Lee DH, Bae YC, Kim HK, Baik SY, Jung JS. Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats. Exp Neurol 2003; 183(2):355-66.

27.Chen J, Sanberg PR, Li Y, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. Stroke 2001;32(11):2682-8.

28.Willing AE, Lixian J, Milliken M, et al. Intravenous versus intrastriatal cord blood administration in a rodent model of stroke. J Neurosci Res 2003;73(3):296-30.

29.Vendrame M, Cassady J, Newcomb J, et al. Infusion of human umbilical cord blood cells in a rat model of stroke dose-dependently rescues behavioral deficits and reduces infarct volume. Stroke 2004;35(10):2390-5.

[ DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.4.3.5 ]