

استفاده از پیوند سلول های مزانشیمی ژله وارتون بند ناف انسان در ترمیم عصب سیاتیک موش صحرایی

سهیلا ابراهیمی وسطی کلایی^{۱*}، مریم شیرمحمدی^۱ (MSc)، مهرداد بختیاری^۲ (PhD)

۱- گروه زیست شناسی دانشگاه پیام نور

۲- گروه علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی تهران

دریافت: ۹۱/۳/۱۱، اصلاح: ۹۱/۴/۱۴، پذیرش: ۹۱/۶/۸

خلاصه

سابقه و هدف: سالیانه تعداد زیادی از بیماران با مشکلات ناشی از آسیب های عصبی روبرو هستند. یکی از روش های جدید در درمان صدمات اعصاب محیطی استفاده از پیوند سلولی است. هدف از این مطالعه ارزیابی استفاده از پیوند سلول های مزانشیمی ژله وارتون بند ناف در بهبود عصب سیاتیک موش صحرایی پس از قطع و اتصال مجدد دو ناحیه پروگزیمال و دیستال عصب می باشد.

مواد و روشها: سلول های مزانشیمی با روش غیرآنزیمی از ژله وارتون بندناف انسان جدا شدند. مورفولوژی، تکثیر و ایمنوفنوتیپ این سلول ها پس از سومین پاساژ با استفاده از روش های رنگ آمیزی اختصاصی مورد ارزیابی قرار گرفت. ۲۵ سر موش نر (ویستار) در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم به صورت کاملاً تصادفی به سه گروه کنترل ($n=5$)، شم ($n=10$) و پیوند ($n=10$) تقسیم شدند. پس از انجام بیهوشی جراحی روی هر سه گروه انجام شد. ولی تنها در گروه شم و گروه پیوند عصب سیاتیک چپ قطع شده و دو انتهای پروکسیمال و دیستال اپی نورایوم عصب قطع شده به هم بخیه شد. در گروه درمانی، ۷۰۰۰۰۰ سلول مزانشیمی در مرحله پاساژ سوم به داخل اپی نورایوم عصب آسیب دیده تزریق شد. پس از گذشت ۱۲ هفته جهت تعیین بازگشت فعالیت عصب از تست footprint و نوار عصب-عضله (Electro Myo Graphy, EMG) استفاده گردید و تعداد آکسون ها در هر سه گروه شمارش و مقایسه شد.

یافته ها: نتایج نشان داد که سلول های جدا شده از ژله وارتون بندناف شاخص های سلولی CD90، CD49 و CD13 را بیان نموده و تحت شرایط مناسب قادرند به سلول های استخوانی و چربی تمایز یابند. نتایج EMG نشان داد در گروه درمانی، عصب سیاتیک بهتر ترمیم شده است ($p<0.05$). در مطالعه بافتی تعداد آکسون ها گروه پیوند ($283/3 \pm 2/35$) در مقایسه با گروه شم ($239/6 \pm 1/5$) بالاتر بود ($p<0.05$). تفاوت معنی داری در میزان ارزیابی عملکردی عصب سیاتیک (SFI) بین گروه شم ($-100/37 \pm 35$) و گروه پیوند ($-84/1 \pm 7$) مشممه شد ($p<0.05$).

نتیجه گیری: تحقیق حاضر نشان داد که پیوند سلول های مزانشیمی جدا شده از ژله وارتون بندناف انسان، ترمیم عصب و برگشت عملکرد پس از آکسوتومی شدید عصب سیاتیک را تا حدودی بهبود می بخشد.

واژه های کلیدی: سلول های بنیادی، ژله وارتون بندناف، ترمیم آکسونی، عصب سیاتیک.

مقدمه

بخیه و یا چسب فیبرین است. اما این روش همیشه با موفقیت همراه نیست (۳و۴). یکی از مسائل اصلی در درمان ضایعات عصبی، هدایت آکسون در حال ترمیم در مسیر صحیح است. به همین دلیل در گذشته از استخوان، لوله های فلزی و عروق خونی برای هدایت آکسون های در حال ترمیم به طرف انتهای مسیر استفاده می شد (۳). امروزه مشخص شد که حضور برخی مواد شیمیایی موسوم به

با وجود پیشرفت های چشمگیری که در علوم پزشکی و توانبخشی ایجاد شده هنوز امکان ترمیم ضایعات عصبی ایجاد نگردیده است بطوریکه از میان بیش از ۲۵۰۰۰ بیمار مبتلا به ضایعات تروماتیک اعصاب محیطی در آمریکا فقط ۱۵٪ با روش های درمانی رایج قابل درمان هستند (۱و۲). ساده ترین روش درمانی برای ترمیم صدمات ناشی از قطع عصب، اتصال دو انتهای عصب قطع شده توسط

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۱۴۳۸۰/۳/۹ دانشگاه پیام نور استان مازندران می باشد.

* مسئول مقاله:

آدرس: بابل، دانشگاه پیام نور، گروه زیست شناسی، تلفن: ۰۱۱۱-۲۲۵۰۴۷۲

انجماد و ذوب سلولی: به منظور نگهداری تعدادی از سلول ها کشت

داده شده در هر پاساژ سلولی، زمانی که سلول ها ۸۰-۷۰٪ کف فلاسک را پر کردند، سلول ها با ۲ ml محلول تریپسین ۰/۲۵ درصد از کف ظرف جدا و با محیط کشت حاوی FBS با دور ۱۵۰۰ بار در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتیفریژ شدند. پس از دور ریختن محیط رویی، یک ml محلول سرد مخصوص انجماد سلولی (حاوی ۹۰٪ FBS و ۱۰٪ دی متیل سولفوکساید یا DMSO) به رسوب سلولی اضافه و سوسپانسیون حاصله به ویال های مخصوص انجماد سلولی منتقل شد. ویال ها به مدت یک ساعت در فریزر $^{\circ}\text{C} -20$ و بدنبال آن یک شبانه روز در فریزر $^{\circ}\text{C} -80$ نگهداری گردیده و سپس برای نگهداری طولانی مدت به داخل مخزن نیتروژن مایع $^{\circ}\text{C} -196$ انتقال یافتند.

جهت استفاده مجدد از سلول های منجمد شده ویال حاوی سلول از تانک ازلت به سرعت به بن ماری $^{\circ}\text{C} 37$ منتقل گردید. پس از ذوب محتویات ویال به داخل یک فالكون استریل منتقل شده و در زیر هود با کمک پمپ استریل ۴ ml محیط کشت کامل با دمای $^{\circ}\text{C} 37$ به آن اضافه شد. سپس محلول حاصله با دور ۱۲۰۰ بار در دقیقه برای ۵ دقیقه سانتیفریژ شد. به رسوب حاصل از سانتیفریژ ۱-۲ ml محیط کشت اضافه کرده و سوسپانسیون حاصله پس از انتقال به فلاسک جهت کشت وارد انکوباتور گردید.

تعیین ایمونوفنوتیپ با فلوسیتومتری: برای مطالعه فلوسیتومتری، از

سلول های کشت داده شده در مرحله پاساژ سوم استفاده گردید. سلول ها در دمای $^{\circ}\text{C} 4$ به مدت ۲۰ دقیقه همراه با ۲۰ μl از هریک از آنتی بادی های اختصاصی CD13، CD49، CD90، CD105 به صورت جداگانه انکوبه گردید. از IgG₁-PE موش بعنوان ایزوتیپ کنترل استفاده شد (۱۸). سلول های نشان دار شده توسط دستگاه فلوسیتومتر بررسی شدند.

تمایز سلول های بنیادی مشتق از ژله وارتنون:

تمایز استئوژنیک و ارزیابی آن: سلول ها در محیط کشت استئوژنیک حاوی LG-DMEM همراه با ۱۰٪ FBS، ۱۰ Mm بتا گلیسروفسفات، ۰/۱ μM دگزامتازون و ۵۰ μM اسکوریات کشت داده شدند. تمایز استئوژنیک با استفاده از رنگ آمیزی آلكالین فسفاتاز ارزیابی گردید (۱۹).

تمایز آدیپوژنیک و ارزیابی آن: جهت القا تمایز آدیپوژنیک سلول ها به

مدت دو هفته در محیط کشت آدیپوژنیک حاوی LG-DMEM همراه با ۳۰/۵ mM ایزوبوتیل -۱- متیل گزانتین (Sigma-Aldrich)، ۱ μM دگزامتازون (Sigma-Aldrich)، ۰/۱ mM ایندومتاسین (Sigma-Aldrich) و ۵ mg/ml انسولین (Sigma-Aldrich) انکوبه شدند و در این مدت هر ۳ روز یکبار تعویض محیط انجام گرفت. در پایان دو هفته جهت تایید حضور چربی های خنثی در سیتوپلاسم سلول های متمایز شده رنگ آمیزی oil-red انجام گرفت (۱۹).

حیوانات مورد استفاده: در این تحقیق از ۲۵ سر موش صحرایی نر نژاد

ویستار با وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم استفاده شد که از انستیتو پاستور تهران تهیه شدند. حیوانات بصورت تصادفی به ۳ گروه کنترل (n=۵)، شم (n=۱۰) و گروه پیوند (n=۱۰) تقسیم گردیدند. در مدت تحقیق حیوانات در حیوان خانه دانشگاه علوم پزشکی ایران در شرایط نور، آب و غذای مناسب و در قفس های فلزی نگهداری شدند و به منظور رعایت اصول اخلاقی کار بر روی حیوانات، مطالعه حاضر بر اساس دستور کار کمیته اخلاقی دانشگاه پیام نور انجام شد.

عوامل نوروتروفیک در اطراف محل ضایعه سبب تقویت رشد آکسون و هدایت آن در مسیر صحیح می گردد. از این عوامل میتوان به فاکتور رشد عصب (NGF)، فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF) و فاکتور نوروتروفیک سیلیاری (CNTF) اشاره نمود (۵-۷). در سال های اخیر محققین سعی دارند از پیوندهای سلولی جهت جایگزینی بافت از دست رفته استفاده کنند. در این راستا از سلول های مختلف مانند سلول های مغز قرمز استخوان، فیبروبلاست ها، سلول های بنیادی فولیکول مو و سلول های شوان استفاده شده است (۸-۱۰). با توجه به قابلیت تکثیر و تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به بافت های مختلف، محققین امیدوارند تا بتوانند از این سلول ها در ترمیم ضایعات عصبی بهره ببرند. اگرچه مغز قرمز استخوان منبع اصلی سلول های بنیادی مزانشیمی است اما به دلیل امکان بروز عفونت های ویروسی و کاهش قابلیت تکثیر و تعداد سلول های بنیادی با افزایش سن فرد، استفاده از آن با محدودیت روبه رو است (۱۱). در سال های اخیر بندناف انسان، اندامی که پس از تولد دور انداخته می شود، مورد توجه فراوانی قرار گرفته است. سلول های بنیادی موجود در بندناف انسان از نوع چندتوان بوده، قدرت تکثیر زیاد و ظرفیت خود نوزایی داشته و حد واسط سلول های بنیادی جنینی و سلول های بنیادی بالغ هستند (۱۲). مطالعات نشان می دهد سلول های بنیادی فراوانی را می توان در ماده زمینه بافت مزانشیمی یا ژله وارتنون بندناف یافت (۱۳ و ۱۴). این سلول های بنیادی از توان تکثیر فوق العاده ای برخوردار بوده و در طی تقسیمات متوالی فرآیند پیری در آنها رخ نداده و مشابه با سلول های بنیادی بالغین تومور ایجاد نمی کنند (۱۵ و ۱۶). هنوز به خوبی مشخص نشده است که آیا سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از ژله وارتنون بندناف انسان می توانند به بافت های مختلف تمایز یابند یا خیر. نشان داده شده که سلول های بنیادی بندناف، مولکول های نوروتروفیکی مثل NGF، BDNF و CNTF را ساخته و ترشح می کنند (۱۷). با توجه به اینکه این مولکول ها سبب تقویت رشد آکسون می شوند، این امکان وجود دارد که بتوان از این سلول ها جهت ترمیم ضایعات عصبی استفاده نمود. هدف از این مطالعه ارزیابی استفاده از پیوند سلول های مزانشیمی ژله وارتنون بند ناف در بهبود عصب سیاتیک موش صحرایی پس از قطع و اتصال مجدد دو ناحیه پروگزیمال و دیستال عصب می باشد.

مواد و روشها

جداسازی و کشت سلول های بنیادی مشتق از ژله وارتنون

بندناف: پس از اخذ رضایت نامه کتبی از والدین، بندناف نوزادانی که پس از طی دوره ۳۶ تا ۳۸ هفتگی با عمل سزارین در زایشگاه بیمارستان اکبرآبادی تهران متولد شده بودند، جمع آوری گردید. پس از شستشو با محلول بافر فسفاتی (Phosphate Buffer Serum, PBS) و جداسازی عروق خونی، تکه های هر بندناف به قطعات بسیار ریز تقسیم و به فلاسک های ۵۰ ml حاوی محیط کشت DMEM، محلول ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum, FBS)، پیروات، گلوتامین و آنتی بیوتیک منتقل شده و به مدت سه روز در انکوباتور در دمای $^{\circ}\text{C} 37$ ، رطوبت ۹۷٪ و مخلوط گازی حاوی ۵٪ گاز دی اکسیدکربن نگهداری شد. در ادامه هر دو روز یک بار تعویض محیط انجام شده و روزانه فلاسک ها توسط میکروسکوپ معکوس بررسی شده و عکس برداری انجام و در صورت آمادگی عملیات پاساژ سلولی انجام گرفت (۱۸).

۱٪ رنگ آمیزی گردیدند. برای شمارش تعداد آکسون ها نمونه ها با میکروسکوپ نوری ($\times 400$) بررسی شدند. در هر نمونه سه گرید انتخاب و تمامی آکسون های موجود اعم از میلیون دار و بدون میلیون شمارش و میانگین تعداد آکسون ها بدست آمد. شمارش آکسونی با استفاده از نرم افزار الیمپوس انجام شد (۲۱).

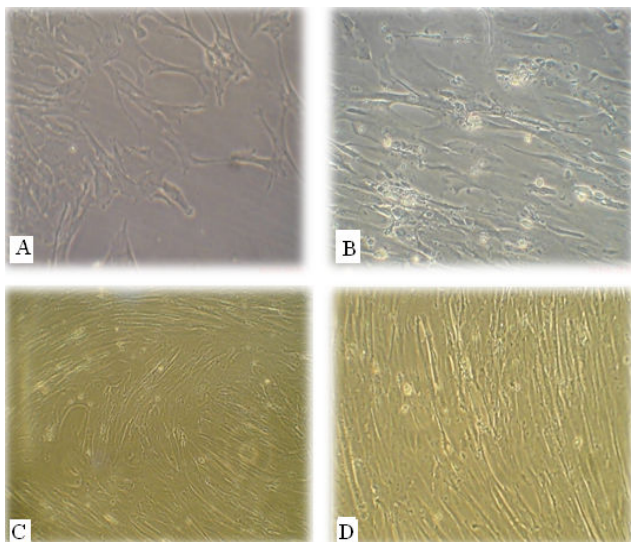
مطالعات ایمنو هیستوشیمی: جهت نشاندار کردن سلول های بنیادی جدا شده از ژله وارتون $3 \mu\text{g/ml}$ پودر بروموتوکسی اوریدین (BrdU) (sigma) به مدت ۷۲ ساعت به محیط کشت سلول ها در فلاسک اضافه گردید. سپس سلول های مزانشیمی نشاندار شده به داخل غلاف اپی نورایوم تزریق شد. در پایان روز دوازدهم پس از خارج کردن عصب ترمیم شده نمونه های بافتی تهیه و به مدت یک شب با آنتی بادی اولیه ضد BrdU در دمای ۴ درجه انکوبه شده و روز بعد، پس از انکوباسیون با آنتی بادی ثانویه به مدت دو ساعت در دمای اتاق و محفظه مرطوب، با رودامین رنگ آمیزی شدند وجود سلول های نشان دار شده در محل ضایعه با میکروسکوپ فلورسنت مطالعه گردید.

تجزیه و تحلیل داده ها

داده ها بصورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ ارائه شدند. برای تعیین اختلاف بین میانگین ها از آنالیز واریانس یک طرفه و متعاقب آن تست Tukey استفاده شد و $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

در تحقیق حاضر سلول های مزانشیمی مشتق از ژله وارتون بندناف پس از ۵ روز به کف ظرف چسبیده و جمعیت های کوچک سلولی متشکل از سلول های دوکی شکل و گرد با نسبت بالای هسته به سیتوپلاسم را تشکیل دادند. به تدریج بر تعداد سلول های دوکی شکل اضافه شد بطوریکه در پاساژ سوم حدود ۷۰۰۰۰ سلول مزانشیمی مورد نیاز جهت ادامه تحقیق به دست آمد (شکل ۱).



شکل ۱. خصوصیات سلول های مزانشیمی جدا شده از ژله وارتون. (A) کشت سلول ۵ روز بعد از اولین جداسازی. سلول ها ظاهری شبه فیبروبلاستی دارند. (B) سلول ها به پاساژ اول نزدیک می شوند. (C و D) سلول ها در پاساژ سوم. میکروسکوپ معکوس، $\times 200$.

روش کار: پس از القا بیهوشی و تثبیت حیوان روی تخت جراحی و برش پوست بالای استخوان ران پای چپ حیوان عضلات کنار زده شد تا عصب سیاتیک نمایان گردد. در گروه کنترل بدون هیچ اقدام درمانی مجدداً محل جراحی دوخته و حیوانات به قفس برگردانده شدند. در گروه شم و گروه پیوند پس از نمایان ساختن عصب سیاتیک چپ و جداسازی آن از بافت همبند اطراف با استفاده از قیچی استیونس، عصب در قسمت میانی قطع شد. در گروه شم اپی نورایوم دو انتهای پروگزیمال و دیستال عصب قطع شده با استفاده از نخ بخیه نایلونی ۹ صفر بخیه شد. در گروه پیوند پس از بخیه زدن اپی نورایوم عصب سیاتیک ۷۰۰۰۰ سلول بنیادی نشاندار شده بندناف در مرحله پاساژ سوم در محل بخیه به داخل اپی نورایوم تزریق گردید. در پایان جراحی در هر سه گروه عصب سیاتیک در عمق عضله قرار داده شده و پوست را با نخ ۳-۰ نایلونی بخیه زده، محل جراحی با بتادین ضد عفونی و حیوان به قفس باز گردانده شد.

ارزیابی حرکتی با تست فوت پرینت: پس از گذشت دوازده هفته از جراحی به منظور ارزیابی میزان بهبود حرکتی تست رفتاری foot print انجام شد. این آزمون روشی جهت ارزیابی بالینی میزان بازگشت عملکرد حرکتی عصب ترمیم شده می باشد (۲۰). برای انجام این تست پاهای عقب موش با جوهر رنگی شده و اجازه داده شد تا موش بر روی کاغذ سفید موجود در داخل جعبه ای به ابعاد 30×100 سانتی متر راه برود. سپس طول کف پا یا طول اثر کف پا در پای جراحی شده (EPL) و در پای طبیعی (NPL)، فاصله بین انگشتان اول و پنجم یا خطی که مرکز انگشت پنجم را به مرکز انگشت اول متصل می کند در پای جراحی شده (EST) و در پای طبیعی (NTS)، فاصله انگشت دوم و چهارم یا خطی که مرکز انگشت دوم را به مرکز انگشت چهارم متصل می کند در سمت جراحی شده (EITS) و در سمت طبیعی (NITS) بر حسب میلی متر اندازه گیری شد. سپس با استفاده از فرمول بین و همکاران شاخص عملکرد سیاتیک (SFI) برای هر دو پا محاسبه گردید. در این روش عدد صفر عملکرد طبیعی و عدد ۱۰۰ نشان دهنده اختلال کامل است (۲۱).

$$SFI = -88.5 \left(\frac{EPL - NPL}{NPL} \right) + 109.5 \left(\frac{EST - NTS}{NTS} \right) + 13.5 \left(\frac{EITS - NITS}{NITS} \right) - 8.8$$

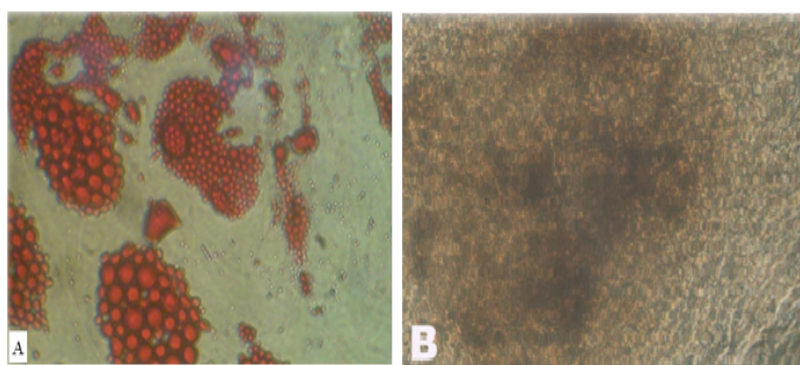
مطالعات الکترومیوگرافی: در آخر هفته دوازدهم جهت تأیید اتصال دو قطعه پروکسیمال و دیستال عصب و کارایی عصب ترمیم شده از عصب سیاتیک و عضله گاسترکنمیوس (GC) نوار عصب-عضله گرفته شد. از روی پاسخ های ثبت شده دامنه پتانسیل عمل مرکب و تأخیر بین اعمال تحریک و شروع پتانسیل عمل در عضله GC برای هر حیوان محاسبه گردید. در پایان عصب سیاتیک از بافت اطراف جدا و بخش ترمیم شده آن جهت بررسی بافتی به داخل محلول تثبیت کننده گلو تار آلدهید ۲/۵ درصد انتقال یافت (۲۱). در بررسی الکتروفیزیولوژی پس از گرفتن نوار عصب و عضله به دو شیوه سوزنی و کپ در دو ناحیه پروکسیمال و دیستال نتایج در پنج سطح ضعیف، نسبتاً ضعیف، متوسط، نسبتاً خوب، خوب بیان شد. برای مقایسه این نتایج از میانگین رتبه ها استفاده گردید.

مطالعات بافت شناسی: دوازده هفته پس از جراحی، بعد از باز نمودن پوست و کنار زدن عضلات، عصب ترمیم شده نمایان شد. پس از جداسازی از بافت اطراف، دو انتهای عصب بریده، جدا شده و درون گلو تار آلدهید قرار داده شد. پس از تثبیت بافت و قالب گیری رزینی توسط دستگاه اولترامیکروتوم (Leica-Ultracut) از بلوک ها برش های $50 \mu\text{m}$ نانومتری تهیه و با محلول تولوئیدین بلو

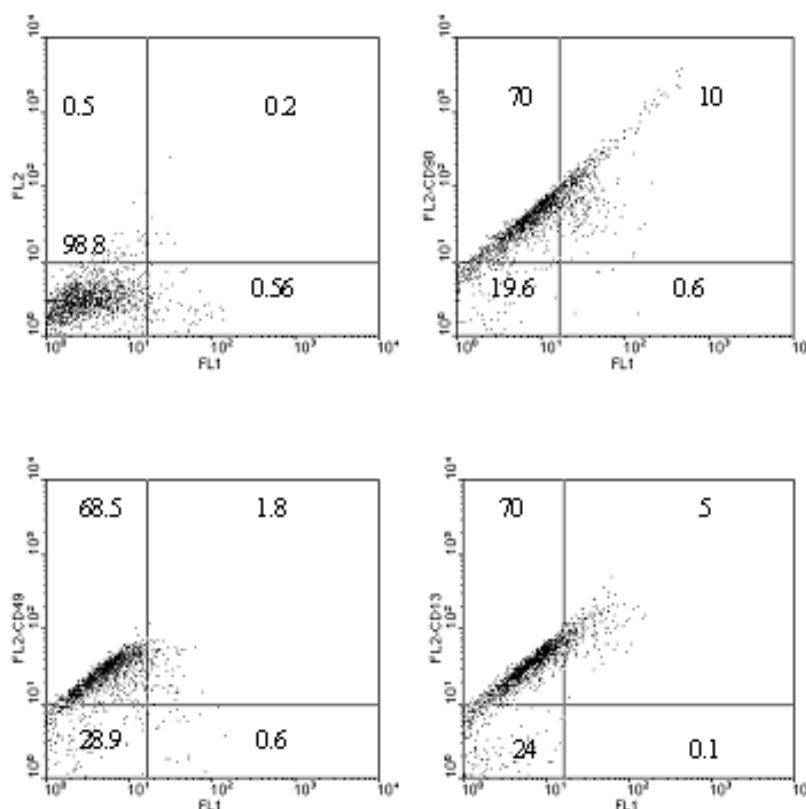
میانگین رتبه‌ها استفاده گردید. میانگین رتبه‌ها در سه گروه کنترل، شم و پیوند به ترتیب 1.3 ± 0.1 ، 1.1 ± 0.6 و 4.4 ± 0.7 بود که بین گروه شم و گروه پیوند تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($p < 0.01$) (نمودار ۲). عصب ترمیم شده در گروه پیوند به سمت ایجاد فاسیکل پیش رفته و تراکم اکسون‌های ترمیم شده در این گروه بیشتر از گروه شم بود (شکل ۵). در صورتی که در گروه شم اکسون‌ها کاملاً پراکنده بوده و اکسون‌های ترمیم شده از لحاظ قطر کاملاً ناهماهنگ و اکثر آنها فاقد میلین هستند. وجود عروق خونی در مقاطع عرضی تهیه شده از عصب ترمیم شده در گروه پیوند قابل توجه بود. نتایج حاصل از شمارش اکسون‌ها نشان داد که در گروه پیوند در مقایسه با گروه شم تعداد اکسون‌ها به میزان قابل توجهی بالاتر بود ($p < 0.05$) (نمودار ۳). نتایج ایمنوهیستوشیمی نیز حضور سلول‌های مزانشیمی زنده را در محل تزریق (داخل علاف اپی‌نوریوم) تایید نمود (شکل ۶).

رنگ آمیزی‌های اختصاصی نشان داد که سلول‌های استخراج شده تحت تاثیر محیط‌های کشت مناسب قادرند به سلول‌های چربی و استخوانی تمایز یابند (شکل ۲) و بر اساس نتایج فلوسیتومتری حدود ۷۰٪ سلول‌ها در پاساژ سوم برای مارکرهای CD90، CD13، CD49 مثبت بودند (شکل ۳).

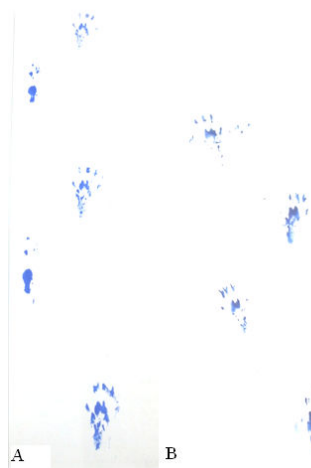
نتایج حاصل از تست فوت پرینت در گروه شم بهبود عملکردی را نشان نداد (10.0 ± 3.7) ولی در گروه درمانی پس از دوازده هفته علانم بهبودی دیده شد (11.1 ± 8.1). بررسی آماری نشان داد که استفاده از پیوند سلول‌های مزانشیمی در ترمیم عصب سیاتیک بهتر از روش بخیه زدن بوده است ($p < 0.05$) (شکل ۴ و نمودار ۱). در بررسی الکتروفیزیولوژی پس از گرفتن نوار عصب و عضله به دو شیوه سوزنی و کپ در دو ناحیه پروکسیمال و دیستال نتایج در پنج سطح ضعیف، نسبتاً ضعیف، متوسط، نسبتاً خوب، خوب بیان شد. برای مقایسه این نتایج از



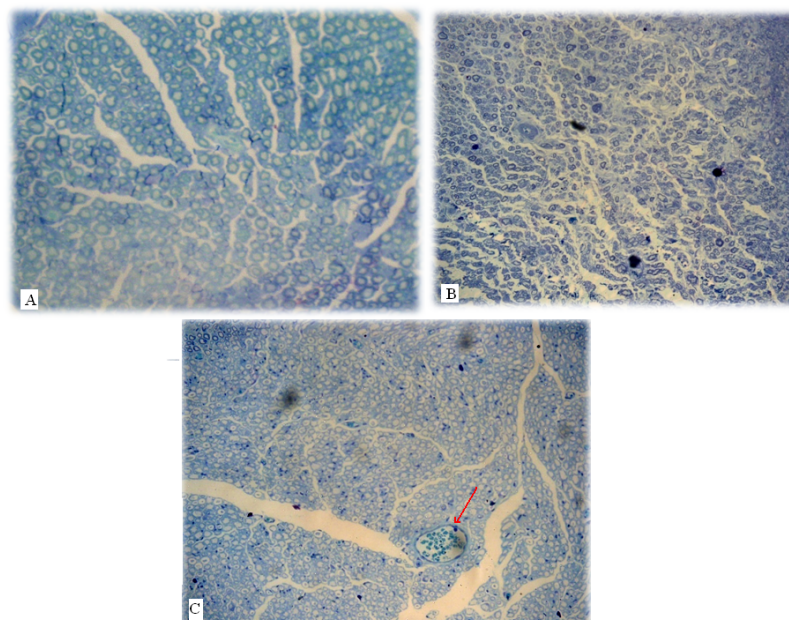
شکل ۲. توانایی تمایزی سلول‌های مزانشیمی جدا شده از ژله وار تون. (A) تمایز آدیپوزیک، رنگ‌آمیزی اوایل رد. (B) تمایز اوستئوزیک، رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز.



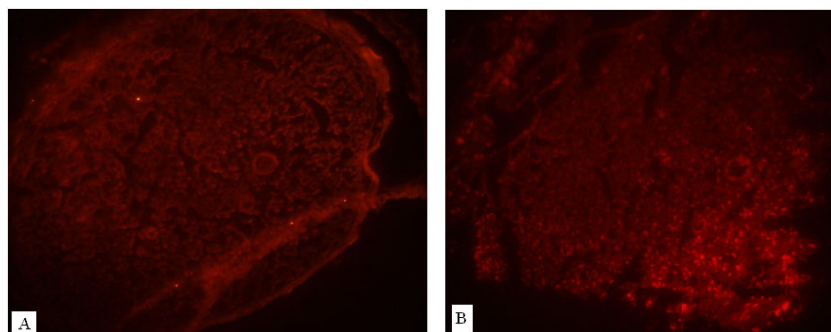
شکل ۳. آنالیز فلوسیتومتری برای مارکرهای CD90، CD49، CD13 در سلول‌های مزانشیمی جدا شده از ژله وار تون.



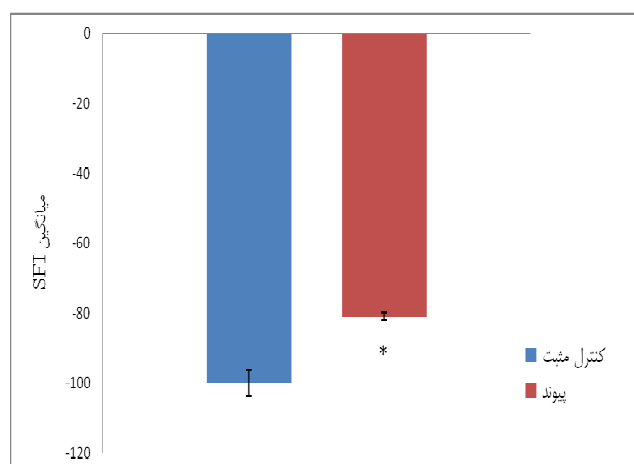
شکل ۴. تصویر اندام عقبی موش‌های گروه‌های مختلف هنگام راه رفتن جهت اندازه‌گیری SFI دوازده هفته بعد از ترمیم. A گروه شم و B گروه پیوند. گروه کنترل نشان داده نشده است.



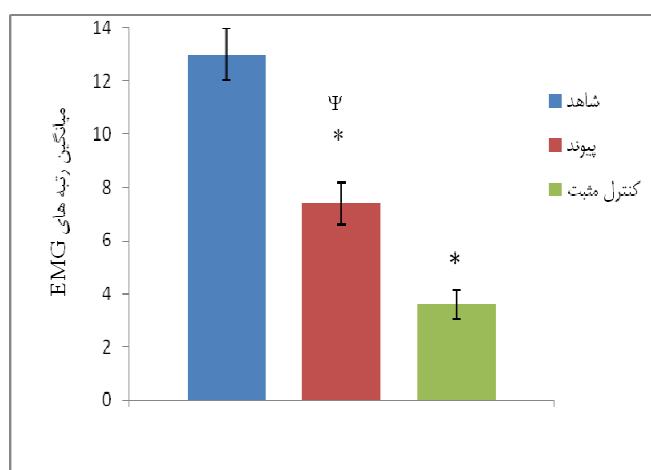
شکل ۵. تصاویر میکروسکوپ نوری از مقطع عرضی عصب سیاتیک در گروه‌های مورد مطالعه دوازده هفته پس از جراحی. A گروه کنترل، B گروه شم و C گروه پیوند. در شکل C پیکان عروق خونی را نشان می‌دهد (رنگ آمیزی تلوییدن بلو، $\times 400$).



شکل ۶. برش عرضی عصب سیاتیک در ناحیه آسیب دیده در گروه پیوند (A) و گروه شم (B) ۱۲ روز پس از جراحی. در گروه پیوند سلول‌های مزانشیمی نشان‌دار شده با Brdu به رنگ روشن نسبت به سایر سلول‌ها دیده می‌شوند (میکروسکوپ فلورسنت، $\times 100$).



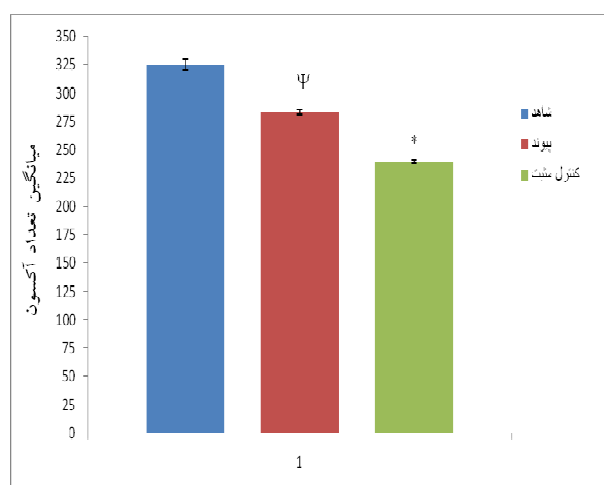
نمودار ۱: مقایسه میانگین SFI بین گروه شاهد و گروه پیوند. سطح معنی دار بودن $P < 0.05$ در نظر گرفته شده است.



نمودار ۲: میانگین رتبه های متغیر EMG در بین گروه های مورد مطالعه دوازده هفته بعد از جراحی.

سطح معنی دار بودن $P < 0.05$ در نظر گرفته شده است.

Ψ: وجود تفاوت معنی دار با گروه شاهد ($P < 0.05$). *: وجود تفاوت معنی دار با گروه کنترل ($P < 0.05$).



نمودار ۳: میانگین تعداد آکسون ها در بین گروه های مورد مطالعه دوازده هفته بعد از جراحی. سطح معنی دار

بودن $P < 0.05$ در نظر گرفته شده است.

Ψ: وجود تفاوت معنی دار با گروه شاهد ($P < 0.05$). *: وجود تفاوت معنی دار با گروه کنترل مثبت ($P < 0.05$).

بحث و نتیجه گیری

در تحقیق حاضر نشان داده شد که استفاده از پیوند سلول‌های مزانشیمی مشتق از ژله وارتون بندناف تا حدودی در ترمیم عصب سیاتیک موفق است. در سال ۲۰۰۶ برای اولین بار سلول‌های بنیادی از ژله وارتون بندناف انسان جداسازی و تخلیص شد (۲۲). یک سال بعد محققین توانستند سلول‌های بنیادی مزانشیمی را از ماتریکس بندناف اسب جدا و به سلول‌های عصبی تمایز دهند (۲۳). در مطالعات مختلف سلول‌های بنیادی ژله وارتون را جزء سلول‌های بنیادی مزانشیمی طبقه بندی کرده‌اند که با قرار گرفتن در شرایط مناسب قادرند به انواع مختلفی از سلول‌ها نظیر کندروسیت، آدیپوسیت، استئوسیت، میوسیت و سلول‌های شبه نورونی تمایز یابند (۲۴).

در این تحقیق نیز این موضوع کاملاً تایید شد زیرا نتایج نشان داد که سلول‌های جدا شده از بافت ژله وارتون بندناف دارای خاصیت تکثیر و خود نوزایی بالایی بوده و توانایی تمایز به سلول چربی و استئوسیت را دارند. مطابق با گزارشات موجود میزان موفقیت در جداسازی یکی از مهمترین عوامل در تعیین قابلیت سلول‌های مزانشیمی جهت کاربرد این سلول‌ها در بالین است (۱۱). نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که جداسازی سلول‌های مزانشیمی ژله وارتون بندناف با روش غیرآنزیمی روشی کاملاً موفق بوده و سلول‌های کشت داده شده با این روش نه تنها از سرعت تکثیر بالایی برخوردار هستند بلکه شبیه به نتایج گزارش شده توسط سایر محققین قادرند تحت شرایط مناسب به اوستئوبلاست‌ها و آدیپوسیت‌ها تمایز یابند (۱۱ و ۱۶). در همین راستا در تحقیقی مشابه سلول‌های بنیادی ژله وارتون بندناف بز بدون استفاده از آنزیم کشت داده شد (۲۵). گزارش شده که جداسازی سلول‌های مزانشیمی از ژله وارتون بندناف بدون استفاده از آنزیم این سلول‌ها را مستعد برای چسبیدن به ته ظرف نموده و از این‌رو نیاز به پاساژهای متعدد را جهت رسیدن به تعداد بالای سلول‌ها کاهش می‌دهد (۲۶). در این تحقیق نیز با استفاده از این روش توانستیم در پاساژ سوم به تعداد مورد نیاز از جمعیت سلولی دست یابیم. گزارشات موجود همگی اذعان دارند که سلول‌های مزانشیمی مشتق از ژله وارتون بندناف در مقایسه با سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان از سرعت تکثیر بالاتری برخوردار هستند (۱۶). نتایج تحقیق حاضر نیز این یافته‌ها را تایید می‌کند. مشابه با گزارشات موجود نتایج فلوسیتومتری نیز نشان داد که سلول‌های جدا شده از ژله وارتون بندناف برای CD49، CD90 و CD13 مثبت بوده و بنابراین مزانشیمی بودن این سلول‌ها تایید گردید (۱۶ و ۲۷). در سال‌های اخیر در مدل‌های حیوانی استفاده از پیوند سلولی جهت ترمیم آکسونی و میلین‌سازی مجدد پس از آکسوتومی پیشنهاد شده است، گزارشاتی مبنی بر استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی جهت بهبود ترمیم نرونی و بازگشت عملکرد پس از آکسوتومی عصب سیاتیک وجود دارد (۲۸). در مطالعه حاضر نیز سلول‌های مزانشیمی مشتق از ژله وارتون بندناف بعنوان منبع دیگری از سلول‌ها با قابلیت تمایز به نرون مطرح گردید. محققینی که در ترمیم مدل ضایعات نخاعی در رت از سلول‌های مزانشیمی ژله وارتون بندناف انسان استفاده کردند، ترمیم ضایعه را به تمایز این سلول‌ها به سلول‌های گلیال و توانایی ترشح نوروتروفین‌ها و سیتوکین‌ها توسط آنها نسبت داده‌اند (۲۹). گزارشاتی مبنی بر توانایی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از ژله وارتون بندناف در محیط کشت به نرون‌ها وجود دارد (۳۱ و ۳۰). هم‌چنین گزارش شده سلول‌های مزانشیمی

مشتق از ژله وارتون بندناف قادرند فاکتورهای نوروتروپیک از جمله فاکتور رشد عصب (NGF) ترشح کنند (۲۹ و ۱۷). گزارش شده فاکتور اخیر نقش مهمی در ایجاد عروق خونی جدید بر عهده دارد. محققین براین باورند که افزایش عروق خونی در بافت عصبی آسیب دیده نشان خوبی برای تایید ترمیم بافتی است (۲۹). در مطالعه حاضر افزایش تعداد عروق خونی به دلیل استفاده از سلول‌های مزانشیمی ژله وارتون می‌باشد. یکی دیگر از فاکتورهای عمده در ایجاد عروق خونی فاکتور رشد آندوتلیوم عروقی (VEGF) است. این فاکتور به گیرنده‌های R3 موجود در لایه آندوتلیوم عروق متصل شده و روند رگ‌زایی را سبب می‌شود (۳۲). گزارش شده به دنبال پیوند سلول‌های بنیادی ژله وارتون بندناف انسان در مدل قطع کامل طناب نخاعی موش صحرایی، تعداد گیرنده‌های R3 در طناب نخاعی افزایش چشمگیری داشته است (۳۳). در مطالعه حاضر نیز در گروه پیوند، رشد و پیدایش عروق خونی بیشتر دیده شد. به نظر می‌رسد بین ترشح فاکتور NGF و گسترش عروق خونی در این گروه ارتباطی وجود داشته باشد.

در بررسی ترمیم اعصاب محیطی، تعداد اکسون‌های ترمیم شده از لحاظ تعداد، میلین‌دار شدن و بررسی کیفیت غلاف میلین ترمیم شده مدنظر قرار می‌گیرند (۲۹ و ۲۴). تجربیات آزمایشگاهی نشان می‌دهند که اگرچه متعاقب قطع عصب محیطی آکسون‌های حسی و حرکتی هر دو قادر به ترمیم هستند اما عضلات مربوط به این عصب ترمیم شده دارای عملکرد ضعیفی است. احتمال دارد رشد نسبتاً آهسته اکسون‌های جدید و افت ویژگی ارتباطات عصبی - عضلانی که مجدداً عصب‌گیری می‌شوند در این اختلال بالینی دخالت داشته باشد (۳۴). نتایج الکترومیوگرافی در مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از سلول‌های مزانشیمی مشتق از ژله وارتون در بازگرداندن عملکرد عضله پس از آکسوتومی تا حدود قابل قبولی موفق بوده است. نتایج ایمونوهیستوشیمی نیز در این مطالعه حضور سلول‌های مزانشیمی را در محل ضایعه نشان داد. با توجه به سرعت تکثیر بالای سلول‌های مزانشیمی مشتق از ژله وارتون احتمال دارد کاهش زمان لازم برای ترمیم عصب در افزایش کارایی عضله پس از بهبود دخالت داشته باشد. گزارشاتی مبنی بر بیان مولکول‌های MHC کلاس یک توسط سلول‌های مزانشیمی ژله وارتون بندناف وجود دارد (۳۵). این مولکول‌ها سلول را در برابر فعالیت سلول‌های کشنده حفاظت کرده و احتمال رد پیوند را کاهش می‌دهد (۱۶). احتمال دارد به همین دلیل سلول‌های مزانشیمی ژله وارتون مورد استفاده در این تحقیق از طرف میزبان رد نشده باشند. زیرا در صورت واکنش با سیستم ایمنی سلول‌های بنیادی ژله وارتون بندناف رد شده و در گروه دریافت کننده سلول ترمیم صورت نمی‌گرفت.

با توجه به آنچه گفته شد سلول‌های جدا شده از بافت ژله وارتون بندناف دارای خاصیت تکثیر و نوزایی بوده و با قرارگیری در شرایط مناسب قادرند به سلول‌های چربی و استخوانی تمایز یابند. هم‌چنین استفاده از سلول‌های بنیادی ژله وارتون در ترمیم عصب سیاتیک قطع شده تا حدود زیادی موفقیت آمیز بود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه پیام نور استان مازندران و کلیه پرسنل این معاونت تقدیر و تشکر بعمل می‌آید.

Administration of Human Umbilical Cord Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells on Rat Sciatic Nerve Regeneration

S. Ebrahimi Vosta Kalae (PhD)^{*1}, M. Shirmohamadi (MSc)¹, M. Bakhtiari (PhD)²

1. Department of Biology, Payame Noor University, Iran

2. Department of Anatomy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

J Babol Univ Med Sci; 15(2); Mar 2013; pp: 69-78

Received: May 31st 2012, Revised: Jul 4th 2012, Accepted: Aug 29th 2012.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Annually, a lot of patients experience motor problems due to nerve lesions. One of procedures for treatment of peripheral nerves injuries is cell therapy. The aim of the present study was to investigate transplantation of umbilical cord Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells for improvement of sciatic nerve of rat after cutting and suturing two parts of proximal and distal nerve.

METHODS: Mesenchymal stem cells (MSCS) were isolated from human umbilical cord Wharton's jelly by non-enzymatic procedure. The morphology, proliferation and immunopheotype of the 3rd passage cells were analyzed. Twenty five male rats (200-250 g) were randomly divided into 3 groups: control (n=5), sham (n=10) and transplantation group (n=10). After anesthesia, surgery was performed on the three groups of rats but only the sciatic nerve in sham and transplantation groups was cut and then end proximal and distal nerve's epineurium were sutured. In transplantation group 700000 mesenchymal cells in the third passage injected into epineurium. Twelfth weeks after surgery, electromyography and foot print test were used to determine the restoration of nerve function and for each rat axon counted and compared.

FINDINGS: Flowcytometry analysis revealed that the MSCS derived from human umbilical cord were positive for CD90, CD49 and CD13 and could be induced to differentiate into osteogenic and adipogenic cells under proper inducing conditions. Results of EMG showed that in transplantation group, nerve was better regenerated ($p < 0.05$). In histological study number of regenerated axons in transplantation group (283.3 ± 2.35) were higher than sham group (239.6 ± 15) ($p < 0.05$) and significant differences in SFI (Sciatic Functional Index) were observed between groups (-100.37 ± 35 and -84.1 ± 7) ($p < 0.05$).

CONCLUSION: This research shows that transplantation of MSCS isolated from human umbilical cord Wharton's jelly proves nerve repair and functional recovery after severe sciatic nerve in rats.

KEY WORDS: Mesenchymal stem cell, Wharton's jelly, Axonal regeneration, Sciatic nerve.

^{*}Corresponding Author;

Address: Department of Biology, Payame Noor University, Babol, Iran

Tel: +98 111 2250472

E-mail: s_ebrahimi@pnu.ac.ir

References

1. Dahlin B. Techniques of peripheral nerve repair. *Scand J Surg* 2008;97(4):310-16.
2. Archibald SJ, Krarup C, Shefner J, Li ST, Madison RD. A collagen-based nerve guide conduit for peripheral nerve repair: An electrophysiological study of nerve regeneration in rodents and nonhuman primates. *J Comp Neuro* 1991; 306(4):685-96.
3. Mahesh CD. Bioengineered Scaffolds for peripheral nerve regeneration. In partial fulfillment of the requirements for the degree doctor of philosophy in the school of bioengineering. Department of Biomedical Engineering Georgia Institute of Technology; May 2007:34-9.
4. Yang Y, Ding F, Wu J, et al. Development and evaluation of silk fibroin-based nerve grafts used for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 2007;28(36):5526-35.
5. Fan B, Louv JY. Enhancement of angiogenic effect of co-transfection human NGF and VEGF genes in rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Gene* 2011;485(2):167-71.
6. Jiang X, Lim SH, Mao HQ, Chew SY. Current applications and future perspective of artificial nerve conduits. *Exp Neurol* 2010;223(1):86-101.
7. Choi BH, Zhu SJ, Kim BY, Huh JY, Lee SH, Jung JH. Transplantation of cultured bone marrow stromal cells to improve peripheral nerve regeneration. *Int J Oral Maxillo fac Surg* 2005;34(5):537-42.
8. Ren Z, Wang Y, Peng J, Zhao Q, Lu S. Role of stem cells in the regeneration and repair of peripheral nerves. *Rev Neurosci* 2012;23(2):135-43.
9. Kawada H, Fujito J, Kinjo K, et al. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood* 2004;104(12):3581-7.
10. Cui L, Jiang J, Wei L, et al. Transplantation of embryonic stem cells improves nerve repair and functional recovery after severe sciatic nerve axotomy. *Stem Cells* 2008;26(5):1356-65.
11. Cao Fu, Feng Shi. Human umbilical cord mesenchymal stem cells and the treatment of spinal cord injury. *Chin Med J* 2009;122(2):225-31.
12. Gang JE, Hong SH, Jeong JA, et al. In vitro mesogenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;321(1):102-8.
13. Fong M, Richards M, Manasi N, Biswas A, Bongso A. Comparative growth behaviour and characterization of stem cells from human Wharton's jelly. *Reprod Biomed* 2007;15(6):708-18.
14. Seshareddy K, Troyer D, Weiss ML. Method to isolate mesenchymal-like cells from Wharton's Jelly of umbilical cord. *Methods Cell Biol* 2008;86:101-19.
15. Nekanti U, Dastidar S, Venuqopal P, Totey S, Ta M. Increased proliferation and analysis of differential gene expression in human Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells under hypoxi. *Int J Biol Sci* 2010;6(5):499-512.
16. Troyer DL, Weiss ML. Concise review: Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells* 2008;26(3):591-9.
17. 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 out growth in vitro. *Brain Res Bull* 2011;84(3):235-43.
18. Jalali M, Ghafaripoor HA, Nikravesht MR, Hamidi Alamdari D, Sanchooli J, Seghatdeslam M. Therapeutic potential of cord blood stem cell in brain damage of an animal model. *J Iran Anat Sci* 2011;9(36):191-202.
19. Abnosi MH, Soleimani Mehranjani M, Momeni HR, Mahdizadeh najafabadi M, Barati M, Shojafar E. The effect of para-nonylphenol on the viability and morphology of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Arak Med Univ J* 2011;14(54):1-11.

20. Kanaya F, Firrell JC, Breidenbach WC. Sciatic function index nerve conduction tests muscle contraction and axon morphometry as indicators of regeneration. *Plast Reconstr Surg* 1996;98(7):1264-72.
21. Zarbakhsh S, Bakhtiyari M, Faghihi A, et al. The effects of Schwann and bone marrow stromal stem cells on sciatic nerve injury in rat: a comparison of functional recovery. *Cell J (Yakhteh)* 2012;14(1): 38-46.
22. Weiss M, Medisetty S, Bledsoe AR, et al. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson s disease. *Stem Cells* 2006;24(3):781-92.
23. Hoynowski SM, Fry MM, Gardner BM, et al. Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells. *Nature* 2007;362(2):342-53.
24. Troyer DL, Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells* 2008;26(3):591-9.
25. Babaei H, Moshrefi M, Golchin M, Nematollahi Mahani SN. Assess the pluripotency of caprine umbilical cord Whartan's jelly mesenchymal cells by RT_PCR analysis of early transcription factor Nanog. *Iran J Vet Surg* 2008;3(2):57-65.
26. Seshareddy K, Troyer D, Weiss ML. Method to isolate mesenchymal-like cells from Wharton's jelly of umbilical cord. *Methods Cell Biol* 2008;86:101-19.
27. Zhao QH, Zhu JX, Wang L, Dong SH, Xia T, Tian JW. Biological characteristics of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells and their differentiation into chondrogenic and osteogenic cells. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2011;91(5):317-21.
28. Cui L, Jiang J, Wei L, et al. Transplantation of embryonic stem cells improves nerve repair and functional recovery after severe sciatic nerve axotomy in Rat. *Stem Cells* 2008;26(5):1356-65.
29. Hsiao ST, Asgari A, Lokmic Z, Sinclair R, Dusting GJ, Lim SY, Dilley RJ. Comparative Analysis of Paracrine Factor Expression in Human Adult Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow, Adipose, and Dermal Tissue. *Stem Cells Dev* 2012;21(12):2168-203.
30. Mitchel KE, Weiss ML, Mitchell BM, et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells* 2003;21(1):50-60.
31. Abdulrazzak H, Moschidou D, Jones G, Guillot PV. Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extra embryonic tissues. *J R Soc Interface* 2010;7(Suppl 6): S689-706.
32. Perrin LA, June JE, Rosebury W, et al. Increased revascularization efficacy after administration of an adenovirus encoding VEGF (121). *Gene Ther* 2004;11(6):512-21.
33. Ming-Chin L, Yung-Hisen Ch, Leih-Chih Ch. Peripheral nerve regeneration through nerve guides filled with bilobalide and Schwann cells. *Biomed Eng Appl Basis Commun* 2006;18(1):8-12.
34. English AW, Chen Y, Carp JS, Wolpaw JR, Chen XY. Recovery of electromyographic activity after transection and surgical repair of the rat sciatic nerve. *J Neurophysiol* 2007;97(2):1127-34.
35. De Miguel MP, Fuentes-Julián S, Blázquez-Martínez A, et al. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Curr Mol Med* 2012;12(5):574-91.