مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره پانزدهم، شمارهٔ ۲، اسفند۱۳۹۱، صفحه ۷۸-۶۹

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

سهیلا ابراهیمی وسطی کلایی(PhD)[1*]، مریم شیرمحمدی(MSc)[1]، مهرداد بختیاری(PhD)[2]

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 روش‌های 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: سلول‌های مزانشیمی با روش غیرآنزیمی از ژله وارتون بندناف انسان جدا شدند. مورفولوژی، تکثیر و ایمنوفنوتیپ این سلول‌ها پس از سومین پاساژ با استفاده از روش‌های رنگ‌آمیزی 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 =۵)، شم (n=۱۰) و پیوند (n=۱۰) 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 اپی‌نوریوم عصب قطع شده به هم بخیه شد. در گروه درمانی، ۷۰۰۰۰۰ سلول مزانشیمی در مرحله پاساژ سوم به داخل اپی‌نوریوم 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 سلول‌های جدا شده از ژله وارتون بندناف شاخص های سلولی CD90، CD49 و CD13 را بیان نموده و تحت شرایط مناسب قادرند به سلول‌های استخوانی و چربی تمایز یابند. نتایج EMG نشان داد در گروه درمانی، عصب سیاتیک بهتر ترمیم شده است (p<۰/۰۵). در مطالعه بافتی تعداد اکسون‌ها گروه پیوند (۲۸۳/۳±۲/۳۵) در مقایسه با گروه شم (۲۳۹/۶±۱/۵) بالاتر بود (p<۰/۰۵). تفاوت معنی داری در میزان ارزیابی عملکردی عصب سیاتیک (SFI) بین گروه شم (-۱۰۰/۳۷±۳۵) و گروه پیوند (-۸۴/۱±۷) مشمه شد (p<۰/۰۵).

نتیجه گیری: تحقیق حاضر نشان داد که پیوند سلول‌های 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: سلول‌های بنیادی، ژله وارتون بندناف، ترمیم آکسونی، عصب سیاتیک.

مقدمه

با وجود پیشرفت‌های چشمگیری که در علوم پزشکی و توانبخشی ایجاد شده هنوز امکان ترمیم ضایعات عصبی ایجاد نگردیده است بطوریکه از میان بیش از ۲۵۰۰۰۰ بیمار مبتلا به ضایعات تروماتیک اعصاب محیطی در آمریکا فقط ۱۵٪ با روش‌های درمانی رایج قابل درمان هستند (۲و۱). 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 (۴و۳). یکی از مسائل اصلی در درمان ضایعات عصبی، هدایت اکسون در حال ترمیم در مسیر صحیح است. به همین دلیل در گذشته از استخوان، لوله‌های فلزی و عروق خونی برای هدایت اکسون‌های در حال ترمیم به طرف انتهای مسیر استفاده می‌شد (۳). امروزه مشخص شد که حضور برخی مواد شیمیایی موسوم به

▣ 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: ۲۲۵۰۴۷۲-۰۱۱۱
e-mail: s_ebrahimi@pnu.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.15.2.9.0]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.15.2.69]

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 (۷-۵). 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 سلول‌های مغز قرمز استخوان، فیبروبلاست‌ها، سلول‌های بنیادی فولیکول مو و سلول‌های شوان استفاده شده است (۱۰-۸). با توجه به قابلیت تکثیر و تمایز سلول‌های 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 سلول‌های بنیادی مزانشیمی است اما به دلیل امکان بروز عفونت‌های ویروسی و کاهش قابلیت تکثیر و تعداد سلول‌های بنیادی با افزایش سن فرد، استفاده از آن با محدودیت روبه‌رو است (۱۱). در سال‌های اخیر بندناف انسان، اندامی که پس از تولد دور انداخته می‌شود، مورد توجه فراوانی قرار گرفته است. سلول‌های بنیادی موجود در بندناف انسان از نوع چندتوان بوده، قدرت تکثیر زیاد و ظرفیت خود نوزایی داشته و حد واسط سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی بالغ هستند (۱۲). مطالعات نشان می‌دهد سلول‌های بنیادی فراوانی را می‌توان در ماده زمینه بافت مزانشیمی یا ژله وارتون بندناف یافت (۱۴و۱۳). این سلول های بنیادی از توان تکثیر فوق العاده‌ای برخوردار بوده و در طی تقسیمات متوالی فرآیند پیری در آنها رخ نداده و مشابه با سلولهای بنیادی بالغین تومور ایجاد نمی‌کنند (۱۶و۱۵). هنوز به خوبی مشخص نشده است که آیا سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از ژله وارتون بندناف انسان می توانند به بافت های مختلف تمایز یابند یا خیر. نشان داده شده که سلول‌های بنیادی بندناف، مولکول‌های نوروتروفیکی مثل NGF، BDNF و CNTF را ساخته و ترشح می کنند (۱۷). با توجه به اینکه این مولکول ها سبب تقویت رشد اکسون 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 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

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مشتق از ژله وارتون

بندناف: پس از اخذ رضایت‌نامه 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، جمع‌آوری 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 فلاسک‌های 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 ۳۷°C، 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 فلاسک‌ها توسط میکروسکوپ معکوس بررسی شده و عکس برداری انجام و در صورت آمادگی عملیات پاساژ سلولی انجام گرفت (۱۸).

انجماد و ذوب سلولی: به منظور نگهداری تعدادی از سلول‌ها کشت داده شده در هر پاساژ سلولی، زمانی که سلول‌ها ۸۰-۷۰ ٪ کف فلاسک را پر کردند، سلول‌ها 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 سانتریفوژ 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. ویال‌ها به مدت یک ساعت در فریزر ۲۰°C- و بدنبال آن یک شبانه روز در فریزر ۸۰°C- نگهداری گردیده و سپس برای نگهداری طولانی مدت به داخل مخزن نیتروژن مایع ۱۹۶- انتقال یافتند.

جهت استفاده مجدد از سلول‌های منجمد شده ویال حاوی سلول از تانک ازت به سرعت به بن‌ماری ۳۷ °C منتقل گردید. پس از ذوب محتویات ویال به داخل یک فالکون استریل منتقل شده و در زیر هود با کمک پیپت استریل ۴ ml محیط کشت کامل با دمای ۳۷°C به آن اضافه شد. سپس محلول حاصله با دور ۱۲۰۰ بار در دقیقه برای ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. به رسوب حاصل از سانتریفوژ ml ۲-۱ 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 سلول‌های کشت داده شده در مرحله پاساژ سوم استفاده گردید. سلول‌ها در دمای ۴ °C به مدت ۲۰ دقیقه همراه با ۲۰ µl از هریک از آنتی‌بادی‌های اختصاصی CD13، CD49، CD90 و CD105 به صورت جداگانه انکوبه گردید. از IgG_1-PE موش بعنوان ایزوتیپ کنترل استفاده شد (۱۸). سلول‌های نشان‌دار شده توسط دستگاه فلوسیتومتر بررسی شدند.

تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از ژله وارتون:

تمایز استئوژنیک و ارزیابی آن: سلول‌ها در محیط کشت استئوژنیک حاوی LG-DMEM همراه با ۱۰٪ FBS، ۱۰ Mm بتا گلیسروفسفات، ۰/۱ µM دگزامتازون و ۵۰ µM اسکوربات کشت داده شدند. تمایز استئوژنیک با استفاده از رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز ارزیابی گردید(۱۹).

تمایز آدیپوژنیک و ارزیابی آن: جهت القا تمایز آدیپوژنیک سلول‌ها به مدت دو هفته در محیط کشت آدیپوژنیک حاوی LG-DMEM همراه با ۰/۵ mM ۳- 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 رنگ‌آمیزی 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.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.15.2.9.0]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.15.2.69]

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 نوریوم 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 نوریوم عصب سیاتیک ۷۰۰۰۰۰ سلول بنیادی نشان‌دار شده بندناف در مرحله پاساژ سوم در محل بخیه به داخل اپی نوریوم تزریق گردید. در پایان جراحی در هر سه گروه عصب سیاتیک در عمق عضله قرار داده شده و پوست را با نخ ۰-۳ 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 pirnt 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 ۱۰۰×۳۰ 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 میلی‌متر اندازه‌گیری 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).

$$SFI = -38.3\left(\frac{(EPL-NPL)}{NPL}\right) + 109.5\left(\frac{(EST-NTS)}{NTS}\right) + 13.3\left(\frac{(EITS-NITS)}{NITS}\right) - 8.8$$

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 گاستروکنمیوس (GC) نوار عصب- عضله گرفته شد. از روی پاسخ های ثبت شده دامنه پتانسیل عمل مرکب و تاخیر 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 گلوتارآلدئید 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، نسبتا ضعیف، متوسط، نسبتا خوب، خوب بیان شد. برای مقایسه این نتایج از میانگین رتبه‌ها 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 گلوتارآلدئید قرار داده شد. پس از تثبیت بافت و قالب گیری رزینی توسط دستگاه اولترامیکروتوم (Leica-Ultracut) از بلوک ها برش‌های ۵۰۰ نانومتری تهیه و با محلول تولوئیدین بلو ۱٪ رنگ‌آمیزی گردیدند. برای شمارش تعداد آکسون‌ها نمونه‌ها با میکروسکوپ نوری (× ۴۰۰) بررسی شدند. در هر نمونه سه گرید انتخاب و تمامی اکسون‌های موجود اعم از میلین‌دار و بدون میلین شمارش و میانگین تعداد اکسون‌ها بدست آمد. شمارش آکسونی با استفاده از نرم افزار الیمپوس انجام شد (۲۱).

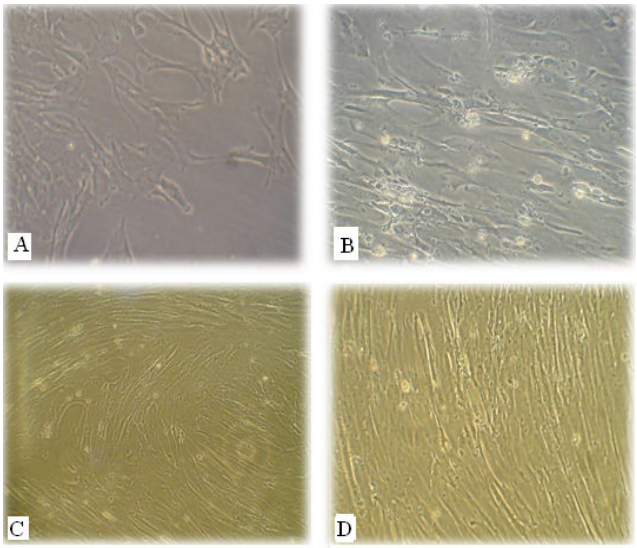
مطالعات ایمنوهیستوشیمی: جهت نشاندار کردن سلول‌های بنیادی جدا شده از ژله وارتون ۳ µg/ml پودر بروموئوکسی اوریدین (Brdu) (sigma) به مدت ۷۲ ساعت به محیط کشت سلول ها در فلاسک اضافه گردید. سپس سلول‌های مزانشیمی نشان‌دار شده به داخل غلاف اپی‌نوریوم تزریق شد. در پایان روز دوازدهم پس از خارج کردن عصب ترمیم شده نمونه‌های 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 سلول‌های نشان دار شده در محل ضایعه با میکروسکوپ فلورسنت مطالعه گردید.

تجزیه و تحلیل داده ها

داده ها بصورت Mean ± 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 سلول‌های 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 سلول‌های دوکی شکل اضافه شد بطوریکه در پاساژ سوم حدود ۷۰۰۰۰۰ سلول مزانشیمی مورد نیاز جهت ادامه تحقیق به دست آمد (شکل ۱).

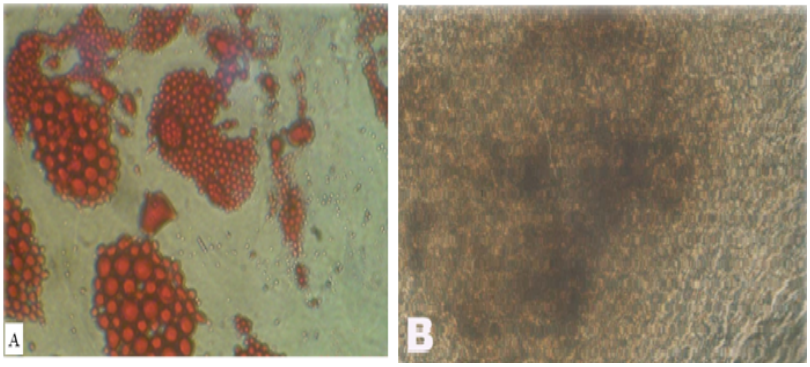


شکل ۱. خصوصیات سلول‌های مزانشیمی جدا شده از ژله وارتون. A) کشت سلول ۵ روز بعد از اولین جداسازی. سلول‌ها طاهری شبه فیبروبلاستی دارند. B) سلول‌ها به پاساژ اول نزدیک می‌شوند. CوD) سلول‌ها در پاساژ سوم. میکروسکوپ معکوس، × ۲۰۰).

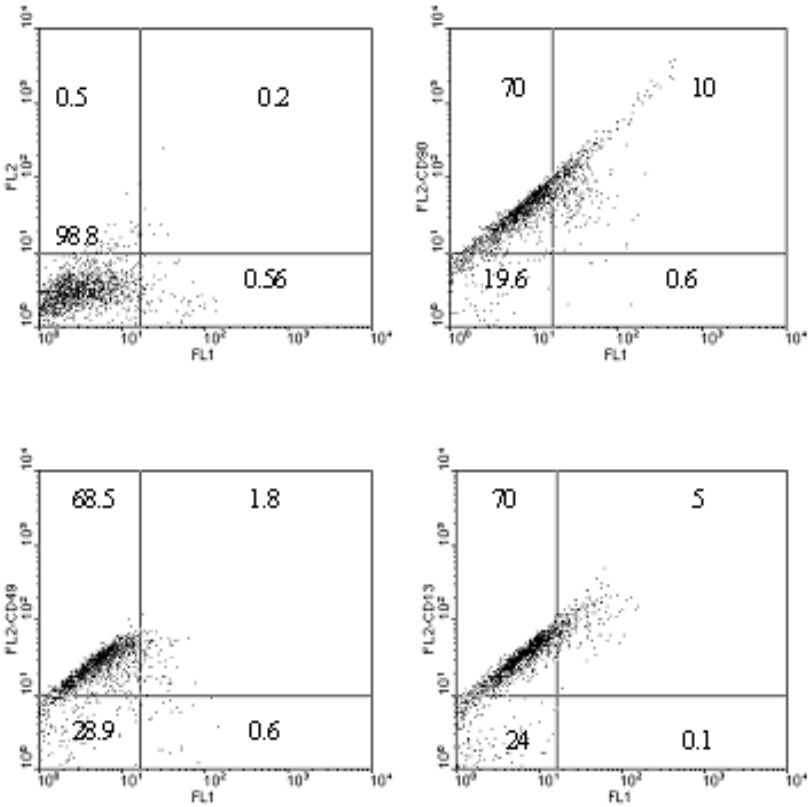
[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.15.2.9.0]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.15.2.69]

رنگ آمیزی‌های اختصاصی نشان داد که سلول‌های استخراج شده تحت تاثیر محیط های 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 و CD49 مثبت بودند (شکل ۳).

نتایج حاصل از تست فوت پرینت در گروه شم بهبود عملکردی را نشان نداد (۱۰۰±۳/۷) ولی در گروه درمانی پس از دوازده هفته علائم بهبودی دیده شد (۸۱±۱/۱). بررسی آماری نشان داد که استفاده از پیوند سلول‌های مزانشیمی در ترمیم عصب سیاتیک بهتر از روش بخیه زدن بوده است ($p<۰/۰۵$) (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، نسبتا ضعیف، متوسط، نسبتا خوب، خوب بیان شد. برای مقایسه این نتایج از میانگین رتبه‌ها استفاده گردید. میانگین رتبه‌ها در سه گروه کنترل، شم و پیوند به ترتیب ۱۳±۰/۱، ۳/۶±۱/۱ و ۷/۴±۰/۵۴ بود که بین گروه شم و گروه پیوند تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($p<۰/۰۰۱$) (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 کاملا پراکنده بوده و اکسون‌های ترمیم شده از لحاظ قطر کاملا 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 آکسون‌ها نشان داد که در گروه پیوند در مقایسه با گروه شم تعداد آکسون‌ها به میزان قابل توجهی بالاتر بود ($p<۰/۰۵$) (نمودار ۳). نتایج ایمنوهیستوشیمی نیز حضور سلول‌های مزانشیمی زنده را در محل تزریق (داخل علاف اپی‌نوریوم) تایید نمود (شکل ۶).



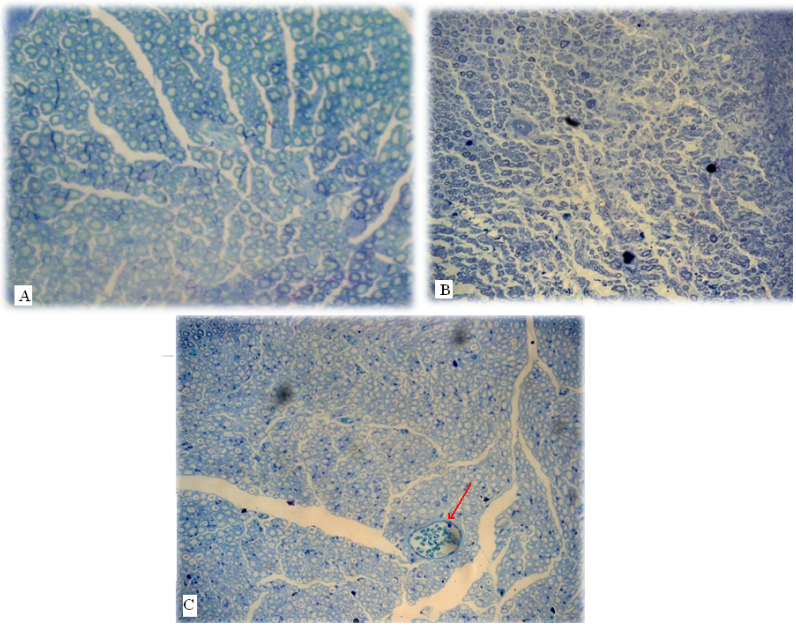
شکل ۲. توانایی تمایزی سلول‌های مزانشیمی جدا شده از ژله وارتون. A) تمایز آدیپوژنیک، رنگ‌آمیزی اویل رد. B) تمایز اوستئوژنیک، رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز.



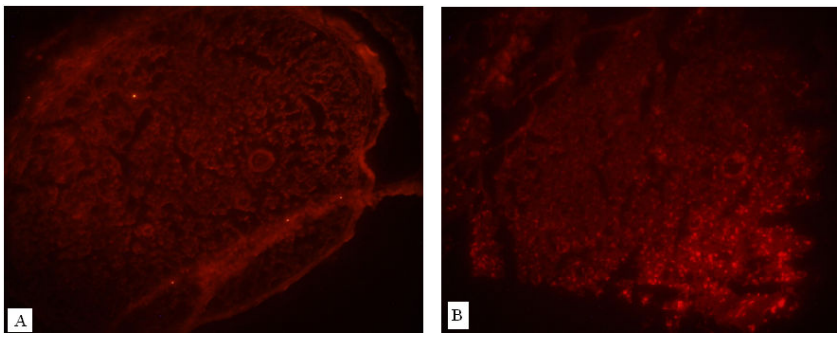
شکل ۳. آنالیز فلوسیتومتری برای مارکرهای CD90، CD49 و CD13 در سلول‌های مزانشیمی جدا شده از ژله وارتون.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.15.2.9.0]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.15.2.69]

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.

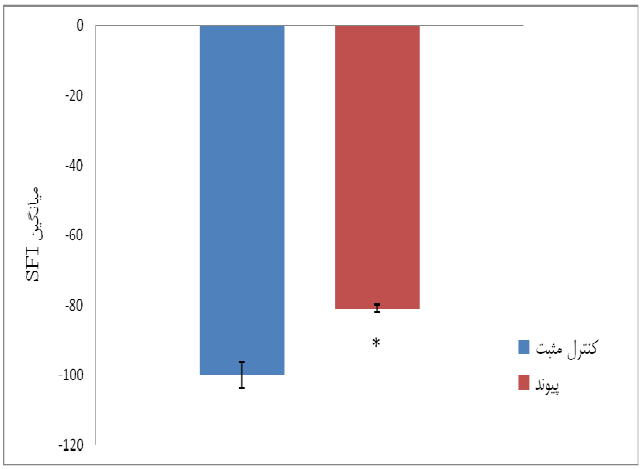


شکل ۵. تصاویر میکروسکوپ نوری از مقطع عرضی عصب سیاتیک در گروه های مورد مطالعه دوازده هفته پس از جراحی. A گروه کنترل، B گروه شم و C گروه پیوند. در شکل C پیکان عروق خونی را نشان می‌دهد(رنگ آمیزی تلوئیدن بلو، ×۴۰۰).

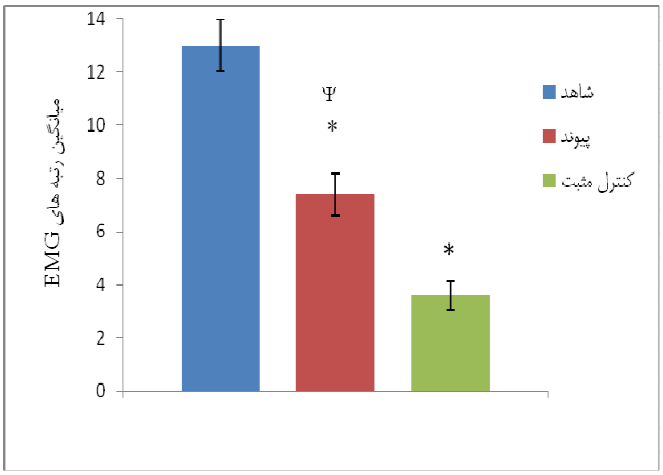


شکل ۶. برش عرضی عصب سیاتیک در ناحیه آسیب دیده در گروه پیوند(A) و گروه شم(B) ۱۲ روز پس از جراحی. در گروه پیوند سلول‌های مزانشیمی نشان‌دار شده با Brdu به رنگ روشن نسبت به سایر سلول‌ها دیده می‌شوند(میکروسکوپ فلورسنت، × ۱۰۰).

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.15.2.9.0]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.15.2.69]

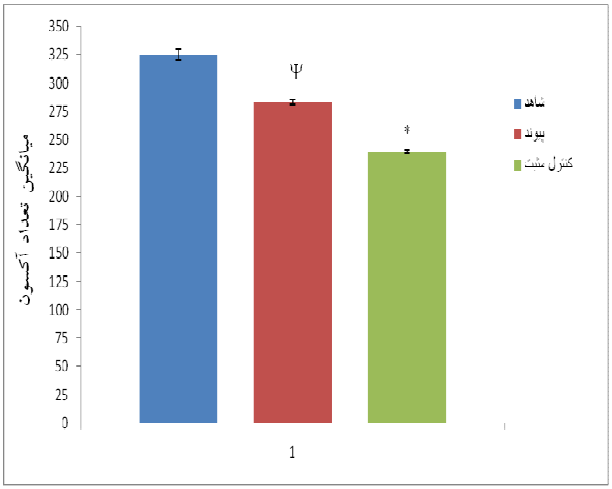


نمودار ۱: مقایسه میانگین SFI بین گروه شاهد و گروه پیوند. سطح معنی دار بودن P < ۰/۰۵ در نظر گرفته شده است.



نمودار ۲. میانگین رتبه‌های متغیر EMG در بین گروه های مورد مطالعه دوازده هفته بعد از جراحی. سطح معنی دار بودن P < ۰/۰۵ در نظر گرفته شده است.

*: وجود تفاوت معنی دار با گروه کنترل(P < ۰/۰۵). Ψ: وجود تفاوت معنی دار با گروه شاهد(P < ۰/۰۵).



نمودار ۳. میانگین تعداد آکسون ها در بین گروه های مورد مطالعه دوازده هفته بعد از جراحی. سطح معنی دار بودن P < ۰/۰۵ در نظر گرفته شده است.

*: وجود تفاوت معنی دار با گروه کنترل مثبت(P < ۰/۰۵). Ψ: وجود تفاوت معنی دار با گروه شاهد(P < ۰/۰۵).

[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.15.2.69]
[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.15.2.9.0]

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 سلول های بنیادی ژله وارتون را جزء سلول های بنیادی مزانشیمی طبقه بندی کرده‌اند که با قرار گرفتن در شرایط مناسب قادرند به انواع مختلفی از سلول‌ها نظیر کندروسیت، آدیپوسیت، استئوسیت، میوسیت و سلول های شبه نورونی تمایز یابند (۲۴).

در این تحقیق نیز این موضوع کاملا 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 اوستئوبلاست ها و آدیپوسیت‌ها تمایز یابند (۱۶و۱۱). 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 یافته ها را تایید می کند. مشابه با گزارشات موجود نتایج فلوسیتومتری نیز نشان داد که سلول‌های جدا شده از ژله وارتون بندناف برای CD90، CD49 و CD13 مثبت بوده و بنابراین مزانشیمی بودن این سلول‌ها تایید گردید (۲۷و۱۶و۱۱). در سال‌های اخیر در مدل‌های حیوانی استفاده از پیوند سلولی جهت ترمیم آکسونی و میلین سازی 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 سلول های 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 (۳۱و۳۰). همچنین گزارش شده سلول‌های مزانشیمی مشتق از ژله وارتون بندناف قادرند فاکتورهای نوروتروپیک از جمله فاکتور رشد عصب (NGF) ترشح کنند (۲۹و۱۷). 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 سلول های مزانشیمی ژله وارتون می باشد. 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 گیرنده های 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 (۲۹و۲۴). 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 نسبتا آهسته اکسون‌های جدید و افت ویژگی ارتباطات عصبی- عضلانی که مجددا عصب‌گیری می شوند 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 ایمنوهیستوشیمی 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 سلول های 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 سلول های 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.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.15.2.9.0]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.15.2.69]

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

S. Ebrahimi Vosta Kalaee (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

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.15.2.9.0]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.15.2.69]

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 cardiomyoctes 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 msengenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. Biochem Biophy 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, Nikravesh 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, Mahdiyeh 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.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.15.2.9.0]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.15.2.69]

20.Kanaya F, Firrell JC, Breidenbach WC. Sciatic function index nerve condution 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 umblical 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 unbilical 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.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.15.2.9.0]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.15.2.69]