

## Structural and functional improvement of snipped sciatic nerve after allograft injection of Schwann cells into fibrin scaffold

Salati A<sup>1,2</sup>, Aboutaleb Kadkhodaeian H<sup>3,4</sup>

1. Assistant Professor of Tissue Engineering and Applied Cell Sciences, Nervous System Stem Cell Research Center, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran. ORCID ID: 0000-0002-6840-1527

2. Assistant Professor of Tissue Engineering and Applied Cell Sciences, Department of Tissue Engineering and Applied Cell Sciences, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran.

3. Assistant Professor of Anatomy Sciences, Nervous System Stem Cell Research Center, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran.

4. Assistant Professor of Anatomy Sciences, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran (Corresponding author), Tel: +98-233365428, Email: habootaleb92@gmail.com, ORCID ID: 0000-0002-9736-9722

### ABSTRACT

**Background and Aim:** Peripheral nerve injuries are among the most common types of injuries of the nervous system and are regarded as the main cause of disability. These injuries can lead to disorders in muscles movement and normal sense, and also painful neuropathy. Tissue engineering and stem cells therapy are among the treatment methods for these disorders. In this study we assessed sciatic nerve restoration through a silicone tube containing a fibrin scaffold filled with Schwann cells and citicoline by using electromyography and histological methods.

**Materials and Methods:** 50 adult male Wistar rats were randomly divided into five groups. 1. Silicon tube. 2. Silicon tube with fibrin gel. 3. Silicon tube with Schwann cells. 4. Silicone tube with citicoline. 5. Silicon tube with Schwann cells & citicholine. The left sciatic nerve was cut and a 10 mm gap was created. A silicon tube was placed between the two cut ends of the nerve, as a guide channel. Allografted Schwann cells and citicoline were injected into the guide channel.

**Results:** The third and fifth groups were significantly different from other groups in regard to the amplitudes of the waves ( $P < 0.05$ ). Also, we found significant decreases in the latency of the waves recorded in the 1<sup>st</sup> to 4<sup>th</sup> groups ( $P < 0.05$ ). There was a significant difference between the third and fifth groups in the results of histological examination ( $P < 0.05$ ).

**Conclusions:** Increased amplitude in the third and fifth groups indicated better restoration of the nerve in these groups. Also reduced latency in the 1<sup>st</sup> to 4<sup>th</sup> groups was indicative of regeneration of the sciatic nerve. Histologic results revealed increased number of recovered axons in the fifth group which was indicative of the better outcome of the combination therapy.

**Keywords:** Schwann cell, Fibrin scaffold, Citicholine, Silicone tube, Electromyography, Sciatic nerve

**Received:** Jan 14, 2019      **Accepted:** June 12, 2019

**How to cite the article:** Salati A, Aboutaleb Kadkhodaeian H. Structural and functional improvement of snipped sciatic nerve after allograft injection of Schwann cells into fibrin scaffold. SJKU 2019;24(3):67-84.

## بهبود ساختار و عملکرد عصب سیاتیک قطع شده بعد از تزریق آلوگرافت سلول‌های شوان

### به درون داربست فیبرینی

امیر سلاطی<sup>۱،۲</sup>، حمید ابوطالب کدخداییان<sup>۳،۴</sup>

۱. استادیار مهندسی بافت و علوم سلولی کاربردی، مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی سیستم عصبی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران. شناسه ارجید: ۱۵۲۷-۶۸۴۰-۰۰۰۰-۰۰۰۲

۲. استادیار مهندسی بافت و علوم سلولی کاربردی، گروه مهندسی بافت و علوم سلولی کاربردی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران.

۳. استادیار علوم تشریح، مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی سیستم عصبی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران.

۴. استادیار علوم تشریح، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران (مؤلف مسئول). تلفن ثابت: ۰۲۳-۳۶۶۰۹۵۰۸، پست الکترونیک: habootaleb92@gmail.com، شناسه ارجید: ۹۷۲۲-۹۷۳۶-۰۰۰۲-۰۰۰۰

### چکیده

**زمینه و هدف:** صدمات اعصاب محیطی جز شایع‌ترین آسیب‌های سیستم عصبی هستند و بزرگترین علت ناتوانی به شمار می‌آیند. این آسیب‌ها موجب اختلال در توانایی حرکات عضلات، حس طبیعی و نوروپاتی دردناک می‌شود. یکی از روش‌های درمانی در این موارد استفاده از مهندسی بافت و سلول درمانی است. در این تحقیق ترمیم عصب سیاتیک از طریق لوله سیلیکونی حاوی داربست فیبرینی پر شده با سلول‌های شوان و داروی سیتی کولین و با استفاده از الکترومیوگرافی و روش‌های بافتی مورد بررسی قرار گرفته است.

**روش بررسی:** ۵۰ سر رت نر نژاد ویستار به طور تصادفی به پنج گروه تقسیم شدند. (۱) لوله سیلیکون (۲) لوله سیلیکون به همراه ژل فیبرین (۳) لوله سیلیکون به همراه سلول‌های شوان (۴) لوله سیلیکون به همراه سیتی کولین (۵) لوله سیلیکون به همراه سلول‌های شوان و سیتی کولین. عصب سیاتیک چپ به اندازه ۱۰ میلی متر قطع و به عنوان کانال برای ترمیم فاصله ایجاد شده استفاده شد. سلول‌های شوان آلوگرافت کشت داده شده و داروی سیتی کولین به درون لوله تزریق شدند.

**یافته‌ها:** دامنه موج الکتریکی ثبت شده در گروه سوم و پنجم تفاوت معنی داری با سایر گروه‌ها دارد ( $P < 0/05$ ). همچنین تاخیر در هدایت موج الکتریکی ثبت شده در گروه‌های یک تا چهار کاهش معنی داری را نشان می‌دهد در بررسی بافتی بین گروه‌های سوم تا پنجم تفاوت معنی داری وجود دارد ( $P < 0/05$ ).

**نتیجه گیری:** افزایش دامنه موج در گروه‌های سوم و پنجم بیانگر ترمیم بهتر عصب در این گروه‌ها می‌باشد. کاهش تاخیر در هدایت موج الکتریکی در گروه‌های یک تا چهار نیز نشان دهنده ترمیم عصب می‌باشد. همچنین افزایش تعداد اکسون‌های ترمیم شده در گروه پنجم نشان دهنده نتیجه بهتر درمان ترکیبی است.

**کلید واژه‌ها:** سلول شوان، داربست فیبرینی، سیتی کولین، لوله سیلیکون، الکترومیوگرافی، عصب سیاتیک

وصول: ۹۷/۱۰/۲۴ اصلاحیه نهایی: ۹۸/۳/۱۹ پذیرش: ۹۸/۳/۲۲

مقدمه

در صدمات عصبی شدید مطالعات هدایت عصب و الکترومیوگرافی شاهدهی بر تمامیت عصبی هستند. همچنین در مورد زمان و مقدار بهبودی عصب اطلاعات قابل اعتمادی فراهم می‌کنند. بهبودی آسیب عصب محیطی از طریق سه مکانیسم صورت می‌گیرد: (۱) ساخت مجدد میلین (remyelination) (۲) تشکیل مخروط جانبی اکسون‌ها (collateral sprouting) و (۳) ترمیم از قسمت پروکسیمال محل ضایعه. ساخت مجدد میلین سریعترین فرآیند جبرانی است و در عرض ۱۲-۲ هفته صورت می‌گیرد و بستگی به وسعت ضایعه دارد. در طی تخریب قسمت‌های دیستال اکسون ضایعه دیده، مخروط های جانبی که در همسایگی اکسون‌های سالم قرار دارند، از این اکسون‌ها عصب دریافت کرده و به عضلات مربوط به آنها می‌روند. این فرآیند ۶-۲ ماه طول می‌کشد (۱). در صدمات شدید اکسونی، جوانه‌های جانبی برای فراهم نمودن عصب برای تمامی رشته‌های عضلانی کافی نیستند. در این موارد، ترمیم بیش از ۱۸ ماه طول می‌کشد. مطالعات هدایت عصب (NSC) و الکترومیوگرافی (EMG) در ارزیابی اختلالات عصبی لازم و ضروری می‌باشند (۲). این مطالعات در متمرکز نمودن محل ضایعه مفید هستند. همچنین در تشخیص قطع هدایت عصبی (neurapraxia) در اکسون‌های تخریب شده مفید هستند (۳).

در طی اکسون‌تومیز و نوروتومیز ارتباط پریکاریون و اکسون قطع می‌شود و سطح کلسیم داخل اکسونی افزایش می‌یابد، قطعات اکسونی جدا شده متورم می‌شوند و پاسخ دهی الکتریکی در طی ۱۲-۵ روز بعد از آسیب کاهش می‌یابد (۱). زمان مورد نیاز برای بهبود آسیب عصبی به نوع صدمه و همچنین همکاری بین ساخت مجدد میلین، تشکیل جوانه جانبی و ترمیم اکسونی وابسته است. برگشت مجدد هدایت عصبی بعد از نورآپراکسیا وابسته به ساخت مجدد میلین محل آسیب دیده است. زمان بهبود به فاصله ضایعه از عضلات بدون عصب شده وابسته است. سرعت ترمیم دیستال ۲-۱ میلی متر در روز می‌باشد (۴). پیش نیاز ترمیم عصبی، لوله‌های تشکیل شده توسط سلول‌های شوان سالم است

که مخروط رشد را به سمت عضلات هدف حمایت و راهنمایی می‌کند. لوله‌های سلول‌های شوان، ۲۴-۱۸ ماه زنده باقی می‌مانند. در صورتی که اکسون به اندام هدف خود نرسد این لوله‌ها تخریب و از بین می‌روند (۵).

در حال حاضر اتوگرافت عصبی، استاندارد طلایی برای ضایعات عصبی دارای فاصله در نظر گرفته می‌شود. این نوع گرافت‌ها بدلیل سازگاری زیستی مناسب و سمیت کمتر ساختاری مناسب برای اتصال سلولی و مهاجرت آنها فراهم می‌کنند. اما دارای محدودیت‌هایی هستند از جمله این که موجب کاهش عملکرد، تشکیل نوروما در محل پیوند، و انجام جراحی‌های متعدد می‌شود. در گرافت‌های اتولوگ، عدم تطابق در اندازه بین عصب دهنده و گیرنده مشکل اصلی است (۶). بنابراین هم‌اکنون تمایل به سمت تکامل تکنیک‌هایی است که موجب ارتقا کیفیت پیوند عصب شود.

برای جایگزینی اتوگرافت‌ها جهت ترمیم عصب محیطی، طیف وسیعی از مواد طبیعی استفاده شده است. مثل استخوان، گرافت عضله، گرافت‌های وریدی، گرافت‌های تاندونی، گرافت‌های ترکیبی عضله \_ ورید (۷). اما تمامی این روش‌ها دارای نقص هستند. کانال‌های هدایت کننده عصب که از مواد سنتتیک ساخته می‌شوند در این گونه موارد بسیار مفید هستند (۸). این کانال‌ها بدلیل قطر بیشتر نسبت به عصب آسیب دیده اجازه رشد مخروط آکسونی به طرف انتهای عصب را فراهم می‌کنند. علاوه بر این برای محدود کردن مهاجرت سلول‌ها و زوائد مخروطی درون محدوده لوله، فضایی برای افزایش موضعی غلظت فاکتورهای رشد ایجاد می‌کنند و همانند یک سد عمل نموده تا از ورود فیروبلاست‌ها و دیگر موارد مهایری یا تشکیل دهنده اسکار که موجب مهار فرایند ترمیم طبیعی می‌شوند عمل می‌کنند (۹). استفاده از کانال‌های هدایت کننده عصب موجب کاهش فشار در خط بخیه می‌شود. همچنین فضای درون لوله را می‌توان با ماتریکس رشد، فاکتورهای رشد، سلول‌های مناسب و یا داروهای سنتتیک موثر پر نمود (۱۰).

در ترمیم اعصاب محیطی صدمه دیده از سلول‌های مختلفی استفاده می‌شود مثل سلول‌های مغز استخوان، فیروبلاست، سلول-

علوم پزشکی سمنان در شرایط نور، آب و غذای مناسب و در قفس های پلاستیکی نگهداری شدند.

### گروه بندی حیوانات

حیوانات به ۵ گروه تقسیم شدند که عبارتند از:

۱- گروه لوله سیلیکون به تنهایی (Silicon). عصب سیاتیک چپ به اندازه ۱۰ میلی متر قطع و به اندازه ۱۲ میلی متر از لوله سیلیکون به دو سر عصب قطع شده دوخته شد.

۲- گروه لوله سیلیکون به همراه ژل فیبرین ( Silicon + Fibrin). عصب سیاتیک چپ به اندازه ۱۰ میلی متر قطع و به اندازه ۱۲ میلی متر از لوله سیلیکون به دو سر عصب قطع شده دوخته شد و ۰/۲ میلی لیتر از ژل فیبرین درون لوله تزریق شد.

۳- گروه لوله سیلیکون به همراه سلول های شوان ( Silicon + Schwann cells + Fibrin). عصب سیاتیک چپ به اندازه ۱۰ میلی متر قطع و به اندازه ۱۲ میلی متر از لوله سیلیکون به دو سر عصب قطع شده دوخته شد و تعداد  $1 \times 10^5$  سلول شوان بدرون لوله سیلیکون تزریق شد.

۴- گروه لوله سیلیکون به همراه داروی سیتی کولین ( Silicon + Citicoline + Fibrin). عصب سیاتیک چپ به اندازه ۱۰ میلی متر قطع و به اندازه ۱۲ میلی متر از لوله سیلیکون به دو سر عصب قطع شده دوخته شد و ۰/۲ میلی لیتر از سیتی کولین بدرون لوله تزریق شد.

۵- گروه لوله سیلیکون به همراه سلول های شوان و داروی سیتی کولین ( Silicon + Fibrin + Schwann cells + Citicoline). عصب سیاتیک چپ به اندازه ۱۰ میلی متر قطع و به اندازه ۱۲ میلی متر از لوله سیلیکون به دو سر عصب قطع شده دوخته شد و تعداد  $1 \times 10^5$  سلول شوان و ۰/۲ میلی لیتر سیتی کولین بدرون لوله تزریق شد.

های بنیادی فولیکول مو و سلول های شوان (۱۱). سلول های شوان که مسئول تولید غلاف میلین اطراف اکسون ها هستند در صورت آسیب عصب فعال شده و موجب بوجود آمدن بستری جهت مهاجرت آکسون ها می شوند (۱۲). این سلول ها فاکتور های فعال کننده ای را می کنند که مهاجرت عصب را افزایش می دهند. بطور مثال مولکول های ماتریکس خارج سلولی همانند لامینین و یا تعدادی مولکول چسبنده سلول عصبی (N-CAM) و کلاژن تولید می کنند (۱۳). سلول های شوان مخلوطی از مولکول های نوروتروفیک مثل فاکتور رشد عصب (NGF)، فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF) و فاکتور نوروتروفیک سیلاری (CNTF) سنتز می کنند (۱۴). استفاده از سلول های شوان در بای پس های (NGC) که کانال فیبرینی تولید می کنند موجب تسریع در تشکیل طناب های بونگتر شده و یک منبع مداوم از فاکتور های نوروتروفیک تولید می شود که موجب افزایش کیفیت ترمیم عصب می شود (۱۵).

سیتی کولین دارویی است که در صدمات نورو دژنراتیو سیستم عصبی مرکزی موثر است. این دارو موجب کاهش شکسته شدن غشای سلولی و تولید اسید های چرب آزاد و تولیدات سمی بافت صدمه دیده می شود و همچنین سیتی کولین موجب ارتقا بقا و یا ترمیم نورون های صدمه دیده می شود که بعد از قطع عصب سیاتیک از بین رفته اند (۱۶). سیتی کولین به طور واضح موجب کاهش تولید اسکار بعد از قطع عصب سیاتیک و پیوند توسط بخیه می شود (۱۷). بنابراین در این طرح برای اولین بار از ترکیب همزمان سلول های شوان و داروی سیتی کولین با استفاده از داربست لوله ای سیلیکونی پر شده با فیبرین برای ترمیم عصب سیاتیک در مدل قطع عصب استفاده شده است.

### روش بررسی

#### حیوانات

در این تحقیق تعداد ۵۰ سر موش صحرایی نژاد ویستار با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم که از انستیتو پاستور تهران تهیه شدند مورد استفاده قرار گرفت. در مدت تحقیق حیوانات در حیوان خانه دانشگاه

## روش کشت سلول‌های شوان

برای کشت سلول‌های شوان از روش ون و همکاران با تغییراتی استفاده شد (۱۸). ابتدا رت‌ها با استفاده از کتامین و زایلزین بیهوش شدند، پوست کنار زده شد و عصب سیاتیک نمایان شد. با استفاده از قیچی عصب سیاتیک بریده شد و برای جلوگیری از اتصال مجدد دو انتهای بریده شده، با استفاده از نخ بخیه انتهایی دیستال عصب به بافت اطراف دوخته شد. سپس پوست حیوان دوخته شد. یک هفته بعد از قطع عصب، مجدد حیوان بیهوش شد پس از باز کردن پوست و کنار زدن عضله دو انتهای عصب سیاتیک قطع شده مشخص شد. اتصال قطعه دیستال به بافت اطراف جدا گردید و با استفاده از قیچی ۱ سانتی متر از عصب سیاتیک (قطعه دیستال) بریده و درون دیش حاوی استرپتومایسین-پنی سیلین-PBS قرار داده شد. سپس در زیر میکروسکوپ اپی نوربوم عصب جدا و آماده هضم سلولی شد. قطعه عصب آماده شده بدین ترتیب به زیر هود انتقال داده شد و در دیش‌های حاوی آنتی بیوتیک و PBS شستشو داده شد و درون لوله حاوی محیط کشت DMEM محتوی  $10\% \text{ FBS}$  و  $100 \text{ U/ml Penicillin}$  و  $100 \text{ U/ml Streptomycin}$  قرار داده شد. قطعه عصب جدا شده به همراه محیط کشت و آنزیم به مدت ۳-۴ ساعت درون انکوباتور قرار داده شد. سپس لوله فالكون از انکوباتور خارج و به مدت ۵ دقیقه و با دور موتور ۲۰۰۰ سانتریفوژ شد. بعد از سانتریفوژ مایع رویی خارج و به آن محیط کشت بدون آنزیم اضافه شد. بعد از سوسپانسیون نمودن آنها بدرون فلاسک T-25 منتقل شدند و  $10\% \text{ FBS}$  اضافه و دور انکوباتور قرار داده شد. محیط کشت سلول‌ها هر ۴۸ ساعت یکبار تعویض شد.

## روش ایمونوسیتوشیمی سلول‌های شوان

سلول‌ها کشت داده شده در پاساژ سوم، سه بار و به مدت ۶ دقیقه در محلول PBS شستشو داده شدند. بعد از فیکس نمودن توسط پارافورمالدئید ۴ درصد، به مدت ۳۰ دقیقه درون محلول بلوک کننده قرار داده شد. سلول‌ها یک شب در دمای ۴ درجه با آنتی بادی اولیه (Rabbit Anti-S100, Dakocytomation, sigma) به نسبت ۱ به ۵۰۰ در  $0.3\% \text{ Triton X} + \text{PBS}$  (10% Normal Goat Serum) انکوبه شدند. در مرحله بعد

سلول‌ها سه بار به مدت ۱۰ دقیقه درون PBS شستشو داده شدند. سپس به سلول‌ها آنتی بادی ثانویه (goat Anti-Rabbit IgG- AF 568) به نسبت ۱ به ۱۰۰۰ FITC اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. در انتها سلول‌ها مجدداً سه بار و به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شدند و توسط گلیسرول بافر فسفات روی لامل چسبانیده شدند و توسط میکروسکوپ فلورسنت Olympus مشاهده شدند.

## روش ساخت داربست فیبرینی و جراحی در گروه‌های مورد مطالعه

پس از نمایان ساختن عصب سیاتیک چپ و جداسازی آن از بافت همبند اطراف به اندازه ۱۰ میلی متر از عصب قطع شد و دو انتهای پروکسیمال و دیستال آزاد بوجود آمد. سپس ۱۲ میلی متر از لوله سیلیکون (قطر داخلی ۲ میلی متر) حاوی داربست فیبرینی وارد محل جراحی شد. برای تهیه داربست، ابتدا لوله سیلیکون به اندازه ۱۲ میلی متر جدا و اتوکلاو شد و در زیر هود فیبرینوژن به درون آن تزریق شد. با استفاده از سرنگ انسولینی ابتدا فیبرینوژن بدرون لوله تزریق شد و سپس با استفاده از سرنگ دیگری ترومبین وارد لوله شد طوری که با فیبرینوژن درهم آمیخته شد. لوله پر شده در زیر هود به مدت ۳-۴ دقیقه قرار داده شد تا داربست ژل فیبرینی و شبکه مورد نظر آماده شد. این لوله در محل جراحی با استفاده از نخ بخیه ابتدا انتهای پروکسیمال آن به اپی نوربوم قطعه پروکسیمال عصب دوخته شد و متعاقباً انتهای تحتانی آن به قطعه دیستال عصب دوخته شد. جهت اطمینان از اینکه عصب وارد لوله شده است و پس از بخیه زدن از درون لوله خارج نشده است، مقدار ۱ میلی متر از عصب در هر طرف وارد لوله شد. پس از اتمام کار لوله سیلیکونی در بین عضلات و در مسیر عصب سیاتیک قرار داده شد. در گروه دریافت کننده سیتی کولین،  $100 \mu\text{g}$  از پودر سیتی کولین درون ۱۰ سی سی آب مقطر حل شد و محلول حاصل در زیر هود فیلتر شد. غلظت داروی حاصل  $100 \mu\text{mol/lit}$  و برای هر رت در گروه‌های مورد مطالعه  $0.2 \text{ ml}$  میلی لیتر بدرون لوله سیلیکون تزریق شد. در گروه دریافت کننده سلول، ابتدا سلول‌ها تریپسینه شده و درون لوله فالكون به مدت ۵ دقیقه و با دور موتور ۱۵۰۰

سانتریفوژ شدند. بعد از سانتریفوژ، مایع رویی خارج و پلت سلولی با مارکر سیتوپلاسمی و غشای سلولی DiI نشان‌دار شد. بطور خلاصه، سلول‌ها با ۲۵۰ میکرولیتر PBS شستشو داده شدند و به آن ۱/۵ میکرولیتر محلول DiI اضافه شد. سپس لوله که حاوی پلت سلولی و PBS و DiI بود به مدت ۲۰ دقیقه درون انکوباتور قرار داده شد. مجدداً سلول‌ها ۵ دقیقه و با دور موتور ۱۵۰۰ سانتریفوژ شدند. مایع رویی تخلیه شد و به آن PBS اضافه شد و به حالت سوسپانسیون وارد سرنگ انسولینی شدند و به درون لوله سیلیکونی تزریق شدند. بعد از اتمام کار، پوست حیوان توسط نخ بخیه ۴-۰ دوخته شد. در انتها محل بخیه ضد عفونی شد و حیوان درون قفس و در محیط گرم قرار داده شد تا بهبودش آید.

### روش الکترومیوگرافی (EMG)

۸ الکترومیوگرافی از رت‌ها بر اساس روش آلفورد و همکاران (۱۹) با کمی تغییرات انجام شد. هفته بعد از تزریق سیتی کولین و سلول‌های شوان در گروه‌های مختلف، جهت تایید اتصال دو قطعه پروکسیمال و دیسال عصب و کارایی عصب ترمیم شده، از تست الکترومیوگرافی استفاده شد. برای این کار ابتدا رت‌ها بیهوش و پوست محل جراحی باز شد. پوست تا قسمت پایین ساق باز شد تا عضله گاستروکنمیوس (GC) برای EMG در دسترس قرار گیرد. سپس لوله سیلیکون جایگزاری شده مشخص شد. در انتهای پروکسیمال لوله، دو الکتروود تحریک دهنده Stimulator Electrodes قرار داده شد. الکتروود زمین Ground Electrodes نیز وارد قسمت شکمی رت شد. سپس دو الکتروود دریافت کننده Recording Electrodes بر روی عضله گاستروکنمیوس و زانوی رت قرار داده شد. پاسخ ثبت شده شامل Amplitude و Latency است. پس از اتمام کار قسمت جراحی شده را که شامل لوله سیلیون و عصب درون آن می‌باشد برداشته و وارد محلول فیکساتیو جهت بررسی بافتی شد.

### روش رنگ آمیزی بافتی

۸ هفته بعد از جراحی، سه موش از هر گروه به طور تصادفی انتخاب و پس از باز نمودن پوست و کنار زدن عضلات،

لوله سیلیکونی حاوی عصب ترمیم شده نمایان شد و پس از جداسازی لوله از بافت اطراف، دو انتهای عصب بریده شد و لوله جدا گردید. سپس توسط تیغ بیستوری برشی طولی در لوله ایجاد شد و عصب درون لوله خارج گردید و درون گلو تار آلدئید ۲/۵ درصد به عنوان pre-fix قرار داده شد. بعد از شستشوی نمونه‌ها توسط بافر فسفات سالین ۰/۱ مولار به مدت ۱۵ دقیقه مراحل بافتی انجام گرفت. با استفاده از دستگاه اولترامیکروتوم (leica\_ultracut) از بلوک‌ها برش‌های ۵۰۰ نانومتری تهیه گردید. برش‌ها روی لام تمیز منتقل و اجازه داده شد تا کاملاً خشک شوند. سپس با چند قطره محلول رنگ تولوئیدین بلو ۱ درصد رنگ شدند. بعد از شستشوی لام با آب مقطر و خشک شدن آن بر روی لام، با میکروسکوپ نوری (Olympus, PROVIS Ax 70, Japan) و با دوربین (Olympus DP11, Japan) بزرگنمایی 400X تصاویر تهیه شد و سپس تصاویر با گرید ۵۰ میکرومتر تقسیم بندی شد. در هر گروه، شش نمونه لام تهیه شد و در هر نمونه سه گرید انتخاب شد و تمامی اکسون‌های موجود (دارای میلین و فاقد میلین) شمارش شدند و میانگین اعداد بدست آمده به عنوان تعداد اکسون-های آن گروه در نظر گرفته شد. همچنین برای ردیابی سلول‌های شوان تزریق شده، بعد از باز نمودن لوله‌های سیلیکونی، بافت ترمیم شده توسط OCT قالب گیری شد و بوسیله دستگاه کرایواستات برش گیری شد. بعد از انجام پروسه بافتی، نمونه‌ها توسط میکروسکوپ فلوروسنت مورد مشاهده قرار گرفتند.

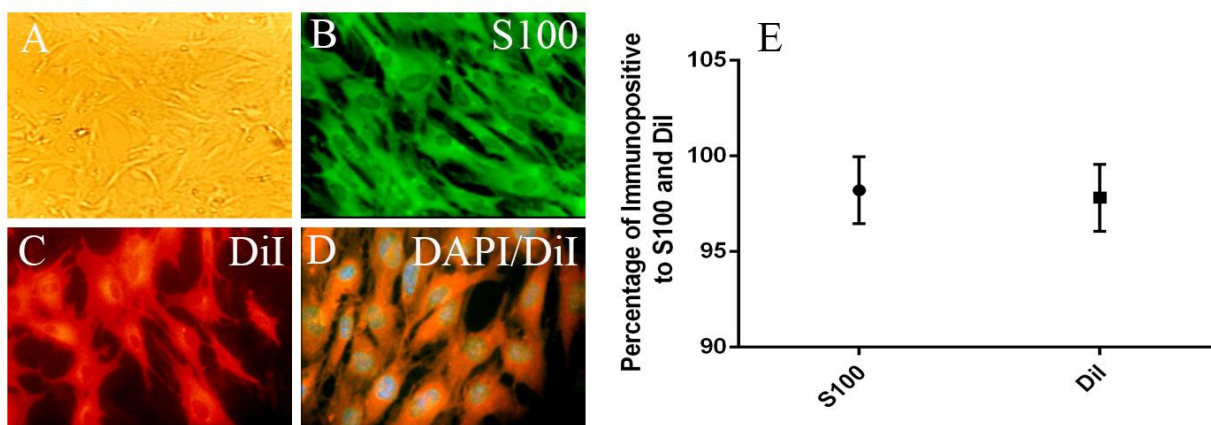
### روش آماری

داده‌های آماری حاصل ابتدا توسط آزمون Clomogrove-smirnovه نرمال بودن آن‌ها بررسی شد و با توجه به  $P > 0.05$  بدست آمده، آزمون آماری واریانس یک‌طرفه (ANOVA) با آزمون post hoc Tukey's استفاده از نرم‌افزار SPSS 16.1 استفاده شد و سطح معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) در نظر گرفته شد.

### یافته ها

سلول‌های شوان به عنوان سلول گلیال در بافت عصبی محیطی هستند و توانایی تقسیم بالایی دارند. این سلول‌ها در محیط کشت قابلیت جداسازی و تکثیر و تمایز دارند. این سلول‌ها در پاسخ به آسیب وارد شده شروع به تقسیم نموده و تعداد آنها افزایش می‌یابد. این سلول‌ها در محیط کشت به صورت فیروبلاست و دوکی شکل دیده می‌شوند (شکل ۱. A). این سلول‌ها در محیط کشت فاکتور S100 که به

طور اختصاصی در این سلول‌ها ترشح می‌شود را بیان می‌کنند (شکل ۱. B  $98 \pm 2$ ٪). سلول‌های شوان را می‌توان به عنوان یک عامل درمانی در سلول درمانی استفاده نمود. این سلول‌ها نسبت به مارکر سیتوپلاسمی و غشای سلولی DiI واکنش داده و نشان دار می‌شوند (شکل ۱. C, D  $97 \pm 2$ ٪).

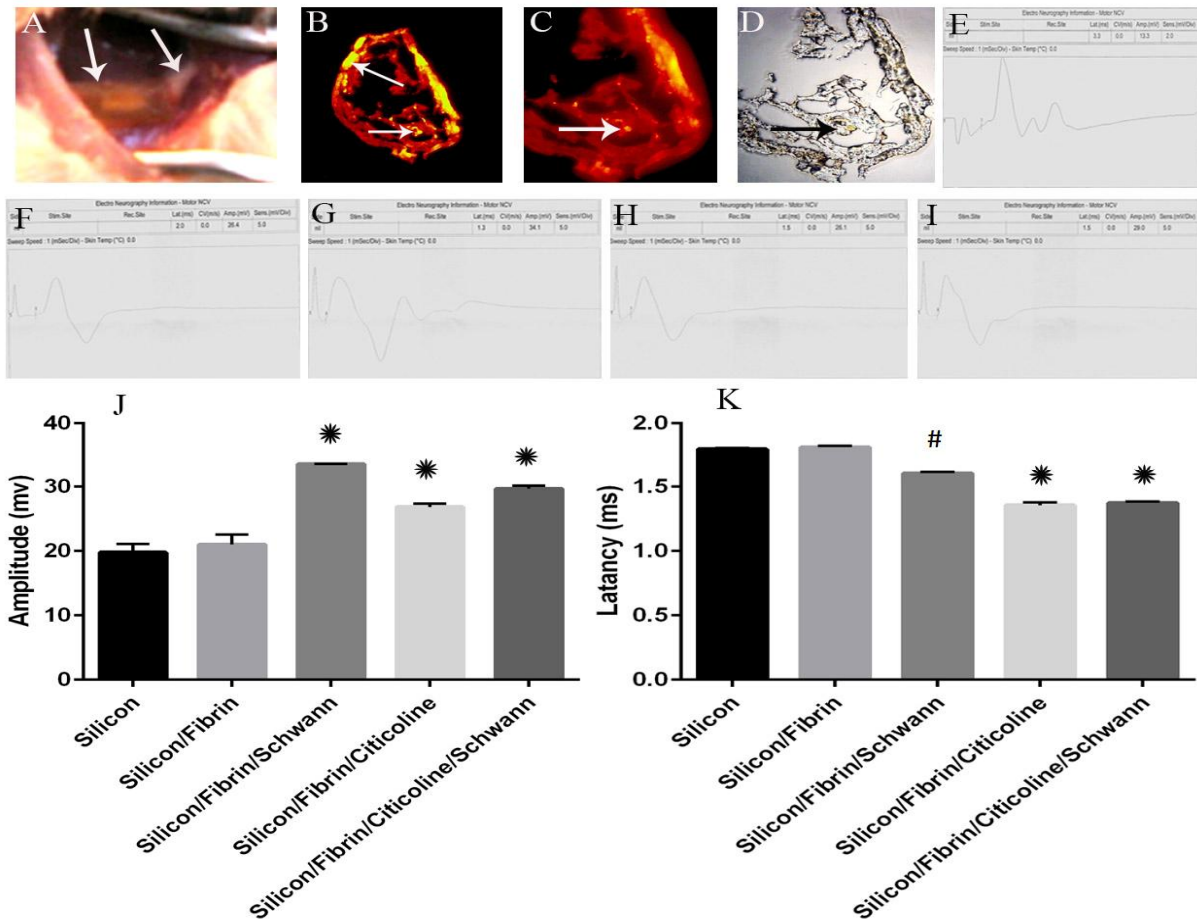


شکل ۱: سلول‌های شوان کشت داده شده و بیان مارکر اختصاصی آن. سلول‌های شوان در پاساژ سوم (A) به صورت سلول‌های دوکی شکل دیده می‌شوند. این سلول‌ها مارکر اختصاصی سلول‌های شوان (B) را نشان می‌دهند. این سلول‌ها توسط مارکر سیتوپلاسمی (DiI) نشان‌دار شده و هسته این سلول‌ها توسط مارکر DAPI (D) نشان‌دار شده است. E درصد بیان مارکر اختصاصی سلول‌های شوان، S100، و سلول‌ها نشان‌دار شده با DiI را نشان می‌دهد. بزرگنمایی ۲۰۰ میکرومتر برای A-D

## ایمونوهیستوشیمی عصب بعد از ترمیم

دهد که سلول‌ها شوان پیوند شده توانایی بقا و مهاجرت در محیط آسیب دیده عصبی را دارند. تجمع سلول‌های پیوند شده بیشتر در محیط لوله دیده می‌شود و کمتر در مرکز قرار دارند.

۸ هفته بعد از جایگزاری لوله سیلیکونی حاوی ژل فیبرین و سلول‌های شوان (شکل ۲. A-D)، نمونه عصب سیاتیک ترمیم شده خارج شد و سلول‌های نشان دار شده توسط مارکر DiI پیوند شده ردیابی شدند. تصاویر نمونه‌های ایمونوهیستوشیمی (شکل ۲. B-D) نشان می‌دهند که سلول‌ها شوان نشان دار شده بعد از پیوند توانسته اند در محیط پیوند شده زنده مانده و شروع به مهاجرت نمایند. این سلول‌ها تقریباً در تمامی قسمت‌ها لوله از جمله در مرکز و در محیط لوله سیلیکونی دیده می‌شوند. این یافته نشان می‌-



شکل ۲: قرارگیری سلول‌های شوان تزریق شده در لوله سیلیکونی در گروه‌های مختلف و تاثیر بر میزان دامنه موج و تاخیر در هدایت عصبی. A-D سلول‌های شوان نشان دار شده با مارکر DiI در محل ترمیم پس از ۸ هفته با ضخامت ۷ میکرون را نشان می‌دهد. با این روش حضور سلول‌های شوان در محل ترمیم به اثبات می‌رسد. شکل D، فاز کنتراست تصویر C را نشان می‌دهند

نشان دهنده کارایی بهتر سیناپس ایجاد شده و در نهایت عصب ترمیم شده می‌باشد. Amplitude (شکل ۲. J) در نمودار نشان دهنده دامنه موج الکتریکی است و نماینده تعداد واحدهای حرکتی در عضله می‌باشد و هر چقدر بیشتر باشد نشان دهنده وجود واحدهای حرکتی بیشتر و کارایی بیشتر عصب ترمیم شده می‌باشد. در مقایسه بین میانگین دامنه موج الکتریکی در گروه‌های مورد مطالعه در گروه Silicon + Fibrin + Schwann cells (۳۳.۶۸) با گروه‌های Silicon + Fibrin + Citicoline (۲۶.۹۵) و Silicon + Fibrin + Schwann + Citicoline (۲۹.۹۰) با اختلاف آماری کمتر از ۰.۵/ (P<0/05) معنی دار است. همچنین در مقایسه بین میانگین دامنه موج الکتریکی در گروه‌های مورد مطالعه در گروه Silicon + Fibrin + Citicoline (۲۶.۹۵) و Silicon + Fibrin + Schwann + Citicoline (۲۹.۹۰) با اختلاف آماری کمتر از ۰/۰۵ (P<۰/۰۵) معنی دار است. در مقایسه بین میانگین ای تاخیر در هدایت الکتریکی در گروه Silicon + Fibrin + Schwann cells (۱.۶) با گروه Silicon + Fibrin + Citicoline (۱.۳۶) و Silicon + Fibrin + Schwann + Citicoline (۱.۳۷) با اختلاف آماری کمتر از ۰/۰۵ (P<۰/۰۵) معنی دار است. همچنین در مقایسه بین میانگین تاخیر در هدایت الکتریکی در گروه‌های مورد مطالعه در گروه Silicon + Fibrin + Citicoline (۱.۳۶) و Silicon + Fibrin + Schwann + Citicoline (۱.۳۷) با اختلاف آماری کمتر از ۰/۰۵ (P<۰/۰۵) معنی دار نیست.

### نتایج بررسی بافتی به روش تولوئیدین بلو

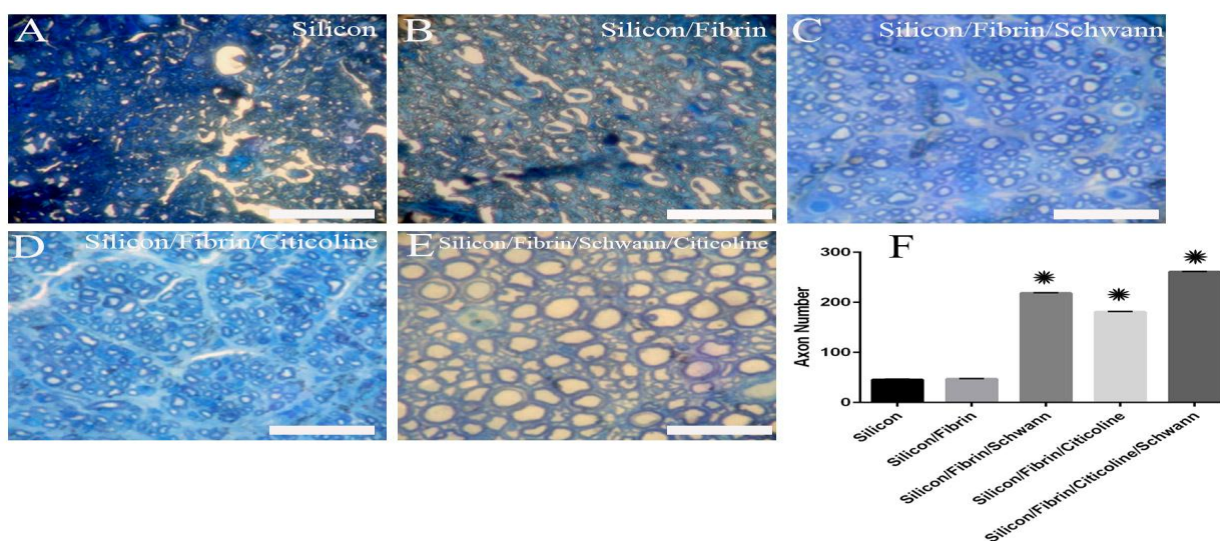
فلش‌ها در B, C سلول‌های شوان نشان‌دار توسط DiI را نشان می‌دهند. سلول‌ها بیشتر در حاشیه مقطع دیده می‌شوند که بدلیل چسبیدن سلول‌های شوان به دیواره لوله سیلیکون می‌باشد (بزرگنمایی برای C, D  $\times 400$  و برای B  $\times 400$ ) E-I. تصاویر موج ثبت شده در عصب ترمیم شده در گروه‌های مختلف بعد از ۸ هفته را نشان می‌دهد و اختلاف بین دامنه موج و تاخیر در هدایت امواج را در گروه‌ها نشان می‌دهد. J, K نمودار هیستوگرام مقایسه بین میانگین دامنه موج الکتریکی و تاخیر در هدایت موج الکتریکی ثبت شده بر حسب میلی ثانیه در گروه‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد\* اختلاف معنی دار در دامنه موج و تاخیر هدایت موج الکتریکی را در مقایسه با گروه سیلیکون و گروه سیلیکون دریافت کننده فیبرین را نشان می‌دهد (J, K). همچنین # اختلاف معنی دار در تاخیر هدایت موج الکتریکی را در مقایسه با گروه سیلیکون و گروه سیلیکون دریافت کننده فیبرین را نشان می‌دهد (K).

### نتایج الکترومیوگرافی

۸ هفته بعد از جراحی جهت تایید اتصال دو قطعه پروکسیمال و دیسال عصب و کارایی عصب ترمیم شده، از الکترومیوگرافی استفاده شد. در انتهای پروکسیمال عصب ترمیم شده، دو الکتروود تحریک دهنده قرار داده شد. الکتروود زمین (G) نیز وارد قسمت شکمی رت گردید. از دو کپ (cup) که بر روی عضله گاستروکنمیوس و دیگری بر روی زانوی رت گذاشته می‌شود، استفاده و پاسخ ثبت شد. پاسخ ثبت شده شامل Amplitude و latency می‌باشد (شکل ۲. E-I, A). Latency نماینده تاخیر در هدایت موج الکتریکی است (شکل ۲. K) و نشان دهنده سرعت هدایت موج الکتریکی در سیناپس‌های عصبی-عضلانی است و هر چقدر مقدار آن کمتر باشد

بزرگنمایی  $\times 400$  تصاویر تهیه شد و سپس تصاویر با گرید  $50 \times$  میکرومتری تقسیم بندی شدند. در هر گروه از شش نمونه، لام تهیه شد و در هر نمونه سه گرید انتخاب شد و تمامی اکسون‌های موجود (دارای میلین و فاقد میلین) شمارش شدند و میانگین اعداد بدست آمده به عنوان تعداد اکسون‌های آن گروه در نظر گرفته شد.

۸ هفته بعد از جراحی، عصب ترمیم شده را از درون لوله سیلیکون خارج کرده و برش‌های کرونال با ضخامت  $500 \mu\text{m}$  نانومتری از قسمت میانی عصب تهیه و بر روی لام جمع آوری و با رنگ تولوئیدین بلو رنگ آمیزی گردید (شکل شماره ۳). پس از قالب گیری عصب ترمیم شده و تهیه لام‌های مورد لازم، با استفاده از میکروسکوپ نوری (Olympus, PROVIS Ax 70, Japan) با



شکل ۳: مقطع عرضی از عصب سیایتک ترمیم شده در گروه‌های مختلف (بزرگنمایی  $\times 400$ ). اکسون‌های ترمیم شده در لوله سیلیکونی به خوبی نشان داده شده است. تعداد و قطر اعصاب ترمیم شده در گروه‌ها با هم دارای اختلاف است و بیشترین تعداد مربوط به گروه ترکیبی سلول شوان و سیتی کولین به همراه فیبرین است (F). در گروه ژل فیبرینی (B) اکسون‌ها کوچک و فاقد غلاف میلین هستند، در گروه دریافت کننده سلول (C) عروق خونی فراوان و بزرگ در حاشیه عصب ترمیم شده وجود دارند و اکسون‌های ترمیم شده دارای غلاف میلین و فاقد میلین می‌باشند. در گروه لوله سیلیکون به همراه داروی سیتی کولین (D) در مقطع عرضی عصب به طور کامی ترمیم شده و نحوه آرایش اکسون‌ها به صورت فاسیکل منظم می‌باشد. در گروه لوله سیلیکون به همراه داروی سیتی کولین و سلول‌های شوان (E) در مقایسه با دو گروه قبلی به وضوح تعداد اکسون‌های بیشتر و آرایش منظم تر اکسون‌ها دیده می‌شود. همچنین تعداد اکسون‌های بزرگ دارای غلاف میلین در این گروه بیشتر می‌باشد

## بحث

در تحقیق حاضر اثر داروی سیتی کولین و سلول‌های شوان در ترمیم عصب سیاتیک قطع شده با استفاده از یافته‌های بافتی و الکترومیوگرافی و ایمونوهیستوشیمی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که استفاده همزمان از داروی سیتی کولین و سلول‌های شوان در افزایش تعداد اکسون‌های ترمیم شده و همچنین افزایش کارایی عصب ترمیم شده نقش موثری دارد.

تنه عصب سیاتیک در موش صحرایی تقریباً ۱/۵ سانتی متر طول دارد و تحقیق با قطع بیش از یک سانتی متر، بدلیل دشواری در بخیه زدن تقریباً غیر ممکن است. در بسیاری از تحقیقات انجام شده اندازه قطع عصب کمتر از یک سانتی متر در نظر گرفته می‌شود که این امر بطور قطع برنتایج حاصل از تحقیق بسیار موثر است (۲۰). بنابراین در تحقیق حاضر از قطع عصب ۱۰ میلی متری استفاده شد. در پیوند اتوگرافت بدلیل داشتن دو خط بخیه، امکان ایجاد بافت لیفی بیشتری وجود دارد که مانع رشد اکسون‌ها و عدم هدایت آنها در مسیر صحیح می‌شود. از آنجا که در ترمیم با NGCs، هر دو انتهای عصب درون مجرا قرار می‌گیرند، لذا تشکیل نوروما کمتر است (۲۰). کاربرد لوله سیلیکون در ترمیم اعصاب محیطی مفید می‌باشد. از بین رفتن کشش خط بخیه جراحی و رگ سازی دو فاکتور مهم در ترمیم عصب به شمار می‌رود، که با استفاده از لوله سیلیکون، خط بخیه به حداقل می‌رسد و NGF نیز رگ سازی را تحریک می‌نماید (۲۱) افزایش کشش در ناحیه بخیه سبب کاهش قطر عروق خونی تغذیه کننده عصب می‌شود، در نتیجه خون رسانی ناحیه ترمیم عصب دچار اختلال می‌شود. تشکیل عروق خونی نیز عامل مهمی در ترمیم بافت به شمار می‌رود (۲۲). در این تحقیق ترمیم به صورت جایگزینی لوله سیلیکون حاوی ژل فیبرین به همراه سلول‌های شوان، داروی سیتی کولین و ترکیب هر دو انجام گرفت. برداشت قطعه ای از عصب و جایگزینی آن با کانال راهنمای عصب، به دلیل داشتن مزیت‌هایی از قبیل در دسترس بودن، تنوع آن

در مقایسه با ترمیم اتوگرافت از جمله روش‌هایی است که در ترمیم عصب مورد توجه محققین قرار گرفته است (۲۳). در بررسی الکترومیوگرافی، تمامی نمونه‌ها در همه گروه‌ها دارای موج الکتریکی هستند که در آن دامنه موج دیده می‌شود. این نکته نشان دهنده آن است که در تمامی این گروه‌ها ترمیم عصب و رشد اکسونی صورت گرفته است و تفاوت هر کدام از گروه‌ها با توجه به مداخله ای که در آن صورت گرفته است نشان دهنده تفاوت در تعداد اکسون‌های ترمیم شده می‌باشد. از آنجا که سلول‌های شوان، محیط عصبی خارج سلولی را توسط سلول‌های بافر کننده و برداشت نوروترانسمیترها تنظیم می‌کنند می‌توانند در انتقال عصبی (neurotransmission) دخالت کنند همچنین سلول‌های شوان پری سیناپتیک (PSCs) صفحه محرکه انتهایی (motor end plate) را احاطه می‌کنند. بنابراین در دامنه موج الکتریکی و سرعت هدایت عصبی نقش مهمی را ایفا می‌کنند. در گروه‌های Silicon + Fibrin + Schwann و Silicon + Fibrin + Schwann + Citicoline دامنه موج بیشتر از دیگر گروه‌ها است (۱۰۵/ p) و به نظر می‌رسد که در این گروه‌ها سلول‌های شوان آگزوژنوس تزریق شده در تنظیم فعالیت صفحه محرکه انتهایی و انتقال عصبی و در نتیجه افزایش دامنه موج نقش موثری داشته‌اند. استفاده از داروی سیتی کولین که در کاهش اسکار شرکت می‌کند (۱۶، ۲۲) نیز موجب ایجاد دامنه موج بیشتر نسبت به Silicon + Fibrin شده است. در هر دو گروه Silicon + Fibrin + Citicoline و Silicon + Fibrin فقط سلول‌های شوان اندوژنوس وجود دارد که این سلول‌ها نیز در تشکیل طناب‌های بونگتر و تشکیل NMJ شرکت می‌کنند (۲۴) اما وجود سیتی کولین به عنوان عامل مداخله ای نشان می‌دهد که این دارو توانسته است در ایجاد موج الکتریکی بلندتر دخالت داشته باشد. در حقیقت سیتی کولین از طریق ارتقا بقا و یا ترمیم نورون‌های صدمه دیده و همچنین کاهش شکسته شدن غشای سلولی و تولید اسیدهای چرب آزاد و تولیدات سمی

بافت صدمه دیده موجب افزایش دامنه موج الکتریکی می-شود (۱۶, ۲۲). اما در مقایسه با گروه Silicon + Fibrin + Schwann + دامنه موج کوتاهتر دیده می-شود. به نظر می-رسد که در این گروه که فقط دارای سلول‌های شوان اندورژنوس فعال شده اند، این سلول‌ها نتوانسته‌اند به طور کامل در انتقال عصبی دخالت داشته باشند. این امر را می-توان به شرکت اکثر سلول‌های شوان اندورژنوس در تشکیل طناب‌های بونگنر جهت ترمیم اکسون نسبت داد (۲۴). اما در گروه Silicon + Fibrin + Schwann سلول‌های شوان اگزورژنوس در ایجاد و عملکرد NMJ دخالت داشته و در نتیجه موج الکتریکی بلند تر دیده می-شود. به طور قطع نتیجه ای که از این تحقیق گرفته می-شود این می-باشد که استفاده همزمان از داروی سیتی کولین و سلول‌های شوان نقش بسیار خوبی در ترمیم عصب و کارایی عصب ترمیم شده دارد. دامنه موج الکتریکی نشان دهنده فعالیت واحد-های حرکتی در عضله می-باشد (۲۵) بنابراین وجود دامنه موج بلند تر در گروه‌های Silicon + Fibrin + Schwann + و Schwann نشان دهنده این مطلب می-باشد که واحدهای حرکتی بیشتری در این گروه‌ها فعالیت می-کنند. هر چند در گروهی که سیتی کولین به تنهایی استفاده شده است بدلیل دامنه موج کوتاهتر احتمالاً واحدهای حرکتی کمتری در این گروه فعالیت می-کنند. بررسی عصب ترمیم شده بعد از ۲ ماه بدین دلیل می-باشد که بعد از اینکه یک اکسون قطع می-شود، فرآیند تخریب والرین در قطعه دیستال عصب برای چندین روز اتفاق می-افتد (۲۶). در دقایق اولیه بعد از قطع عصب در طی چندین روز اول، قطعه دیستال عصب از لحاظ الکتریکی تحریک پذیر است. در طی این دوره، تحریک دیستال محل ضایعه ممکن است منجر به موج طبیعی و یا نزدیک به موج طبیعی شود. اکسون‌های حرکتی بیش از ۷ روز بعد از آسیب تحریک پذیر باقی می-مانند و اکسون‌های حسی بیش از ۱۱ روز تحریک پذیر باقی می-مانند.

با بررسی نمودار و تصاویر گروه‌های مورد مطالعه دیده می-شود که تاخیر در هدایت عصبی در گروه‌ها روبه کاهش می-باشد. هر چقدر تاخیر هدایت حرکتی کمتر باشد مدت زمان لازم برای انتقال ایمپالس عصبی کمتر می-باشد و بنابراین امواج عصبی با سرعت بیشتری منتقل می-شوند که در عملکرد عصب ترمیم شده تاثیر مثبت دارد (۴, ۲۷, ۲۸). کمترین میزان تاخیر هدایت حرکتی در گروه Silicon + Fibrin + Citicoline و Silicon + Fibrin + Schwann + می-باشد ( $P < 0.05$ ). اسکار ایجاد شده بعد از آسیب عصبی در هدایت حرکتی اختلال ایجاد می-کند و از آنجا که سیتی کولین موجب کاهش اسکار می-شود (۱۶, ۲۲) بنابراین همانطور که در فرضیه تحقیق انتظار می-رفت، سیتی کولین موجب افزایش سرعت هدایت ایمپالس‌های عصبی در محل اتصال نوروماسکولار شده است و یا به عبارت دیگر سیتی کولین اسکار بعد از آسیب را کاهش داده و در نتیجه تاخیر در هدایت حرکتی (Latency) عصب ترمیم شده را کاهش داده است. در گروه Silicon + Fibrin + Schwann تاخیر هدایت حرکتی نسبت به گروه‌های Silicon + Fibrin + Citicoline و Silicon + Fibrin + Schwann + است ( $P < 0.05$ ). اما نسبت به گروه Silicon + Fibrin + Schwann + کاهش نشان می-دهد، در حقیقت سلول‌های شوان اگزورژنوس تزریق شده توانسته اند سرعت هدایت عصبی را از طریق تشکیل و حفظ NMJ افزایش دهد اما در گروه Silicon + Fibrin + Schwann سلول‌های شوان اندورژنوس نتوانسته اند به اندازه سلول‌های اگزورژنوس در تشکیل NMJ و افزایش هدایت عصبی نقش داشته باشند.

در بررسی ترمیم اعصاب محیطی، تعداد اکسون‌های ترمیم شده از لحاظ تعداد و همچنین میلین دار شدن آنها و نیز بررسی کیفیت غلاف میلین ترمیم شده، اطلاعات مفیدی جهت پی بردن به موثر بودن روش جراحی و تداخلات درمانی فراهم می-کند (۲۹). در بررسی بافتی عصب ترمیم شده می-توان عروق ایجاد شده درون عصب در حال ترمیم

در گروه‌های Silicon + Fibrin + Schwann و Silicon + Fibrin + Citicoline و Silicon + Fibrin + Schwann + Citicoline اعصاب ترمیم شده دارای نظم بیشتر و بهتری می‌باشند. فاسیکل‌ها در هر سه گروه تشکیل شده است اما نحوه آرایش فاسیکل‌ها در گروه Silicon + Fibrin + Citicoline و Silicon + Fibrin + Schwann + Citicoline بهتر از گروه Silicon + Fibrin + Schwann می‌باشد. تراکم اکسون‌های ترمیم شده در گروه Silicon + Fibrin + Schwann + Citicoline بیشتر از گروه‌های Silicon + Fibrin + Schwann + Citicoline می‌باشد همچنین قطر اکسون‌ها نیز در گروه Silicon + Fibrin + Schwann + Citicoline بیشتر می‌باشد. تعداد اکسون‌های ترمیم شده در گروه Silicon + Fibrin + Schwann + Citicoline دارای تفاوت معنی داری با دو گروه دیگر می‌باشد همچنین گروه Silicon + Fibrin + Schwann با گروه Silicon + Fibrin + Citicoline نیز از لحاظ تعداد اکسون‌ها دارای تفاوت معنی داری است ( $P < 0.05$ ). (شکل شماره ۳. F).

در بررسی ایمونوهیستوشیمی عصب ترمیم شده درون لوله سیلیکون (شکل شماره ۲. B-D) دیده می‌شود که سلول‌های شوان نشاندار شده با مارکر DiI که به درون لوله سیلیکون تزریق شده اند در حاشیه لوله متمرکز شده اند. در حقیقت با توجه به گذشت ۲ هفته از تزریق سلول‌های شوان، تجمع سلول‌ها در حاشیه لوله قابل قبول می‌باشد چرا که این سلول‌ها با توجه به ترشح مولکول‌های چسبنده سطح سلول و تولید لامینین نیاز به تکیه گاه برای تولید طناب‌های بونگتر دارند (۳۱) و پس از گذشت مدتی به مرکز عصب برای تشکیل طناب‌ها حرکت می‌کنند، بنابراین چسبیدن سلول‌ها به حاشیه لوله طبیعی است. در گروه Silicon + Fibrin + Schwann و Silicon + Fibrin + Schwann + Citicoline تعداد اکسون‌ها بیشتر از گروه Silicon + Fibrin + Citicoline می‌-

را نیز مورد توجه قرار داد. یکی از مواردی که در استفاده از کانال‌های هدایت عصب مد نظرمی‌باشد استفاده از لوله ای است که اجازه خون رسانی به عصب در حال ترمیم را می‌دهند. به عبارت بهتر از لوله‌هایی استفاده می‌شود که آنژیوژنز را موجب می‌شوند (۳۰). لوله سیلیکون بدلیل اینکه اجازه ورود عروق خونی به درون عصب را نمی‌دهد، کمتر مورد توجه قرار می‌گیرد بنابراین در تحقیق حاضر و در بررسی بافت عصب ترمیم شده، توجه به وجود و تعداد عروق خونی تشکیل شده درون عصب ترمیم شده در گروه‌های مورد مطالعه کارایی و کیفیت کانال هدایت عصب را نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد که عروق خونی تشکیل شده در گروه‌های مورد مطالعه به دلیل حضور سلول‌های شوان باشد چرا که این سلول‌ها فاکتور رشد عصب (NGF) تولید می‌کنند و این فاکتور نقش بسیار مهمی در تشکیل عروق خونی (آنژیوژنز) دارد. در حقیقت این فاکتور در طریق مهاجرت، تکثیر، حفظ، بقا و عملکرد سلول‌های اندوتلیال از طریق مکانیسم‌های اتوکرین و پاراکرین شرکت می‌کند (۲۱). با توجه به تصاویر و نمودارهای مربوط به تعداد اکسون‌ها دیده می‌شود که تفاوت معنی داری بین گروه Silicon + Fibrin + Schwann و Silicon + Fibrin + Citicoline و Silicon + Fibrin + Schwann + Citicoline وجود دارد ( $P < 0.05$ ). همانطور که در شکل شماره ۳. A, B دیده می‌شود عصب ترمیم شده درون لوله سیلیکون از لحاظ بافتی با عصب سیاتیک طبیعی تفاوت دارند. درون عصب ترمیم شده در این دو گروه بافت همبندی فراوان دیده می‌شود که احتمالا نشان دهنده هجوم فیبروبلاست‌ها است. فاسیکل‌های عصبی مورد انتظار در یک عصب در این دو گروه دیده نمی‌شود و در ضمن اکسون‌های ترمیم شده نیز اکثرا فاقد میلین می‌باشند. به همین دلیل نمودار دامنه موج الکتریکی (amplitude) در این دو گروه کوتاه و پهن دیده می‌شود که با نتایج بافتی آن مطابقت دارد.

باشد که فاقد سلول شوان می‌باشد و به نظر می‌رسد به دلیل وجود سلول‌های شوان آگزورنوس تزریق شده در این گروه ها باشد. از طرفی استفاده از داروی سیتی کولین نیز موجب کاهش شکسته شدن غشای سلولی و تولید اسیدهای چرب آزاد و تولیدات سمی بافت صدمه دیده می‌شود و همچنین سیتی کولین موجب ارتقا بقا و یا ترمیم نورون‌های صدمه دیده می‌شود که بعد از قطع عصب سیاتیک از بین رفته اند (۲۲). اما همانطور که مشاهده می‌شود تاثیر سلول‌های شوان در افزایش تعداد اکسون‌ها بیشتر از داروی سیتی کولین بوده است و این احتمالاً به دلیل تولید مولکول‌های ماتریکس خارج سلولی و عوامل نوروتروفیک می‌باشد. شاید به همین دلیل که هم داروی سیتی کولین و هم سلول‌های شوان موجب بقا نورونی و افزایش ترمیم می‌شوند است که در گروه Silicon + Fibrin + Schwann + Citicoline تعداد اکسون بیشتری در عصب ترمیم شده وجود دارد و احتمالاً این دو اثر تقویتی بر روی یکدیگر دارند.

پیوند سلول‌های شوان در محل ضایعه عصب سیاتیک موجب تشکیل میلین اکسون‌های ترمیم شده می‌شود و موجب تشکیل نواحی گره ای جدید که قادر به بیان کانال سدیمی هستند می‌شود (۳۲). وجود غلاف میلین و افزایش قطر غلاف منجر به افزایش سرعت هدایت الکتریکی و افزایش دامنه موج الکتریکی می‌شود (۳۱). همانطور که در شکل شماره ۳، D, E دیده می‌شود اکسون‌های ترمیم شده دارای غلاف میلین ضخیم تری نسبت به سایر گروه‌ها هستند و این افزایش ضخامت با نتایج الکتروفیزیولوژیکی منطبق می‌باشد.

یکی از دلایل استفاده از سیتی کولین در این طرح اثر این دارو در کاهش تولید اسکار بعد از آسیب عصبی است (۲۲). در تحقیق حاضر عصب سیاتیک به اندازه ۱۰ میلی متر قطع شد و فاصله ای بین دو سر پروکسیمال و دیسال عصب بوجود آمد. در چنین مواردی بخیه زدن دو انتهای عصب باعث بوجود آمدن فشار و کشش بر روی عصب می‌شود در نتیجه ترمیم عصب به خوبی صورت نمی‌گیرد (۳۳) بنابراین

از کانال سیلیکونی برای پر نمودن این فاصله استفاده شد. بخیه زدن دو انتهای عصب به دو سر لوله کشش و فشار را از روی عصب بر می‌دارد اما اسکاری که در محل بخیه به وجود می‌آید می‌تواند در ترمیم بافت اختلال ایجاد نماید. بافت همبند و اسکار در گروه Silicon + Silicon+ و Fibrin به وضوح دیده می‌شود اما مقدار آن در گروه Silicon + Fibrin + Schwann کاهش یافته است. در گروه Silicon + Fibrin + Citicoline که از داروی سیتی کولین بطور منفرد استفاده شده است اسکار در مقایسه با گروه‌های دیگر کاهش داشته است به طوری که در اطراف عصب ترمیم شده بافت غیر عصبی دیده نمی‌شود به عبارت دیگر در حاشیه عصب همانند مرکز عصب ترمیم شده اکسون‌ها دیده می‌شوند این مطلب در سایر گروه‌ها دیده نمی‌شود. در گروه Silicon + Silicon + Fibrin + Schwann + Citicoline به دلیل استفاده از سیتی کولین حاشیه عصب و در نتیجه اسکار کمتر از گروه Silicon + Fibrin + Schwann می‌باشد که فاقد سیتی کولین است.

### نتیجه گیری

بر خلاف سیستم عصبی مرکزی، سیستم عصبی محیطی توانایی ترمیم بعد از آسیب وارده به خود را داراست. البته نوع آسیب وارد شده و محل آسیب در فرایند ترمیم عصب بسیار مهم می‌باشند. امروزه از مواد بسیار متنوعی در ترمیم اعصاب محیطی استفاده می‌شود. اما عامل اصلی ترمیم در این سیستم وجود سلول‌های شوان می‌باشد که دارای پتانسیل فراوان برای ترمیم می‌باشد. در تحقیقات اخیر تلاش در افزایش کارایی این سلول‌ها و یا کمک به این سلول‌ها در ترمیم عصب می‌باشد. در تحقیق حاضر با استفاده از سلول‌های شوان و داروی سیتی کولین و کانال هدایت عصب سیلیکونی و همچنین روش‌های ایمونوهیستوشیمی و بافتی و الکتروفیزیولوژیکی سعی در ترمیم عصب قطع شده بوده است. در این تحقیق دیده شد که استفاده از سلول‌های شوان و سیتی کولین درون لوله سیلیکون موجب ترمیم بهتر

دوره كارشناسي ارشد آناتومي در دانشكده پزشكي دانشگاه علوم پزشكي است و نويسندگان مقاله از حمايت هاي بخش علوم تشریح دانشگاه علوم پزشكي ايران و مركز تحقيقات سلول هاي بنيادی سيستم عصبی دانشگاه علوم پزشكي سمنان و همچنين مركز تحقيقات چشم فارابی كمال تشكر و امتنان را دارد.

عصب سياتيك هم از لحاظ بافتی و هم از لحاظ عملکردی می شود.

### تقدیر و تشكر

این مقاله حاصل از طرح تحقیقاتی (كد طرح: ۱۹۲۸/۸۸)

## References

1. Quan D, Bird SJ. Nerve conduction studies and electromyography in the evaluation of peripheral nerve injuries. *Univ Pa Orthop J* 1999;12:45-51.
2. Samiee F, Zarrindast M-R. Effect of electrical stimulation on motor nerve regeneration in sciatic nerve ligated-mice. *Eur J Transl Myo* 2017;27:6488
3. Gordon T. Electrical stimulation to enhance axon regeneration after peripheral nerve injuries in animal models and humans. *Neurotherapeutics* 2016;13:310-295.
4. Kuyucu E, Gümüs B ,Erbas O, Oltulu F, Bora A. Exenatide promotes regeneration of injured rat sciatic nerve. *Neural Regen Res* 2017;12:637-43.
5. Gramsbergen A, IJkema-Paassen J, Meek M. Sciatic nerve transection in the adult rat: abnormal EMG patterns during locomotion by aberrant innervation of hindleg muscles. *Exp Neurol* 2000;161:183-93.
6. Siemionow M, Brzezicki G. Current techniques and concepts in peripheral nerve repair. *Int Rev Neurobiol* 2009;87:141-72
7. Tan C, Ng MH ,Ohnmar H, Lokanathan Y, Nur-Hidayah H, Roohi S, et al. Sciatic nerve repair with tissue engineered nerve: Olfactory ensheathing cells seeded poly (lactic-co-glycolic acid) conduit in an animal model. *Indian J Orthop* 2013;47:547-522.
8. Johnson P, Wood M, Moore A, Mackinnon S. Tissue engineered constructs for peripheral nerve surgery. *Eur Surg* 2013;45:122-35.
9. Georgiou M, Bunting SC, Davies HA, Loughlin AJ, Golding JP, Phillips JB. Engineered neural tissue for peripheral nerve repair. *Biomaterials* 2013;34:7335-43.
10. Belanger K, Dinis TM, Taourirt S, Vidal G, Kaplan DL, Egles C. Recent strategies in tissue engineering for guided peripheral nerve regeneration. *Macromol Biosc* 2016;16:472-81.
11. Jiang L, Jones S, Jia X. Stem cell transplantation for peripheral nerve regeneration: Current options and opportunities. *Int J Mol Sci* 2017;18:94.
12. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. *Stem Cells* 2007;25:2896-902.
13. Cooney DS, Wimmers EG, Ibrahim Z, Grahammer J, Christensen JM, Brat GA, et al. Mesenchymal stem cells enhance nerve regeneration in a rat sciatic nerve repair and hindlimb transplant model. *Scie Rep* 2016;6:31306.
14. Masgutov R, Masgutova G, Mukhametova L, Garanina E, Arkhipova SS, Zakirova E, et al. Allogenic Adipose Derived Stem Cells Transplantation Improved Sciatic Nerve Regeneration in Rats: Autologous Nerve Graft Model. *Front Pharmacol* 2018;9:86.
15. Ma Y, Ge S, Zhang J, Zhou D, Li L, Wang X, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles promote nerve regeneration after sciatic nerve crush injury in rats. *Int J Clin Exp Pathol* 2017;10:10032-9.

16. Sinir SSSHM, ve Fonksiyonel R. Investigation of the dose-dependency of citicoline effects on nerve regeneration and functional recovery in a rat model of sciatic nerve injury. *Turk Neurosurg* 2014;24:54-62.
17. Emril DR, Wibowo S, Meliala L, Susilowati R. Cytidine 'o-diphosphocholine administration prevents peripheral neuropathic pain after sciatic nerve crush injury in rats. *J Pain Res* 2016;23:287-91.
18. Wen J, Tan D, Li L, Guo J. Isolation and Purification of Schwann Cells from Spinal Nerves nuof Neonatal Rat. *Bio Protocol* 2017;7:e2588.
19. Alford EK, Roy RR, Hodgson JA, Edgerton V. Electromyography of rat soleus, medical gastrocnemius, and tibialis anterior during hind limb suspension. *Exp Neurol* 1987;96:635-49.
20. Roganovic Z, Pavlicevic G. Difference in recovery potential of peripheral nerves after graft repairs. *Neurosurgery* 2006;59:621-33.
21. Nico B, Mangieri D, Benagiano V, Crivellato E, Ribatti D. Nerve growth factor as an angiogenic factor. *Microvasc Res* 2008;75:135-41.
22. Özay R, Bekar A, Kocaeli H, Karlı N, Filiz G, Ulus İH. Citicoline improves functional recovery, promotes nerve regeneration, and reduces postoperative scarring after peripheral nerve surgery in rats. *Surg Neurol* 2007;68:615-22.
23. Roozbehi A, Almasi-Tork S, Piryae A, Sadeghi Y. Effects of cadmium on photoreceptors and ganglionic cells of retinal layer in mice embryo—an ultrastructural study. *Indian J Exp Biol* 2007;45:469-74.
24. Constantin A-M, Tache S. Stimulating factors for the regeneration of peripheral nerves. *Cluj Med* 2012;85:9-12.
25. Sheth KA, Iyer CC, Wier CG, Crum AE, Bratasz A, Kolb SJ, et al. Muscle strength and size are associated with motor unit connectivity in aged mice. *Neurobiol Aging* 2018;128:36-67.
26. Chang B, Quan Q, Lu S, Wang Y, Peng J. Molecular mechanisms in the initiation phase of Wallerian degeneration. *Eur J Neurosci* 2016;44:2040-8.
27. Hsu S-T, Yao C-H, Hsu Y-M, Lin J-H, Chen Y-H, Chen Y-S. Effects of taxol on regeneration in a rat sciatic nerve transection model. *Sci Rep* 2017;7:45421.
28. Moattari M, Kouchesfehiani HM, Kaka G, Sadraie SH, Naghdi M, Mansouri K. Chitosan-film associated with mesenchymal stem cells enhanced regeneration of peripheral nerves: A rat sciatic nerve model. *J Chem Neuroanat* 2018;46:54-88.
29. Ayan I, Esenkaya I, Karakaplan M, Germen B, Milcan A, Zorludemir S, et al. The effect of human placental suspension on rat sciatic nerve healing. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2007;41:140-6.
30. Stang F, Keilhoff G, Fansa H. Biocompatibility of different nerve tubes. *Materials (Basel)* 2009;2:1480-507.
31. Armati P. The function of RhoGTPases in axon ensheathment and myelination: *Glia* 2008;56:1508-17.
32. Hu X, Hu J, Dai L, Trapp B, Yan R. Axonal and Schwann cell BACE is equally required for remyelination of peripheral nerves. *J Neurosci* 2015;35:3806-14.
33. Terzis J, Faibisoff B, Williams B. The nerve gap: suture under tension vs. graft. *Plast Reconstr Surg* 1975;56:166-70.