

## سلول‌های بنیادی و نقش آن در بهبود ضایعات مغزی ناشی از هیپوکسی ایسکیمی

مهدی جلالی Ph.D.\*، حسینعلی غفاری پور M.D.\*\*، محمدرضا نیکروش Ph.D.\*، داریوش حمیدی علمداری Ph.D.\*\*

جواد سنچولی M.Sc.\*\*، معصومه ثقه‌الاسلام Ph.D. Student\*

\*گروه علوم تشریحی و بیولوژی سلولی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران

\*\*دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی زابل، ایران

\*\*\*گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران

تاریخ دریافت: تیر ماه ۹۰ تاریخ پذیرش: مهرماه ۹۰

### چکیده

**هدف:** مطالعه اثر درمانی سلول‌های بنیادی مشتق از خون بند ناف جنین انسان روی ضایعات مغزی ناشی از ایسکمی هیپوکسیک در موش صحرایی دچار سکته مغزی ایسکمیک

**مواد و روش‌ها:** مطالعه حاضر روی رت‌های جوان انجام گرفت. با این توصیف که ابتدا برای ایجاد مدل آزمایشگاهی سکته مغزی ایسکمیک، شریان کاروتید حیوانات مورد مطالعه برای مدت ۳۰ دقیقه بسته شد. سپس سلول‌های موجود در خون بند ناف که جداسازی شده و با استفاده از برومودی اکسی یوریدین نشان‌دار شدند، به مقدار  $2 \times 10^6$  سلول از طریق ورید دمی به حیوانات گروه تجربی تزریق شدند در حالی که در گروه شم، تزریقی صورت نگرفت و علاوه بر این دو گروه، تعدادی از حیوانات تحت عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد که مورد عمل جراحی و تزریق قرار نگرفته و دست نخورده باقی ماندند.

**یافته‌ها:** نتایج به دست آمده بر اساس تجزیه و تحلیل واکنش‌های رفتاری - حرکتی و همچنین مطالعات عصب شناختی مناطق آسیب دیده مغزی با تأکید بر ناحیه قشر فرونتال مغز حیوانات گروه کنترل، شم و گروه تجربی ارزیابی شد. بررسی‌های به عمل آمده نشان داد که واکنش‌های رفتاری - حرکتی گروه تجربی نسبت به گروه شم و کنترل بهبود یافته است و به علاوه بررسی‌های بافتی نشان‌دهنده کاهش درصد بافت ضایعه دیده در گروه تجربی در مقایسه با گروه شم است.

**نتیجه‌گیری:** پیوند سلول‌های بنیادی مشتق از خون بند ناف در ترمیم بافت مغزی آسیب دیده ناشی از سکته مغزی ایسکمیک موثر می باشد.

**کلید واژه‌ها:** سلول بنیادی، هیپوکسی ایسکیمی، قشر فرونتال مغزی

### مقدمه

عوارض ناگوار و جبران ناپذیری به دنبال داشته باشد. تجربه نشان داده است که اگر چه برای این‌گونه ضایعات درمان قطعی وجود ندارد و صرف نظر از تجویز داروهای ترومبولیتیک در سکته مغزی خونریزی دهنده به درمان‌های

در حال حاضر سکته مغزی یکی از مهمترین عوامل ناتوانی‌های حسی حرکتی است که به خاطر انسداد مویرگی یا کم خونی مغزی پدید می‌آید. بنابراین زمینه مرگ و میر سلول‌های عصبی بسته به ناحیه ضایعه دیده در مغز می‌تواند

آدرس مکاتبه: مشهد، میدان آزادی، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، صندوق پستی: ۸۵۶۴ - ۹۱۷۷۹۴

Email: Nikravesh@hotmail.com

مجله علوم تشریح ایران، سال نهم، شماره ۳۶، پاییز ۹۰، صفحات ۲۰۲-۱۹۱

را دارند که در مقایسه با سلول‌های مزانشیمال مشتق از مغز استخوان کمتر ایمنوژنیک هستند [۱۰]. بنابراین در طراحی این تحقیق سعی شده است تا با استفاده از سلول‌های بنیادی مشتق از بند ناف و انتقال آن‌ها به بدن مدل آزمایشگاهی سکنه مغزی ایسکمیک، میزان بهبود حرکتی و جایگزینی این سلول‌ها در بافت دچار ایسکمی با استفاده از آزمون‌های حرکتی و ایمنو هیستوشیمی بررسی شود.

### مواد و روش‌ها

**الف- جمع‌آوری خون بند ناف و جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای**  
خون بند ناف از بند ناف مادران ۲۰ تا ۴۰ ساله مراجعه کننده به زایشگاه بیمارستان قائم که سابقه بیماری خاصی نداشته و سیگاری و الکلی نبودند در کیسه‌های مخصوص جمع‌آوری خون حاوی دکستروز آدین سترات فسفات با رعایت حقوق بیماران جمع‌آوری شد و در مدتی کمتر از ۸ ساعت نمونه‌های خون به نسبت ۱:۱ با بفر (PBS فاقد کلسیم و منیزیم) رقیق شده و سپس خون رقیق شده به نسبت ۳:۸ در لوله‌های سانتریفوژ ۱۵ میلی‌لیتر با Ficoll-Paque در دمای اتاق با سرعت ۸۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شده و سپس لایه سلولی جدا شده بالای Ficoll-Paque و زیر پلاسما (Buffy Coat) به آهستگی و دقت با استفاده از پیپت جدا شده و به لوله‌های جدید مخروطی منتقل شدند و پس از دو بار شستشو با بفر PBS از طریق سانتریفوژ با دور ۸۰۰ g و در مدت زمان ۱۰ تا ۲۰ دقیقه، سلول‌های جمع‌آوری شده در ته لوله‌ها با ۱ میلی‌لیتر از سرم جدا شده از خون بند ناف معلق شدند.

**ب- بررسی بیان گیرنده‌های سطحی ویژه سلول‌های بنیادی تخلیص شده از خون بند ناف با روش فلوسایتومتری**  
با استفاده از فلوسایتومتری بیان گیرنده‌های سطحی سلول‌های هماتوپویتیک مشتق از خون بند ناف (CD34, CD45) بررسی شد. به منظور انجام فلو سیتومتری، سلول‌های بنیادی

مکمل دیگری از جمله درمان‌های توانبخشی و فیزیوتراپی بسنده می‌شود که برای بازیافت سلامتی چندان مؤثر نیست [۱].

بنابراین برای درمان این اختلال عصبی شایع، در میان جامعه پزشکی به یک استراتژی ترمیمی کار آمد نیازمند است و در حال حاضر با توجه به تحقیقات گسترده‌ای که روی اثر درمانی سلول‌های بنیادی در نواحی مختلف بدن و به‌ویژه روی بیماری‌های سیستم عصبی در سطح جهانی انجام می‌شود، سلول درمانی می‌تواند یکی از راه‌های اصلی درمان سکنه مغزی در نظر گرفته شود.

سلول‌های بنیادی سلول‌های نامتمایزی هستند که توانایی تکثیر و تولید سلول‌های پیش ساز را در خود حفظ می‌کنند در نتیجه می‌توانند در پاسخ به تحریکات خاص به انواع سلول‌های موجود در بدن تمایز یابند. دانسته‌های ما در مورد این سلول‌ها به سرعت در حال رشد است و اخیراً چشم اندازه‌های جدیدی را در استراتژی‌های ترمیمی مغز در جریان بیماری‌های حاد نظیر سکنه مغزی ایسکمیک و صدمه مغزی [۲-۴] و همچنین بیماری‌های مزمنی نظیر پارکینسون، کره هانتینگتون، اسکروزیس آمیوتروفیک طرفی، اسکروزیس مولتیپل و آلزایمر [۴ و ۵] پیش روی ما گذاشته است. پیشرفت در تحقیقات امید این را می‌دهد که روش درمانی جدید استفاده از پیوند سلول‌های بنیادی در مغز صدمه دیده ناشی از ایسکمی کاربردی شود.

انواع سلول‌های بنیادی در سرتاسر دوره تکامل پستانداران تولید می‌شوند و چندین منبع برای این سلول‌ها وجود دارد که ممکن است در درمان ایسکمی مغزی مفید باشند. این سلول‌ها شامل سلول‌های بنیادی جنینی [۶]، سلول‌های بنیادی عصبی موجود در نواحی در حال تکامل خاصی از مغز پستانداران بالغ [۷] و سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان، خون بند ناف و بافت چربی هستند [۸]. خون بند ناف شامل جمعیتی از سلول‌های بنیادی است که توانایی بالقوه تبدیل شدن به سلول‌های عصبی را دارند [۹] به‌علاوه این سلول‌ها این مزیت

طرفی میانی سمت راست گردن انجام شد و سپس از دستیابی به غلاف کاروتید و آزاد کردن کاروتید مشترک از نسوج اطراف آن، شریان کاروتید با استفاده از نخ بخیه ۰۶ برای مدت ۳۰ دقیقه مسدود شده و سپس شریان آزاد شده و پوست محل برش تحت شرایط استریل بخیه شد و حیوانات تا زمان به هوش آمدن تحت نظر قرار گرفتند.

سپس در روز هفتم بعد از آسیب هیپوکسی-ایسکمی، ۱۰ سر از حیوانات مجدداً تحت بیهوشی قرار گرفته و از طریق ورید دمی تعداد  $2 \times 10^6$  سلول بنیادی معلق در یک میلی‌لیتر نرمال سالین به هر یک از آنان تزریق شد. ۱۰ سر رت باقیمانده دارای عارضه هیپوکسی به عنوان گروه شم در نظر گرفته شده که به آنها فقط یک میلی‌لیتر نرمال سالین وریدی تزریق شد. در ضمن ۱۰ رت سالم بدون آن‌که دچار هیپوکسی شده باشند به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند.

#### ۵- بررسی تغییرات حرکتی، رفتاری و بافتی

همان‌طور که قبلاً اشاره شد، ۲ آزمون رفتاری برای ارزیابی عملکرد چگونگی حرکت حیوان و وجود اختلالات حرکتی و هماهنگی حرکات و نقایص حسی-پیکری، برای حیوانات انجام شد. این آزمون‌ها در ۳ نوبت شامل روزهای ۱ و ۷ و ۱۴ بعد از تزریق سلول‌های بنیادی برای حیوانات انجام شد به این صورت که:

در آزمون اول، یعنی آزمون نحوه قرارگیری اندام‌های حرکتی (Modified limb placing) به گزارش درک (De Ryck) و همکارانش [۱۲] عملکرد هر یک از اندام‌های جلویی و عقبی در هر سمت بدن به صورت مجزا در ۶ آزمون ارزیابی شده و برای هر آزمون امتیاز صفر (عدم وجود پاسخ حرکتی یک اندام)، ۱ (پاسخ حرکتی ناکامل یا با تاخیر بیشتر از ۲ ثانیه یک اندام) و ۲ (پاسخ حرکتی سریع و کامل اندام) که در مجموع ۱۶ امتیاز برای یک موش سالم است در نظر گرفته شد.

در آزمون دوم، یعنی آزمون چرخش در گوشه

تخلیص شده طی مراحل قبل با آنتی‌بادی‌های ضد این نشانگرهای سلولی که با دو کروموژن Fluorescein isothiocyanate (FITC) و Phycoerythrin (PE) کونژوگه شده بودند به طور جداگانه انکوبه شدند تا درصد سلول‌هایی که این نشانگرها را نشان می‌دهند و همچنین تعداد این سلول‌ها، با دستگاه فلوسایتومتر تعیین شوند. علاوه بر این به منظور تأیید وجود این سلول‌ها در نمونه سلولی باید یک نمونه کنترل نیز در نظر گرفته شود که برای این کار از آنتی‌بادی کنترل ایزوتیپ (ایمنو گلوبولین G1) کونژوگه شده با دو کروموژن FITC و PE استفاده شد.

#### ج- نشان‌دار کردن سلول‌ها با BrdU

سلول‌های تک هسته‌ای جدا شده از خون بند ناف به داخل فلاسک‌های کشت حاوی محیط کشت RPMI غنی شده با سرم گاوی ۱۰ درصد و آنتی‌بیوتیک منتقل شده و برای نشان‌دار کردن آن‌ها به ازای هر یک میلی‌لیتر از محلول حاوی سلول، ۳ میکروگرم ماده برومودی اکسی یوردین به فلاسک‌های کشت اضافه شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباتور حاوی گاز دی‌اکسید کربن ۵ درصد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. ارزیابی زنده بودن سلول‌های تک هسته‌ای جدا شده از خون بند ناف نیز با استفاده از لام نئوبار و تریپان بلوانجام گرفت.

#### د- ایجاد مدل حیوانی سکنه مغزی ایسکمیک

برای این مطالعه از رت‌های جوان نر نژاد ویستار در سن دو هفتگی استفاده شد. با تزریق داخل صفاقی ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کتامین ۱ درصد و ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم زایلازین ۲۰ سر از نوزادان تحت بیهوشی عمیق قرار گرفته و به منظور ایجاد هیپوکسی ناشی از ایسکمی، مطابق روش هیداتوشی (Hidetoshi) و همکاران شریان کاروتید یک طرف به صورت موقتی بسته شد [۱۱]. این کار با برشی در ناحیه

حجم نیم‌کره سالم طرف مقابل بیان شد. بنابراین عددی که از فرمول بالا به دست آمد تقسیم بر حجم نیم‌کره سالم شده و عدد حاصل به عنوان درصد حجم بافت آسیب دیده گزارش شد.

برای مشاهده سلول‌های بنیادی جایگزین شده در ناحیه ایسکمیک، بافت مغزی ناحیه آسیب دیده را برای انجام آزمایش‌های ایمنوهیستوشیمی و ردیابی سلول‌های نشاندار شده با BrdU استفاده شد، به این ترتیب که ابتدا آنتی‌بادی اولیه ضد BrdU را روی مقاطع ریخته و سپس آنتی‌بادی ثانویه نشاندار شده با پروکسیداز را به آن متصل نموده و در نهایت به کمک کروموزن DAB مقاطع را رنگ‌آمیزی کرده و سلول‌های نشان‌دار در موضع بررسی شد. در ضمن برای ایجاد کتراست، از رنگ هماتوکسیلین برای رنگ‌آمیزی سایر سلول‌ها استفاده شد.

#### د- ارزیابی آماری

تمام داده‌های اندازه‌گیری شده، ابتدا با نرم افزار SPSS نسخه ۱۳ تجزیه و تحلیل واریانس شد و سپس میانگین‌ها با آزمون چند دامنه Duncan در سطح احتمال ۵ درصد ( $p < 0.05$ ) مقایسه شد.

### یافته‌ها

#### فلوسیتومتری سلول‌های هماتوبویتیک خون بند ناف

بررسی فلوسیتومتری نمونه‌های گرفته شده از خون بند ناف نشان داد که سلول‌های تک هسته‌ای جدا شده از خون بندناف به‌طور معنی‌داری گیرنده سطحی CD45 را بیان کرده و میانگین درصد سلول‌های معین شده برای این گیرنده ۸۹/۴۳ درصد بوده و میانگین درصد سلول‌های معین شده برای گیرنده CD34 نیز ۴۱/۲۸ درصد است.

#### بهبود حرکتی رفتاری

نتایج حاصل از دو آزمون حرکتی به این صورت بود که در آزمون Limb Placing توانایی حرکت اندام‌های جلویی و عقبی هر دو طرف حیوان بررسی شد و امتیازهای به‌دست آمده از حیوانات گروه تجربی ( $9/2 \pm 0/25$ ) و شم ( $0/2 \pm$ )

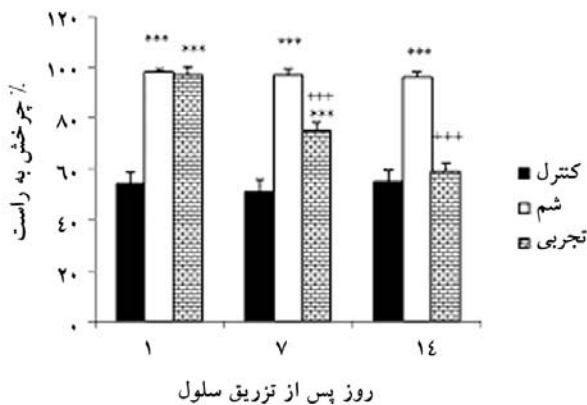
(Corner turn testing)، مطابق روش هیو (Hua) و همکارانش [۱۳] حیوانات در زاویه بسته‌ای (۳۰ درجه) رها شده و سپس تعداد برگشتن‌های آن‌ها از سمت چپ و راست در ۱۰ نوبت جداگانه شمارش و به صورت درصد بیان شد. اگر میزان برگشتن‌های موش از هر دو سمت به صورت اتفاقی یکسان بود، سالم در نظر گرفته و اگر در حیوان تمایل به گردش به یک سمت بیشتر مشاهده شد، نشان‌گر صدمه مغزی یک طرفه است.

برای بررسی تغییرات بافتی و درصد ضایعه بافت ناحیه ایسکمی در مغز موش‌ها، در روز ۱۴ پس از انجام آخرین مرحله آزمون‌های حرکتی، تمام موش‌های صحرائی بیهوش شده و پس از پرفیوژن با ۱۰۰ میلی‌لیتر نرمال سالین سرد و ۱۰۰ میلی‌لیتر پارافرمالیدید ۴ درصد در ۰/۱ مول بر لیتر PBS مغز آن‌ها از جمجمه خارج شده و برای ۲۴ ساعت داخل تثبیت‌کننده پارافرمالیدید نگهداری شد و پس از آن از هر مغز بلوک‌های پارافینی تهیه کرده، سپس با استفاده از میکروتوم روتاری برش‌های کرونال به ضخامت ۶ میکرون از بلوک‌ها تهیه و به ازای هر ۴۰ برش ۶ میکرونی یک برش را انتخاب و با هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی نموده و سپس درصد ضایعه بافتی ناحیه ایسکمیک در مقایسه با نیمکره سمت مقابل به کمک سیستم آنالیز تصویری (Data Translation, Marlboro, MA) در هر مقطع بافتی محاسبه شد. حجم بافت آسیب دیده مطابق فرمول زیر محاسبه شد [۱۴]:

حجم یک نیم‌کره = میانگین (مساحت کل نیم‌کره - مساحت بطن - مساحت ناحیه آسیب دیده) × فاصله بین مقاطع بافتی × تعداد مقاطع بافتی  
سپس حجم ناحیه آسیب دیده به کمک فرمول زیر محاسبه شد:

حجم بافت آسیب دیده = حجم باقیمانده نیم‌کره سالم - حجم باقیمانده نیم‌کره آسیب دیده  
به‌علت اینکه از زمان ایجاد ایسکمی در بافت مغز تا تهیه بافت در حدود یک ماه می‌گذشت و طی این مدت مغز دستخوش چروکیدگی می‌شد، حجم بافت آسیب دیده به عنوان درصدی از

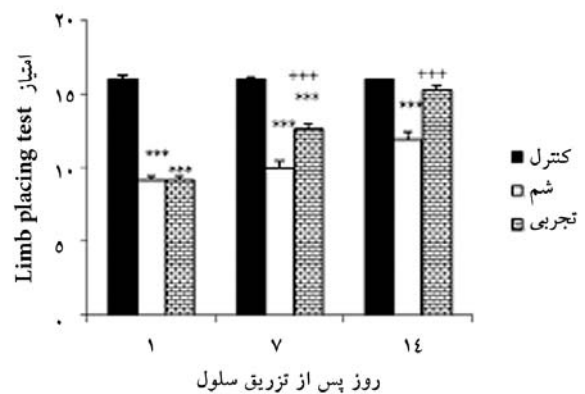
در آزمون Corner Turn وضعیت تعادل حرکتی مرتبط با تماس حسی موهای بینی (Vibrissa) حیوانات با ثبت تعداد چرخش‌های حیوان به سمت راست که دچار هیپوکسی مغزی شده بودند بررسی شد و به صورت درصد گزارش شد. به این ترتیب که این آزمون همانند قبلی برای تمام گروه‌ها در روزهای اول و هفتم و ۱۴ پس از تزریق سلول انجام شد و نتایج حاصل در دو گروه تجربی ( $3 \pm$  ۹۷ درصد) و شام ( $1/3 \pm 98$  درصد) در روز ۱ پس از تزریق نشان‌گر آن بود که با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند ولی تا روز ۷ پس از تزریق، با توجه به نتیجه  $3/07 \pm 75$  درصد برای گروه تجربی و  $2/13 \pm 97$  درصد برای گروه شام، اختلاف بین این دو گروه معنی‌دار شده و این معنی‌دار بودن تا روز ۱۴ نیز ادامه یافت [گروه تجربی ( $3/14 \pm 59\%$ ) و گروه شام ( $2/21 \pm 96\%$ )]. از طرف دیگر؛ در گروه کنترل نتایج به‌دست آمده در روزهای ۷، ۱۴ و ۱ پس از تزریق به ترتیب  $4/52 \pm 54$ ،  $4/82 \pm 51$  و  $4/53 \pm 53$  درصد بود و با نگاهی به نتایج دو گروه دیگر در روزهای ۱ و ۷ مشخص شد که با یکدیگر اختلاف معنی‌داری دارند ولی در روز ۱۴ در مورد گروه تجربی این اختلاف معنی‌دار از بین رفته است (شکل ۲).



شکل ۲. تأثیر تزریق سلول‌های بنیادی مشتق از خون بند ناف بر درصد چرخش به راست حاصل از آزمون Corner Turn در موش‌های صحرایی دچار سکته مغزی ایسکمیک. درصد چرخش به راست در حیوانات گروه تجربی در مقایسه با گروه شام، پس از ۱۴ روز کاهش پیشرونده‌ای را نشان می‌دهد ( $p < 0/05$ ).

\*\*\* $P < 0.001$  vs control  
+++ $P < 0.001$  vs sham

در روز اول پس از تزریق سلول، با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشت. در حالی که تا روز ۷ پس از تزریق، امتیازهای هر دو گروه افزایش یافته و از آنجایی که این افزایش امتیاز در گروه تجربی ( $0/26 \pm 12/7$ ) در مقایسه با گروه شام ( $0/47 \pm 10$ ) بارزتر بود از لحاظ آماری با یکدیگر اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. به‌علاوه این اختلاف تا روز ۱۴ پس از تزریق واضح‌تر شد و امتیاز در گروه تجربی به  $0/31 \pm 15/3$  و در گروه شام به  $0/53 \pm 11/9$  رسید که با یکدیگر در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری داشتند. در گروه کنترل که آن دسته از حیواناتی بودند که هیچ‌گونه دستکاری در آن‌ها صورت نگرفته و به‌علاوه سلولی دریافت نکرده بودند در هر سه نوبت نتایج حاصل از این آزمون برای آن‌ها امتیاز ۱۶ بود که با توجه به امتیازهای به‌دست آمده از دو گروه تجربی و شام که در بالا ذکر شد، در روز اول و هفتم پس از تزریق، این گروه با هر دو گروه اختلاف معنی‌دار داشته و اگر چه که این اختلاف با گروه شام تا روز ۱۴ همچنان ادامه یافته ولی با گروه تجربی نتیجه این‌گونه نبوده و بین این دو گروه اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۱).



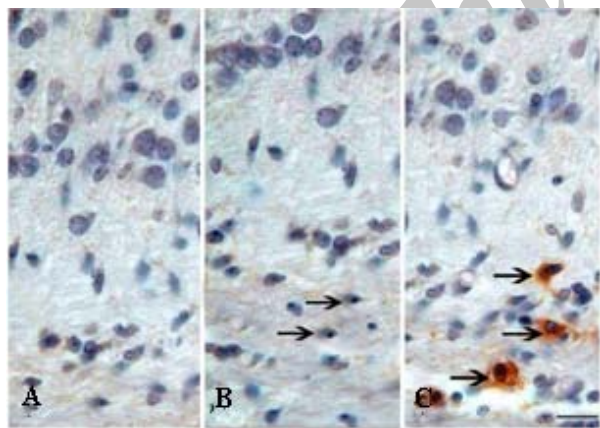
شکل ۱. تأثیر تزریق سلول‌های بنیادی مشتق از خون بند ناف بر امتیاز حاصل از آزمون Limb Placing در موش‌های صحرایی دچار سکته مغزی ایسکمیک. حیوانات گروه تجربی در مقایسه با گروه شام، در مدت ۱۴ روز پس از تزریق در اندام‌های جلویی و عقبی خود بهبود حرکتی نشان می‌دهند. ( $p < 0.05$ )

\*\*\* $p < 0.001$  vs control  
+++ $p < 0.001$  vs Sham

(شکل‌های ۵C و ۶C). در ناحیه آسیب دیده مغز از رنگ زمینه بنفش ناشی از همتوکسیلین قابل تفکیک است. در حالی که در گروه شم که درمانی انجام نشده پدیده کروماتولیز و مرگ سلولی به وضوح در ناحیه قشری دیده می‌شود (شکل‌های ۵B و ۶B).



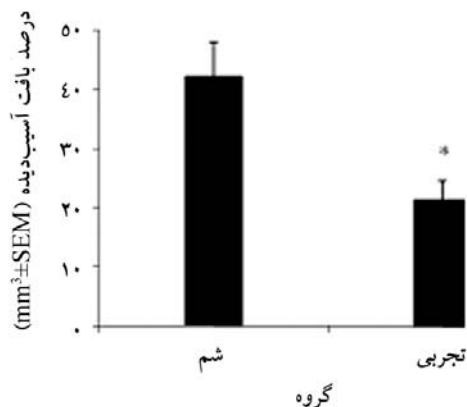
شکل ۴. برش کروئال مربوط به یک نیمکره مغز رت ۲۱ روزه از گروه کنترل با بزرگنمایی کم که ناحیه قشر فرونتال (fc) مشخص شده است (رنگ آمیزی: همتوکسیلین، بزرگنمایی:  $\times 4$ )



شکل ۵. برش مربوط به ناحیه قشر فرونتال مغز رت‌های ۲۱ روزه از گروه‌های سه گانه A: کنترل، B: تجربی درمان نشده و C: تجربی درمان شده با سلول‌های بنیادی نشاندار که به رنگ قهوه‌ای دیده می‌شوند (پیکان‌های نشانه) و جایگزین سلول‌های از دست رفته شده‌اند. در شکل B ناحیه ضایعه با نمایی از سلول‌های پیکنوتیک (پیکان‌های نشانه) قابل مشاهده است با بزرگنمایی بیشتر (بزرگنمایی:  $\times 100$ ).

### بررسی درصد بافت آسیب دیده مغز

نتایج به دست آمده از بررسی بافت آسیب دیده مغز در نیم‌کره راست در مقایسه با نیم‌کره چپ سالم در دو گروه تجربی و شم ۳ هفته پس از عمل جراحی منجر به هیپوکسی مغزی، نشان داد که درصد بافت آسیب دیده در گروه تجربی ( $21/4 \pm 3/2$ ) که یک هفته پس از جراحی سلول دریافت کرده بودند در مقایسه با گروه شم ( $42/2 \pm 5/73$ ) که به آن‌ها سلول تزریق نشده بود به طور معنی‌داری کاهش یافته است (شکل ۳)



شکل ۳. بررسی آماری درصد بافت آسیب دیده مغز در مقایسه با نیم‌کره سالم مغز در دو گروه تجربی و شم در سطح احتمال کمتر از ۵ درصد

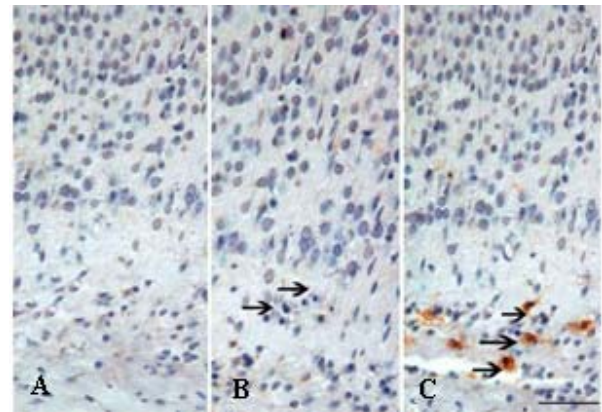
### جایگزینی سلول‌های بنیادی نشان‌دار در قشر فرونتال آسیب دیده

بررسی مقاطع بافتی مغز حیوانات بر روی ناحیه قشر فرونتال متمرکز شد که در تصویر ۴ این ناحیه از مغز در حیوانات گروه کنترل به نمایش گذاشته شده است. برای بررسی وجود سلول‌های بنیادی نشان‌دار تزریق شده به گروه تجربی، رنگ آمیزی ایمنو هیستوشیمی برای مقاطع به دست آمده از مغز حیوانات این گروه انجام شد و همان‌طور که در تصویر ۵ مشاهده می‌شود مهاجرت و جایگزینی سلول‌های BrdU+ به صورت سلول‌هایی با هسته‌های گرد یا بیضی که کروماتین موجود در آن‌ها رنگ قهوه‌ای DAB را جذب کرده و همچنین دارای هاله‌ای از سیتوپلاسم قهوه‌ای کم‌رنگ هستند

این رابطه تیم‌های مطالعاتی متعددی گزارش کرده‌اند که پیوند داخل وریدی و داخل مغزی سلول‌های پیش‌ساز خونی جدا شده از خون بند ناف توانایی بهبود رفتارهای حرکتی را دارند [۲۷، ۲۸ و ۲۹].

در سال ۲۰۰۱ چن (Chen) و همکاران با توجه به اینکه می‌دانستند خون بند ناف انسان منبع غنی از سلول‌های پیش‌ساز و بنیادی است، برای اثبات ورود این سلول‌ها به مغز، زنده ماندن، متمایز شدن و بهبود فعالیت‌های عصبی- حرکتی در مدل آزمایشگاهی، در موش‌های صحرایی سگته مغزی نوع ایسکمیک را القاء کرده و سپس تعداد  $3 \times 10^6$  سلول مشتق از خون بند ناف انسان را به ترتیب ۲۴ ساعت و ۷ روز پس از جراحی از طریق وریدی وارد بدن حیوانات نمودند. در ضمن آن‌ها برای تمامی گروه‌ها آزمون‌های رفتاری Rotarod و Modified Neurological Severity Score (mNSS) را انجام داده و رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی نیز برای بررسی سلول‌ها در ناحیه ایسکمیک صورت گرفت. در این مطالعه نتایج حاصل آزمون‌های رفتاری نشان داد که تزریق سلول ۲۴ ساعت پس از جراحی منجر به افزایش امتیازهای هر دو آزمون می‌شود. در حالی که تزریق پس از ۷ روز فقط در امتیازهای به دست آمده از mNSS تغییرات معنی‌داری ایجاد می‌کند. به علاوه بررسی ایمنوهیستوشیمی مقاطع بافتی ناحیه ایسکمیک، بیان پروتئین‌های رده‌های سلولی عصبی و گلیال توسط سلول‌های مهاجرت یافته به مغز را نشان داد که این موضوع در یافته‌های دیگران نیز به ثبت رسیده است [۲۶].

در مطالعه مشابهی ویلینگ (Willing) و همکاران ۲۴ ساعت پس از ایجاد مدل آزمایشگاهی سگته مغزی ایسکمیک، سلول‌های بنیادی مشتق از خون بندناف انسانی



شکل ۶. برش مربوط به ناحیه قشر فرونتال مغز رت‌های ۲۱ روزه از گروه‌های سه‌گانه. A: کنترل، B: تجربی درمان نشده و C: تجربی درمان شده با سلول‌های بنیادی نشان‌دار که در اطراف یک مویرگ (پیکان‌های نشانه شکل C) به رنگ قهوه‌ای دیده می‌شوند و جایگزین سلول‌های از دست رفته شده‌اند. در شکل B ناحیه ضایعه با نمایی از سلول‌های پیکنوتیک (پیکان‌های نشانه) قابل مشاهده است (بزرگنمایی:  $\times 40$ ).

## بحث

امروزه طیف وسیعی از مطالعات مربوط به ضایعات مغزی نخاعی و تلاش در زمینه ترمیم بافت‌های آسیب دیده عصبی روی پتانسیل درمانی سلول‌های بنیادی با منشأ جنینی (خون بند ناف) یا غیر جنینی (بافت چربی و مغز استخوان) متمرکز شده‌اند. تحقیقات نشان می‌دهد که بهره‌گیری از منابع یاد شده چنانچه به صورت علمی و اصولی و حساب شده انجام گرفته باشد می‌تواند به بهبود چشمگیری چه در ضایعات عصبی و چه در زمینه ترمیم سایر بافت‌های از دست رفته منجر شود [۱۵] سلول‌های انسانی که تا کنون در این گونه مطالعات بررسی شده‌اند شامل سلول‌های بنیادی عصبی کشت داده شده از بافت جنینی (NPCs: Neural stem/progenitor cells) [۱۶ و ۱۷]، رده‌های سلول‌های عصبی نامیرا [۱۸ و ۱۹]، پیش‌ساز سلول‌های خون‌ساز و اندوتلیال جدا شده از مغز استخوان [۲۰ و ۲۱]، خون بند ناف [۲۲ و ۲۳] و خون محیطی [۲۴] و سلول‌های استرومایی مشتق از بافت چربی [۲۵] هستند. در

همان‌طور که در بخش نتایج ملاحظه شد، امتیازهای به‌دست آمده از دو گروه تجربی و شم در روزهای اول و هفتم پس از تزریق سلول با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری داشتند ولی تا روز ۱۴ این اختلاف در مورد گروه تجربی که تحت درمان با سلول قرا گرفته بود از بین رفت. به‌علاوه در آزمون دوم نیز که معیار سالم بودن حیوان گردش اتفاقی به سمت راست و چپ است و بنابراین چرخش به راست حیوان در گروه کنترل در حدود ۵۰ درصد بود، با نگاهی به نتایج حاصل از دو گروه دیگر که در روز ۱ پس از تزریق تمایل به چرخش به راست حیوانات نزدیک به ۱۰۰ درصد است، اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشخص می‌شود که به تدریج در مورد گروه تجربی تا روز ۱۴ این اختلاف از بین می‌رود و عدد به‌دست آمده از درصد چرخش‌های این گروه به ۵۰ درصد نزدیک می‌شود.

این نتایج با نتایج به‌دست آمده از مطالعات مشابه قبلی منطبق بوده و کاملاً آن‌ها را تأیید می‌نماید. ولی در این مطالعه با وجود دیگر مطالعات مشابه [۲۶ و ۲۷] ناحیه آسیب دیده مغز نیز در مقایسه با نیم‌کره سالم بررسی شد و نشان داده شد که در گروه تجربی تحت درمان با سلول در مقایسه با گروه شم، حجم این ناحیه به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است. وندرام (Vendrame) و همکاران [۲۸] نیز نشان داده بودند که تزریق وریدی این سلول‌ها به حیوانات دچار سکنه مغزی ایسکمیک البته با تعداد بیش از ۱۰<sup>۷</sup> باعث کاهش حجم ناحیه آسیب دیده مغز می‌شود.

تمامی این یافته‌ها بر این امر دلالت دارد که تزریق وریدی سلول‌های مشتق از خون بندناف می‌تواند منجر به بهبود رفتار حرکتی در مدل آزمایشگاهی شوند و به‌علاوه نتایج به‌دست آمده از کاهش درصد بافت آسیب دیده در

را به دو صورت تزریق وریدی و تزریق مستقیم به‌داخل بافت استریاتوم وارد بدن حیوانات کرده و نتایج به‌دست آمده را با بررسی بهبود رفتار حرکتی حیوانات به این صورت بیان کردند که در بهبود فعالیت خودبه‌خودی حیوان، هر دو نوع پیوند سلول کارآمد بوده ولی در مورد آزمون حرکتی قدم زدن (Stepping test)، فقط در صورت تزریق وریدی سلول، نتایج در گروه تحت درمان در مقایسه با گروه کنترل بهبود حرکتی را نشان می‌دهد. بنابراین آن‌ها نتیجه گرفتند که تزریق وریدی این سلول‌ها از تزریق مستقیم آن به‌داخل بافت آسیب دیده بهتر عمل می‌کند [۲۷].

در ادامه بررسی بهبود حرکتی ناشی از تزریق سلول‌های بنیادی مشتق از خون بندناف در مدل آزمایشگاهی سکنه مغزی ایسکمیک، محققین بر آن شدند تا از دوزهای متعدد این سلول‌ها، به صورت تزریق وریدی استفاده نمایند و در نهایت علاوه بر اینکه به نتایج حاصل از مقالات قبل دست یافتند، این نتیجه را گرفتند که بهبود رفتار حرکتی در این حیوانات وابسته به تعداد سلول است [۲۸].

در این مطالعه آثار پیوند داخل وریدی سلول‌های بنیادی مشتق از خون بند ناف انسان در مدل آزمایشگاهی با آسیب هیپوکسی - ایسکمی بررسی شد. مطالعه حاضر نشان داد که تزریق سلول‌های بنیادی مشتق از خون بندناف به‌صورت داخل وریدی باعث بهبود رفتارهای حرکتی در مدل‌های ایسکمی می‌شود که این بهبود در نمونه‌های درمان شده در مقایسه با گروه هیپوکسی تیمار نشده قابل مقایسه است.

در این مطالعه از ۲ آزمون رفتاری Limb placing و Corner Turn استفاده شد. برای آزمون اول، فعالیت حرکتی طبیعی برای حیوانات سالم امتیاز ۱۶ را داشت در حالی که



داخل وریدی در مطالعات بالینی بتواند راه‌گشای مناسبی برای آن دسته از نوزادانی باشد که در زایمان‌های سخت دچار هیپوکسی مغزی شده و در معرض ضایعات مغزی غیر قابل جبران قرار می‌گیرند. لازم به ذکر است که برای کاربرد بالینی این سلول‌ها آزمایش‌های بیشتری مثل تعیین تعداد سلول تزریقی یا ارزیابی فواید عملکردی در مدت‌های طولانی مورد نیاز است.

### تقدیر و تشکر

این مطالعه در قالب یک طرح پژوهشی بین دانشگاهی به انجام رسیده و عمده هزینه‌های آن به وسیله معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زابل تأمین شده است. بنابراین بدین وسیله از مساعدت‌های به عمل آمده تقدیر و تشکر می‌شود. همچنین از خدمات تکنیکی سرکارخانم متجدد در آزمایشگاه تخصصی بافت شناسی دانشکده پزشکی مشهد، بخش زنان و زایمان بیمارستان قائم (عج) و مساعدت‌های پرسنل آزمایشگاه کشت سلولی دانشکده پزشکی مشهد قدردانی می‌شود.

### References

1. Zivin JA, Choi DW. Stroke therapy. *Sci Am* 1991; 265: 56-63.
2. Bliss T, Guzman R, Daadi M, Steinberg GK. Cell transplantation therapy for stroke. *Stroke* 2007; 38: 817-26.
3. Schouten JW, Fulp CT, Royo NC, Saatman KE, Watson DJ, Snyder EY, et al. A review and rationale for the use of cellular transplantation as a therapeutic strategy for traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2004; 21:1501-38.
4. Harris DT. Cord blood stem cells: A review of potential neurological applications. *Stem Cell Rev* 2008, 4:269-74.
5. Ormerod BK, Palmer TD, Caldwell MA. Neurodegeneration and cell replacement. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2008; 363:153-70.
6. Broderick JP, Brott T, Tomsick T, Huster G, Miller R. The risk of subarachnoid and intracerebral hemorrhages in blacks as compared with whites. *N Engl J Med* 1992; 326:733-6.
7. Kornblum HI. Introduction to neural stem cells. *Stroke* 2007; 38:810-16.
8. Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004; 95:209-14.

نیم‌کره دچار هیپوکسی در گروه تجربی در مقایسه با گروه شم و همچنین قرارگیری سلول‌های نشان‌دار شده در ناحیه آسیب دیده تأییدی بر نتایج قبل بوده و این پیش فرض را تأیید می‌کند که برای درمان سکته مغزی ناشی از هیپوکسی، می‌توان از سلول‌های بنیادی خون بندناف استفاده نمود. البته این موضوع را نیز باید همواره مد نظر قرار داد که هیپوکسی ایسکمی ایجاد شده فقط منجر به ایجاد ضایعه در ناحیه قشر فرونتال نبوده و بقیه قسمت‌های مغز مثل قشر حرکتی را نیز در برداشته است، پس آزمون‌های رفتاری انجام شده و بهبود یا عدم بهبودهای حرکتی ممکن است به بخش‌های دیگر مغز مربوط شود. بنابراین باید یادآوری کرد که در مطالعه حاضر، آزمون‌های انجام شده به صورت عام و رنگ‌آمیزی و بررسی تغییرات سلولی به صورت خاص در ناحیه قشر فرونتال صورت گرفته است.

بنابراین با تکیه بر این حقیقت که سلول‌های تزریق شده داخل وریدی نتایج امیدوار کننده‌ای را برای درمان‌های بالینی نشان می‌دهد، به نظر می‌رسد شانس پیوند

9. **Sanberg PR, Willing AE, Garbuzova-Davis S, Saporta S, Liu G, Sanberg CD, et al.** Umbilical cord blood-derived stem cells and brain repair". *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1049:67- 83.
10. **Andres RH, Guzman R, Ducray AD, Mordasini P, Gera A, Barth A, et al.** Cell replacement therapy for intracerebral hemorrhage. *Neurosurg Focus* 2008;24(3-4):E16.
11. **Hidetoshi T, Ikuko M, Hitomi OA, Kosuke A, Kazuko W, et al.** Prostaglandin D2 Protects Neonatal Mouse Brain from Hypoxic Ischemic Injury. *J Neurosci* 2007; 27: 4303-12.
12. **De Ryck M, Van Reempts J, Borgers M, Wauquier A and Janssen PA.** Photochemical stroke model: flunarizine prevents sensorimotor deficits after neocortical infarcts in rats. *Stroke* 1989; 20; 1383-90.
13. **Hua Y, Schallert T, Keep R F, Wu J, Hoff J T, Xi G.** Behavioral tests after intracerebral hemorrhage in the rat. *Stroke* 2002; 33: 2478-84.
14. **MacLellan CL, Gyawali S, Colbourne F.** Skilled reaching impairments follow intrastriatal hemorrhagic stroke in rats. *Behav Brain Res.* 2006; 175(1):82-9.
15. **Bliss T, Guzman R, Daadi M, Steinberg GK.** Cell transplantation therapy for stroke. *Stroke* 2007; 38: 817-26.
16. **Ishibashi S, Sakaguchi M, Kuroiwa T, Yamasaki M, Kanemura Y, Shizuko I, et al.** Human neural stem/progenitor cells, expanded in long-term neurosphere culture, promote functional recovery after focal ischemia in mongolian gerbils. *J Neurosci Res* 2004; 78:215-23.
17. **Kelly S, Bliss TM, Shah AK, Sun GH, Ma M, Foo WC, et al.** Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:11839-44.
18. **Saporta S, Borlongan CV, Sanberg PR.** Neural transplantation of human neuroteratocarcinoma (hNT) neurons into ischemic rats: a quantitative dose-response analysis of cell survival and behavioral recovery. *Neuroscience* 1999; 91:519–25.
19. **Bliss TM, Kelly S, Shah AK, Foo WC, Kohli P, Stokes C, et al.** Transplantation of hNT neurons into the ischemic cortex: cell survival and effect on sensorimotor behavior. *J Neurosci Res* 2006; 83:1004 -14.
20. **Chen J, Zhang ZG, Li Y, Wang L, Xu YX, Gautam SC, et al.** Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. *Circ Res* 2003; 92:692-9.
21. **Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC.** Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol* 2002; 174:11-20.
22. **Borlongan CV, Hadman M, Sanberg CD, Sanberg PR.** Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required for neuroprotection in stroke. *Stroke* 2004; 35:2385-9.
23. **Xiao J, Nan Z, Motooka Y, Low WC.** Transplantation of a novel cell line population of umbilical cord blood stem cells ameliorates neurological deficits associated with ischemic brain injury. *Stem Cells Dev* 2005; 14: 722-33.
24. **Shyu WC, Lin SZ, Chiang MF, Su CY, Li H.** Intracerebral peripheral blood stem cell (CD34+) implantation induces neuroplasticity by enhancing beta1 integrin-mediated angiogenesis in chronic stroke rats. *J Neurosci* 2006; 26:3444-53.
25. **Kang SK, Lee DH, Bae YC, Kim HK, Baik SY, Jung JS.** Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Exp Neurol* 2003; 183:355-66.
26. **Chen J, Sanberg PR, Li Y, Wang L, Lu**

- M, Willing AE, et al.** Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke* 2001; 32(11): 2682-8.
27. **Willing AE, Lixian J, Milliken M, Poulos S, Zigova T, Song S, et al.** Intravenous versus intrastriatal cord blood administration in a rodent model of stroke. *J Neurosci Res* 2003; 73(3): 296-30.
28. **Vendrame M, Cassady J, Newcomb J, Butler T, Pennypacker KR, Zigova T, et al.** Infusion of human umbilical cord blood cells in a rat model of stroke dose-dependently rescues behavioral deficits and reduces infarct volume. *Stroke* 2004; 35(10): 2390-5.

Archive of SID