دانشگاه محقق اردبیلی
معاونت آموزشی و تحصیلات تکمیلی

دانشکده علوم

گروه آموزشی زیست شناسی

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد
رشته زیست شناسی گرایش علوم سلولی و مولکولی

بررسی تاثیر داروی فنی توئین در برهمکنش سلول بنیادی بند ناف انسانی بر داربست‌های سلول‌زدایی شده عصب سیاتیک موش صحرایی

پژوهشگر:
سمیه عباس زاده

اساتید راهنما:
دکتر اسداله اسدی
پروفسور صابر زهری

اساتید مشاور:
دکتر آرش عبدالملکی
دکتر فریبا محمودی

تابستان ۱۳۹۸

عنوان و نام پدیدآور:	بررسی تاثیر داروی فنی توئین در برهمکنش سلول بنیادی بند ناف انسانی بر داربست‌های سلول‌زدایی شده عصب سیاتیک موش صحرایی/ سمیه عباس زاده
استادان راهنما:	دکتر اسداله اسدی/ پروفسور صابر زهری
استادان مشاور:	دکتر آرش عبدالملکی/ دکتر فریبا محمودی
تاریخ دفاع:	
تعداد صفحات:	**۹۶ ص.**
شماره پایان‌نامه:	**زیست شناسی /**

چکیده:

هدف: هدف از این مطالعه بررسی تاثیر داروی فنی توئین در برهمکنش سلول بنیادی بند ناف انسانی بر داربست سلول‌زدایی شده عصب سیاتیک موش صحرایی تولید شده به روش ساندل بود.

روش‌شناسی پژوهش: گروه‌های آزمایشی به ترتیب زیر بود، ۱- گروه کنترل، ۲- گروه عصب سیاتیک سلول‌زدایی شده، ۳- گروه عصب سیاتیک سلول‌زدایی شده + سلول بنیادی بند ناف انسان، ۴- گروه عصب سیاتیک سلول‌زدایی شده + سلول بنیادی بند ناف انسان + داروی فنی توئین دوز ۰٫۵ میکرو گرم/ میلی لیتر، ۵- گروه عصب سیاتیک سلول‌زدایی شده + سلول بنیادی بند ناف انسان + داروی فنی توئین دوز ۱ میکرو گرم/ میلی لیتر. پس از برداشت عصب سیاتیک موش توسط عمل جراحی، وارد مرحله‌ی سلول‌زدایی شده و عصب سیاتیک برداشته شده با استفاده از محلول‌هایی مثل تریتیون X-100 و سدیم دِاکسی کولات سلول‌زدایی شد. سپس داربست‌های سلول‌زدایی شده از جنبه‌ی ساختاری و سپس از نظر کیفیت حذف سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات بافت شناسی داربست‌ها در سطح میکروسکوپ نوری و الکترونی صورت گرفت. سپس سلول‌های بنیادی استخراج شده بر روی داربست‌های سلول‌زدایی شده کاشته شد. سپس به روش آزمون رنگ سنجی MTT رشد و زنده مانی سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: پس از سلول‌زدایی به روش شیمیایی، حذف سلول‌ها از داربست توسط رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، پیکروفوشین و DAPI به تایید رسید. تعیین هویت سلول‌های استخراج شده به کمک آنالیز فلوسایتومتری و تمایز به سلول‌های استخوانی و چربی تایید شد. با استفاده از آزمون MTT نشان داده شد که دوزهای دارویی هیچ گونه سمیتی برای سلول‌های بنیادی ندارد.

نتیجه‌گیری: قابلیت چسبندگی و زنده مانی سلول‌های بنیادی بر روی داربست در دوز ۱ میکرو گرم/ میلی لیتر از داروی فنی توئین نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری افزایش یافته است.

واژه‌های کلیدی: داربست، سلول بنیادی، عصب سیاتیک، فنی توئین، MTT

۱- مقدمه و هدف

۱-۱- مقدمه

امروزه با توجه به کمبود افراد اهداء کننده و آلودگی ویروسی بافت‌ها، بر طراحی بافت با کمک سلول و داربست‌های گوناگون اعم از طبیعی و مصنوعی تاکید شده است. این امر منتهی به ایجاد مفهومی نوین در علم، با عنوان مهندسی بافت شده است. اصطلاح مهندسی بافت نخستین بار در سال ۱۹۸۵ توسط فونگ[1] مطرح گردید و از سال ۱۹۸۷ در سراسر جهان رونق پیدا کرد. تا به امروز مهندسی بافت در زمینه ترمیم بافت استخوان، غضروف، رگ‌های خونی و پوست پیشرفت‌های چشمگیری داشته است. مهندسی بافت به عنوان یک علم دانشگاهی شرایط مناسبی را برای پیشرفت و بهبود شیوه‌های درمانی برای درمان بیماری‌های مادرزادی و اکتسابی فراهم کرده است. مهندسی بافت بر مبنای ترکیبات اصلی بافت بیولوژیکی از جمله داربست، سلول و عوامل رشد بنیان نهاده شده است. در مهندسی بافت سلول‌ها اغلب در ساختارهای مصنوعی کاشت می‌شوند. به طوری که این ساختارهای سنتزی، قادر به تقلید از ساختار سه بعدی بافت‌ها می‌باشند. این ساختارهای مهندسی شده را داربست می‌گویند. داربست‌های بیولوژیکی مشتق شده از بافت و اندام‌های سلول‌زدایی شده به طور موفقیت‌آمیزی در مهندسی بافت مورد استفاده قرار گرفته است. مطالعات سلول‌زدایی نشان دادند که داربست‌های طبیعی حاصل از بافت‌های سلول‌زدایی شده با حفظ ترکیبات اصلی ماتریکس خارج سلولی می‌توانند بستر مناسبی را برای بررسی رفتارهای سلولی فراهم سازند. آماده‌سازی چنین داربست‌هایی بخش گسترده‌ای از پژوهش‌های زیست‌شناسی در سال‌های آتی را به خود اختصاص خواهد داد. به طوری که می‌تواند کاربردهای وسیعی در دانش پزشکی ترمیمی و مهندسی بافت داشته باشد

[1] Fong

.(Mahdavi Shahri et al., 2014)

۲-۱- داربست

داربست‌ها در نقش یک پشتیبان فیزیکی ظاهر شده و بستری مناسب برای اتصالات سلولی و تکوین بافتی را فراهم می‌سازند. داربست‌هایی که در مهندسی بافت مورد استفاده قرار می‌گیرند، دارای خصوصیاتی مانند استحکام و توان مکانیکی موثر در الگوبرداری از وضعیت موجود زنده، سازگاری زیستی با بافت مد نظر، قابلیت پیام‌دهی مناسب برای رشد بافت و جلوگیری از رد پیوند و داشتن شبکه متخلخل مرتبط با هدف تغذیه سلولی، دفع ضایعات سلولی به خارج از داربست، تشکیل ماتریکس خارج سلولی و رگزایی می‌باشند. درصد تخلخل و اندازه منافذ از خصوصیات مهم داربست‌ها در مهندسی بافت است (Polak and Bishop, 2006; Rezwan et al., 2006). داربست‌های به کار گرفته شده در مهندسی بافت عصبی شامل داربست‌های طبیعی، مصنوعی و ترکیبی(طبیعی- مصنوعی) می‌باشد (Barati et al., 2016). از جمله موادی که در تولید داربست‌های سنتزی استفاده می‌شوند، می‌توان به پلیمرهای تخریب‌پذیر مانند پلی لاکتیک اسید[2] و کوپلیمرهای آن، پلیمرهای قابل تزریق مانند پلی پروپیلن فومارات[3]، هیدروژل‌ها مانند پلی اتیلن گلیکول[4] و بیوسرامیک‌ها اشاره نمود. داربست‌های سنتزی در مقیاس زیادی تولید شده و دارای ویژگی‌های مانند استحکام، سرعت تجزیه، تخلخل و ساختار میکروسکوپی می‌باشند (Yang et al., 2008). داربست‌ها سنتزی به علت گران‌قیمت بودن، تولید مواد سمی، بروز پاسخ ایمنی و التهاب به هنگام تجزیه کاربرد چندانی ندارند (Barati et al., 2016). امروزه کاربرد داربست‌های طبیعی در مهندسی بافت به طور گسترده‌ای در سراسر جهان رونق پیدا کرده است. این داربست‌ها توانایی آن را دارند که محیطی مشابه ماتریکس خارج سلولی ایجاد کنند، در نتیجه از نظر پاسخ‌های مناسب ایمنولوژیک، رگزایی، توانایی بهبود چسبندگی سلولی و خاصیت هموستازی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند (Mahdavi Shahri et al., 2014).

---

[2] Polylactic Acid

[3] Polypropylene Fumarate

[4] Polyethylene Glycol

۱-۲-۱- داربست‌های طبیعی

داربست‌های طبیعی، داربست‌هایی هستند که از مواد موجود در طبیعت مانند ساختارهای بدن حشرات، گیاهان، حیوانات و انسان تهیه می‌شوند. این داربست‌ها از کلاژن، فیبرونکتین، فیبرین، ژلاتین، کیتوزان، آلژینات و غیره ساخته می‌شوند. کلاژن را از پوست، غضروف، زردپی و استخوان حیوانات استخراج می‌کنند. این نوع داربست‌ها توانایی تجزیه شدن را داشته و طی یک هفته تا یک ماه در بدن فرد تجزیه می‌شوند. داربست‌های تهیه شده از کلاژن در ترمیم بخش‌های آسیب دیده و انتقال مواد پروتئینی استفاده می‌شود. استفاده از این داربست‌ها به منظور ترمیم اعصاب محیطی موجب رشد آکسونی شده و عملکرد حسی و حرکتی را در محل آسیب ارتقاء می‌بخشند. فیبرونکتین از ساختار گلیکوپروتئینی بوده که برای ترمیم جراحات نخاعی و اعصاب محیطی استفاده می‌شود. آلژینات را از جلبک دریایی استخراج کرده و معمولاً به صورت نمک سدیم برای پرکردن حفره‌های ناشی از آسیب‌های مغز و نخاع استفاده می‌کنند. از آلژینات برای هدایت آکسونی در نواحی آسیب دیده دستگاه عصبی مرکزی استفاده می‌شود. کیتوزان پلیمری زیستی بوده که از داِستیلاسیون کیتین به دست می‌آید. اگر داِستیلاسیون کیتین بیشتر باشد تخریب پذیری آن افزایش می‌یابد. کیتوزان موجب بروز پاسخ‌های التهابی نشده و بستر مناسبی را برای رشد و تکثیر سلول‌ها فراهم می‌سازد. مواد طبیعی شرکت کننده در ساخت داربست‌ها شرایط لازم برای چسبندگی، تمایز، تکثیر و مهاجرت سلول‌ها را فراهم می‌کنند ولی خواص مکانیکی بسیار ضعیف و غیر قابل کنترلی دارند (Barati et al., 2016).

۱-۱-۲-۱- روش‌های سلول‌زدایی برای تهیه داربست‌های طبیعی

۱-۱-۱-۲-۱- روش‌های فیزیکی

تیمارهای فیزیکی به منظور سلول‌زدایی بافت هدف موجب تخریب غشاء سلول، آزاد شدن محتویات درون سلولی و افزایش سرعت حذف آن از ماتریکس خارج

سلولی[5] می‌شود. از روش‌های فیزیکی سلول‌زدایی می‌توان به انجماد و ذوب سریع، اِعمال نیروی مکانیکی مانند فشار و امواج صوتی اشاره کرد. در روش‌های فیزیکی مانند انجماد سریع، به کار گیری ازت مایع موجب تشکیل کریستال‌های یخ در داخل سلول و درنهایت تخریب غشای سلولی می‌شود. روش‌های فیزیکی معمولاً برای یک سلول‌زدایی موثر و کامل کافی نیستند و بایستی با تیمارهای شیمیایی همراه شوند.

۲-۱-۱-۲-۱- روش‌های شیمیایی

در تیمارهای شیمیایی به منظور سلول‌زدایی، از مواد شیمیایی مختلف مانند مواد اسیدی و بازی، دترجنت‌های یونی و غیریونی استفاده می‌شود. تیمارهای اسیدی و بازی برای حذف اجزای سیتوپلاسمی و اسیدهای نوکلئیک به کار گرفته می‌شوند. اسیدهایی که برای سلول‌زدایی استفاده می‌شوند شامل اسید استیک، اسید هیدروکلریک، اسید سولفوریک و هیدروکسید آمونیوم می‌باشد که به طور موثری موجب از بین رفتن غشای سلولی و اندامک‌های داخل سلولی می‌شود. از دترجنت‌های غیر یونی می‌توان به تریتون X-100 اشاره کرد. سدیم دودسیل سولفات[6] دترجنت یونی بوده که با توجه به ساختار دوگانه دوستش می‌تواند با غشاهای سلولی برهمکنش داده و سبب لیز شدن غشای سلول و هسته گردد.

۳-۱-۱-۲-۱- روش‌های آنزیمی

روش‌های آنزیمی سلول‌زدایی، شامل تجزیه پروتئین‌ها توسط پروتئازها و تجزیه اسید نوکلئیک‌ها توسط نوکلئازها است. تریپسین یکی از آنزیم‌های پروتئولیتیک کاربردی در فرایند سلول‌زدایی است. این آنزیم اتصالات پپتیدی را از انتهای کربوکسیلی اسیدهای آمینه آرژینین و لیزین می‌شکند. اِندونوکلئازها موجب شکست پیوند داخلی زنجیره‌ی ریبونوکلئیک اسید و دِاکسی ریبونوکلئیک اسیدی شده و منجر به تخریب آنها می‌شوند (Mahdavi Shahri et al., 2014).

---

[5] Extracellular Matrix

[6] Sodium Dodecyl Sulfate

۲-۲-۱- داربست‌های مصنوعی

داربست‌های مصنوعی را از مشتقات پلی لاکتیک اسیدها یا پلی گلیکولیک اسیدها تهیه می‌کنند. از فواید این داربست‌ها، تولید چندین داربست مشابه و تعیین خواص مکانیکی و شیمیایی آن است. پلی لاکتیک اسید را با به کار گیری روش‌های شیمیایی و بیولوژیکی از مواد تجدیدپذیری مانند نشاسته و شکر تولید می‌کنند. این پلیمر تجزیه پذیر بوده و توسط میکروارگانیسم‌ها به آب و دی اکسید کربن تبدیل می‌شود. پلی گلیکولیک اسید یک ترکیب آلیفاتیک پلی استر است. این پلی استر در برقراری ارتباط نواحی آسیب دیده استفاده می‌شود (Barati et al., 2016).

۳-۱- دستگاه عصبی

دستگاه عصبی کنترل و هماهنگی فعالیت‌های اصلی بدن را برعهده دارد، به طوری که بین بدن موجودات زنده و محیط هماهنگی ایجاد می‌کند. بخش حسی دستگاه عصبی اطلاعات را از محیط پیرامون جمع‌آوری کرده و بخش حرکتی آن پاسخگوی اطلاعات دریافتی است. دستگاه عصبی به دو بخش تقسیم می‌شود که شامل دستگاه عصبی مرکزی و دستگاه عصبی محیطی می‌باشد. دستگاه عصبی مرکزی خود شامل مغز، طناب نخاعی و دستگاه عصبی محیطی شامل اعصاب مغزی، اعصاب نخاعی و عقده‌های مربوط به آن است.

۱-۳-۱- دستگاه عصبی مرکزی[7]

دستگاه عصبی مرکزی بزرگترین بخش از دستگاه عصبی است که وظیفه تنظیم کلیه فعالیت‌های ارادی و غیرارادی بدن را برعهده دارد. این دستگاه دربرگیرنده مغز و طناب نخاعی است. مغز و طناب نخاعی توسط ساختارهای استخوانی جمجمه، ستون مهره و پرده مننژ محافظت می‌شوند.

---

[7] Central Nervous System

۲-۳-۱- دستگاه عصبی محیطی[8]

دستگاه عصبی محیطی بخشی از دستگاه عصبی بوده که در خارج از مغز و نخاع قرار دارد. دستگاه عصبی محیطی به دو بخش خودگردان(خودمختار) و سوماتیک(ارادی) تقسیم می‌شود. این دستگاه دربرگیرنده ۱۲ جفت عصب مغزی، ۳۱ جفت عصب نخاعی و گره‌های عصبی(عقده عصبی) متعدد است. دستگاه عصبی محیطی مسیر ارتباطی بین دستگاه عصبی مرکزی و بقیه قسمت‌های بدن می‌باشد که با تحریکات عصبی فعالیت‌های بدن را تنظیم می‌کند.

۱-۲-۳-۱- اعصاب نخاعی[9]

اعصاب نخاعی از ۳۱ جفت عصب نخاعی تشکیل شده که به وسیله سوراخ‌های بین مهره‌ای، ستون فقرات را ترک می‌کنند. عصب نخاعی، عصبی مختلط و متشکل از یک شاخه عصبی بزرگ(خلفی یا حسی) و یک شاخه عصبی کوچک(قدامی یا حرکتی) است. شاخه قدامی به ترتیب پوست، عضلات جداره قدامی- طرفی تنه و اندام‌ها را عصب دهی می‌کند. این در حالیست که شاخه خلفی پوست، عضلات مجاور ستون مهره‌های گردن و تنه را عصب دهی می‌کند.

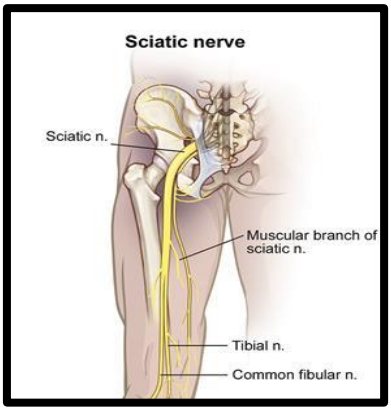
۱-۱-۲-۳-۱- عصب سیاتیک

عصب سیاتیک بزرگترین عصب بدن بوده که از شاخه‌ی قدامی اعصاب چهارم، پنجم کمری و یک تا سه اعصاب خاجی منشاء گرفته است. این عصب از طریق سوراخ سیاتیک بزرگ، لگن را ترک و وارد ناحیه سرینی شده و در انتها به سه شاخه‌ی تیبیال، پرونئال و سورال تقسیم می‌شود (شکل ۱- ۱). این عصب پا را تا پنجه عصب دهی می‌کند (علی, ۱۳۸۱).

---

[8] Periphral Nervous System

[9] Spinal Nerve



شکل ۱-۱- عصب سیاتیک

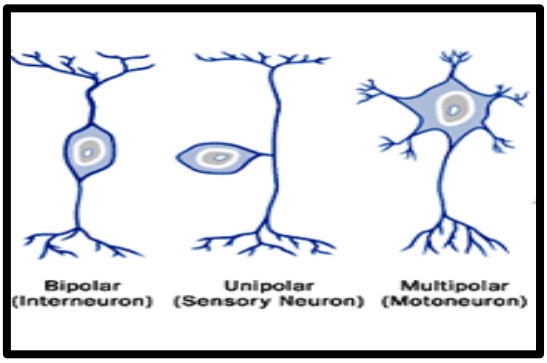
٤-۱- بافت عصبی

بافت عصبی قابلیت تحریک و انتقال تحریکات را دارد. بافت عصبی از سلول‌های عصبی و زوائد مربوط به آن تشکیل شده است. از خصوصیات این بافت ارتباط زوائد سیتوپلاسمی آنها با یکدیگر می‌باشد. بین سلول‌ها و زوائد آنها بافت پشتیبانی به منظور عبور رگ‌های خونی و تغذیه‌ی بافتی حضور دارد که بافت نوروگلی گفته می‌شود. سلول‌های عصبی در داخل و یا نزدیک دستگاه عصبی مرکزی مانند مغز، مخچه، نخاع و غیره قرار گرفته‌اند.

۱-٤-۱- نورون

سلول عصبی را نورون گویند. نورون‌ها هدایت پیام عصبی را برعهده دارند. نورون‌ها دارای زوائد سیتوپلاسمی فراوان، هسته درشت و یک یا دو هستک می‌باشند. سیتوپلاسم سلول‌های عصبی، نوروپلاسم نام دارد که تعداد زیادی میتوکندری در آن قرار گرفته است. نورون‌ها دارای تعداد زیادی زوائد سیتوپلاسمی کوتاه به نام دندریت و زوائد سیتوپلاسمی بلند به نام آکسون می‌باشند. سلول‌های عصبی بر اساس زوائد سیتوپلاسمی که از آنها خارج می‌شوند، انواع مختلفی از سلول‌های عصبی را ایجاد می‌کنند. این سلول‌ها شامل سلول‌های یک‌قطبی، سلول‌های دوقطبی و سلول‌های چندقطبی هستند (شکل ۱- ۲). سلول‌های تک‌قطبی معمولاً بدون دندریت و دارای یک آکسون هستند. تعداد سلول‌های تک‌قطبی بسیار اندک است. در سلول‌های دوقطبی از هر قطب سلول،

یک زائده سیتوپلاسمی خارج می‌گردد. به گونه‌ای کـه یکـی از زوائـد دنـدریت و دیگـری آکسون است. سلول‌های چندقطبی بیشـتر سـتاره‌ای شـکل بـوده و دارای چنـدین زائـده سیتوپلاسمی می‌باشند. این سلول‌ها یک آکسون و چندین دندریت دارند.



شکل ۱-۲- انواع نورون

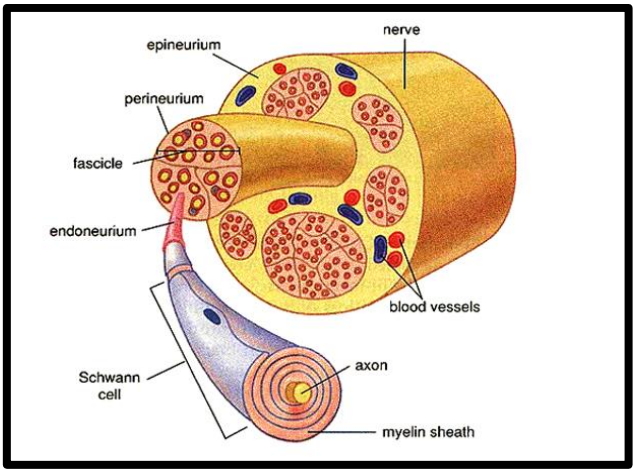
۲-٤-۱- بافت نوروگلی

این بافـت همبنـد داربسـتی را بـرای سـلول‌ها و رشـته‌های عصـبی فـراهم می‌سـازد. سلول‌های این بافـت شـامل آستروسـیت، الیگوندروسـیت، مزوگلیـا و آپانـدیما می‌باشـد. آستروسیت‌ها بزرگترین سلول‌های نوروگلی محسوب می‌شوند که دارای هسـته مرکـزی و زوائد سیتوپلاسمی طویل‌اند. گروهی از این سلول‌ها در اطراف رگ‌های خونی، عـده ای در اطراف جسم سـلولی عصـب و دسـته سـوم در حدواسـط ایـن دو گـروه قـرار می‌گیرنـد. الیگوندروسیت‌ها بیشترین تعداد سلول بافت نوروگلی را به خـود اختصـاص داده‌انـد. ایـن سـلول‌ها دارای هسـته‌ی کـروی کوچـک و زوائـد سـیتو پلاسـمی کـم می‌باشـند. الیگوندروسیت‌ها در اعصاب مرکزی به ویـژه در مـاده‌ی خاکسـتری رنـگ آن بـه صـورت زنجیره‌وار در طول رشته‌های عصـبی کشـیده شـده و عمـل مشـابه سـلول‌های شـوان در اعصاب محیطی را انجام می‌دهند. آستروسیت‌ها و الیگوندروسیت‌ها سـد خـون- مغـزی را بین مویرگ‌ها و سلول عصبی ایجاد کرده و در تغذیه و اکسیژن دهی نقـش دارنـد. گـروه دیگری از سلول‌ها مزوگلیا می‌باشد که هسته کشیده و زوائـد ظریـف و منشـعب کوتـاهی دارد. این سلول‌ها دارای فعالیت ماکروفاژی هستند. آپاندیما سلول‌های مـژه‌داری هسـتند که در مجرای مرکزی نخاع و بطن‌های مخ یافت می‌شوند. این سلول‌ها در بطن مخ توسط

زوائد قاعده‌ای خود تا عمق بافت عصبی هیپوتـالاموس فـرو می‌رونـد. سـلول آپانـدیما در حرکت مایع مغزی- نخاعی نقش دارد.

۵-۱- ساختار عصب

رشته‌های عصبی و غلاف میلـین پیرامـون آنهـا درون بافـت همبنـد سسـتی بـه نـام اِندونوریوم قرار گرفته و یک فاسیکل[10] را ایجاد می‌کنند. دور تا دور فاسیکل را یـک بافـت همبند نسبتاً سخت دارای رشـته‌های کـلاژن بـه نـام پِری‌نوریـوم احاطـه می‌کنـد. چنـد فاسیکل در کنار هم قرار می‌گیرند تا یک عصب را ایجاد کنند. دور تا دور عصـب را بافـت همبند متراکمـی احاطـه می‌کنـد کـه بـه آن اِپی‌نوریـوم می‌گوینـد (شـکل ۱- ۳). بـین فاسیکل‌ها عروقی وجود دارد که مسئول تغذیه عصب هستند. بعضی از اعصاب فقط حسی بوده یعنی تمام رشته‌های عصبی آن، حس را از انـدام حسـی بـه مغـز منتقـل می‌کننـد. بعضی دیگر از اعصاب حرکتی هستند یعنی فقط دستورات حرکتی را از مغـز بـه عضـلات اندام‌ها ارسال می‌کنند. بعضی اعصاب نیز وجود دارد که هر دو رشته حسـی و حرکتـی را دارند (ایرج، ۱۳۹۱).



شکل ۱-۳- ساختارعصب

[10] Fascicle

۱-۶- ضایعات اعصاب محیطی

افراد زیادی در سراسر جهان از آسیب‌های دستگاه عصبی مرکزی و محیطی رنج می‌برند (Hejcl et al., 2008). آسیب اعصاب محیطی ناشی از تروما، یکی از موضوعات مهم در جراحی ترمیمی به شمار می‌رود.

آسیب اعصاب محیطی در ۶ گروه دسته‌بندی می‌شوند:

۱- در آسیب نوع اول، غشای میلینی آکسون دچار آسیب شده، در حالی که خود آکسون دچار آسیب نمی‌شود. این آسیب‌ها در اثر سرما و گرمای شدید، تابش، آسیب الکتریکی، کوفتگی و کشش به وجود آمده و بهبودی آن چند ساعت تا چند روز طول می‌کشد.

۲- در آسیب نوع دوم، آکسون دچار آسیب می‌شود، ولی اِندونوریوم، پِری‌نوریوم و اِپی‌نوریوم دچار آسیب نمی‌شود. بنابراین تخریب والرین رخ داده و رشد آکسونی در امتداد غلاف اِندونوریوم صورت گرفته و بازیابی عملکردی با گذشت چند ماه حاصل می‌گردد.

۳- در آسیب نوع سوم، اِندونوریوم پاره شده اما پِری‌نوریوم و اِپی‌نوریوم سالم است. اگر آکسون از محل آسیب عبور کرده و غلاف اِندونوریوم خود را پیدا کند امکان ترمیم کامل و موثر فراهم خواهد شد.

۴- در آسیب نوع چهارم، رشته‌های منفرد عصبی قطع شده در حالی که پیوستگی تنه عصبی توسط غلاف اِپی‌نوریوم حفظ شده است. این نوع از جراحت برای ترمیم به جراحی نیازمند است.

۵- در آسیب نوع پنجم، عصب به طور کامل قطع شده و ترمیم بدون دخالت پزشک بسیار ضعیف خواهد بود (Sunderland, 1951).

۶- در آسیب نوع ششم چند نوع از آسیب ذکر شده با درصدهای مختلف بر یک عصب وارد می‌شود (Bain et al., 1989).

۱-۷- ترمیم عصبی

حدود ۲,۸ درصد از کل جراحت‌های تروما را جراحات اعصاب محیطی به خود اختصاص می‌دهد که می‌تواند موجب معلولیت گردد. ترمیم اعصاب محیطی فرایند بسیار پیچیده‌ای بوده که با تغییرات وسیع در سطح نورون و سلول‌های شوان همراه است. پس

از جراحت‌های شدید اعصاب محیطی و قطع ارتباطات آکسونی با جسم سلولی نورون‌ها، انتهای عصب آسیب دیده دچار فرایندی به نام تحلیل والرین می‌گردد. تحلیل والرین با تخریب قطعه‌ی انتهایی عصب آسیب دیده، شرایط لازم برای ترمیم آکسون و عصب دهی دوباره اندام‌ها را فراهم می‌سازد. سلول‌های شوان همزمان در پیرامون قطعه‌ی انتهایی عصب آسیب دیده، به فنوتیپ غیرمیلینه تمایز زدایی پیدا کرده و وارد روند تکثیر می‌شوند. بنابراین جذب ماکروفاژهای خونی به محل جراحت صورت گرفته و سلول‌های ماکروفاژی با عمل فاگوسیتوز، بقایای سلولی و میلین ناشی از تحلیل والرین را پاکسازی می‌کنند. در مرحله بعد سلول‌های شوان در امتداد غشای پایه خود ساختار لوله‌ای شکل به نام نوار بونگنر را ایجاد می‌کنند. آکسون‌های در حال ترمیم از خلال این کانال‌ها عبور کرده و به سمت اندام مورد نظرشان حرکت می‌کنند. سلول‌های شوان با ترشح فاکتور رشد عصبی و فاکتور نوروتروفیک مشتق شده از مغز، ساخت مولکول‌های ماتریکس خارج سلولی، تنظیم پاسخ ایمنی بدن و میلینه کردن آکسون‌های جدید سبب پیشرفت فرایند ترمیم اعصاب محیطی و بازیابی عملکرد آن می‌گردند (Ghayour 2015 ,). در جراحات شدید اگر شکاف ایجاد شده بین دو انتهای عصب قطع شده بیش از ۱ تا ۲ سانتی متر باشد بخیه زدن عصب به دلیل ایجاد کشش شدید مناسب نبوده و پر کردن شکافت حاصل از قطع شدن عصب با استفاده از گرافت‌های عصبی طبیعی یا مصنوعی صورت می‌گیرد. پژوهشگران دریافتند که ماتریکس خارج سلولی نقش بسیار مهمی در تسریع روند ترمیم اعصاب محیطی دارد. ساخت داربست‌های زیستی مشابه ماتریکس خارج سلولی اعصاب محیطی، شرایط مناسب برای رشد آکسون‌ها را فراهم خواهد کرد. بنابراین شناخت عملکرد اجزای ماتریکس خارج سلولی در روند ترمیم اعصاب محیطی یکی از ضروریات اساسی برای پژوهشگران حوزه ترمیم اعصاب و مهندسی بافت عصبی است (Lundborg, 2003). به کار گیری داربست‌هایی حاصل از پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی اعصاب محیطی و داربست‌های تهیه شده به وسیله‌ی روش‌های سلول‌زدایی در مقایسه با سایر داربست‌ها در ترمیم اعصاب محیطی تاثیرات موفق‌تری داشتند. یکی دیگر از مهم‌ترین رویکردهای پژوهشی استفاده از سلول‌های بنیادی در ترمیم اعصاب محیطی است. از فواید این سلول‌ها، قابلیت تمایز به سلول‌های شوان است. سلول‌های بنیادی عملکرد سیستم ایمنی با ترشح فاکتورهای نوروتروفیک کاهش و به تشکیل لایه میلینی در طی ترمیم اعصاب محیطی کمک می‌کنند.Ghayour et al (2015,).

۸-۱- ماتریکس خارج سلولی اعصاب محیطی

بخش عمده ای از ماتریکس خارج سلولی اعصاب محیطی در غشاء پایه سلول‌های شوان و غلاف اِندونوریوم قرار گرفته است. اجزای ماتریکس خارج سلولی شامل گلیکوپروتئین‌ها، پروتئوگلیکان‌ها، گلیکوزآمینوگلیکان‌ها، عوامل رشد، سیتوکاین‌ها و انواع آنزیم‌ها بوده که توسط سلول‌ها ترشح شده و فضای بین سلولی را پر می‌کند. در موجودات پرسلولی ماتریکس خارج سلولی وظیفه ایجاد بستر ساختاری، مهاجرت، تکثیر و تمایز سلولی را برعهده دارد. به منظور ترمیم آکسون‌ها آسیب دیده بایستی نورون‌های اعصاب محیطی دچار تغییرات سلولی مختلفی مانند تغییر بیان ژن و تغییر در انتقال آکسونی پروتئین‌ها گردند، تغییرات حاصل تحت تاثیر پیام‌های ماتریکس خارج سلولی است (Ghayour et ali, 2015).

۱-۸-۱- غشاء پایه

هر آکسون در عصب محیطی توسط سه لایه‌ی پیوندی دربرگرفته شده است که شامل اِپی‌نوریوم، پِری‌نوریوم و اِندونوریوم می‌باشد. لایه اِندونوریوم حاوی فیبروبلاست، فیبرهای کلاژن و رتیکولر است. غشاء پایه دارای سلول‌های شوان می‌باشد. سلول‌های شوان در پاسخ تماسی با آکسون‌ها غشاء پایه را تشکیل می‌دهند. به عبارتی در نقش یک ساختار حمایتی ظاهر می‌شوند. این ساختار از ماتریکس خارج سلولی دارای کلاژن تیپ IV، آگرین، فیبرونکتین، لامینین ۲ و ۸، نیدوژن است. کلاژن تیپ IV و لامینین، شبکه‌ای نامحلول را ایجاد کرده و نیدوژن پروتئین‌های غشاء پایه را به یکدیگر متصل می‌کند (Bryan et al., 2012; Khoshnoodi et al., 2008; Timpl and Duance, 1986). تنوع در ساختار غشاء پایه عموماً ناشی از تنوع ایزوفورم‌های لامینین است. پرلیکان و آگرین با جذب آب ساختار ژله مانند غشاء را به وجود آورده و در ارائه فاکتورهای رشد به سلول‌ها نقش دارند. سلول‌های شوان از طریق لامینین و به مقدار اندکی از طریق فیبرونکتین و کلاژن به غشاء پایه متصل می‌شوند. این اتصالات موجب تنظیم فنوتیپ و عملکرد سلول‌های شوان می‌شود. اتصالات آکسونی و سلول‌های شوان از طریق مولکول‌های چسبنده مانند فوق خانواده ایمونوگلوبولین‌ها همچون N-CAM[11] و

---

[11] Neural cell adhesion molecule

فــوق خــانواده کادهرین‌هــا همچــون E-Cadherin و N-Cadherin انجــام می‌پــذیرد (Ghayour et al., 2015).

۱-۱-۸-۱- کلاژن

کــلاژن از اصــلی‌ترین ترکیبــات بافــت همبنــد پســتانداران بــوده و ۳۰ درصــد کــل پروتئین‌های بدن انسان را تشکیل می‌دهد. تاکنون بیش از ۲۰ نــوع کلاژن شناخته شــده است. کلاژن پروتئینی است که در آن سه زنجیره پلی پپتیدی آلفا به شکل یــک مــارپیچ بزرگ به دور یکــدیگر پــیچ خورده‌انــد (Ganganna et al., 2012). رشــته‌های کــلاژن بــه وسیله پروتئوگلیکان‌های و کلاژن‌های بین رشــته‌ای بــه یکــدیگر متصــل شــده و ســاختار شبکه مانندی را بــه وجــود می‌آورنــد (Ottani et al., 2002). کــلاژن نقــش ســاختاری و مکانیکی داشته و در چسبندگی سلول‌ها به مــاتریکس خــارج ســلولی، مهــاجرت و تمــایز سلول نیز نقش دارند (Mahdavi Shahri et al., 2014). در اعصــاب محیطــی کلاژن‌هــای فیبریل ساز تیپ I، III، Vو XI و کلاژن بین رشــته‌ای تیــپ X و کلاژن‌هــای شــبکه ســاز تیپ IV و VI در ساختار اِندونوریوم و پِری‌نوریوم قرار دارند. کلاژن همراه با فیبریل تیــپ IX و کلاژن XIII در عرض غشایی حضور دارنــد. در ایــن میــان کــلاژن IV و I در فرآینــد ترمیم اعصاب محیطی نقش دارند (Masan et al., 2012).

۲-۱-۸-۱- اینتگرین

اینتگرین از جمله پروتئین‌های است که در اتصالات سلول- سلول و سلول- مــاتریکس نقش اساسی دارد. اینتگــرین‌هــا گیرنــده‌هــای هترو دایمری می‌باشند که بــا اتصال به زیرواحــدهای 8α و 8β ایجاد می‌گردند. انواع گیرنده‌های اینتگرینی وجود دارنــد کــه بــه لیگانــدهای ماتریکس خــارج ســلولی، بــا میــل ترکیبــی مختلــف متصــل مــی‌شــوند. اینتگــرین بــا کمــک بــه چســبندگی ســلول به مــاتریکس خارج سلولی می‌توانــد موجــب انتقال اطلاعات و پیامــدهی بــین بیــرون و درون ســلول شــده و در فرآینــد پراکنــدگی و مهــاجرت ســلولی اثر بگذارند (Augoff et al., 2011 Luo and Carman, 2007;).

۳-۱-۸-۱- الاستین

خصوصیات الاستیکی بسیاری از بافت‌هــا مانند شــش، پوســت و عروق خونی به دلیــل

وجود رشته‌های الاستین در فضای خارج سلولی این بافت‌ها است. مهمترین وظیفه الاستین ایجاد خاصیت ارتجاعی و مقاومتی بافت به هنگام رویارویی با فشارهای خارجی به خصوص ایجاد مقاومت در رگ‌ها، به منظور حفظ آنها در برابر فشارهای همودینامیک در هنگام سیستول و دیاستول بطنی است (Rozario and DeSimone, 2010).

٤-١-٨-١- گلیکوپروتئین‌ها

گلیکوپروتئین‌ها از ترکیبات ماتریکس خارج سلول هستند که جایگاه‌های اتصالی متعددی داشته و توانایی اتصال به کلاژن، پروتئوگلیکان‌ها و سطح سلول را دارند. از گلیکوپروتئین‌ها می‌توان به فیبرونکتین اشاره کرد (Rosso et al., 2004).

٥-١-٨-١- فیبرونکتین

فیبرونکتین دایمر گلیکوپروتئینی با وزن مولکولی حدود ۲۲۲ تا ۲۴۰ کیلو دالتون می‌باشد که از اجزای اصلی ماتریکس خارج سلولی است (Chen and Strickland, 2003). فیبرونکتین توسط ژنی منفرد کد گذاری می‌شود که از طریق پردازش متناوب[12] ۱۲ ایزوفورم را در موش و ۲۰ ایزوفورم را در انسان به وجود می‌آورد. فیبرونکتین در اعصاب محیطی توسط سلول‌های شوان و فیبروبلاست‌ها تولید و بیشتر در اِندونوریوم و سطح خارج غشاء پایه سلول‌های شوان یافت می‌شود. این گلیکوپروتئین از طریق تحریک رشد سلول‌های شوان و آکسون‌ها نقش بسیار مهمی در تنظیم روند ترمیم جراحات عصبی محیطی برعهده دارد. فیبرونکتین در دوران تکوین جنینی در آکسون‌ها و سلول‌های شوان به شدت بیان شده، در حالی که میزان آن در ماتریکس خارج سلولی اعصاب محیطی بزرگسالان کمتر است. فیبرونکتین مانند کلاژن، شبکه‌ای فیبریلی به وجود آورده و با داشتن دومین‌های اتصالی برای رسپتورهای سطح سلولی همچون اینتگرین و دیگر اجزاء ماتریکس خارج سلولی از قبیل رشته‌های کلاژن، فیبرین و گلیکوزآمینوگلیکان‌ها به شکل‌گیری ساختار سه بعدی ماتریکس خارج سلولی، چسبندگی، مهاجرت و تمایز سلول‌ها کمک می‌کند (Ghayour et al., 2015).

---

[12] Alternative Splicing

Title and Author:	**Investigating the effect of Phenytoin on the interaction of Human umbilical cord stem cells on Decellularized scaffolds rat scitatic nerve / Somayyeh Abbaszadeh**
Supervisor:	**A. Asadi (Ph.D.) / S. Zahri (Ph.D.)**
Graduation date:	
Number of pages:	

Abstract

Research Aim: The aim of this study was to investigate the effect of phenytoin on the interaction of human umbilical cord mesenchymal stem cells on prepared decellularized scaffold of sciatic nerve by sondell method.

Research method: The experimental groups were as follows: 1- control group, 2- decellularization sciatic nerve group, 3- decellularization sciatic nerve + human umbilical cord stem cell group, 4- decellularization sciatic nerve + human umbilical cord stem cell + Phenytoin (0.5 µg/ ml) group, 5- decellularization Sciatic Nerve + Human umbilical cord stem cell + Phenytoin (1 µg/ ml) group. After cessation of the sciatic nerve of the rats, by surgery, nerves enter the decellularization stage. The sciatic nerve was decellularization using solutions such as trytion X 100 and deoxycholate. Then scaffolds were investigated structurally and decellularization quality of scaffolds was evaluated. Histological studies of scaffolds were performed at the light and electron microscope levels. Then extracted stem cells were implanted on the decellularized scaffolds. Afterward, growth and survival of the cells were evaluated by MTT colorimetric assay.

Findings: After chemical decellularization, removal of cells from scaffolds was confirmed by hematoxylin-eosin, picrophosin and DAPI staining. Identification of the extracted cells was confirmed by flow cytometric analysis and differentiation into bone and adipocytes. Using the MTT test, it has been shown that phenytoin has no toxicity on stem cells.

Conclusion: The adhesion and viability of stem cells on the scaffold was significantly increased at the dose of 1 µg / ml of phenytoin compared to the control group.

Keywords: Scaffold, Stem cell, Scitatic nerve, Phenytoin, MTT.

University of Mohaghegh Ardabili
Faculty of Siences
Department of Biology

Dissertation submitted in partial fulfillment for the degree of
M.Sc. in Cellular and Molecular Sciences

Investigating the effect of Phenytoin on the interaction of Human umbilical cord stem cells on Decellularized scaffolds rat scitatic nerve

By:
Somayyeh Abbaszadeh

Supervisor:
Asadollah Asadi (Ph.D.)
Saber Zahri (Ph.D.)

Advisor:
Arash Abdolmaleki (Ph.D.)
Fariba Mahmoudi (Ph.D.)

30 June 2019