

بررسی فراساختاری اثر توام ژل کلاژن و مجرای پلی وینیلیدین فلوراید بر روی رژنراسیون عصب محیطی موش صحرایی

دکتر غلامحسین فرجاه^۱، دکتر تهمنه پیروی^۲، دکتر محمد تقی جغتایی^۳، دکتر مهدی مهدیزاده^۴

^۱ نویسنده مسئول: استادیار دانشگاه علوم پزشکی ارومیه E-mail: hfarjah@hotmail.com

^۲ استادیار دانشگاه علوم پزشکی ارومیه ^۳ استاد دانشگاه علوم پزشکی ایران ^۴ دانشیار دانشگاه علوم پزشکی ایران

چکیده

مقدمه: تشکیل میلین به بلوغ و تکامل سیتو اسکلتال آکسون و میتو کندری وابسته است. ژل کلاژن بصورت اختصاصی در تنظیم و تکامل سیتواسکلتان آکسون نقش دارد.

روش کار: این تحقیق یک مطالعه تجربی است که از ۴۸ سر موش صحرایی نر (۲۵۰-۲۰۰g) استفاده شد. پس از قطع عصب سیاتیک، ۱ سانتی متر از عصب برداشته شد و شکاف حاصله توسط یکی از ۴ روش زیر ترمیم شد (مجرای پلی وینیلیدین فلوراید یا PVDF (Ploy Vinyl Dene Fluoride) با ژل کلاژن، اتوگرافت، شم و کنترل). عصب سیاتیک در پایان هفته چهارم و دوازدهم توسط میکروسوپ الکترونی مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته ها: در پایان هفته چهارم پس از ترمیم، تعداد آکسون های میلین در گروه های اتو گرافت و ژل کلاژن اختلاف معنی داری ندارد ولی در پایان هفته دوازدهم، تعداد آکسون های بدون میلین در گروه اتوگرافت بیشتر از گروه ژل کلاژن است ($p < 0.01$). چگالی میکروتوبول ها در هفته دوازدهم پس از ترمیم، در گروه نرمال و اتوگرافت اختلاف معنی داری ندارند. ستیغ میتو کندری در گروه های آزمایش موازی با محور درازشان می باشد.

نتیجه گیری: با توجه به اثرات مثبت ژل کلاژن بر روی رشد و تکامل میکروتوبول ها و میتو کندری ها، ممکن است این ژل جهت ترمیم ضایعات عصب محیطی مفید باشد.

واژه های کلیدی: عصب سیاتیک، ژل کلاژن، میکروتوبول، میتو کندری، پلی وینیلیدین فلوراید

دریافت: ۸۵/۱۱/۷ پذیرش: ۸۶/۱۰/۱۱

مقدمه

قطع عصب و روش ترمیم آن از دیرباز مورد توجه محققین بوده است. پیوند اتوگرافت عصب در حال حاضر بعنوان یک روش طلایی (Gold standard) برای ترمیم شکاف عصبی به کار می رود. برداشتن عصب از بدن بیمار ایده آل نیست و گاهی غیر ممکن است، تشکیل نوروما و بافت لیفی از عوارض شایع در روش اتوگرافت است [۲،۱]. به لوله های طبیعی یا مصنوعی که شکاف بین دو انتهای عصب بریده شده را پل می زنند،

کانال راهنمای عصب یا NGC^۱ می گویند.

میزان ترمیم عصب در کانال راهنمای عصب به غلظت ژل کلاژن وابسته است [۳]. در یک تحقیق، هنگامی که از لوله سلیکون حاوی ژل کلاژن بعنوان کانال راهنمای عصب (جهت ترمیم عصب سیاتیک) استفاده گردید، مشاهده شد که سرعت جوانه زدن آکسون افزایش می یابد [۴]. استفاده از ژل کلاژن جهت تشکیل پری نورایوم در طی ترمیم عصب موثر است [۵].

^۱ Nerve Guidance channel

مطالعات نشان می دهد که مراحل طویل شدن آکسون به محل بافت، ماتریکس خارج سلولی، سلول های مجاور و عوامل هورمونی نوروون در حال ترمیم وابسته است [۶]. ژل کلاژن بعنوان یک ماتریکس مناسب برای نگهداری عوامل تغذیه کننده عصب یا سلول ها معرفی شده است [۷]. به دنبال ترمیم اعصاب محیطی، فیبروبلاست های اندونوریم در تولید کلاژن نوع I و فیبرونکتین شرکت می نمایند [۸]. نتایج تحقیقات نشان می دهد هنگامی که از ورید ژوگولار پر شده با ژل کلاژن بعنوان کانال راهنمای عصب استفاده شود، ترمیم عصب افزایش می یابد [۹]. پس از قطع عصب (در مقایسه با له شدن) بیان Collagen mRNA در سلول های فیبروبلاست اپی نورایوم افزایش می یابد [۱۰]. تحقیقات نشان می دهد که غلظت کمتر ژل کلاژن سبب بهبودی بالای ترمیم عصب می شود [۱۱]. همچنین استفاده از ترکیب ژل کلاژن، لامینین و فیبرونکتین محیط مناسبی را برای ترمیم آکسون ایجاد می نماید [۱۲]. مطالعات نشان می دهد که استفاده از ترکیب کلاژن نوع I و III بعنوان ماتریکس در داخل مجرای راهنمای عصب سبب تقویت ترمیم عصب می شوند [۱۳]. در تحقیقی دیگر هنگامی که از لوله سلیکون جهت ترمیم ضایعه عصب محیطی استفاده نمودند، مشاهده شد که استفاده از ژل کلاژن تاثیری در افزایش ترمیم عصب ندارد [۱۴].

مواد پیزوالکتریک موادی هستند که تغییر فشار و یا نیرو باعث تغییر بار الکتریکی لحظه ای در سطح آن ها می شود. پلی وینیلیدین فلوراید (PVDF)^۱ یک مجرای مصنوعی است که علاوه بر اجازه انتشار گازها و مایعات به داخل مجرا، از نفوذ ملکول های مهار کننده جلوگیری می نماید و با تولید شارژ سطحی، نقش مهمی در تمایز و تحریک انواع سلول ها از جمله سلول شوان و رشد آکسون دارد [۱۵]. تحقیقات نشان می دهد که PVDF ترمیم عصب محیطی را تقویت می نماید. کانال PVDF قطبی نسبت به غیر قطبی در افزایش کمی و کیفی

ترمیم عصب تاثیر بیشتری دارد [۱۷،۱۶]. لوله های قطبی شده PVDF نسبت به تغییرات مکانیکی حساس تر می باشند و بطور معنی داری حتی در تغییرات کم فیزیکی، شارژ سطحی تولید می کنند. بافت ایجاد شده در لوله های قطبی شده مثبت بطور معنی داری نسبت به لوله های قطبی منفی و یا غیر قطبی، تعداد آکسون میلیون دار و ضخامت میلین بیشتری دارد همچنین سطح مقطع عصب نیز بزرگتر است [۱۸]. در تحقیق دیگری مشخص شده است که زوائد نوروون های کشت داده شده در روی صفحات PVDF قطبی شده بیشتر از PVDF غیر قطبی رشد می نمایند [۱۹].

با توجه به نتایج به دست آمده از تحقیقات مختلف، ترکیب محرک های بیولوژیکی و استفاده از کانال راهنمای عصب از جنس مواد پیزوالکتریک، ممکن است برای تقویت ترمیم عصب و کسب نتایج بهتر مفید باشد [۱]. ژل کلاژن و خاصیت پیزوالکتریک هر یک به تنهایی موجب افزایش رژنراسیون می شوند. بررسی های انجام شده توسط مولفان مقاله نشان می دهد که مطالعه ای مبنی بر بررسی فراساختاری آکسون هنگام استفاده توأم آن ها تاکنون گزارش نشده است.

روش کار

پژوهش حاضر یک مطالعه تجربی است که بر روی ۴۸ سر موش صحرایی نر بالغ، نژاد Sprague-Dawley به وزن تقریباً ۲۵۰-۲۰۰ گرم انجام گرفت. حیوانات به صورت تصادفی به چهار گروه ۱۲ تایی تقسیم شدند:

- گروه PVDF با ژل کلاژن

- گروه اتوگرافت

- گروه Sham

- گروه کنترل

روش جراحی:

موش ها در ابتدا توسط ماده بیهوشی Ketamin به مقدار ۹۰ mg/kg و Xylazine به مقدار ۱۰ mg/kg به صورت داخل صفاقی بیهوش شدند. با ایجاد برشی در پوست ناحیه خلفی خارجی پای سمت چپ، عضله و فاسیا به آرامی کنار زده و عصب سیاتیک در فاصله بین

¹ Ploy Vinyl dene Fluoride

بریدگی سیاتیک تا محل دو شاخه شدن اعصاب تیبا و پروتئال مشترک نمایان گردید. سپس در حد واسط بین دو نقطه فوق و در محل یکسان برای گروه اتوگرافت و گروه PVDF + ژل کلاژن، قطعه‌ای از عصب به اندازه ۱۰mm قطع شد. از یک قطعه لوله PVDF (Harvard Apparatus Ltd) استریل شده با قطر داخلی ۱/۶mm و به طول ۱۴mm در محل شکاف استفاده شد. دو انتهای بریده عصب به صورت تلسکوپی داخل لوله گذاشته و با نخ نایلون ۱۰-۰ به دیواره لوله بخیه زده شد. تمام مراحل فوق در زیر میکروسکوپ جراحی (Olympus, SZX12, Japan) با بزرگنمایی ۲۰ و تحت شرایط استریل انجام شد. ۰/۳ میلی لیتر از ژل کلاژن (Roche) حاوی کلاژن I و III با غلظت ۱.۲۸mg/ml از طریق یک سرنگ و قبل از محکم نمودن بخیه اپی‌نوریال به داخل لوله تزریق شد. محلول فوق در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به ژل تبدیل می شود.

در گروه اتوگرافت قطعه بریده شده عصب ۱۸۰ درجه جابه‌جا و به دو انتهای بریده عصب توسط نخ ۱۰-۰ بخیه شد. در گروه شاهد (Sham)، عصب سیاتیک نمایان شد ولی قطع نگردید. در گروه کنترل حیوان سالم و دست نخورده است. پس از عمل جراحی، بخش‌های بریده عضله و پوست بخیه شدند.

شش موش از هر گروه در پایان هفته چهارم و پایان هفته دوازدهم جهت مطالعه بافت‌شناسی پرفیوژن شدند. عصب سیاتیک ۱ میلی‌متر قبل و ۱ میلی‌متر بعد از محل ترمیم (لوله PVDF یا اتوگرافت) بریده و نمونه‌ها تمام شب در ثابت کننده گلوئارالدهید ۲/۵ درصد و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. نمونه‌ها به سه قسمت ابتدایی، میانی و دیستال تقسیم شدند. به دنبال استفاده از تتراکسید اسمیوم یک درصد به مدت ۱/۵ ساعت، مراحل تهیه بلوک برای میکروسکوپ الکترونی انجام گرفت. توسط اولترامیکروتوم برش‌هایی به ضخامت ۵۰۰ نانومتر تهیه و با محلول تولوئیدین بلو ۱٪ به مدت ۳-۲ دقیقه رنگ آمیزی شدند. پس از تهیه برش نیمه نازک، محل

مناسب برای مطالعه میکروسکوپ الکترونی مشخص شد. سپس برش‌هایی به اندازه ۵۰ نانومتر تهیه شدند. برش‌ها بر روی شبکه مسی (Gride) منتقل و رنگ آمیزی شدند. سپس توسط میکروسکوپ الکترونی (Leo 906) در بزرگ‌نمایی‌های مختلف مطالعه و از نواحی مورد نظر توسط دوربین دیجیتال متصل به کامپیوتر عکس تهیه گردید. ابتدا در بزرگ‌نمایی ۳۰۰۰ آکسون‌های بدون میلین شمارش شدند. سپس با بزرگ‌نمایی ۶۰۰۰۰ تعداد لایه‌های میلین آکسون‌های میلین‌دار، شکل میتوکندری‌ها و تعداد میکروتوبول‌های درون آکسون‌ها بررسی گردید. تصاویر به نواحی شش گوشه که هریک به مساحت $0.35 \mu m^2$ اکسوپلاسم می باشند تقسیم و میکروتوبول‌ها در حداقل ۶۰ آکسون (۳۷۰ ناحیه شش گوش) شمرده شدند. تعداد متوسط میکروتوبول‌های هر ناحیه شش گوش توسط تعداد کل میکروتوبول‌های شمارش شده به تعداد کل نواحی شش گوش بدست آمد [۲۰].

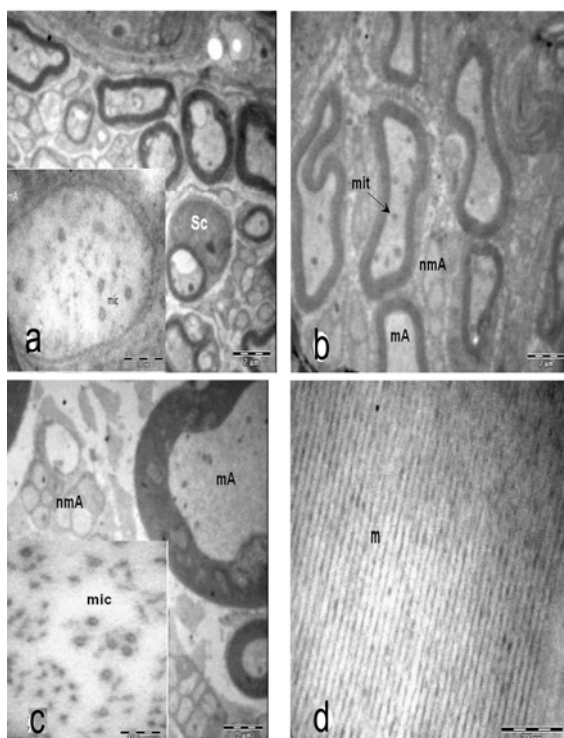
یافته‌ها جهت تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار spss و تست‌های ANOVA و t-test مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها

با ثابت نمودن نمونه‌ها توسط گلوئار آلدهید و تتراکسید اسمیوم، چربی غلاف میلین حفظ شده و در برش‌های عرضی بصورت یک حلقه تقریباً سیاه که پیرامون آکسون قرار دارد، دیده می‌شود. مطالعه میکروسکوپ الکترونی نشان می‌دهد که آکسون‌های فاقد میلین در ناودان‌های عمیق موجود در سطح سلول‌های شوان قرار دارند. برای تعیین تعداد آکسون‌های بدون میلین، غشای پایه و حضور نوروفیلانمنت‌ها ملاک تشخیص قرار گرفت. تعداد آکسون بدون میلین در بخش‌های میانی و انتهایی محل ترمیم عصب کمتر از ناحیه ابتدایی می‌باشد. میانگین آکسون‌های بدون میلین در پایان هفته دوازدهم پس از ترمیم در گروه ژل کلاژن نسبت به گروه اتوگرافت اختلاف معنی‌داری دارد ($p > 0.01$) (جدول ۱).

(b) گروه اتوگرافت: تعدادی آکسون بدون میلین که توسط یک سلول شوان احاطه می‌شوند ($\times 4683$)
 (c) گروه ژل کلاژن: تعدادی آکسون بدون میلین در حد واسط دو آکسون میلین‌دار ($\times 12630$)
 (d) مجاورت سلول شوان با آکسون میلین‌دار ($\times 21560$)
 (e) عصب نرمال: تیغه پایه (bl) در نزدیکی غلاف میلین ($\times 21560$)
 آکسون میلین‌دار (mA)، آکسون بدون میلین (nmA)، سلول شوان (Sc)، میتوکندری (mit)، تصویر کوچک در شکل های a و b: به وضعیت قرارگیری ستیغ‌های میتوکندری در گروه‌های ژل کلاژن و اتوگرافت (موازی با محور طولی میتوکندری) و c و عصب نرمال (عمود بر محور طولی) d توجه نمایند ($\times 35970$)

میکروسکوپ الکترونی مشخص می‌کند، که میکروتوبول‌ها در آکسون عصب نرمال با فاصله کم و مساوی قرار گرفته‌اند و در فضای بین آنها نوروفیلانمت‌ها دیده می‌شود (شکل ۲).



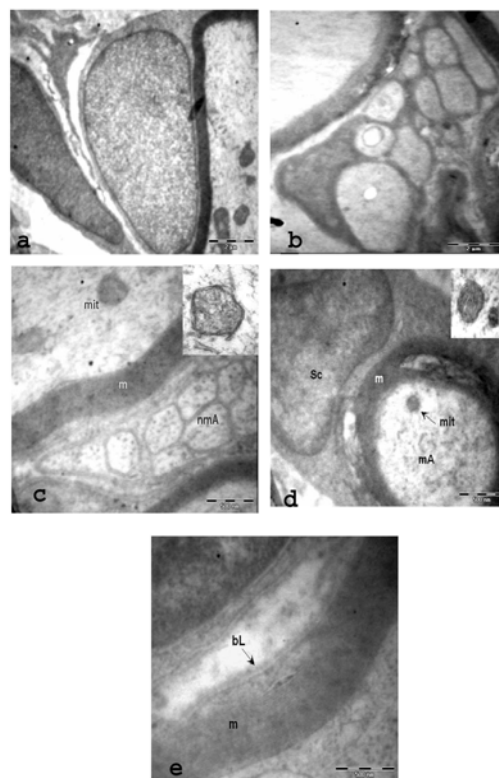
شکل ۲: تصویر میکروسکوپ الکترونی، از عصب رزتره در ناحیه میانی لوله PVDF، در مقایسه با اتوگرافت و عصب نرمال ۱۲ هفته پس از ترمیم ($\times 3597$)

(a) گروه Collagen Gel (b) گروه Autograft (c) عصب نرمال (d) منظم بودن خطوط تیره و روشن غشای میلین را نشان می‌دهد ($\times 60000$).

تصویر کوچک در شکل های a و b: آرایش میکروتوبول‌ها در آکسون میلین‌دارو آکسون بدون میلین، به دسته‌های ۲، ۳ و ۵ تایی میکروتوبول توجه فرمائید ($\times 60000$)
 میکروتوبول (mic)

میکروسکوپ الکترونی نشان می‌دهد که در گروه‌های آزمایشی غلاف میلین به خوبی در اطراف آکسون ایجاد شده است و میلین در واقع بخشی از سلول شوان می‌باشد، که بصورت مارپیچ دور آکسون می‌پیچد و با یک توالی تیره و روشن مشاهده می‌شود. با اندازه‌گیری توالی تیره و روشن میلین در پایان هفته چهارم و دوازدهم پس از ترمیم، ملاحظه گردید که ضخامت میلین در گروه اتوگرافت نسبت به گروه ژل کلاژن اختلاف معنی‌داری دارد ($p < 0.01$) (جدول ۱).

میکروسکوپ الکترونی نشان می‌دهد که سلول شوان در خارج توسط یک تیغه قاعده‌ای (basal lamina) محدود شده است و آن نیز به نوبه خود توسط اندونوریوم پوشیده می‌شود، به طوری که وجه تمایز سلول‌های شوان از فیبروبلاست‌ها، حضور تیغه قاعده‌ای (basal lamina) است (شکل ۱).

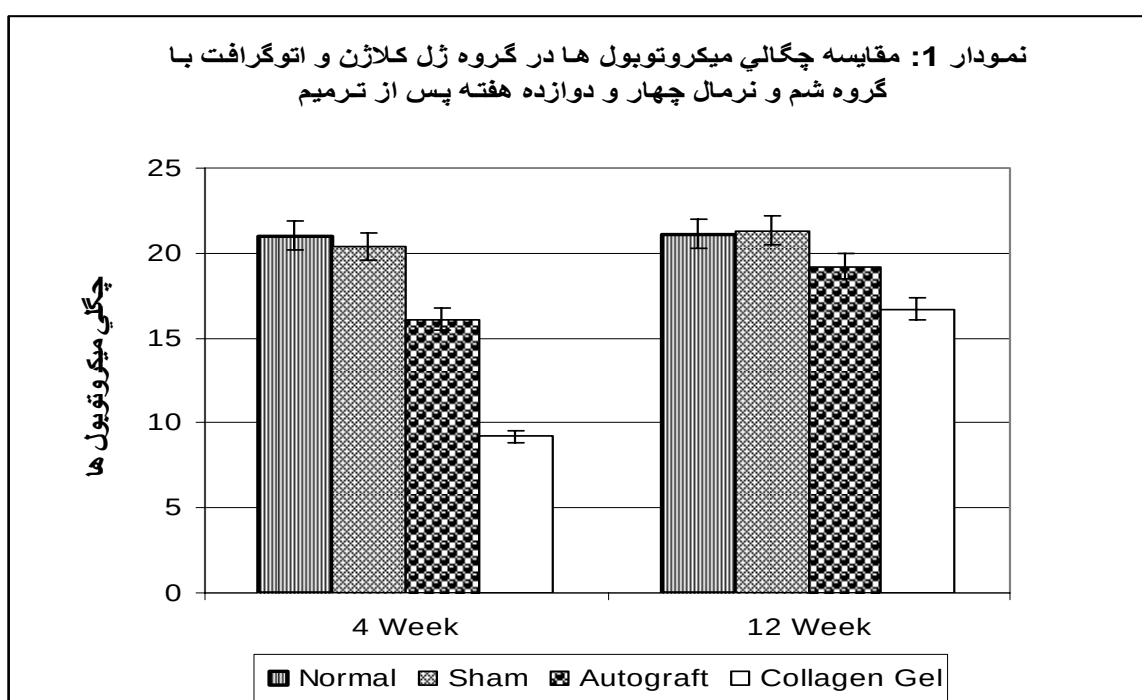


شکل ۱: تصویر میکروسکوپ الکترونی، از عصب رزتره در ناحیه میانی لوله PVDF، در مقایسه با اتوگرافت و عصب نرمال ۱۲ هفته پس از ترمیم
 (a) گروه ژل کلاژن: مجاورت سلول شوان با آکسون میلین‌دار، هسته سلول فیبروبلاست در مجاورت سلول شوان مشاهده می‌شود ($\times 4683$)

جدول ۱: مقایسه تعداد آکسون های بدون میلین و ضخامت غلاف میلین در هفته چهارم و دوازدهم پس از ترمیم (mean±SD)

گروه	تعداد آکسون بدون میلین (هفته چهارم)	تعداد آکسون بدون میلین (هفته دوازدهم)	ضخامت غلاف میلین (هفته چهارم)	ضخامت غلاف میلین (هفته دوازدهم)
ژل کلاژن + PVDF	۱۰۵۳۰±۸۸۰	۱۱۲۷۰±۵۱۱ ^a	۲۰۸±۲۵nm ^a	۵۱۱±۹۱ nm ^a
اتوگرافت	۸۱۱۱±۴۱۷	۱۷۲۸۰±۷۶۰	۳۱۰±۳۳ nm	۱۰۵۲±۱۹۱ nm
شم	۱۰۵۶۱±۲۴۵	۱۰۵۶۱±۲۴۵	۱۸۵۷±۱۹۵ nm	۱۸۹۰±۱۹۷ nm
کنترل	۱۱۴۵۰±۳۷۸	۱۱۴۵۱±۳۷۸	۱۹۵۰±۱۸۱ nm	۲۰۵۰±۱۸۱ nm

a اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه اتوگرافت $p < 0.01$ nm = نانومتر



چگالی میکروتوبول ها در عصب نرمال 24 ± 3 در میکرومتر مربع است.

آرایش فراگیری میکروتوبول ها در آکسون های در حال ترمیم در مقایسه با عصب نرمال متفاوت است. در پایان هفته چهارم پس از ترمیم، میکروتوبول ها در گروه اتوگرافت بصورت دسته های ۴-۵ تایی دیده می شوند. دسته ها با فواصل متغیری نسبت به هم قرار دارند و چگالی میکروتوبول ها در گروه اتوگرافت $16/1 \pm 2/7$ در میکرومتر مربع است. در حالی که در گروه ژل کلاژن، میکروتوبول ها غالباً بصورت دوتایی دیده

می شوند و چگالی آنها $9 \pm 2/8$ در میکرومتر مربع می باشد، که از لحاظ آماری نسبت به عصب نرمال اختلاف معنی داری دارند ($p < 0.01$). در پایان هفته ۱۲، چگالی میکروتوبول ها در گروه اتوگرافت نزدیک به عصب نرمال است ($19/2 \pm 3$ در میکرومتر مربع)، در حالی که چگالی آنها در گروه ژل کلاژن ($16/7 \pm 3/1$) می باشد ($p < 0.01$) (نمودار ۱).

میتوکندری در آکسون میله ای شکل و غالباً باریکتر از میتوکندری در سایر سلول های غیر عصبی است. البته گاهی میتوکندری گرد و بزرگی نیز دیده می شود.

میتوکندری‌ها در طول آکسون و با فواصل متغیر نسبت به هم پخش می‌شوند. ستیغ‌های میتوکندری در گروه سالم بیشتر بصورت عرضی جهت‌گیری نموده ولی در گروه های آزمایشی موازی با محور درازشان قرار دارند، در برش عرضی، حلقه‌های هم مرکز تیره و روشن به نظر می‌رسند. همچنین در گروه‌های آزمایشی گرانول‌های متراکم و کروی شکل (matrix granules) بیشتری نسبت به گروه کنترل در فضای بین ستیغی مشاهده می‌گردد (شکل ۱).

بحث

اگر چه پیوند اتوگرافت در حال حاضر به عنوان روش طلایی برای ترمیم شکاف عصبی به کار می‌رود، ولی ترمیم کامل نادر است [۲۱]. فقدان یک روش استاندارد و شناخت ناکافی اصول مکانیسم‌های ترمیم عصب از جمله دلایل قصور در تحقیقات NGC می‌باشند. بعنوان مثال اندازه شکاف ایجاد شده در عصب محیطی، خواص فیزیکی و شیمیایی NGC به کار برده شده، ویژگی‌های ماتریکس داخل لوله و یا تحت فشار قرار دادن عصب (بدون ایجاد شکاف در آن) بر میزان ترمیم تاثیر دارند.

با توجه به روش‌های مختلف ارزیابی توسط محققین مختلف، مقایسه بین این تحقیقات سخت و دشوار است. در بسیاری از تحقیقات انجام شده اندازه شکاف عصب کمتر از یک سانتی‌متر در نظر گرفته می‌شود که این امر مطمئناً بر نتایج حاصل از تحقیق بسیار موثر است. عصب سیاتیک شایع‌ترین مدل برای مطالعه ترمیم عصب در جوندگان می‌باشد، زیرا به راحتی قابل دسترسی است، به اندازه کافی بزرگ است و نهایتاً اینکه عصب مختلط حسی و حرکتی می‌باشد [۲۱].

استفاده از پلی مرهای شارژ شده همانند PVDF، ممکن است نکات بیشتری را درباره نقش جریان الکتریکی در کنترل ترمیم روشن نماید. نتایج نشان می‌دهد که برخلاف بزرگسالان، ترمیم بافت در جنین (به دلیل عدم حضور التهاب شدید) سریع‌تر انجام

می‌شود [۲۲].

هنگامی که عصب تحت فشار (Crush) قرار می‌گیرد، پوشش‌های اپی نورئوم و پری نورئوم آن سالم است و نیازی برای بخیه زدن وجود ندارد، در نتیجه ترمیم عصب به راحتی و سریع تر انجام می‌گیرد. در مطالعه حاضر نیز همانند سایر تحقیقات انجام شده مشاهده گردید که تعداد آکسون‌ها در ناحیه انتهایی محل ترمیم کمتر از ناحیه ابتدایی می‌باشد که این امر ممکن است به دو دلیل باشد، اولاً تعدادی از آکسون‌ها (به دنبال انتخاب مسیر غلط) نوروما تشکیل می‌دهند، ثانیاً ممکن است زمان بیشتری جهت رشد آکسون‌ها و رسیدن آن‌ها به انتهای کانال راهنمای عصب نیاز باشد [۲۳].

میکروتوبول‌ها در عصب سالم بصورت منفرد و با فاصله کم و مساوی قرار می‌گیرند [۲۴]. آنالیز میکروسکوپ الکترونی نشان می‌دهد که چگالی میکروتوبول‌های اکسونی در گروه اتوگرافت و گروه ژل کلاژن در پایان هفته چهارم با عصب نرمال اختلاف معنی داری دارد.

در پایان هفته دوازدهم در هر دو گروه افزایش می‌یابد ولی این افزایش در گروه اتوگرافت نزدیک به نرمال است. این امر به دلیل سالم بودن پوشش‌های اپی نورئوم و پری نورئوم و حضور تعداد زیادی سلول شوان در گروه اتوگرافت است که ترمیم عصب به راحتی و سریع تر انجام می‌گیرد. در گروه ژل کلاژن به دلیل استفاده از کانال راهنمای عصب، با تشکیل اپی نورئوم و عروق خونی، سلول‌های شوان از دو انتهای پروگزیمال و دیستال کانال تکثیر یافته و در داخل کانال تجمع می‌یابند. تحقیق حاضر نشان می‌دهد که حضور کلاژن به عنوان ماتریکس جهت رشد اکسون در کانال راهنمای عصب اهمیت دارد.

بزرگتر بودن مقطع آکسون در ناحیه ابتدایی نسبت به انتهایی محل ترمیم عصب، به دلیل تعداد بیشتر نوروفیلانمت‌ها و میکروتوبول‌ها و سایر پلی‌پپتیدها می‌باشد. انتقال آکسونی میتوکندری به میکروتوبول‌ها وابسته است ولی به میکروفیلانمت‌ها و جریان

اندوپلاسمیک رتیلولوم ارتباطی ندارد. چگالی میکروتوبول ها در هفته دوازدهم با افزایش قطر آکسون افزایش می‌یابد، این افزایش چگالی با افزایش قطر آکسون‌ها ارتباط دارد. با آنالیز میکروسکوپ الکترونی تعداد میکروتوبول ها در گروه PVDF + ژل کلاژن کمتر از گروه اتوگرافت است. افزایش تعداد میکروتوبول ها نشانه افزایش بیان پروتئین های سیتواسکلتال است که میلین سازی را تحت تاثیر قرار می دهد [۲۳].

در نورو ن های در حال رشد، میکروتوبول ها نقش مهمی در افزایش طول آکسون به سوی سلول هدف بازی می‌کنند. به دنبال قطع اعصاب محیطی و شروع دژنراسانس والرین، قطعه انتهایی آکسون آسیب دیده توسط سلول‌های اطراف هضم و جذب می‌شوند. در روز اول حادثه، انتهای قطعه ابتدایی آکسون، به دلیل تجمع محتویات آکسوپلاسمی تازه رسیده شامل ترکیبات سیتواسکلتی همانند نوروفیلانمنت ها، میکروتوبول ها و میکروفیلانمنت‌ها، همچنین میتوکندری و عناصر اندوپلاسمیک صاف متورم می‌شوند، که اصطلاحاً به آن مخروط رشد (Growth Cones) می‌گویند [۲۵]. در مخروط رشد، میکروتوبول ها بصورت دسته قرار دارند و توسط پل‌های عرضی که در فواصل منظم قرار گرفته‌اند به یکدیگر متصل می‌شوند، این پل‌ها از پروتئینی به نام دی‌نئین (Dynein) تشکیل شده است. این پروتئین در حضور ATP (Adenosine Triphosphate) و یک کوفاکتور سبب می‌شود برخی میکروتوبول ها نسبت به برخی دیگر از آنها بلغزند. افزایش طول ایجاد شده در

میکروتوبول های روی هم افتاده، به پیشروی مخروط رشد کمک می‌کند. مخروط‌های رشد بصورت پاهای نخ‌شکل، آرام آرام در طول سطح خارجی ستون‌های سلول‌های شوان پیشروی می‌کنند و بتدریج توسط آن‌ها احاطه می‌شوند [۲۶].

در سیستم عصبی تشکیل و تکامل غلاف میلین به تکامل میکروتوبول ها وابسته است [۲۷، ۲۰].

در تحقیق حاضر نیز مشاهده می گردد در گروه اتوگرافت میانگین ضخامت میلین در هفته چهارم و دوازدهم پس از ترمیم بطور معنی داری بیشتر از گروه ژل کلاژن+PVDF است و این مطلب با افزایش چگالی میکروتوبول ها ارتباط دارد. بطوری که در پایان هفته دوازدهم چگالی میکروتوبول ها در گروه اتوگرافت نزدیک به چگالی عصب نرمال است.

میتوکندری و میکرو توبول ها با هم همکاری می نمایند بطوری که میکروتوبول ها جهت بازسازی و افزایش طول خود نیاز به انرژی دارند که میتوکندری ها آن را تامین می کنند. میتوکندری ها هم جهت انتقال به ناحیه دیستال اکسون به میکروتوبول ها وابسته هستند.

نتیجه گیری

این مطالعه پیشنهاد می کند که با توجه به اثرات مثبت بر روی رشد و تکامل میکروتوبول ها و میتوکندری ها، ژل کلاژن ممکن است جهت ترمیم ضایعات عصب محیطی مفید باشد.

References

- 1- Hudson TW, Evans GR.D, and Schmidt CE: Engineering strategies for peripheral nerve repair. Clin Plast Surg. 1999; 26(4): 617-628.
- 2- Ansselin AD, Fink T, and Davey DF. An alternative to nerve grafts in peripheral nerve repair: Nerve guides seeded with adult schwann cells. Acta Churargica Austriaca. 1998; 30(147): 19-24.
- 3- Valentini FR, Aebischer P, Winn SR and Galletti PM. collagen-and Laminin containing gels impede peripheral nerve regeneration through semipermeable nerve guidance channels. Exp Neurol. 1987; 98(2): 350-6.
- 4- Satou T, Nishida S , Hiruma S , Tanji K , Takahashi M , Fujita S , et al. A morphological study on the effects of collagen gel matrix on regeneration of served rat sciatic nerve in silicone tubes. Acta pathol Jpn. 1986 ; 36(2): 199-208.
- 5- Takahashi M, satou T, and Hashimoto S. Experimental in vivo regeneration of peripheral nerve

- axons and perineurium guided by resorbable collagen film . *Acta pathol Jpn.* 1988; 38(12): 1489-502.
- 6- Sephel GC, Burrous BA, and kleinman HK. Laminin neural activity and binding proteins. *Dev Neurosci.* 1989; 11(4-5): 313-31.
- 7- Keeley R, Atagi T , Sabelman E , Padilla J , Kadlcik S , Keeley A , et al . Peripheral nerve regeneration across 14-mm gaps: a comparison of autograft and entubulation repair methods in the rat . *J Reconstr Microsurg.* 1993; 9(5): 349-58.
- 8- Siironen J, Sandberg M , Vuorinen V , and Roytta M. Expression of type I and III collagens and fibronectin after transection of rat sciatic nerve. Reinnervation compared with denervation. *Lab Invest.* 1992; 67(1): 80-7.
- 9- Wang KK, Costas PD , Jones DS , Miller RA , and Seckel BR . Sleeve insertion and collagen coating improve nerve regeneration through vein conduits. *J Reconstr Microsurg.* 1993; 9(1): 39-48.
- 10- Siironen J, Vuorio E , Sandberg M , and Royatta M . Expression of type I and III collagen and Laminin beta I after rat sciatic nerve crush injury . *J Peripher Nerve Syst.* 1996;1(3) : 209-21.
- 11- Labrador RO , Buti M , and Navaro X . Influence of collagen and laminin gels concentration on nerve regeneration after resection and tube repair . *Exp Neurology.* 1998 ; 149:243-252.
- 12- Chen YS, Hsieh CL, Tsai CC, Chen TH, Cheng WC, Hu CL, et al. Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin .*Biomaterials.* 2000; 21(15): 1541-7.
- 13- Keilhoff G, Stang F , Wolf G , and Fansa H . Bio-compatibility of type I/III collagen matrix for peripheral nerve reconstruction , *Biomaterials,* 2003 ; 24(16): 277-87.
- 14- Terris DJ, Cheng ET , Utey DS , Tarn DM , HO PR , and Verity AN . Functional recovery following nerve injury and repair by silicon tubulization: comparison of laminin-fibronectin, dialyzed plasma, collagen gel , and phosphate buffered solution . *Auris Nasus Larynx.* 1999 ; 26 (2): 117-22 .
- 15- Robert F, Pokholok DK and Hannett NM. Electrically charged Polymeric substrates enhance nerve fibre out growth in vitro. *Biomaterials.* 1992 ;13(3): 183-190.
- 16- Aebischer P, Valentini RF , Dario P ,Domenici C , and Galletti PM . Piezoelectric guidance channels enhance regeneration in the mouse sciatic nerve after axotomy. *Brain Research.* 1987; 436: 165-168.
- 17- Valentini RF , Sabatini AM , Dario P , and Aebischer P. Polymer electret guidance channels enhance peripheral nerve regeneration in mice. *Brain Research.* 1989; 480: 300-304.
- 18- Fine EG, Valentini RE , Bellamkonda R , and Aebischer P. Improved nerve regeneration through piezoelectric vinylidene fluoride trifluoroethylene copolymer guidance channels. *Biomaterials.* 1991; 12: 775-780.
- 19- Valentini RF, Vargo TG , Gardella JA JR , and Aebischer P. Electrically charged polymeric substrates enhance nerve fiber outgrowth in vitro. *Biomaterials.* 1992; 13(3): 183-90.
- 20- Lura L.Kirkpatric , Andrea S.Witt , H.Ross Payne , H. David Shine , and Scott T. Brady .Changes in Microtubule Stability and Density in Myelin-Deficient Shiverer Mouse CNS Axons. *The Journal of Neuroscience.* 2001; 21(7):2288-2297.
- 21- Pu LL.syed SA, Reid M , Patwa H. Effects of nerve growth factor on nerve regeneration through a vein graft across a gap.*Plastic and Reconstructive Surgery.* 1999; 104(5), 1379-1385.
- 22- Wang K, Nemeth IR, Seckel BR, Chakalis DP, Swann DA , Kuo JW , et al. Hyaluronic acid enhances peripheral nerve regeneration in vivo. *Microsurgery.* 1998; 18: 270-275.
- 23- Scott T.Brady, Andrea S. Witt, Laura L. Kirkpatrick , Sylvie M.de Waegh , Carol Readhead , Pang-Hsien Tu, and et al. Formation of compact myelin is required for maturation of the axonal cytoskeleton. *The journal of Neuroscience.* 1999; 19(17):7278-7288.
- 24- Lundborg G. Nerve regeneration and repair- A review. *Acta Orthop.* 1987; 58: 145-169.
- 25- Grill RJ, and Tuszynski M H. *CNS Regeneration: Axonal Responses to Injury*, California, Academic Press , USA , 1999 : 15-90
- 26- Thanos PK, Okajima S, and Terzis J K. *Ultrastructure and cellular biology of nerve regeneration.* *J of Reconstructive Microsurg.* 1998; 14(6): 423-437.