

تغییرات الکترومیوگرافیک و رفتاری بعد از پیوند سلول‌های بنیادی فولیکول مو به محل ضایعه‌ی نخاعی موش صحرایی توسط مدل فشاری

دکتر نوروز نجف‌زاده^۱، دکتر ملیحه نوبخت^۲، دکتر کوروش منصوری^۳، دکتر علی نیاپور^۱، دکتر محمد قاسم گل محمدی^۱

نویسنده‌ی مسوول: اردبیل، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، گروه علوم تشریحی و پاتولوژی n.najafzade@arums.ac.ir

دریافت: ۹۰/۹/۸ پذیرش: ۹۱/۵/۲

چکیده

زمینه و هدف: ضایعه نخاعی در دنیا از شیوع بالایی برخوردار است، هم اکنون جهت ترمیم علایم حسی و حرکتی بعد از ضایعات نخاعی روش درمانی خوبی وجود ندارد. به دنبال تحقیق و پژوهش پیرامون نحوه‌ی درمان ضایعات نخاعی، استفاده از سلول‌های بنیادی، دریچه‌ی نوینی را به روی محققین گشوده است. در این ارتباط سلول‌های بنیادی می‌تواند مشتق از منابع متفاوتی باشد. در این تحقیق با توجه به ویژگی خاص ناحیه‌ی بالج فولیکول مو که حاوی سلول‌های بنیادی چند ظرفیتی با قدرت تکثیری بالا و قابلیت دسترسی آسان می‌باشد، از این سلول‌ها جهت ترمیم ضایعات حاصله در نخاع استفاده می‌کنیم. در این مطالعه، سلول‌های بنیادی فولیکول مو بعد از جداسازی و کشت در آزمایشگاه، به مدل ضایعه‌ی نخاعی پیوند زده شد.

روش بررسی: سلول‌های بنیادی بیان‌کننده‌ی نستین از ناحیه‌ی بالج فولیکول موی موش صحرایی نژاد ویستار جدا شد، در مرحله‌ی بعد ۱۴ سر موش صحرایی ضایعه نخاعی شدند و سلول‌های بنیادی جدا شده به محل ضایعه پیوند زده شد. هشت هفته بعد از پیوند، بهبودی رفتاری حیوان با روش نمره‌دهی BBB، تغییرات فعالیت عضلانی با روش EMG، مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: نتایج بررسی رفتاری با مقیاس BBB نشان داد که نمره‌ی BBB در گروه پیوندی نسبت به گروه کنترل، زیاد بود و در پایان هفته‌ی هفتم و هشتم میزان بهبودی عملکرد حرکتی در گروه پیوندی بهتر بود ($P=0/023$) که این میزان برای گروه پیوندی $0/32 \pm 15/64$ و برای گروه شم $12/8 \pm 0/45$ بود و در حیوانات گروه پیوندی تخلیه‌ی شارژها و سیگنال‌های EMG طولانی بود ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری: ما در این مطالعه نشان دادیم که سلول‌های بنیادی فولیکول موی موش صحرایی، بعد از تزریق به داخل ضایعه‌ی نخاعی، می‌تواند در ترمیم و جایگزینی سلول‌های عصبی و گلیال تخریب شده موثر واقع شود و باعث بهبودی حرکتی و فعالیت عضلانی شود.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی فولیکول مو، ضایعه نخاعی مدل فشاری، تست BBB، الکترومیوگرافی

مقدمه

در سال ۲۰۰۴ مرکز ملی آمار آسیب نخاعی در آمریکا، در سال اعلام کرد که به طور تقریبی ۴۰ نفر در هر یک میلیون جمعیت این کشور را مبتلا می‌کند و در کل دنیا هم میزان شیوع ضایعه نخاعی را در این کشور ۱۱۰۰۰ مورد

۱- دکترای تخصصی علوم تشریحی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

۲- دکترای تخصصی بافت شناسی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی تهران، مرکز تحقیقات مقاومت میکروبی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی

۳- دکترای تخصصی طب فیزیکی و توانبخشی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی تهران

۱۵ تا ۴۰ نفر در هر میلیون مبتلا می‌شوند (۱). آسیب نخاعی خواه به علت تروما ایجاد شده باشد و یا علت غیر تروماتیک داشته باشد، باعث اختلال عملکرد قابل ملاحظه‌ای در عملکرد فرد می‌شود و به‌طور فیزیکی و روانی نه تنها خود فرد را مبتلا می‌کند بلکه خانواده و جامعه هم درگیر می‌شوند. هم‌اکنون درمان بالینی جهت ترمیم علائم حسی و حرکتی بعد از ضایعات نخاعی وجود ندارد و درمان‌های جراحی شامل برداشتن فشار از روی نخاع، ثابت نگهداشتن ستون فقرات، برداشتن قطعات استخوانی شکسته شده، خون و مواد ناشی از آسیب دیسک بین مهره‌ای برای جلوگیری از صدمات بیشتر انجام می‌گیرد (۲). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی در اغلب ارگان‌های بدن همچون عضله قلبی و اسکلتی، کبد، سیستم عصبی، سیستم خونی و اپیدرم قرار دارند (۳). سلول‌های بنیادی بالغین را می‌توان به‌صورت پیوند اتولوگ استفاده کرد و نیاز به تضعیف سیستم ایمنی هم نیست و مسایل اخلاقی هم مطرح نمی‌شود. از طرفی چون ظرفیت تکثیری سلول‌های بنیادی بالغین کم است و خاصیت تومورزایی آن‌ها هم کمتر است، پس سلول‌های بنیادی بالغین بهترین گزینه جهت پیوند مطرح هستند (۴). چندین سال است که ناحیه‌ی بالج، به‌عنوان محل سلول‌های بنیادی فولیکول مو شناخته شده است. ناحیه‌ی بالج نزدیک محل اتصال عضله راست کننده‌ی مو و غده‌ی چربی واقع شده است. علی‌الرغم نقش اساسی آن در هموستاز و ترمیم زخم، سلول‌های بنیادی این ناحیه کمتر مورد بررسی قرار گرفته است (۵). کوتسارلیس و همکارانش، سلول‌های حفظ کننده لیبیل را در ناحیه‌ی غلاف ریشه‌ای خارجی فولیکول موی موش مشاهده کردند (۶و۷) و کوبایاشی و همکارانش با کشت فولیکول موی موش صحرایی گزارش کردند که در فولیکول موی سبیل موش صحرایی، سلول‌های تشکیل دهنده‌ی کلونی کراتینوسیت در ناحیه‌ی بالج قرار دارند (۸). سلول‌های بنیادی ناحیه‌ی بالج فولیکول مو توانایی بیان مارکر

سلول‌های بنیادی نورونی نستین را دارند و می‌توانند بعد از پیوند به سلول‌های رده‌ی نورونی و گلیال تبدیل شوند (۹و۶). علاوه بر فولیکول مو، سلول‌های بنیادی دیگری با منشأ مزانشیمی از ناحیه‌ی درم پوست یافت شده است که توانایی تمایز به سلول‌های استخوانی، غضروفی، عضلانی و نورونی را دارند (۱۰). در جایگزین کردن سلول‌های از بین رفته در ضایعه‌ی نخاعی، سلول‌های بنیادی نورونی، اولین گزینه می‌تواند باشد. منابع اصلی این سلول‌ها از نواحی مختلف سیستم عصبی مرکزی که دارای تکثیر سلولی است، می‌باشد که شامل نواحی ساب و نتریکولار، بطن طرفی، ناحیه‌ی گیروس دنتیت، کورتکس، بطن‌های چهارم و کانال مرکزی نخاع می‌باشد. به دلیل اینکه سلول‌های بنیادی عصبی اندک هستند و تهیه‌ی آنها نیاز به روش‌های تهاجمی دارد و پتانسیل محدودی دارند تا در محیط کشت تکثیر پیدا کنند، بررسی پتانسیل ترمیمی سلول‌های بنیادی مشتق از بالج که از لایه‌ی اکتودرمی ایجاد می‌شود و در محیط آزمایشگاه توانایی تمایز به سلول‌های عصبی را دارد، در این مطالعه مورد توجه قرار گرفت. این مطالعه بر روی فولیکول موی موش صحرایی انجام شد و پس از کشت سلول‌های بالج فولیکول موی موش صحرایی و پیوند آن‌ها به محل ضایعه‌ی نخاعی و تغییرات رفتاری و الکترومیوگرافی مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

در این مطالعه‌ی تجربی از موش‌های صحرایی نژاد ویستارنر به وزن ۱۵۰ تا ۲۰۰ گرم استفاده شد. گروه‌بندی حیوانات به شرح زیر بود:

الف) گروه پیوندی: در تعداد ۱۴ سر موش صحرایی ویستار ضایعه‌ی نخاعی نوع فشاری ایجاد شد و سلول‌های بنیادی فولیکول مو تزریق گردید.

ب) گروه شم: در تعداد ۵ سر موش صحرایی که ضایعه نخاعی شده بودند فقط بافر HBSS تزریق شد.

ج) گروه کنترل: تعداد ۵ سر موش صحرایی به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد که لامینکتومی شده بودند و هیچ‌گونه ضایعه‌ای نداشتند و سلول هم دریافت نمی‌کردند.

اتاق نگهداری دارای نور و حرارت کافی بود. شرایط نوری حیوانات به صورت دوازده ساعت روشنایی و دوازده ساعت تاریکی بود. درجه‌ی حرارت اتاق در محدوده‌ی ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد حفظ شد. آب و غذای کافی برای حیوانات به صورت آزاد وجود داشت.

جهت جدا کردن فولیکول مو و ناحیه‌ی بالچ از روش تعدیل شده‌ی کوبیاشی و همکاران استفاده شد (۸ و ۱۱). در این روش بعد از بیهوشی حیوانات با اتر، صورت و سر حیوانات توسط محلول ۱:۱ بتادین و پراکسید هیدروژن به مدت سه دقیقه شستشو می‌شوند و به‌دنبال آن موهای ناحیه‌ی صورت تراشیده شده و با الکل ۷۰ درصد تمیز و ضد عفونی می‌شود و بافت لب بالا که حاوی فولیکول‌های موی سبیل موش است، بریده می‌شود. در این مطالعه بعد از برداشتن بافت لب بالا در زیر هود و محیط استریل، نمونه‌ها در محیط DMEM/F12 (اینویتروژن) حاوی پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر - اینویتروژن)، استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر - اینویتروژن)، آمفوتریسین B (۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر - سیگما) به مدت نیم ساعت قرار داده شد. پس از شستشوی نمونه‌ها در فسفات بافر، بافت‌های همبند اطراف فولیکول برداشته شد. نمونه به تکه‌های کوچک تقسیم شد و در محلول کلاژناز/دیسپاز (۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر - سیگما) و در درجه حرارت ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت نیم ساعت انکوبه شدند. بعد از نیم ساعت، فولیکول‌های مو به وسیله‌ی پنس ظریف از بافت لب بیرون کشیده شد و به پلیت‌های 35 میلی‌متر منتقل شدند و پس از ایجاد برش‌های عرضی از بالا و پایین ناحیه‌ی بالچ، با استفاده از تیغ بیستوری کوچک ناحیه‌ی بالچ جدا شد بعد از برداشتن کپسول کلاژن اطراف آن با بافر فسفات شستشو داده شده، آماده‌ی کشت گردید.

برای کشت سلول‌های ناحیه‌ی بالچ این مراحل طی شد (۱۲). ناحیه‌ی بالچ جدا شده در محلول ۰/۱ درصد اتیل‌دی‌آمین‌تترااسیتیک اسید (EDTA) و ۰/۱۲۵ درصد تریپسین (گیکو) به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای 37 درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. سلول‌های جدا شده با سرعت ۱۲۰۰ rpm به مدت ده دقیقه سانتریفوژ شدند و بعد از جداسازی، سلول‌ها در پلیت‌ایی که قبلاً با کلاژن نوع یک پوشیده شده بود، ریخته شدند. سلول‌ها در محیط DMEM/F12 حاوی ال-گلوتامین (3/4 میلی‌مول)، آدنین (۰/۱۳۵ میلی‌مول)، انسولین (5 میکروگرم در میلی‌لیتر)، کلراتوکسین (سیگما 10^{-9})، هیدروکورتیزون (۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، فاکتور رشد اپیدرمال (EGF) (۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، سیگما) و ۱۰ درصد FBS کشت داده شدند (۱۱). مدل ضایعه‌ی نخاعی مشابه روش تاوکا و همکارانش انجام شد (۱۳). به‌طور خلاصه، با کتامین و گزیلازین بیهوشی انجام شد. موش‌های صحرایی با استفاده از دستگاه استریوتاکس بی‌حرکت نگه داشته شدند تا ستون فقرات موقع جراحی لامینکتومی ثابت بماند. پوست روی ستون فقرات با تیغ بیستوری بریده شد و بعد از برش عضلات متصل شده به زایده خاری، لامینای مهره ده سینه‌ای با مته برداشته شد، بعد از آشکار شدن سخت شامه، وزنه ۲۰ گرمی به مدت ۲۰ دقیقه روی سخت شامه گذاشته شد تا نخاع را تحت فشار قرار دهد، در طول مدت جراحی دمای بدن حیوان با استفاده از لامپ رشته‌ای گرم نگه داشته شد.

ده روز بعد از ضایعه‌ی نخاعی پیوند سلولی انجام شد، محل ضایعه دوباره باز شد، بعد از پیپتاز کردن، تعداد ۴۰۰۰۰ سلول بنیادی در ۱۰ میکرولیتر بافر HBSS و با استفاده از سرنگ همیلتون (با اندازه‌ی سوزن ۳۰) به محل ضایعه تزریق شد، به‌طوری که ۵ میکرولیتر به مرکز ضایعه و ۵ میکرولیتر دیگر به بالا و پایین محل ضایعه تزریق شد. بعد از پیوند سلولی، حیوانات در مجاورت لامپ رشته‌ای قرار داده شدند و

یافته‌ها

بررسی رفتاری بعد از ضایعه و تایید مدل قبل از پیوند نتایج رفتاری پس از ضایعه‌ی نخاعی نوع فشاری نشان داد که از ۱۹ سر موش صحرایی که در این پژوهش ضایعه‌ی نخاعی نوع فشاری را دریافت کرده بودند (شکل ۱ A, B)، در هفته‌ی اول بعد از ایجاد ضایعه توانایی حرکت نداشتند.

تغییرات رفتاری پس از پیوند: یک روز بعد از پیوند در گروه‌های پیوندی (تجربی) و شم، پاهای فلج بودند و در موقع حرکت، پاهای را روی سطح صاف می‌کشیدند. این وضعیت در گروه کنترل که لامینکتومی شده بودند تا آخر هفته هشتم یکسان بود و حیوانات قادر بودند به راحتی حرکت کنند و نمره‌ی BBB آن‌ها کامل و ۲۱ بود. یک هفته بعد از پیوند سلول‌های بنیادی فولیکول مو به گروه پیوندی، امکان تحمل وزن یا گام برداشتن در اندام‌های خلفی دیده نشد و ارزیابی عملکرد حرکتی با استفاده از تست BBB، تفاوت چندانی بین گروه شم و پیوندی (سلول پیوند شده) نشان نداد و میزان بهبودی در گروه شم و پیوندی یکسان بود و حرکات خفیفی در فواصل در پاهای به‌خصوص ران و زانو دیده شد. در پایان هفته‌ی هفتم و هشتم میزان بهبودی عملکرد حرکتی در گروه پیوندی نسبت به گروه شم بهتر بود ($P=0/023$) که این میزان برای گروه پیوندی $15/64 \pm 0/32$ و برای گروه شم $12/8 \pm 0/45$ بود.

مطالعات آماری نشان داد که از هفته‌ی سوم تا پایان هفته هشتم میزان بهبودی حرکتی در گروه پیوندی نسبت به گروه شم بهتر شد. در دو هفته‌ی آخر مطالعه، در گروه پیوندی، تحمل وزن و هماهنگی حرکتی بین اندام‌های جلویی و عقبی در طی راه رفتن بهتر شده بود. در حالی‌که در گروه شم، بهبودی عملکرد حرکتی تا حد گروه پیوندی نبود. آنالیز آماری گروه‌های شم و پیوندی با استفاده از Independent T Test نشان

بعد از جراحی هر ۷ روز سفازولین تزریق شد، دو بار در روز روی مئانه‌ی حیوان فشار ملایمی وارد شد تا دفع ادرار صورت گیرد.

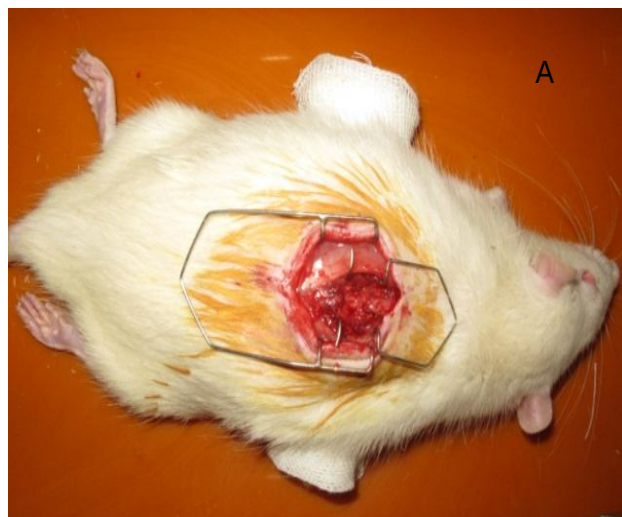
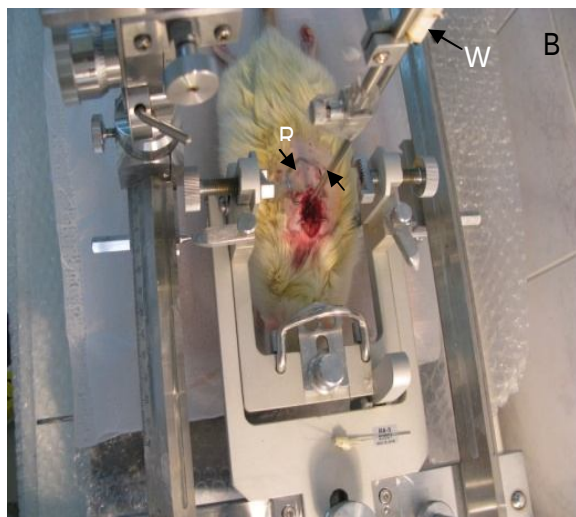
در تست رفتاری BBB (Basso Beattie Bresnahan) دامنه‌ی حرکتی حیوان دارای ضایعه نخاعی در دو مرحله ارزیابی می‌شود. در مرحله‌ی پیش تست جهت آشنایی حیوان با محفظه‌ی مدور که فیلمبرداری حیوانات از داخل آن صورت می‌گیرد، انجام می‌شود. در این مرحله حیوان به مدت ده روز و هر روز به مدت یک ساعت داخل محفظه مدور قرار داده می‌شود تا علایم استرس و ترس حیوان از بین برود. فیلمبرداری نیز توسط دوربین Canon G9 انجام می‌شود. در مرحله تست حیوان به مدت ۴ دقیقه داخل محفظه‌ی مدور قرار داده شده به حرکت تشویق می‌شود. براساس وضعیت حرکتی نمره‌ی صفر تا ۲۱ داده می‌شود (۱۵ و ۱۴).

بعد از پیوند، ثبت الکترومیوگرافی انجام شد، حیوانات با تزریق داخل صفاقی کتامین (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و گزیلازین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند برای انجام EMG سوزنی روی حیوانات از دستگاه EMG پورتابل و الکتروود سوزنی مخصوص استفاده شد. موقع انجام فرایند EMG، الکتروود داخل عضلات گروه فلکسور اندام تحتانی قرار داده شد و بدن حیوان از طریق دم به زمین وصل شد تا میزان نویز به حداقل برسد. بنابراین EMG سوزنی داخل عضلانی انجام شد. حیوانات تقریباً به مدت ۲ دقیقه روی سطح صاف الکترومیوگرافی شدند و بعد از اتمام الکترومیوگرافی از هر پا، مدت زمان ۳۰ ثانیه از امواج ثبت شده که روی ۱۰۰ میکرو ولت تنظیم شده بود، مورد بررسی قرار گرفتند (۱۶).

آنالیز آماری: آنالیز آماری با روش آماری ANOVA و آنالیز Bonferroni Post Hoc Analysis انجام شد و در هر دو روش P کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

به شش، به‌طور معنی‌داری افزایش یافته بود (نمودار ۲ و ۱)

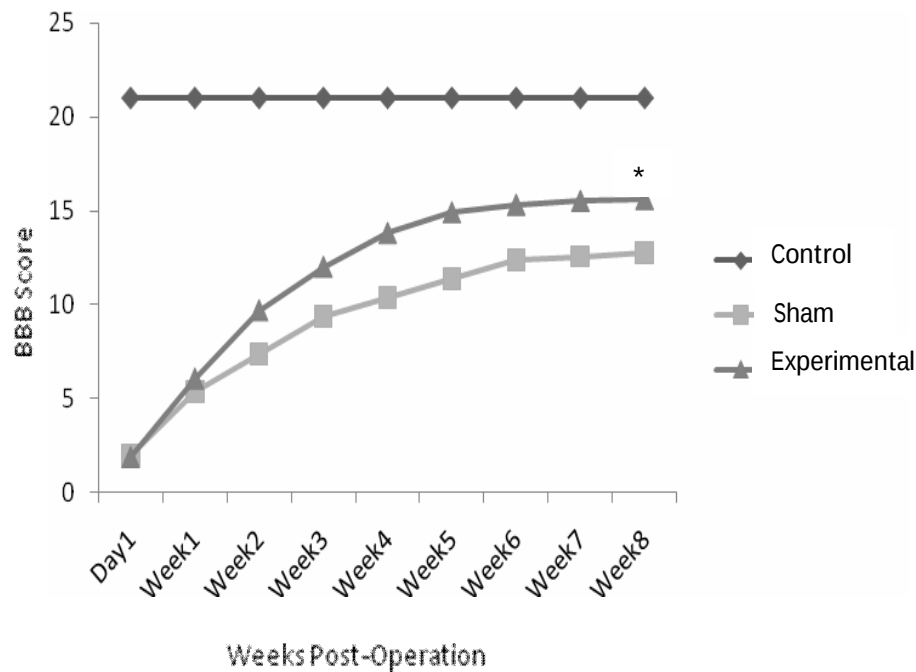
داد که بهبودی در دو هفته آخر در گروه پیوندی نسبت



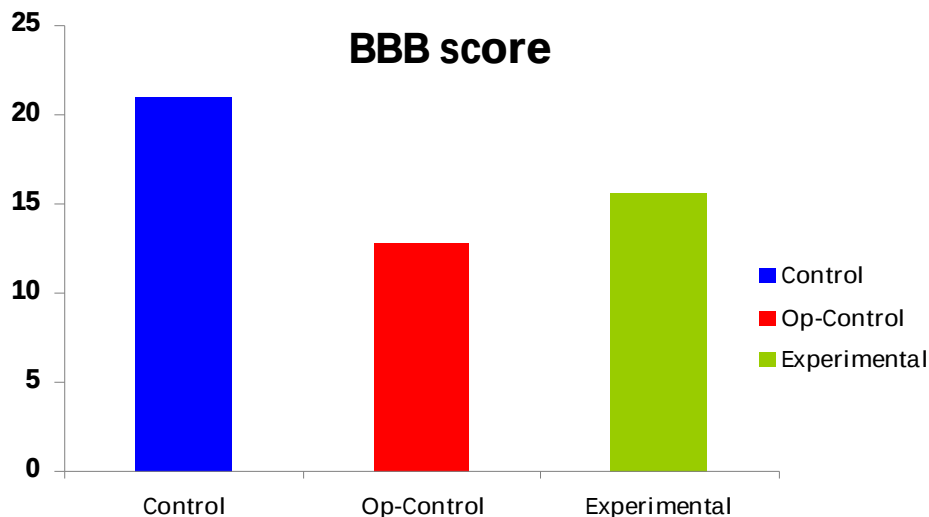
شکل ۱: روش دسترسی به نخاع از طریق لامینکتومی (A)، بعد از لامینکتومی حیوان به وسیله‌ی دستگاه استرنوسکوپ ثابت نگه داشته شده و میله‌ای باریک به وزن ۲۰ گرم داخل لوله‌ی استوانه‌ای به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفته است (B)، دستگاه EMG پرتابل (C) W=Weight

امواج ثبت شده مشاهده نشد ولی در گروه تجربی دیس شارژهای طولانی ثبت شد که نشان دهنده‌ی بهبودی نسبی عضلات گروه فلکسور ران موش صحرایی می‌باشد (شکل ۲).

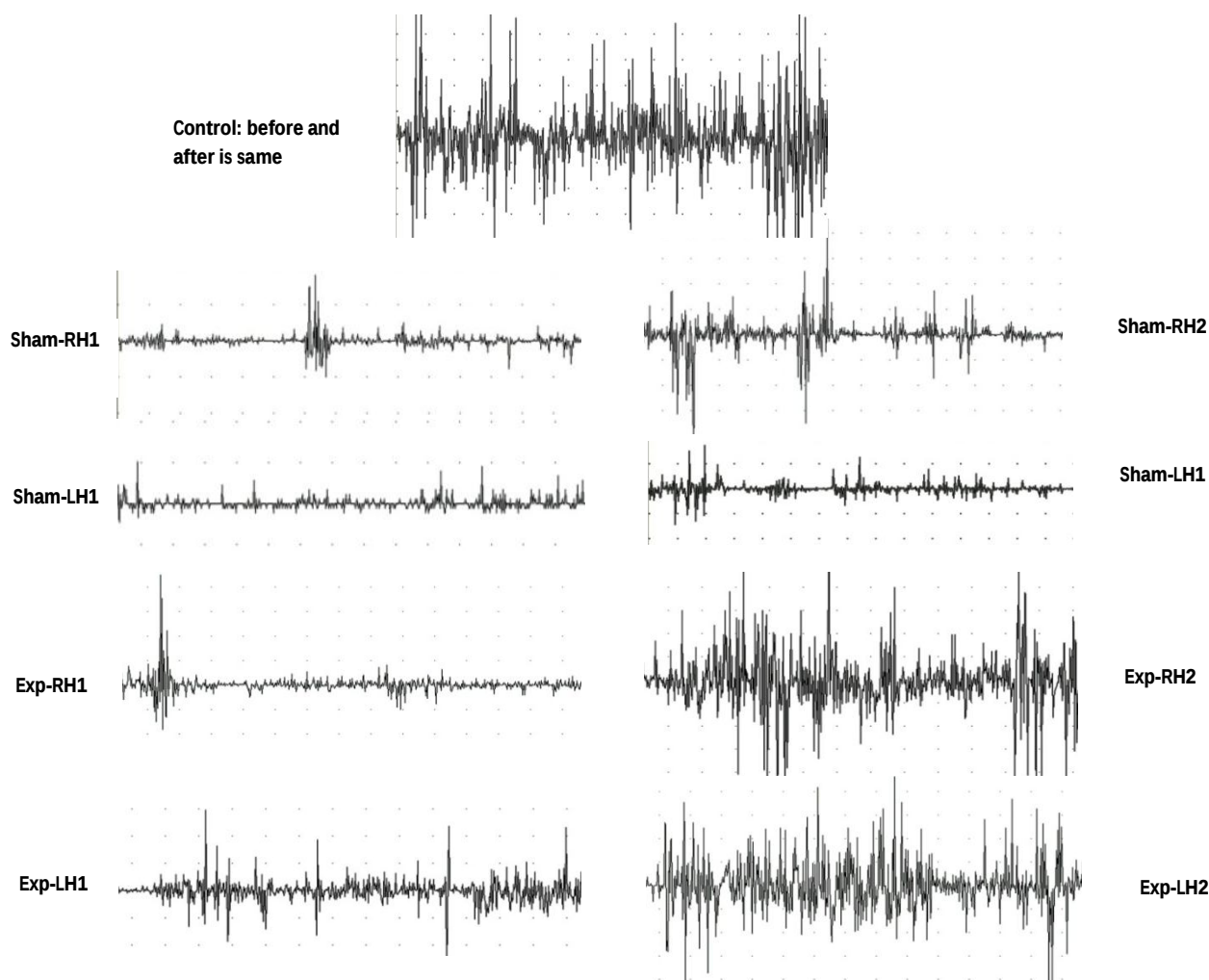
یافته‌های EMG قبل از پیوند و هشت هفته بعد از پیوند؛ نتایج این مطالعه نشان داد که در عضلات فلکسور ران گروه کنترل، EMG کامل ثبت شد و در گروه شش بعد از هشت هفته تغییرات قابل ملاحظه‌ای در طول



نمودار ۲: میزان بهبودی در گروه‌های کنترل، شام و تجربی در طی هشت هفته در گروه کنترل تغییراتی از هفته‌ی اول تا هشتم مشاهده نشد، ولی در هفته‌ی هشتم، تغییراتی در عملکرد حرکتی در گروه پیوندی مشاهده شد که نسبت به گروه شام معنی‌دار بود.



نمودار ۳: میانگین نمره‌ی BBB بعد از هشت هفته به‌طور قابل ملاحظه‌ای میزان بهبودی در گروه تجربی (پیوندی) نسبت به گروه شام بیشتر بود در گروه پیوندی میانگین نمره‌ی BBB $15/64 \pm 0/32$ بود و میانگین نمره‌ی BBB در گروه شام $12/8 \pm 0/45$ بود ($P=0/23$).



شکل ۲: نمونه‌ای از سیگنال‌های *EMG* سوزنی از عضلات گروه فلکسور ران. در گروه کنترل، قبل و بعد از پیوند امواج کاملاً ثبت شد. در گروه شم، امواج ثبت شده قبل از پیوند با بعد از پیوند تفاوت اندکی داشت اما در گروه تجربی تفاوت قابل ملاحظه‌ای در امواج قبل و بعد از پیوند مشاهده شد. عدد ۱ قبل از پیوند و عدد ۲ بعد از پیوند را نشان می‌دهد. *RH=Right Hindlimb, LH=Left Hindlimb*.

بحث

در زمینه سلول درمانی، سلول‌های بنیادی یکی از گزینه‌های درمان محسوب می‌شوند. این سلول‌ها قادرند تکثیر یافته، به رده‌های سلولی خاصی متمایز شوند. ظرفیت تمایزی سلول‌های بنیادی بالغین، فرصتی برای دانشمندان فراهم آورده است تا ارگان‌های آسیب دیده را با استفاده از سلول‌های بنیادی بالغ ترمیم دهند. به‌ویژه در بیماری‌های سیستم عصبی

از جمله بیماری پارکینسون، سکته مغزی و ضایعات نخاعی نیز از سلول‌های بنیادی استفاده می‌شود (۱۷). تحقیقات اخیر بر روی فولیکول مو نشان داده است که این سلول‌ها به انواع مختلف سلول‌ها متمایز می‌شوند (۷ و ۱۸) در این مطالعه، پیوند سلول‌های بنیادی جدا شده از فولیکول مو در درمان ضایعه نخاعی فشاری مورد بررسی قرار گرفت. تاکنون از چندین روش کیفی و کمی جهت بررسی تغییرات در فعالیت

حرکتی بعد از ضایعه‌ی نخاعی استفاده شده است. در این تحقیق ما شاخص‌های حرکتی را در موش‌های صحرایی که به‌صورت آزادانه حرکت می‌کردند با استفاده از دو روش جداگانه بررسی کردیم تا نتایج کمی و کیفی به‌دست بیاوریم. در این مطالعه برای اولین بار از دو روش EMG و BBB جهت تعیین عملکرد حرکتی حیوان استفاده شد. در پایان هفته‌ی هشتم میزان بهبودی عملکرد حرکتی در گروه پیوندی نسبت به گروه شم بهتر بود ($p=0/023$) که این میزان برای گروه پیوندی $15/64 \pm 0/32$ و برای گروه شم $12/85 \pm 0/45$ بود و همزمان امواج بهتری در EMG ثبت شد. در مطالعه‌ی دیگری که آموه و همکارانش انجام دادند، نشان داده شد که سلول‌های بنیادی فولیکول موی پیوند شده به عصب، قادر است عصب محیطی را ترمیم دهد و باعث اتصال آن شود، سلول‌های پیوندی هم توانستند به سلول‌های شوان بیان کننده ی GFAP تبدیل شوند (۱۹)، همچنین این محقق در مطالعه‌ی دیگری نشان داد که بعد از تزریق سلول‌های بنیادی موش سوری به محل ضایعه‌ی نخاعی نوع له شدگی نشان داد که سلول‌ها در محل ضایعه به سلول‌های شوان تبدیل می‌شوند و باعث بهبودی حرکتی نسبی می‌شوند $P<0/05$ (۲۱ و ۲۰) که این یافته‌ها با نتایج ما هماهنگی دارد. سایر بلم و همکارانش سلول‌های نورال کرست مشتق از فولیکول مو را به نخاع ضایعه‌ی دیده موش تزریق کردند بعد از پیوند سلول‌های بنیادی نورال کرست اپیدرمی به نخاع موش، سلول‌ها زنده می‌مانند و با نورون‌های میزبان ادغام می‌شوند و این سلول‌ها در نخاع مهاجرت و تکثیر پیدا نمی‌کنند و باعث بهبودی عملکرد حرکتی در تست BBB می‌شوند (۲۲)، همچنین مطالعات لی و همکارانش در سال ۲۰۱۱ نشان داد که سلول‌های مشتق از ناحیه‌ی بالچ نسبت به سلول‌های مشتق از ناحیه‌ی پایلای درم باعث بهبودی بیشتری در محل ضایعه‌ی نخاعی می‌شود (۲۳) که این یافته‌ها با یافته‌های ما در این مطالعه سازگار است. دلیل این مساله می‌تواند این باشد که

سلول‌های بنیادی فولیکول مو منشا اکتودرمی دارند و در محل ضایعه‌ی نخاعی به سلول‌های نورونی تبدیل می‌شود و یا این سلول‌ها در محل آسیب فاکتورهای تولید می‌کند که باعث رشد مجدد آکسونی و ترمیم عصبی می‌شوند (۲۴ و ۱۱). در EMG، بین سیگنال‌های ثبت شده و فعالیت عضلانی ارتباط مستقیمی وجود دارد، هر چه قدر سیگنال‌های ثبت شده طولانی و با دامنه‌ی بالا باشند فعالیت عضلانی هم بهتر است، یکی دیگر از نتایج ما ثبت امواج EMG با ارتفاع زیاد در گروه پیوندی نسبت به گروه شم بود که نشان دهنده ی بهبود عملکرد عضلانی است علاوه براین، در حیوان‌های گروه پیوندی نمره ی BBB نسبت به گروه شم، بهتر بود. این دو نتیجه تایید کننده ی اثر سلول‌های بنیادی فولیکول مو روی بهبود ضایعه‌ی نخاعی است. مطالعات زیادی فعالیت EMG را در عضلات اندام‌های تحتانی موش صحرایی بررسی کرده‌اند، هرچند بنظر می‌رسد اطلاعات کمی راجع به فعالیت عضلانی در بعد از پیوند به محل ضایعه نخاعی وجود دارد. جهت بررسی بهبود حرکتی در مدل ضایعه‌ی نخاعی موش صحرایی از مقیاس نمره‌دهی BBB به‌طور معمول استفاده می‌شود. به‌نظر می‌رسد که تغییراتی که در حرکت حیوان ایجاد می‌شود تنها با استفاده از مقیاس BBB، قابل ارزیابی نیست، بنابراین بهتر است از روش‌هایی که اجازه‌ی آنالیز شاخص‌های مختلف حرکتی همچون خصوصیات الکترومیوگرافیک را می‌دهند استفاده شوند. علی‌الرغم، استفاده گسترده از موش‌های صحرایی، به‌عنوان مدل‌های پیوندی برای بررسی بهبودی عملکرد حرکتی، مطالعات کمی از روش‌های کمی برای آنالیز اختلالات حرکتی هنگام راه رفتن استفاده کرده‌اند (۲۵). تاکنون مکانیسم دقیق ترمیم ضایعات نخاعی و بهبودی حرکتی در موش‌های صحرایی مشخص نشده است. اما یکی از مکانیسم‌های احتمالی رشد مجدد آکسون‌های آسیب دیده و رسیدن این آکسون‌ها به هدف است، مکانیسم احتمالی دیگر به‌دنبال آسیب، آرایش آناتومیک آکسون‌های بالا و پایین

اتولوگ و در دسترس جهت بهبودی ضایعات نخاعی و آسیب‌های عصبی پیشنهاد می‌شود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که از سرکار خانم دکتر ناهید رهبر روشندل، آقای دکتر مسعود محمودیان اعضای هیات علمی گروه فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران به خاطر مساعدت و همکاری در انجام این مطالعه قدردانی نمایند.

References

- 1- Lim P, Tow A. Recovery and regeneration after spinal cord injury: A review and summary of recent literature. *Ann Acad Med Singapore*. 2007; 36: 49-57.
- 2- Reier P. Cellular transplantation strategies for spinal cord injury and translational neurobiology. *J Am Socie Exp Neuro Therap*. 2004; 1: 424-51.
- 3- Mimeault M, Batra SK. Recent progress on tissue-resident adult stem cell biology and their therapeutic implications. *Stem Cell Rev*. 2008; 4: 27-49.
- 4- Wong CE, Paratore C, Dours-Zimmermann MT, et al. Neural crest-derived cells with stem cell features can be traced back to multiple lineages in the adult skin. *J Cell Biol*. 2006; 175: 1005-15.
- 5- Paus R, Cotsarelis G. The biology of hair follicles. *N Engl J Med*. 1999; 341: 491-7.

ضایعه است که اجازه‌ی عبور سیگنال‌ها از ناحیه‌ی ضایعه را می‌دهد و باعث بهبودی حرکتی می‌شود (۲۶ و ۲۷). این نتایج پیشنهاد می‌کند که سلول‌های بنیادی فولیکول مو می‌توانند باعث بهبودی آسیب نخاعی شوند بنابراین، این سلول‌ها به عنوان منبع اتولوگ و در دسترس جهت بهبودی ضایعات نخاعی و آسیب‌های عصبی می‌باشند.

نتیجه گیری

سلول‌های بنیادی فولیکول مو می‌توانند باعث بهبودی آسیب نخاعی شوند. بنابراین، این سلول‌ها به عنوان منبع

- 6- Amoh Y, Li L, Katsuka K, Penman S, Hoffman RM. Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair-follicle bulge stem cells can form neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102: 5530-4.
- 7- Cotsarelis G, Sun TT, Lavker RM. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell*. 1990; 61: 1329-37.
- 8- Kobayashi K, Rochat A, Barrandon Y. Segregation of keratinocyte colony-forming cells in the bulge of the rat vibrissa. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90: 7391-5.
- 9- Amoh Y, Aki R, Hamada Y, et al. Nestin-positive hair follicle pluripotent stem cells can promote regeneration of impinged peripheral nerve injury. *J Dermatol*. 2012; 39: 33-8.
- 10- Sellheyer K, Krahl D. Cutaneous mesenchymal stem cells: status of current

- knowledge, implications for dermatopathology. *J Cutaneous Pathol*. 2010; 37: 624-34.
- 11- Mignone JL, Roig-Lopez JL, Fedtsova N, et al. Neural potential of a stem cell population in the hair follicle. *Cell Cycle*. 2007; 6: 2161-70.
- 12- Yang JY, Lee JK, Rhee KJ, Kim KC, Hong UP, Lee JB. A comparative study of behavioral and immunohistological changes after spinal cord injury between young and adult rats. *J Korean Orthop Assoc*. 2004; 39: 522-30.
- 13- Taoka Y, Okajima K, Uchiba M, et al. Activated protein C reduces the severity of compression-induced spinal cord injury in rats by inhibiting activation of leukocytes. *J Neurosci*. 1998; 18: 1393-8.
- 14- Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*. 1995; 12: 1-21.
- 15- Basso DM, Fisher LC, Anderson AJ, Jakeman LB, McTigue DM, Popovich PG. Basso mouse scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *J Neurotrauma*. 2006; 23: 635-59.
- 16- Skinner SA, Transfeldt EE, Mehbod AA, Mullan JC, Perra JH. Electromyography detects mechanically-induced suprasegmental spinal motor tract injury: review of decompression at spinal cord level. *Clin Neurophysiol*. 2009; 120: 754-64.
- 17- Korblyng M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med*. 2003; 349: 570-582.
- 18- Oshima H, Rochat A, Kedzia C, Kobayashi K, Barrandon Y. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell*. 2001; 104: 233-45.
- 19- Amoh Y, Li L, Campillo R, et al. Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102: 17734-8.
- 20- Amoh Y, Hamada Y, Aki R, Kawahara K, Hoffman RM, Katsuoka K. Direct transplantation of uncultured hair-follicle pluripotent stem (hfPS) cells promotes the recovery of peripheral nerve injury. *J Cellular Biochemistry*. 2010; 110: 272-7.
- 21- Amoh Y, Li L, Katsuoka K, Hoffman RM. Multipotent hair follicle stem cells promote repair of spinal cord injury and recovery of walking function. *Cell Cycle*. 2008; 7: 1865-9.
- 22- Sieber-Blum M, Schnell L, Grim M, Hu YF, Schneider R, Schwab ME. Characterization of epidermal neural crest stem cell (EPI-NCSC) grafts in the lesioned spinal cord. *Mol Cell Neurosci*. 2006; 32: 67-81.
- 23- Liu F, Uchugonova A, Kimura H, et al. The bulge area is the major hair follicle source of nestin-expressing pluripotent stem cells which can repair the spinal cord compared to the dermal papilla. *Cell Cycle*. 2011; 10: 830-9.
- 24- Ding Y, Kastin AJ, Pan W. Neural plasticity after spinal cord injury. *Curr Pharm Des*. 2005; 11: 1441-50.
- 25- Majczynski H, Maleszak K, Gorska T, Slawinska U. Comparison of two methods for

quantitative assessment of unrestrained locomotion in the rat. *J Neuroscience Methods*. 2007; 163: 197-207.

26- Raineteau O, Schwab ME. Plasticity of motor systems after incomplete spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci*. 2001; 2: 263-73.

27- Ballermann M, Tse AD, Misiaszek JE, Fouad K. Adaptations in the walking pattern of spinal cord injured rats. *J Neurotrauma*. 2006; 23: 897-907.

Electromyographic and Behavioral Changes after Transplantation of Hair Follicle Stem Cells into Rats with Spinal Cord Injury by Compression Model

Najafzadeh N¹, Nobakht M², Mansoori K³, Niapour A¹, Golmohammadi MG¹

¹Dept. of Anatomy and Pathology, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

²Dept. of Histology and Neurosciences, Microbial Resistance Research Center, Cellular and Molecular Research Center, Tehran university of Medical Sciences, Tehran, Iran

³Dept. of Physical Medicine and Rehabilitation, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Corresponding Author: Najafzadeh N, Dept. of Anatomy and Pathology, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

E-mail: n.najafzade@arums.ac.ir

Received: 29 Nov 2011 **Accepted:** 23 Jul 2012

Background and Objective: Spinal cord injury (SCI) has a high incidence rate in the world. However, until recently, there has been no reliable treatment available for its sensory and motor complications. Utilization of stem cells has opened new insights for treatment of SCI. Hair follicle stem cells (HFSCs) are multipotent, have high proliferative potential, and easily accessible. Here, we isolated HFSCs and transplanted them to Rats with spinal cord injury by compression model.

Materials and Methods: HFSCs were isolated from the bulge area of Wistar rat whisker follicles. The SCI model was induced in 14 rats, and cultivated HFSCs were transplanted to the spinal cord lesion sites. Functional recovery was assessed by Basso–Beattie–Bresnahan (BBB) scale and muscular activity changes were evaluated with electromyography (EMG) 8 weeks following the transplantation.

Results: Behavioral assessments with BBB test showed that scores in transplanted animals were higher than the control group. Functional recovery in the transplanted group were better eight weeks after transplantation ($p=0.023$) and BBB scores were 15.64 ± 0.32 compared to 12.8 ± 0.45 in the sham group. Moreover, the signal amplitude of the needle EMG records of the lower extremity muscles increased in transplanted rats.

Conclusion: Our results show that transplantation of HFSCs to the site of SCI could be useful for repair and replacement of degenerated neuronal and glial cells.

Keywords: Hair follicle stem cells, Compression model of spinal cord injury, BBB test, Electromyography, Bulge