تاثیر ژل کلاژن بر روی رژنراسیون عصب سیاتیک در لوله پلی وینیلیدین فلوراید (مطالعه فانکشنال و هیستولوژی)

غلامحسین فرجاه [1]، محمد تقی جغتایی [2]، مهدی مهدیزاده [3]، ملیحه نوبخت [4]، ملک سادات نعیمی [5]

۱- استادیار، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه
۲- استاد، دانشگاه علوم پزشکی ایران
۳- دانشیار، دانشگاه علوم پزشکی ایران
٤- استادیار، دانشگاه علوم پزشکی ایران
٥- پزشک عمومی

یافته / دوره هفتم / شماره ۳ و ۴ / پاییز و زمستان ۸۴ / مسلسل ۲۶

چکیده

دریافت مقاله: ۸۴/۵/۱۴، پذیرش مقاله: ۸۴/۸/۱۷

مقدمه: محدودیت دسترسی به محل‌های دهنده مناسب برای پیوند عصب، ضرورت تحقیق جهت یافتن جانشین مناسب برای پیوند عصب را توجیه می کند. هدف از این تحقیق مطالعه اثر مجرای پیزو الکتریک و ژل کلاژن بر روی رژنراسیون عصب بود.

مواد و روش ها: این تحقیق یک مطالعه تجربی است که از ۴۸ سر موش صحرایی نر (gr ۲۵۰-۲۰۰)استفاده شد. پس از قطع عصب سیاتیک، ۱ سانتیمتر از عصب برداشته شد و شکاف حاصله توسط یکی از ۴ روش زیر ترمیم شد (مجرای پلی وینیلیدین فلوراید یا PVDF با ژل کلاژن، اتوگرافت، شم و کنترل). همه حیوانات در روزهای ۷، ۲۱، ۳۵، ۴۹، ۶۰ و ۹۰ بعد از جراحی توسط تست‌های حسی،شاخص فعالیت عصب سیاتیک (SFI) و در نودمین روزبوسیله الکتروفیزیولوژی ارزیابی شدند. عصب سیاتیک در پایان هفته چهارم و دوازدهم بوسیله میکروسکوپ نوری و الکترونی مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته ها: نود روز پس از جراحی، اختلاف معنی‌داری از لحاظ حسی در گروه‌های آزمایش مشاهده نشد.
میانگین SFI در هفته نهم در گروه اتوگرافت نسبت به گروه ژل کلاژن+PVDF افزایش معنی داری داشت ($p<0/01$). اختلاف میانگین سرعت هدایت عصب حرکتی در گروه های آزمایش از لحاظ آماری معنی دار نبود. در پایان هفته چهارم پس از ترمیم، بافت عصب تشکیل شده داخل مجرای PVDF به شکل گرد بود و تعداد آکسون‌های میلین‌دار در گروه اتوگرافت بطور معنی داری بیشتر از گروه ژل کلاژن + PVDF بود ($p<0/001$). در پایان هفته دوازدهم پس از ترمیم، میانگین تعداد آکسون‌های میلین‌دار در گروه ژل کلاژن +PVDF نسبت به گروه اتوگرافت کمتر بود ($p<0/01$).

نتیجه گیری: این مطالعه پیشنهاد می‌کند که با توجه به اثرات مثبت ژل کلاژن همراه با مجرای PVDF بر روی ترمیم عصب، استفاده از مجرای PVDF ممکن است جهت ترمیم ضایعات عصب محیطی مفید باشد.

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

آدرس مکاتبه: ارومیه – ص.پ ۱۶۸۳-۵۷۱۳۵
پست الکترونیک: hfarjah@umsu.ac.ir

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-03-28]

مقدمه

به دنبال قطع اعصاب محیطی و شروع دژنرسانس والرین، قطعه انتهایی آکسون آسیب دیده توسط سلول‌های اطراف هضم و جذب می‌شوند (۱). به طور معمول پیوند اتوگرافت عصب یاروش طلایی[1] برای ترمیم شکاف عصبی به کار می‌رود ولی به دلیل محدودیت دسترسی به بافت عصب و خطر گسترش بیماری، روشی ایده‌ال محسوب نمی شود(۲). بنابر این تلاش جهت پیدا کردن جانشین مناسب برای اتوگرافت ادامه دارد.کانال های راهنمای عصب[2] (NGCs)، لوله های طبیعی یا مصنوعی هستند که شکاف بین دو انتهای عصب بریده شده را پل می زنند و علاوه بر کمک به رشد آکسون، تشکیل بافت اسکار را به حداقل می رسانند (۳) و کشش را در ناحیه ترمیم عصب کاهش می دهند(۴). پلی وینیلیدین فلوراید[3] (PVDF) یک مجرای مصنوعی است که علاوه بر انتشار گازها و مایعات به داخل مجرا، از نفوذ ملکول های مهارکننده جلوگیری می نماید و حاوی ملکول های دو قطبی است. هنگامی که این ملکول‌ها از لحاظ موقعیت در جهت صحیح قرار بگیرند، خاصیت پیزوالکتریک[4] از خود نشان می دهند، یعنی به دنبال تغییر مکانیکی، شارژ سطحی تولید می کنند. تولید شارژ سطحی، رل مهمی در تمایز و تحریک انواع سلول ها از جمله شوان و رشد آکسون دارد (۵).

در دستگاه عصب محیطی، مقدار کشیدگی عصب توسط جهت‌گیری رشته‌های کلاژن محدود می‌شود. از آنجائی که تعدادی از رشته های کلاژن ارتباط نزدیکی با غشای پایه سلول شوان عصبی دارند، احتمال دارد که با جهت‌گیری رشته های عصبی در داخل دسته ها ارتباط داشته باشند (۶).

در اعصاب بزرگتر لایه‌هایی از رشته‌های کلاژن (در جهت طولی) و تعداد اندکی رشته ارتجاعی مابین سلول‌های فیبروبلاست یافت می‌شوند (۷).

ویلیامز[5] و همکاران هنگامی که از لوله سلیکون خالی (بدون ماتریکس) جهت ترمیم عصب (حد فاصل دو انتهای عصب حدود ۱۰ میلی متر) استفاده نمودند، ترمیم آکسونی با شکست مواجه شد (۸). والنتینی[6] و همکاران بیان نمودند که میزان ترمیم عصب در کانال راهنمای عصب به غلظت ژل کلاژن وابسته است (۹). ساتو[7] و همکاران با ایجاد شکاف در عصب سیاتیک و استفاده از لوله سلیکون حاوی ژل کلاژن، مشاهده نمودند که سرعت جوانه زدن آکسون به سمت انتهای دیستال افزایش می‌یابد (۱۰) تاکاهاشی[8] و همکاران پیشنهاد نمودند که استفاده از ژل کلاژن جهت تشکیل پری نوریوم در طی ترمیم عصب ایده‌ال است (۱۱). کیلی[9] و همکاران با استفاده از لوله محتوای ژل کلاژن یا فسفات بافر سالین جهت ترمیم ضایعه عصب سیاتیک، مشاهده نمودند که ژل کلاژن بعنوان یک ماتریکس ایده‌ال برای نگهداری فاکتورهای تغذیه کننده عصب یا سلول‌ها مفید می‌باشد (۱۲). نتایج تحقیقات وانگ[10] و همکاران نشان می‌دهد که ورید ژوگولار پر شده با ژل کلاژن، سبب افزایش ترمیم عصب می‌شود (۱۳). سییرونن[11] و همکاران مشاهده نمودند که پس از قطع عصب در مقایسه با له شدن آن، بیان RNA پیامبر کلاژن در سلول‌های فیبروبلاست اپی‌نوریوم افزایش می‌یابد. افزایش بیان کلاژن I در اپی‌نوریوم ممکن است سبب ایجاد بافت لیفی در اپی‌نوریوم و مانع ترمیم آکسون شود (۱۴).

لابرادور[12] و همکاران با استفاده از غلظت کمتر ژل کلاژن، بهبودی بالای ترمیم عصب را مشاهده نمودند (۱۵). مککولوچ[13] و همکاران مشاهده نمودند که کلاژن نوع I پستانداران سبب پشتیبانی رشد ترمیم نورون‌های حلزونی می‌شو (۱۶)؛ در حالی که تریس[14] و همکاران هنگامی که از لوله سلیکون جهت ترمیم ضایعه عصب محیطی استفاده نمودند، نتیجه گرفتند که استفاده

1. Gold Standard
2. Nerve Guidance Channels
3. Polyvinylidene Fluoride
4. Piezo electric
5. Williams
6. Valentini
7. Satou
8. Takahashi
9. Keeley
10. Wang
11. Siironen
12. Labrador
13. Mcculloch
14. Terris

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-03-28]

از ژل کلاژن نمی‌تواند میزان ترمیم را تقویت نماید (۱۷). کیل هوف[1] و همکاران نتیجه گرفتند که کلاژن نوع I و III می‌توانند در داخل مجرای راهنمای عصب سبب تقویت ترمیم عصب شوند (۱۸). والتینی و مکاران نیز نشان دادند که شارژ الکتریکی تولید شده از مجرای پیزوالکتریک سبب تقویت ترمیم اعصاب محیطی می‌شود (۱۹). فاین[2] و همکاران گزارش کردند که تعداد آکسون میلین‌دار و ضخامت میلین در لوله های قطبی مثبت نسبت به قطبی منفی بیشتر است (۲۰). زوائد نورون‌های کشت داده شده بر روی صفحات PVDF قطبی شده بیشتر از PVDF غیر قطبی رشد می‌نمایند (۲۱).

ژل کلاژن و خاصیت پیزوالکتریک کانال PVDF هر یک به تنهایی موجب افزایش رژنراسیون اعصاب محیطی می شوند. بررسی های انجام شده توسط نویسندگان مقاله نشان می دهد که گزارشی مبنی بر استفاده توام آن ها تاکنون ارائه نشده است. هدف از این تحقیق ارزیابی رژنراسیون عصب سیاتیک با استفاده از کانال PVDF و ژل کلاژن در مقایسه با روش اتوگرافت بوده است.

مواد و روش ها

تحقیق حاضر یک مطالعه تجربی است که برروی ۴۸ سر موش صحرایی نر بالغ[3]، به وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم انجام گرفت. حیوانات به صورت تصادفی به چهار گروه ۱۲تایی تقسیم شدند: گروه PVDF با ژل کلاژن، گروه اتوگرافت، گروه شم[4] ،گروه کنترل.

روش جراحی: موش‌ها توسط ماده بیهوشی کتامین[5] (۹۰ mg/kg) وگزیلازین[6] (۱۰ mg/kg) بصورت داخل صفاقی بیهوش شدند. برشی در پوست ناحیه خلفی خارجی ران ایجاد نموده و با کنار زدن عضله و فاسیا، عصب سیاتیک در فاصله بین بریدگی سیاتیک تا محل دو شاخه شدن آن نمایان شد. در حد واسط بین دو نقطه فوق و در محل یکسان برای همه گروه‌های آزمایشی، قطعه‌ای از عصب به اندازه ۱۰ mm بریده شد. در گروه کلاژن + PVDF از یک قطعه لوله PVDF[7] قطبی مثبت استریل با قطر داخلی ۱/۶ mm و به طول ۱۴mm در محل شکاف استفاده شد به طوری که دو انتهای بریده عصب را به صورت تلسکوپی داخل لوله قرار داده و با نخ نایلون ۱۰-۰ به دیواره لوله بخیه زدیم. تمام مراحل فوق در زیر میکروسکوپ جراحی[8] با بزرگنمایی ۲۰ و تحت شرایط استریل انجام شد.

۰/۳ میلی لیتر از محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار حاوی ژل کلاژن[9] با غلظت ۱/۲۸ mg/ml از طریق یک سرنگ یک میلی لیتری با سوزن شماره ۲۵ و قبل از محکم نمودن بخیه اپی‌نوریال به داخل لوله تزریق شد. در گروه اتوگرافت قطعه بریده شده عصب ۱۸۰ درجه جابه‌جا و به دو انتهای بریده عصب توسط نخ ۱۰-۰ بخیه شد. در گروه شم، عصب سیاتیک را نمایان کرده ولی قطع نکردیم. پس از عمل جراحی، بخش‌های بریده عضله و پوست توسط اتیکون ۵-۰ بخیه شد.

روش قطبی نمودن لوله PVDF: به منظور قطبی نمودن لوله PVDF، میله فلزی به قطر ۱/۶ mm را که بعنوان الکترود داخلی محسوب می‌شود و به زمین اتصال دارد، داخل مجرا و الکترود خارجی را که با سطح خارجی لوله تماس دارد، به قطب مثبت منبع تولید کننده ولتاژ بالا مرتبط می‌نماییم. ولتاژ را به تدریج در مدت ۲ ساعت تا ۲۱ کیلوولت بالا برده و سپس به مدت ۱۲ ساعت در این حالت نگه می‌داریم (۱۹).

روش‌های اندازه‌گیری ترمیم عصب

الف ـ تست حسی: موش‌ها در روزهای ۷، ۲۱، ۳۵، ۶۰ و ۹۰ بعد از جراحی تحت بررسی حسی قرار گرفتند. برای این کار حیوان در بالای ظرف آب گرم ۵۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد. پای جراحی شده را در ظرف آب فرو برده به طوری که کف پای حیوان با کف ظرف در تماس بود. زمان بین شروع تماس و کشیدن پا از آب ثبت شد (۲۲).

1. Keilhoff
2. Fine
3. Sprague-Dawley
4. Sham
5. Ketamin
6. Xylazine
7. Harvard Apparatus.Ltd
8. Olympus, SZX12, Japan
9. Roche

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-03-28]

ب ـ ارزیابی راه رفتن[1]: در روزهای ۷، ۲۱، ۳۵، ۶۰ و ۹۰ پاهای عقب موش با جوهر[2] رنگی شدند، سپس اجازه nhni an که برروی کاغذ سفیدی که در کف راهرویی به ابعاد ۲۵×۲۵×۱۳۰ سانتی‌متر قرار دارد و در انتها به اتاقک تاریکی منتهی می‌شود، راه برود. شاخص فعالیت عصب سیاتیک[3] یا SFI را براساس فرمول بین[4] و همکاران برای پای جراحی شده و پای سالم محاسبه an (۲۳).

$$SFI = -38.3\left(\frac{EPL - NPL}{NPL}\right) + 109.5$$

$$\left(\frac{ETS - NTS}{NTS}\right) + 13.3\left(\frac{EIT - NIT}{NIT}\right) - 8.8$$

طول کف پا[5] (PL):طول اثر کف پا در سمت آزمایش[6] و نرمال[7] بر حسب میلی‌متر

فاصله بین انگشتان ۱ و ۵ (TS)[8]: خطی که فاصله بین مرکز انگشت پنجم را به مرکز انگشت اول متصل می‌کند (برحسب میلی متر)

فاصله بین انگشتان ۲ و ۴ (IT)[9]: خطی که فاصله بین مرکز انگشت دوم را به مرکز انگشت چهارم متصل می‌کند (برحسب میلی‌متر)

ج ـ مطالعات الکتروفیزیولوژی :در آخر هفته دوازده، شش موش از هر گروه از طریق داخل صفاقی کاملا بیهوش شدند. پس از نمایان کردن عصب سیاتیک، الکترود سوزنی دو قطبی استریل را به آرامی به داخل عضله گاستروکنمیوس، یک سانتی‌متر زیر برجستگی تیبیا فرو بردیم. ابتدا از عضله گاستروکنمیوس در حالت استراحت، الکترومیوگرافی بدست آمد (جوابگیری مستقیم). سپس سرعت هدایت عصب حرکتی و حسی[10] (SNCV) و MNCV محاسبه شد. همچنین پتانسیل عمل حرکتی[11] (MAP) و پتانسیل عمل حسی[12] (SAP) جهت تعیین زمان جوابگویی (زمان تاخیر)[13] و دامنه پتانسیل فعالیت[14] جهت بررسی و تجزیه و تحلیل توسط دستگاه ثبت گردید.

د ـ مطالعات بافت‌شناسی: شش موش از هر گروه در پایان هفته چهارم و بقیه موش‌ها پس از انجام الکتروفیزیولوژی در پایان هفته دوازدهم جهت مطالعه بافت‌شناسی پرفیوژن شدند. در تمام موارد پس از پرفیوژن، عصب سیاتیک را یک میلی‌متر قبل و یک میلی‌متر بعد از محل ترمیم بریده و نمونه تمام شب در ثابت کننده گلوتارالدهید ۲/۵ درصد و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سپس هر نمونه را به سه قسمت ابتدایی, میانی و دیستال تقسیم نموده و پس از استفاده از تتراکسید یک درصد به مدت ۱/۵ ساعت، مراحل تهیه بلوک[16] برای میکروسکوپ الکترونی انجام گرفت. بلوک‌های تهیه شده را توسط اولترامیکروتوم[17] به اندازه ۵۰۰ نانومتر (۰/۵ میکرون) برش زده و با محلول تولوئیدین بلو ۱٪ به مدت ۳-۲ دقیقه رنگ‌امیزی شدند. نمونه‌های نیمه نازک[18] توسط میکروسکوپ پیشرفته تحقیقاتی[19] در بزرگ نمایی‌های مختلف مطالعه شدند و توسط دوربین دیجیتالی[20] متصل به کامپیوتر عکس گرفته شدند. تصاویر توسط برنامه کامپیوتری[21] مورد مطالعه قرار گرفت. به طوری که ابتدا سطح مقطع عصب، ضخامت اپی‌نوریوم و مساحت عروق خونی تشکیل شده محاسبه شدند. سپس سطح مقطع عصب را به نواحی با مساحت ۱۵۰۰ میکرومتر مربع تقسیم و سه ناحیه بصورت تصادفی در همه مقاطع انتخاب شدند. پس از شمارش آکسون های میلین دار،

1. Gait Analysis
2. Stamp pad
3. Sciatic Functional Index
4. Bain
5. Foot print Length
6. Experimental
7. Normal
8. Total spreading
9. Intermediary Toes
10. Motor and sensory Nerve Conduction Velocity
11. Motor Action Potential
12. Sensory Action Potential
13. Latency time
14. Amplitude
15. Toennies, Duoliner, England
16. TAAB Araldite 502/812
17. leica, ultracut
18. Semithin
19. Olympus, PROVIS Ax70, Japan
20. Olymus, DP11, Japan
21. OLYSIA Biorefort,Olympus, Japan

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-03-28]

قطر رشته عصب و ضخامت میلین محاسبه شد. پس از تهیه برش نیمه نازک، محل مناسب برای مطالعه میکروسکوپ الکترونی مشخص شد؛ سپس با استفاده از اولترا میکروتوم به اندازه ۵۰ نانومتر برش داده شد و برش‌ها بر روی شبکه مسی[1] قرار گرفت و توسط میکروسکوپ الکترونی[2] برای شمارش آکسون های بدون میلین مورد مطالعه قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل آماری، بوسیله نرم افزار SPSS و با استفاده از آنالیزهای (ANOVA و t-test) انجام شد.

یافته ها

هیچ علائمی مبنی بر عفونت و درد در جریان ترمیم مشاهده نگردید. هیچ حیوانی نمرد؛ ولی خود خواری[3] در پای تعدادی از حیوانات (۱۲ درصد) مشاهده گردید، که توسط نمونه‌های جدید جایگزین شدند.

الف ـ تست حسی: میانگین تاخیر پاسخ حسی پای نرمال به تحریک حرارتی دردناک، ۰/۹±۲/۲ ثانیه است. در آخر هفته دوازدهم پس از ترمیم، هیچ اختلاف معنی‌داری بین گروه ژل کلاژن +PVDF و اتوگرافت مشاهده نشد (p=۰/۰۷)؛ ولی در مقایسه با گروه کنترل و شاهد اختلاف معنی‌داربود (p<۰/۰۰۳).

ب ـ تست حرکتی: بعد از قطع عصب سیاتیک هیچ کدام از حیوانات توانایی راه رفتن بر روی کف پای آسیب دیده را نداشتند. توانایی راه رفتن در پای جراحی شده از هفته سوم شروع شد. به هر حال برگشت به حالت نرمال (حد فاصل ۱۱+ و ۱۱-) در هیچ حیوانی مشاهده نگردید (شکل شماره ۱). تا انتهای هفته سوم (روز۲۱) پس از ترمیم، از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری بین گروه های آزمایشی مشاهده نشد (p=۰/۰۶). پس از هفته پنجم مقدار SFI در گروه اتوگرافت بطور معنی‌داری بیشتر از گروه ژل کلاژن+PVDF بود (p<۰/۰۱). مقدار SFI تا هفته نهم افزایش یافت و پس از آن تقریبا ثابت ماند. در هفته نهم میانگین SFI در گروه ژل کلاژن + PVDF و اتوگرافت به ترتیب 7.6±86- , 6±68 - می‌باشد. پس از هفته دهم، مقدار SFI در گروه های آزمایشی تغییر زیادی نداشت (شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱ـ تصویر اندام عقب (Toes print) موش های گروه های مختلف هنگام راه رفتن جهت اندازه گیری SFI، دوازده هفته پس از ترمیم
a) Collagen gel + PVDF b) Autograft c) Control

ج ـ الکتروفیزیولوژی: در انتهای هفته ۱۲، از تعداد شش سر موش از هر گروه الکترومیوگرافی بعمل آمد. علائمی دال بر بی‌عصبی[4] مشاهده نشد که این نشانه برقراری ارتباط عصب با عضله بود و راه عصبی سالم بود. میانگین MNCV وSNCV عصب سیاتیک نرمال به ترتیب ۴۵±۲/۷ و ۴۳/۱±۱/۷ متر بر ثانیه است. اختلاف میانگین MNCV بین گروه ژل کلاژن + PVDF (۲۳±۳/۲ m/s) و گروه اتوگرافت (۲۸/۴±۳/۹ m/s) از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (p=۰/۰۵). میانگین SNCV در گروه اتوگرافت (۳۱/۹±۴/۱) بیشتراز گروه ژل کلاژن + PVDF (۲۴/۳±۱/۹) بود (p<۰/۰۱).

د ـ مطالعه میکروسکوپی

برشهای نیمه نازک[5]: در پایان هفته چهارم، عصب های ترمیم شده در داخل لوله PVDF به شکل مدور[6] بود، که توسط ژل غلیظ و چسبناک بدون سلولی احاطه شده بودند. به طوری که بافت های ترمیم شده هرگز با دیواره داخل لوله تماس مستقیم

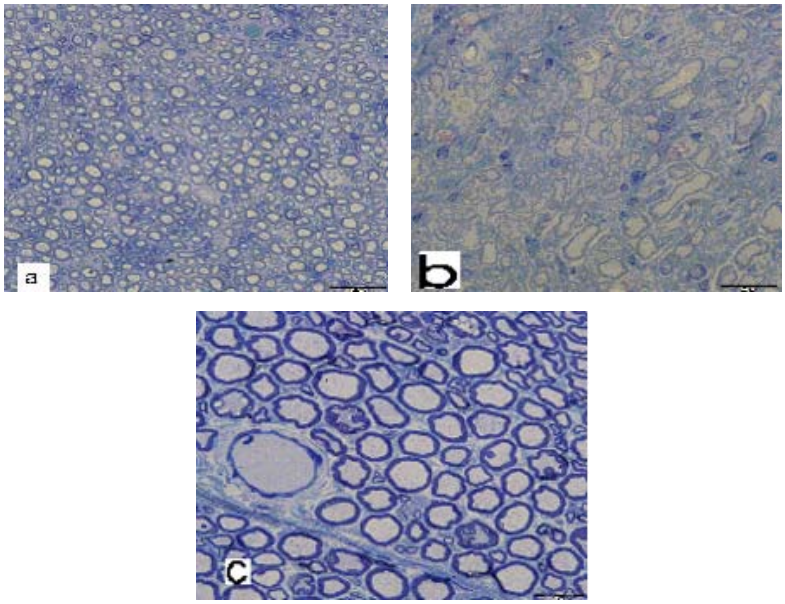
1.Grid
2. Leo 906
3. Autophage
4. Denervation
5. Semi-thin
6. Circular

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-03-28]

نداشتند. عصب رشد کرده باریک بوده و در ناحیه میانی لوله، نسبت به دو انتهای ابتدایی و انتهایی نازکتر بود. نسبت ضخامت اپی‌نوریوم به سطح عصب ترمیم شده (بر حسب درصد)، در گروه ژل کلاژن + PVDF، 4.8±1.1 بود. سطح خارجی عصب ترمیم شده در داخل لولهPVDF، توسط تعدادی ماکروفاژ احاطه شده بود. انشعاباتی از اپی‌نوریوم به داخل بافت عصب کشیده شده بودند، و دسته‌های تازه تشکیل شده را از هم مجزا نمودند.

عروق خونی در اندازه های مختلف (۶۰ تا ۱۱۰۰ میکرومتر مربع) و بصورت پراکنده در سرتاسر عصب ترمیم شده تشکیل شده بودند. نسبت مساحت عروق خونی به سطح کل بافت عصب ترمیم شده در گروه ژل کلاژن + PVDF در ناحیه پروگزیمال بیشتر و در ناحیه میانی کمتر بود و مقدار آن بر حسب درصد به سطح کل بافت عصب در گروه ژل کلاژن+PVDF (۱/۶±۴/۱) و گروه اتوگرافت (۰/۸±۴/۳) بود (p=۰/۰۸) در همه گروه های آزمایش تعداد آکسون های میلین دار در بخش پروگزیمال محل ترمیم عصب بیشتر از ناحیه میانی و دیستال آن بود. تعداد آکسون‌های میلین‌دار در گروه اتوگرافت ۳۱۴±۴۲۹۰ بود که به طور معنی داری بیشتر از گروه ژل کلاژن+PVDF (۴۱۱±۲۲۵۰) بود (p<۰/۰۰۱). میانگین ضخامت میلین در گروه ژل کلاژن+PVDF (۲۱mm±۳۸۱) بود که نسبت به گروه اتوگرافت (۳۳mm±۴۶۰) کمتر بوده است (p<۰/۰۱). اختلاف میانگین نسبت ضخامت میلین به قطر آکسون در گروه ژل کلاژن + PVDF (۰/۰۲±۰/۱۱) نسبت به گروه اتوکرافت (۰/۰۱±۰/۱۲) معنی دار نبود.

در پایان هفته دوازدهم، نسبت ضخامت اپی‌نوریوم به سطح عصب ترمیم شده (بر حسب درصد)، در گروه ژل کلاژن + PVDF (۰/۶±۰/۸۵) به طور معنی داری نسبت به گروه اتوگرافت (۰/۱± ۰/۴۵) بیشتر بود (p<۰/۰۱)؛ ولی در مقایسه با هفته چهارم کاسته شده بود، به طوری که اپی نوریوم در گروه ژل کلاژن + PVDF نازکتر شده بود. اندازه فاسیکل ها نسبت به هفته چهارم بزرگتر شده و حدود آنها به راحتی قابل تشخیص بود. نسبت مساحت عروق خونی به سطح کل بافت عصب ترمیم شده درگروه ژل کلاژن + PVDF (۱/۱±۵/۳) به طور معنی داری بیشتر از گروه اتوگرافت (۰/۴±۳/۱) بود (p<۰/۰۲). میانگین تعداد آکسون‌های میلین‌دار در گروه ژل کلاژن + PVDF و گروه ۷ اتوگرافت به ترتیب ۳۱۵±۶۳۲۹ و ۶۱۴±۱۱۱۱۵ بود (p<۰/۰۰۱). همچنین میانگین ضخامت میلین در گروه ژل کلاژن + PVDF ۱۶۱mm±۶۶۵ است که نسبت به گروه اتوگرافت ۱۶۲ mm± ۱۳۵۵ اختلاف معنی داری داشت (P<.۰/۰۰۱) (شکل شماره ۲).

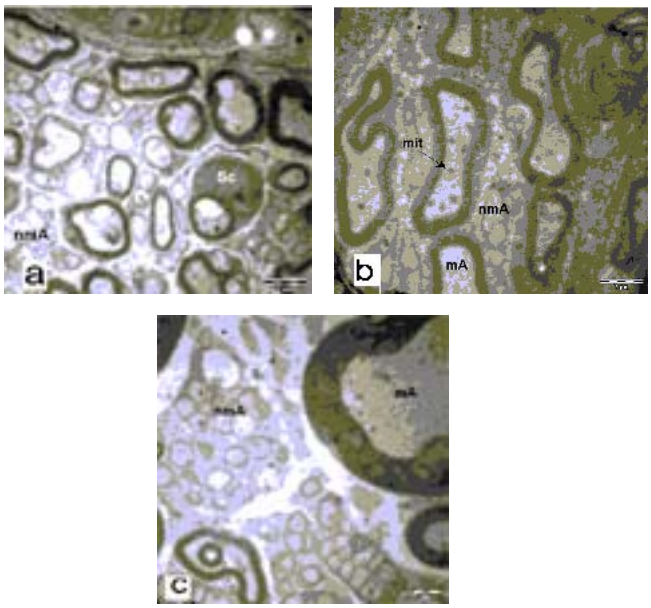


شکل شماره ۲ـ برش عرضی رنگ‌آمیزی شده با تولوئیدین ـ بلو، از عصب رژنره شده در ناحیهٔ میانی لوله PVDF در مقایسه با گروه اتوگرافت، ۱۲ هفته پس از ترمیم (X100 a) گروه Collagen + PVDF b) گروه اتوگرافت c)گروه نرمال

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-03-28]

برش‌های نازک[1]: میانگین تعداد آکسون‌های بدون میلین در پایان هفته چهارم پس از ترمیم، در ژل کلاژن + PVDF (۸۸۰±۱۰۵۳۸) نسبت به گروه اتوگرافت (۴۱۷±۱۰۵۳۸) اختلاف معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۱$) (شکل شماره ۳).

میانگین آکسون‌های بدون میلین در پایان هفته دوازدهم پس از ترمیم، در گروه ژل کلاژن + PVDF (۵۱۱ ± ۱۱۲۷۰) نسبت به گروه اتوگرافت (۷۶۰±۱۷۲۸۰) کمتر بود ($p<۰/۰۱$).



شکل شماره ۳ـ تصویر میکروسکوپ الکترونی، از عصب رژنره در ناحیهٔ میانی لوله PVDF، در مقایسه با اتوگرافت و عصب نرمال، ۴ هفته پس از ترمیم (X ۳۵۹۷) **a) گروه Collagen + PVDF** **b) گروه Autograft** **c) عصب Normal**

بحث

تحقیق ما نشان داد که در کانال راهنمای عصب نسبت به اتوگرافت بافت لیفی کمتری تشکیل می شد. وجود دو خط بخیه در پیوند اتوگرافت امکان ایجاد بافت لیفی و جلوگیری از رشد آکسون‌های ترمیم شده را افزایش می‌داد.

با توجه به روش‌های مختلف ارزیابی توسط محققین مختلف، مقایسه بین تحقیقات سخت و دشوار است (۲۴). در بسیاری از تحقیقات انجام شده اندازه شکاف عصب کمتر از یک سانتی‌متر در نظر گرفته شده بود که این امر مطمئنا بر نتایج حاصل از تحقیق بسیار موثر بوده است (۲۵). کانایا[2] و همکاران پس از تحت فشار قرار دادن عصب سیاتیک موش صحرایی، از محلول NGFs به مقدار ۱mg به صورت موضعی جهت تسریع در روند ترمیم استفاده نمودند و میانگین تاخیر پاسخ حسی دردناک را در هفته پنجم پس از ضایعه ۳±۵/۱ ثانیه گزارش کردند (۲۶).

در تحقیق حاضر هنگامی که از ژل کلاژن در داخل لوله PVDF استفاده نمودیم، میانگین تاخیر به ۳/۱۱±۱۰/۹۸ ثانیه افزایش یافت. تصور می شود اگر چه حضور کلاژن بعنوان راهنمای آکسون های در حال رشد اهمیت دارد؛ ولی کافی نیست. هنگامی که عصب تحت فشار قرار می گیرد، پوشش های اپی نوریوم و پری نوریوم آن سالم است و نیازی برای بخیه زدن وجود ندارد، در نتیجه ترمیم عصب به راحتی و سریع تر انجام می گیرد و کاهش میانگین تاخیر پاسخ حسی دردناک در هنگام له شدن عصب نسبت به تحقیق ما توجیه پذیر است.

1. Ultrathin 2. Kanaya

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-03-28]

هار[1] با مطالعه بر روی ترمیم عصب سیاتیک موش صحرایی، مشاهده نمود که بیشتر نتایج بهبودی فانکشنال در هفته ۲ تا ۱۲ اتفاق می‌افتد، بطوری که متوسط مقدار SFI در هفته دوم، ۵/۵±۱۰۲/۴- و در هفته دوازدهم، ۸/۳±۶۵/۸- بوده است. در تحقیق حاضر مقدار SFI در گروه های آزمایش تا هفته نهم افزایش می‌یابد و بعد از آن تغییر زیادی ملاحظه نمی‌گردد. این عدم افزایش SFI پس از هفته نهم، احتمالا به دلیل کوتاهی عضلات و سفتی مفاصل در اندام جراحی شده می‌باشد و پیشنهاد می‌گردد که انجام حرکت درمانی و توانبخشی در دست یابی به نتایج بهتر، ممکن است مفید باشد (۲۷).

کیلی[2] و همکاران با انجام تست‌های الکتروفیزیولوژی نشان دادند که گروه اتوگرافت نسبت به کانال پر شده از کلاژن، سرعت هدایت حسی و حرکتی بالاتری دارد (۲۸). در تحقیق حاضر میانگین سرعت هدایت عصب حرکتی در گروه ژل کلاژن + PVDF و گروه اتوگرافت از لحاظ آماری معنی دار نبود، ولی سرعت هدایت عصب حسی در گروه اتوگرافت کمی بیشتر از گروه ژل کلاژن بود. کسب نتایج حاصل از این تحقیق از دو جهت حائز اهمیت است: اولا طول شکاف عصب به یک سانتیمتر افزایش یافته است؛ ثانیا سرعت هدایت عصب حرکتی و حسی نسبت به سایر تحقیقات افزایش دارد. افزایش سرعت هدایت عصب حرکتی به قطر آکسون و ضخامت میلین وابسته است.

سیلوا[3] و همکاران با مطالعه برروی ترمیم عصب سیاتیک موش مشاهده کردند که در هفته چهارم پس از ترمیم، کابل عصب ترمیم شده در ناحیه مرکزی کانال راهنمای عصب تشکیل شده بود (۲۹). در تحقیق حاضر و در پایان هفته چهارم مشاهده گردید که عصب ترمیم شده در داخل لوله PVDF به شکل گرد بوده است که توسط ژل غلیظ و چسبناک بدون سلولی احاطه شده بود. آکسون ها به دلیل شارژ تولید شده توسط خاصیت پیزوالکتریک لوله PVDF به طرف مرکز لوله رشد کرده بودند. از طرفی بعضی از ملکول های ماتریکس خارج سلولی (همانند کلاژن) نیز شارژ الکتریکی دارند و هنگامی که در محیط پیزوالکتریک با ذخیره شارژ الکتریکی قرار می‌گیرند، در جهت‌گیری منظمی آرایش می‌یابند. جنارد[4] و همکاران با استفاده از لوله PVDF جهت ترمیم عصب سیاتیک، ملاحظه نمودند که ماکروفاژها سطح خارجی کابل عصبی را احاطه می‌کنند (۳۰). ماکروفاژها با ترشح فاکتورهای متعدد رشد، سبب تقویت ترمیم می‌شوند. در تحقیق حاضر نیز مشاهده گردید که بافت عصب ترمیم شده داخل لوله توسط تعدادی ماکروفاژ فعال و بزرگ احاطه شده است، که ممکن است بافت عصب تازه تشکیل شده را نسبت به لوله PVDF محافظت نماید. وجود واکوئل‌های فراوان در داخل سیتوپلاسم ماکروفاژها، بیانگر عمل بیگانه خواری آن‌ها است.

سیلوا و همکاران با مطالعه ترمیم عصب، چهار هفته پس از ترمیم مشاهده نمودند که اپی نوریوم به خوبی تشکیل شده و مقدار فراوانی عروق خونی وجود دارد (۲۹).

در تحقیق حاضر مشاهده گردید که نسبت ضخامت اپی نوریوم به سطح عصب رژنره شده در گروه ژل کلاژن بیشتر از گروه اتوگرافت بوده است. این افزایش ضخامت اپی‌نوریوم در گروه ژل کلاژن به دلیل افزایش مقدار رشته‌های کلاژن بوده است که در داخل لوله بعنوان فاکتور کمک کننده به ترمیم اضافه شده است. به طوری که رشته‌های کلاژن و فیبروبلاست‌ها در مسیری موازی با جهت حلقه‌های سطحی لوله قرار می‌گیرند و بافت لیفی در داخل عصب مشاهده نمی‌شود. نسبت اپی نوریوم به سطح مقطع عصب در گروه کلاژن، بیانگر این نکته است که افزایش سطح مقطع گروه کلاژن به تنهایی نشانه بهبود ترمیم عصب نیست، بلکه تعداد

1. Hare
2. Keeley
3. Silva
4. Guenard

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-03-28]

اکسون و ضخامت میلین دو عامل مهم به شمار می آیند. ابیشر[1] و همکاران با استفاده از لوله PVDF قطبی حاوی نرمال سالین، تعداد آکسون‌های میلین‌دار را ۱۷۷±۲۱۷۹، ۲۲۴± ۳۱۸۳ به ترتیب در پایان هفته ۴ و ۱۲ پس از ترمیم گزارش کردند (۵). والتینی[2] و همکاران با استفاده از لوله پیزوالکتریک شارژ شده حاوی محلول فیزیولوژیک، تعداد آکسون‌های میلین‌دار را در پایان هفته چهارم ۲۰۶±۲۳۰۱ اعلام نمودند و مشاهده کردند که آکسون‌ها با شکل‌های نامنظم تشکیل می‌گردند (۱۹). جنارد و همکاران با استفاده از لوله PVDF غیر شارژ جهت ترمیم شکاف عصب سیاتیک ۴۲۸±۱۹۸۹ آکسون میلین‌دار را در پایان هفته چهارم پس از ترمیم مشاهده نمودند (۳۰). فاین و همکاران با استفاده از لوله PVDF شارژ شده و مقایسه تعداد آکسون‌های میلین دار در ناحیه ابتدایی، میانی و انتهایی لوله، مشاهده کردند که تعداد آکسون‌ها از ناحیه ابتدایی به دیستال کاسته می‌شود (۲۰).

نتیجه گیری

در تحقیق حاضر نیز همانند سایر تحقیقات انجام شده مشاهده گردید که تعداد آکسون‌های میلین‌دار در ناحیه انتهایی محل ترمیم کمتر از ناحیه ابتدایی می‌باشد زیرا تعدادی از آکسون‌ها (به دنبال انتخاب مسیر غلط) نوروما تشکیل می‌دهند. افزایش تعداد آکسون‌های میلین‌دار در گروه PVDF شارژ شده، نشانگر تاثیر رشته های کلاژن در مسیریابی صحیح اکسون های ترمیم شده است. تصور می شود که رشته های کلاژن در هدایت صحیح اکسون های در حال رشد نقش مهمی ایفا نمایند.

تحقیقات فراوانی در زمینه ترمیم اعصاب محیطی انجام شده، ولی هنوز سوالات زیادی بدون جواب باقی مانده است، از جمله: الف - کدام ماتریکس و با چه ترکیب و غلظتی برای رژنراسیون مفید است؟، ب ـ ترکیب ایده‌ال برای فاکتورهای تحریک کننده عصب که موجب ترمیم رشد آکسون‌ها می‌شوند، کدامند؟، ج ـ مقدار این فاکتورهای تحریک کننده عصب را چگونه تنظیم نماییم؟، د ـ آیا می‌توانیم فاکتورهای تحریک کننده یا مهار کننده رشد عصب را در مراحل تکامل جنین بیابیم؟

تلاش جهت پاسخ‌گویی به سوالات بالا، ضرورت انجام تحقیقات بیشتر را درباره ترمیم اعصاب نشان می‌دهد.

1. Aebischer 2. Valentini

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-03-28]

References

1. Chen YS, Wang-Bennett LT, and Coker NJ. Facial nerve growth factor receptor mRNA is developmentally regulated and increased after axotomy in rat spinal cord motoneurons, Neuron 1989; 2(6): 1605-13
2. Evans GR, Challenges to nerve regeneration, Semin Surg oncol, 2000; 19(3): 312-8
3. Hudson TW, Evans GR.D, and Schmidt CE. Enginearing strategies for peripheral nerve repair, Tissue Enginearing, 1999; 26(4): 617-628
4. Strauch B. Use of nerve conduits in peripheral nerve repair, Nerve Repair and Reconstruction, 2000; 16(1): 123-130
5. 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
6. Fawcett DW. A Text book of Histology, 12 th ed, Chapman and Hal, New york, 1994: 309-364
7. Junqueira LC, Carneiro J, and long AY. Basic Histology, chapter 9, 10th ed USA, Appleton and Lange, 2003
8. Williams LR, Danielsen N, Muller H, and Varon S. Exogenous matrix precursors promote functional nerve regeneration across a 15mm gap within a silicone chamber in the rat, J Comp Neurol, 1987; 264(2): 284-90
9. 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
10. Satou T, Nishida S, Hiruma S, Tanji K, Takahashi M, Fujita S. 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 (Abstract)
11. 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 (Aabstract)
12. Keeley R, Atagi T, Sabelman E, Padilla J, Kadlcik S, Keeley A, and 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
13. 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
14. 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 (Abstract)
15. 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
16. Mcculloch F, and Breckenridge L. Effects of target tissue on growth of snail neurons in collagen gel culture, Neuroreport, 1998; 9(10): 3291-7
17. Terris DJ, Cheng ET, Utley DS, Tarn DM, HO PR, and Verity AN. Functional

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-03-28]

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 (Abstract)

18. 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
19. Valentini RF, Sabatini AM, Dario P, and Aebischer P. Polymer electric guidance channels enhance peripheral nerve regeneration in mice, Brain Research 1989; 480: 300-304
20. Fine EG, Valentini RE, Bellamkonda R, and Aebischer P. Improved nerve regeneration through piezoelectric vinylidenefluoride trifluoroethylene copolymer guidance channels. Biomaterials 1991; 12: 775-780
21. 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
22. Lee LQ. Effects of nerve growth factor on nerve regeneration through a vein graft across a gap, Plastic and Reconstructive Surgery, 1999; 104(5):405-411
23. Bain J, Mackinnon S, and Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal and posterior tibial nerve lesions in the rat. Plast Reconstr Surg, 1989; 83: 129
24. Pu L, Syed SA, Reid M, Patwa H, Goldstein JM, Forman DL, and et al. Effects of nerve growth factor on nerve regeneration through a vein graft across a gap, Plastic and Reconstructive Surgery, 1999; 104(5): 1379-1385
25. Maniwa S, Iwata A, Hirata H, and Ochi M. Effects of neurotrophic factors on chemokinesis of schwann cells in culture, Scand J Plast Reconstr surg Hand surg, 2003; 37(1): 14-7 (Abstract)
26. Kanaya F, Breidenbach WC, and Firrell JC. Sciatic function index nerve conduction tests, Muscle contraction, and axon morphometry as indicators of regeneration, Plast Reconstr Surg, 1996; 98 (7): 1264-1271
27. Hare GMT, Evans PJ, Mackinnon SE, Best JJ, Bain JR, Szalai JP, and et al. Walking track analysis: A long – term assessment of peripheral nerve recovery, Plastic and Reconstructive Surgery, 1992; 89 (2): 251-258
28. Keeley R, Atagi T, Sabelman E, Padilla J, Kadlcik S, Keeley A, and 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
29. Silva CD, Madison R, Dikkes P, Chiu T, and Sidman R ; An invivo model to quantify motor and sensory peripheral nerve regeneration using bioresorbable nerve guide tubes, Brain Research, 1985, 342: 307-315
30. Guenard V, Valentini RF, and Aebischer P. Influence of surface texture of polymeric sheets on peripheral nerve regeneration in a two-compartment guidance system, Biomaterials, 1991,12: 259-263

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-03-28]