

Assessment of Simultaneous Injection of Neural Stem Cells and (-)-Deprenyl to Improve Contusive Spinal Cord Injury in Rats

Esmael Izadpanah, Ph.D.^{1,2}, Fardin Fathi, Ph.D.^{1,3*}, Kambiz Hassanzadeh, Ph.D.^{2,3}, Alireza Asgari, Ph.D.⁴

1. Applied Neuroscience Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Department of Physiology and Pharmacology, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran
3. Cellular and Molecular Research Center, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran
4. Exercise Physiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* Corresponding Address: P.O.Box: 13446-66177, Cellular and Molecular Research Center, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran
Email: farfath@yahoo.com

Received: 18/May/2010, Accepted: 5/Oct/2010

Abstract

Objective: Assessment of functional recovery of neural stem cells (NSCs) and (-)-deprenyl, in a contusive spinal cord injury model in rats.

Materials and Methods: A total of 24 female Sprague Dawley rats were randomly, but equally (n=6), allocated into the following groups: control, sham, NSC graft and NSC graft + (-)-deprenyl. All animals were laminectomized at the T13 level. Contusion was performed according to the weight dropping technique in the control, NSC and NSC graft + (-)-deprenyl groups. Daily injections of 0.1 mg/kg (ip) (-)-deprenyl were administered to the NSC graft + (-)-deprenyl group and an equal amount of saline into the other groups for 14 days. The NSC graft and NSC graft + (-)-deprenyl groups received stereotaxic injections of 100,000 labelled NSCs at day nine after injury. Behavioral Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) test was carried out in all groups at day one (after the contusion day) and at the end of each week for eight weeks. In addition, cavity and spared tissue volume at the site of injury and number of motoneurons at frozen sections of spinal cord were obtained and compared by ANOVA. Differentiation of grafted NSCs into astrocytes, oligodendrocytes and neurons were evaluated by immunohistochemistry.

Results: Motor ability of the NSC graft + (-)-deprenyl group in comparison with the control and NSCs groups increased significantly at the end of the study. The mean volume of spared spinal cord and mean number of motoneurons significantly increased in the NSCs and NSC graft + (-)-deprenyl groups compared with the control group. Immunohistochemical evaluations revealed that the grafted NSCs were alive at the end of the study and differentiated into astrocytes, oligodendrocytes and neurons in both the NSCs and NSC graft + (-)-deprenyl groups. In addition, in the NSCs graft group, transplanted cells mainly concentrated around the cavity and showed less differentiation, while in the NSCs graft + (-)-deprenyl group transplanted cells were more scattered and differentiated into one of the above mentioned cell lines.

Conclusion: The results of the present study indicate that (-)-deprenyl and NSCs, probably via protection of motoneurons, spinal cord tissue and replacement of lost cells, improves motor recovery in a contusive SCI model in rats.

Keywords: Spinal Cord Injury, Contusion, Stem Cell Deprenyl, Motoneurons, NSCs

Yakhteh Medical Journal, Vol 12, No 3, Autumn 2010, Pages: 411-420

بررسی تزریق هم‌زمان سلول‌های بنیادی عصبی و (-) - دپرنیل در بهبود ضایعه نخاعی Contusion در موش صحرایی

اسماعیل ایزدینا،^۱ Ph.D.، فریدین فتحی،^{۲،۱} Ph.D.*، کامبیز حسن‌زاده،^{۳،۱} Ph.D.، علیرضا عسگری،^۴ Ph.D.

۱. دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، مرکز تحقیقات علوم اعصاب کاربردی، تهران، ایران
۲. دانشگاه علوم پزشکی کردستان، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، سنندج، ایران
۳. دانشگاه علوم پزشکی کردستان، مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی، سنندج، ایران
۴. دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، مرکز تحقیقات فیزیولوژی ورزش، تهران، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: ایران، سنندج، صندوق پستی: ۶۶۱۷۷-۱۳۴۴۶، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، دانشکده پزشکی،

مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی

پست الکترونیک: Email: farfath@yahoo.com

دریافت مقاله: ۸۹/۲/۲۸، پذیرش مقاله: ۸۹/۷/۱۳

مکیده

* **هدف:** بررسی بهبودی عملکردی ناشی از (-) - دپرنیل و سلول‌های بنیادی عصبی (Neural Stem Cells; NSCs) در مدل ضایعه نخاعی Contusive در رت

* **مواد و روش‌ها:** ۲۴ سر رت ماده سالم نژاد Sprague Dawley وارد مطالعه شدند و به صورت تصادفی و مساوی (n=۶) به گروه‌های کنترل، شم، دریافت کننده NSCs و دریافت کننده هم‌زمان NSCs و (-) - دپرنیل تقسیم شدند. همه حیوانات در سطح مهره T13 لامینکتومی شدند. در گروه‌های کنترل، NSCs و دریافت کننده هم‌زمان NSCs و (-) - دپرنیل ضایعه contusion بر اساس تکنیک Weight Dropping ایجاد گردید. (-) - دپرنیل روزانه با دوز ۰/۱ میلی گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن در گروه دریافت کننده هم‌زمان NSCs و (-) - دپرنیل و در گروه کنترل، NSCs و شم به همان میزان نرمال سالیان به صورت داخل صفاقی به مدت ۱۴ روز تزریق گردید. در گروه‌های NSCs و دریافت کننده هم‌زمان NSCs و (-) - دپرنیل در روز نهم بعد از آسیب ۱۰۰۰۰۰ سلول بنیادی عصبی نشان‌دار با هدایت استروئوتاکسیک پیوند شد. تست حرکتی (Basso Beattie Bresnahan; BBB)، در روز اول بعد از ایجاد ضایعه و در آخر هر هفته تا پایان هفته هشتم در همه گروه‌ها انجام شد. حجم حفره، حجم بافت باقی مانده و تعداد نورون‌های حرکتی در مقاطع انجمادی محل ضایعه محاسبه و با هم مقایسه گردیدند (ANOVA). هم‌چنین تمایز سلول‌های پیوند شده به آستروسیت، الیگودندروسیت و نورون توسط ایمونوهیستوشیمی بررسی شد.

* **یافته‌ها:** توانایی حرکتی گروه دریافت کننده هم‌زمان NSCs و (-) - دپرنیل در مقایسه با گروه کنترل و NSCs، در پایان مطالعه، به طور معنی‌داری افزایش نشان داد. در بررسی بافت باقی مانده نخاع و تعداد متوسط نورون‌های حرکتی هم افزایش معنی‌داری در گروه NSCs و دریافت کننده هم‌زمان NSCs و (-) - دپرنیل نسبت به کنترل مشاهده شد ($P < 0/05$). هم‌چنین در بررسی ایمونوهیستوشیمی، سلول‌های پیوند شده در پایان مطالعه زنده بودند و در هر دو گروه به نورون، آستروسیت و الیگودندروسیت تمایز یافتند، در گروه دریافت کننده هم‌زمان NSCs و (-) - دپرنیل سلول‌های پیوند شده، به طور عمده به یکی از رده‌های سلولی بیان شده تمایز پیدا کرده بودند و پراکنندگی بیشتری نیز داشتند در حالی که در گروه NSCs سلول‌های پیوند شده در نزدیکی حفره تشکیل شده در نخاع متمرکز بودند و تمایز کمتری را نشان دادند.

* **نتیجه‌گیری:** این تحقیق نشان داد که تجویز (-) - دپرنیل به همراه پیوند NSCs به احتمال با حفظ نورون‌های حرکتی و بافت نخاع و هم‌چنین جایگزینی سلول‌های از بین رفته در نخاع، باعث بهبودی حرکتی بیشتری نسبت به NSCs به تنهایی، در مدل ضایعه نخاعی Contusion در رت گردیده است.

* **کلیدواژه‌ها:** ضایعه نخاعی، Contusion، سلول بنیادی دپرنیل، نورون‌های حرکتی، سلول‌های بنیادی عصبی

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دوازدهم، شماره ۳، پاییز ۸۹، صفحات: ۴۲۰-۴۱۱

مقدمه

بخش آسیب دیده می‌باشد. تاکنون از سلول‌ها و بافت‌های مختلفی جهت پیوند به نخاع استفاده شده است (۱) و در چند سال اخیر توجه زیادی به سلول‌های بنیادی عصبی (Neural Stem Cells; NSCs) جهت درمان اختلالات CNS معطوف شده است. NSCs سلول‌های پیش‌ساز چند ظرفیتی هستند که از توانایی خود تجدیدی (Self-Renewal) برخوردار بوده و قادرند به انواع مختلف سلول‌های CNS (شامل نورون‌ها، آستروسیت‌ها و الیگودندروسیت‌ها) تمایز یابند. NSCs از بافت مغز اکثر گونه‌ها شامل موش، رت و انسان قابل جداسازی است (۳). سلول‌های بنیادی عصبی

ضایعه نخاعی (Spinal Cord Injury; SCI) یک حادثه تروماتیک است که موجب قطع اکسون‌های مسیرهای حرکتی و حسی، از دست رفتن میلیون در نواحی وسیعی از نخاع و از بین رفتن نورون حرکتی تحتانی، اینترنورون‌ها و سلول‌های گلیال می‌شود (۱). این امر در حالی است که بعد از آسیب، نورون‌های سیستم عصبی مرکزی (Central Nervous System; CNS) پستانداران بالغ، توانایی کمی جهت رژنراسیون دارند (۲) بنابراین جایگزین کردن سلول‌های از دست رفته، یکی از اقدامات مفید و موثر در جهت بازگشت عملکرد

محیط کشت DMEM/F12 (Gibco) شست‌وشو داده شدند. در نهایت سلول‌ها در محیط کشت مذکور که حاوی ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر EGF (Sigma) Epidermal Growth Factor، ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor) (Sigma)، ۲۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر (Gibco B27)، ۲ میلی‌مولار گلوتامین (Sigma)، ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین (Gibco) و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین (Gibco) بود، کشت داده شدند. پس از یک هفته در اثر تکثیر سلول‌های بنیادی، نوروسفرهای اولیه در محیط کشت تشکیل شده که این نوروسفرها از طریق پاساژهای متوالی تکثیر یافتند و به صورت منجمد در نیتروژن مایع ذخیره شدند (۱۷، ۱۸). بنیادی بودن آنها در کار قبلی نویسندگان مقاله تایید شده بود (۱۹).

نشان‌دار کردن سلول‌های بنیادی عصبی و تزریق آنها به محل ضایعه در روز نهم

سلول‌ها به مدت یک هفته قبل از پیوند کشت و در روز هفتم یعنی ۴۸ ساعت قبل از پیوند در معرض 5-Bromo-2'-deoxyuridine (Sigma) (BrdU) با غلظت ۱ میکرومولار قرار داده شدند. این غلظت از BrdU بعد از ۴۸ ساعت بیشتر از ۹۰ درصد سلول‌ها را نشان‌دار می‌کند. بعد از ۴۸ ساعت سلول‌ها به وسیله تریپسین از همدیگر جدا شدند و بعد از شست‌وشو با PBS استریل با استفاده از تریان‌بلو شمارش و در محیط پایه DMEM/F12 با تراکم 10^5 بر ۲۰ میکرولیتر معلق شدند.

ایجاد ضایعه نخاعی و پیوند سلول‌ها

آسیب نخاعی نوع Contusion بر اساس مدل Weight Drop - ping در رت ایجاد شد (۲۰). این مدل در حیوانات یک الگوی قابل پیش‌بینی آسیب پیش‌رونده گلیالی و نورونی، آسیب عروقی، تخریب اسکونی و دمیلینه شدن را ایجاد می‌کند که مشابه با آسیب نخاعی Contusion در انسان است (۲۱، ۲۲).

گروه‌های مورد مطالعه

جهت ایجاد ضایعه نخاعی Contusion از ۲۴ سر رت بالغ ماده نژاد Sprague Dawley به وزن تقریبی ۲۲۰-۲۰۰ گرم استفاده شد. رت‌ها از موسسه رازی کرج تهیه و به طور تصادفی و مساوی ($n=6$) به گروه‌های شم، کنترل، دریافت‌کننده NSCs، دریافت‌کننده (-) - دپرنیل به اضافه NSCs تقسیم گردیدند. حیوانات در حیوان‌خانه با شرایط مطلوب و استاندارد با دوره‌های روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته و به طور منفرد در یک قفس نگهداری شدند. تمام آزمایشات براساس پروتکل راهنمای مراقبت و کاربرد حیوانات آزمایشگاهی (نشریه شماره ۸۵۲۳ موسسه ملی بهداشت، تجدید نظر شده در سال ۱۹۸۵) انجام شد و مورد تایید کمیته اخلاق در تحقیق دانشگاه علوم پزشکی بقیه... قرار گرفته‌اند.

نحوه ایجاد مدل ضایعه نخاعی و تزریق سلول‌ها و (-) - دپرنیل به موش‌های ضایعه دیده

ضایعه نخاعی Contusion به روش weight dropping (۲۳) در سطح مهره T13 ایجاد گردید. حیوانات با تزریق داخل صفاقی ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کتامین و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم زایلازین بیهوش گردیدند و بر روی شکم روی یک میز جراحی که با یک صفحه گرم‌کننده پوشانده شده بود قرار داده شدند. سطح پشتی رت‌ها تراشیده شد و با بتادین ضدعفونی گردید. با استفاده از تکنیک‌های

پتانسیل زیادی را جهت درمان آسیب‌های CNS دارا می‌باشند؛ زیرا این سلول‌ها قادرند حمایت‌های ساختاری و شیمیایی برای نخاع آسیب دیده فراهم کنند (۴). محققان زیادی روی این سلول‌ها کار کرده‌اند و گزارش‌های ضد و نقیضی ارائه نموده‌اند، در نهایت عنوان کرده‌اند که وقتی NSCs به تنهایی استفاده شود، اثر آن محدود خواهد بود و یک ترکیب پیوند NSCs با استراتژی‌های ترمیمی دیگر که ممکن است با هم اثرات سینرژیک داشته باشند مورد نیاز است (۵).

از آنجایی که به دنبال آسیب نخاعی در اثر قطع اکسون‌ها و روندهای انتهایی تعداد زیادی سلول عصبی در محل ضایعه می‌میرند (۶) و بعد از پیوند سلول‌های بنیادی نیز تعداد قابل ملاحظه‌ای از آنها از بین می‌روند (۷)، توجه ما به این نکته جلب شد که شاید استفاده از یک عامل نوروپروتکتیو به همراه سلول‌های بنیادی عصبی در روند بهبودی عملکردی نخاع ضایعه دیده موثر باشد و کارایی پیوند را بالا ببرد.

بنابراین در مطالعه حاضر (-) - دپرنیل مورد استفاده قرار گرفت که یک مهارکننده مونوآمینوآکسیداز نوع B است و در این اواخر مطالعات زیادی، اثرات نوروپروتکتیو و القاکنندگی عصبی آن را نشان داده است (۸، ۹). این دارو اولین بار به صورت همراه با لوودوپا برای درمان پارکینسون مورد استفاده قرار گرفت. بعدها مشخص شد که خود (-) - دپرنیل به تنهایی نیز باعث کند شدن روند پیشرفت ضعف و ناتوانی در این بیماری می‌شود (۱۰، ۱۱). مطالعات دیگر نشان داده است که (-) - دپرنیل بیان فاکتورهای رشدی مانند: Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)، Nerve Growth Factor (NGF)، Neurotrophin-3 (NT-3) و Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) را افزایش می‌دهد (۸، ۹، ۱۲، ۱۳) و در آسیب ناشی از Ischemic Reperfusion fusion (۱۴) و اکسوتومی (۱۵) و مدل Contusion (۱۶) در نخاع هم موثر است.

با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعات گذشته که به طور مختصر به آن اشاره شد، در این تحقیق تاثیر سلول‌های بنیادی عصبی و (-) - دپرنیل بر بهبودی عملکردی در مدل ضایعه نخاعی نوع Contusion در موش صحرایی ماده به منظور ایجاد بهبودی بیشتر بررسی شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی عصبی از مغز موش C57 بالغ ابتدا دیواره طرفی شاخ قدامی بطن‌های طرفی مغز موش C57 (موسسه پاستور ایران) به بافر Hank's Buffered Salt Solution (HBSS) (Sigma) حاوی ۰/۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هیالورونیک اسید (Sigma)، ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کینورنیک اسید (Sigma)، ۱/۳۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تریپسین (Sigma) و گلوکز ۲ میلی‌مولار منتقل شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. سپس محصول هضم ایجاد شده به مدت ۵ دقیقه با دور ۲۰۰ شتاب ثقل سانتریفیوژ شده و به HBSS حاوی سوکروز ۰/۹ مولار انتقال یافت. سپس سوسپانسیون سلولی به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۷۵۰ شتاب ثقل سانتریفیوژ شد. در مرحله بعد سلول‌ها در ۲ میلی‌لیتر محیط کشت حل شده و سپس به آرامی روی سطح ۱۰ میلی‌لیتر Earle's Balanced Salt Solution (EBSS) (Sigma) حاوی Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma) ۴ درصد منتقل شدند. سلول‌ها با دور ۲۰۰ شتاب ثقل به مدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ و با استفاده از

قرار داده شده روی لام‌های ژلاتینه برای رنگ‌آمیزی کرسیل فست ویولت استفاده شدند. مقاطع بعد از خشک شدن با کرسیل فست ویولت رنگ‌آمیزی گردیدند و از آنها جهت تعیین حجم حفره و شمارش نوروئیک عکس گرفته شد. معیار شمارش، نوروئیک‌های حرکتی سالم در لامینای IX شاخ قدامی جانبی نخاع که دارای سیتوپلاسم زیاد، هسته و هستک مشخص و هم‌چنین قطر متوسط بیشتر از ۲۵ میکرومتر بود، در نظر گرفته شد (۱۴، ۲۵). از مقاطع منتقل شده بر روی لام‌های Super Frost Plus جهت ایمونوهیستوشیمی استفاده گردید.

ایمونوهیستوشیمی

جهت این کار مقاطع عرضی که روی لام‌های Super Frost Plus گذاشته شده بودند ابتدا با PBS شست‌وشو داده شدند. بعد

در ۵۰ درصد

Formamide / 2x Standard Sodium Citrate (SSC) (Merck Germany): 0.3 M NaCl and 0.03 M Sodium Citrate)

به مدت ۲ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد (جهت دناتورده شدن DNA) قرار داده شدند. در مرحله بعد با 2x/SSC به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق شست‌وشو انجام شد. سپس در معرض اسیدکلریدریک ۲ نرمال به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از ۳۰ دقیقه با بافر بورات ۰/۱ مولار (pH=۸/۵) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق شست‌وشو داده شد. در مرحله بعد با PBS شسته شد و با محلول بلاک کننده (سرم بز ۱۰ درصد در PBS به اضافه ۰/۳ درصد تریتون) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (در محفظه مرطوب) جهت پوشاندن مکان‌های غیراختصاصی انکوبه گردید. بعد از آن با آنتی‌بادی اولیه ضد Brdu (MAB3222, CHEMI) -MAB3222, CHEMI) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در محفظه مرطوب انکوبه شدند. بعد از این مرحله چند بار با PBS شست‌وشو انجام شد و در معرض آنتی‌بادی ثانویه ضد موش کونژوگه به (FITC) Fluorescein Isothiocyanate (FITC) به مدت ۱ ساعت (AP308F, CHEMICON International, Inc) در دمای اتاق (در محفظه مرطوب و تاریک) قرار گرفتند. بعد از شست‌وشو با PBS (در تاریکی)، با آنتی‌بادیهای ضد الیگودندروسیت (Rabbit Polyclonal to Oligodendrocyte Specific Protein ab7474, abcam)

ضد بتا توبولین III

(Rabbit Polyclonal to Neuron specific beta III Tubulin, ab18207, abcam)

و ضد GFAP

(Rabbit Polyclonal to GFAP, ab7260 abcam)

به طور جداگانه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (در تاریکی و در محفظه مرطوب) انکوبه شدند. بعد از شست‌وشو با PBS (در تاریکی) با آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه به TR (Goat Polyclonal to Rabbit IgG - H&L ab6719, abcam) به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق (در محفظه مرطوب و تاریک) انکوبه گردیدند. سپس با PBS شست‌وشو داده و روی آنها لامل قرار داده شد. در نهایت لام‌ها در تاریکی و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان بررسی توسط میکروسکوپ فلوروسنت نگهداری شدند.

آنالیز آماری

نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16.0 با هم مقایسه شدند و با استفاده

استریل جراحی برشی در پوست ایجاد شد و عضلات ناحیه جدا و کنار زده شدند. بعد در ناحیه مهره T13 لامینکتومی با احتیاط و دقت فراوان ایجاد شد به طوری که هیچ‌گونه آسیبی به سخت شامه وارد نشد. در مرحله بعد از ارتفاع ۲۵ میلی‌متری استوانه‌ای به وزن ۱۰ گرم روی سخت شامه رها شد. بعد از برخورد، محل جراحی لایه به لایه بخیه زده شد. مراقبت‌های بعد از ایجاد ضایعه شامل تزریق ۱۰ سانتی‌متر مکعب سرم رینگر لاکتات به صورت داخل صفاقی برای جلوگیری از دهیدراتاسیون، تزریق جنتامایسین به میزان ۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه یک بار و به مدت ۷ روز جهت جلوگیری از عفونت‌های سیستم ادراری، تزریق مسکن روزانه دو بار به مدت ۲ روز جهت کاهش درد ناشی از ضایعه وارد شده، تخلیه مثانه حیوان با دست، روزانه ۲-۳ بار تا زمان بازگشت رفلکس تخلیه خود به خودی مثانه انجام شد (۲۴). در گروه شم فقط لامینکتومی انجام شد. در گروه شاهد ۹ روز بعد از ضایعه DMEM/F12 (حلال سلول‌های بنیادی عصبی) به صورت داخل نخاعی تزریق شد. در گروه دریافت کننده NSCs و دریافت کننده هم‌زمان NSCs و (-) - دپرنیل در روز نهم سلول‌های بنیادی عصبی نشان‌دار با Brdu با غلظت ۱۰^۵ بر ۲۰ میکرولیتر با کمک میکروسکوپ و با هدایت استرنوتاکیسیک به داخل نخاع در دو طرف خط میانی یک میلی‌متر روسترال و کودال به ناحیه ضایعه تزریق شد. در گروه دریافت کننده هم‌زمان NSCs و (-) - دپرنیل علاوه بر پیوند سلول‌های بنیادی عصبی، از یک ساعت بعد از ایجاد ضایعه تا ۱۴ روز (-) - دپرنیل (Sigma) با دوز ۰/۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به طور روزانه به صورت داخل صفاقی و در گروه شاهد حلال (-) - دپرنیل (نرمال سالین) به مدت ۱۴ روز تزریق شد. دوز مذکور در محدوده دوز انسانی این دارو است و هم‌چنین براساس مقالات منتشر شده در زمینه (-) - دپرنیل (۱۰، ۱۴، ۱۶) انتخاب شد. همه حیوانات، دارو سرکوب کننده سیستم ایمنی سیکلوسپورین A به صورت زیرپوستی از روز هفتم بعد از ضایعه دریافت کردند و به مدت ۸ هفته مورد مطالعه قرار گرفتند.

تست رفتار

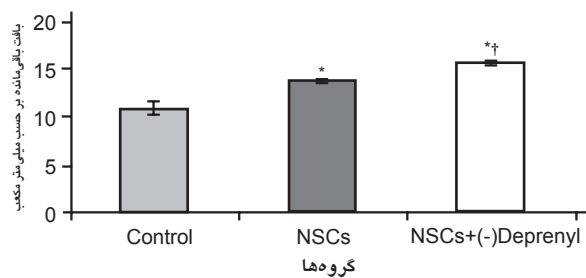
از روز اول بعد از ایجاد ضایعه و بعد به صورت هفتگی در همه گروه‌ها از حرکات آنها در استوانه مخصوص این تست، فیلم‌برداری به عمل آمد (۲۳) و به حرکات موش‌ها در فیلم بر اساس جدول امتیازدهی تست رفتاری (BASSo Beattie Bresnahan (BBB)، به صورت یک‌سوی خبر امتیاز داده شد.

یافت‌شناسی

در پایان هفته هشتم، حیوانات به طور عمیق بیهوش شدند و پرفیوژن قلبی به وسیله نرمال سالین (۱۰۰ میلی‌لیتر) و پارافرم آلدئید ۴ درصد (۲۰۰ میلی‌لیتر) صورت گرفت و نخاع محل ضایعه دیده خارج شد و یک شب در پارافرم آلدئید، بعد به مدت ۸ ساعت در سوکروز ۱۰ درصد و بعد به مدت یک شب به ترتیب در سوکروز ۲۰ و ۳۰ درصد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس قالب‌گیری شده و با نیتروژن مایع فریز و در ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان برش نگهداری گردید.

نمونه‌های نخاع با دستگاه CRYOCUT Leica ۱۸۰۰ با ضخامت ۲۰ میکرومتر به طور عرضی برش زده شد. برش‌ها به نسبت ۱ به ۴ روی لام‌های ژلاتینه و Super Frost Plus قرار داده شدند. مقاطع

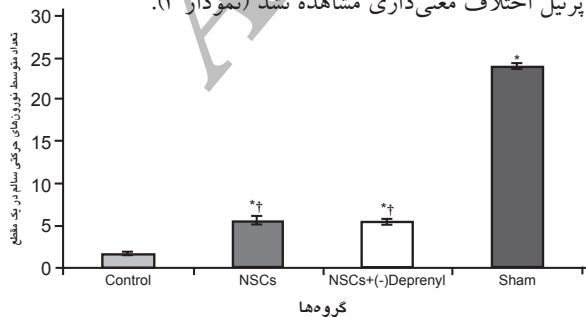
ضایعه بود، بنابراین در این مرحله، حجم نخاع در یک طول مشخص (۲/۵ میلی‌متر از طرفین مرکز ضایعه) در گروه‌های کنترل، NSCs و دریافت‌کننده هم‌زمان NSCs و (-) - دپرنیل محاسبه و با هم مقایسه گردید. جهت انجام این کار مساحت متوسط نخاع در محل ضایعه محاسبه و در طول ۵ میلی‌متر ضرب و حجم حفره از آن کم گردید و در نتیجه میزان حجم بافت باقی‌مانده نخاع در محل ضایعه به دست آمد. میزان حجم بافت باقی‌مانده در گروه‌های NSCs و دریافت‌کننده هم‌زمان NSCs و (-) - دپرنیل نسبت به کنترل به صورت معنی‌داری بیشتر بود. هم‌چنین میزان حجم بافت باقی‌مانده در گروه دریافت‌کننده هم‌زمان NSCs و (-) - دپرنیل نسبت به گروه NSCs هم به صورت معنی (p < ۰/۰۵) داری افزایش نشان داد (نمودار ۲).



نمودار ۲: مقایسه حجم بافت باقی‌مانده نخاع در گروه‌های کنترل، NSCs و NSCs+(-)deprenyl بر حسب میلی‌متر مکعب. * تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل، † تفاوت معنی‌دار بین گروه NSCs+(-)deprenyl و NSCs (p < ۰/۰۵).

شمارش نورونی

بر اساس مشخصات گفته شده در بالا حدود ۵ میلی‌متر از نخاع محل ضایعه از نظر وجود نورون‌های حرکتی سالم، در گروه‌های شام، کنترل، NSCs و دریافت‌کننده هم‌زمان NSCs و (-) - دپرنیل شمارش و با یکدیگر مقایسه گردیدند. تعداد نورون‌های سالم در گروه‌های کنترل، NSCs و دریافت‌کننده هم‌زمان NSCs و (-) - دپرنیل به میزان خیلی زیادی نسبت به گروه شام کاهش یافته بود (اختلاف معنی‌دار بود). با این وجود، تعداد نورون‌های سالم در گروه NSC و دریافت‌کننده هم‌زمان NSCs و (-) - دپرنیل هم نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش نشان داد ولی بین تعداد نورون‌های دو گروه NSCs و دریافت‌کننده هم‌زمان NSCs و (-) - دپرنیل اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (نمودار ۳).



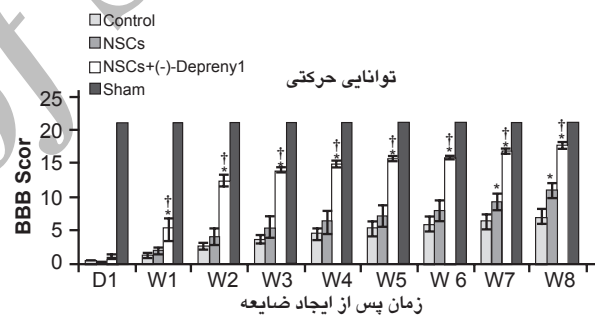
نمودار ۳: مقایسه تعداد نورون‌های حرکتی سالم در یک مقطع نخاع در گروه شام، کنترل NSCs و NSCs+(-)deprenyl. درصد تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل با گروه‌های شام NSCs+(-)deprenyl، † تفاوت معنی‌دار بین گروه شام با گروه NSCs و NSCs+(-)deprenyl (p < ۰/۰۵).

از نرم‌افزار Excel 2003 نمودارها رسم گردیدند. در مورد نتایج تست رفتاری، تعداد نورون‌های حرکتی، حجم حفره و حجم بافت باقی‌مانده از ANOVA یک طرفه استفاده گردید و p < ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

مشاهدات رفتاری

بعد از ایجاد ضایعه، موش‌ها فلج شدند و یک روز بعد از ضایعه هر هفته یک‌بار به مدت ۴ دقیقه از حرکات آنها فیلم‌برداری شد و بر اساس معیارهای تست BBB به توانایی حرکتی آنها امتیاز داده شد (نمودار ۱). توانایی حرکتی همه گروه‌ها نسبت به گروه شام به طور معنی‌داری در همه زمان‌ها بعد از ایجاد آسیب کاهش یافت. هم‌چنین توانایی حرکتی گروه دریافت‌کننده هم‌زمان NSCs و (-) - دپرنیل در همه زمان‌ها غیر از روز اول بعد از ضایعه نسبت به گروه کنترل و NSC به صورت معنی‌داری (p < ۰/۰۵) افزایش نشان داد، اما افزایش توانایی حرکتی گروه NSC فقط در هفته‌های هفتم و هشتم نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود (p < ۰/۰۵).



نمودار ۱: مقایسه توانایی حرکتی بین گروه‌های شام، کنترل، NSC و NSCs+(-)deprenyl در مقیاس BBB. * تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل، † تفاوت معنی‌دار بین گروه NSCs+(-)deprenyl و NSCs (p < ۰/۰۵).

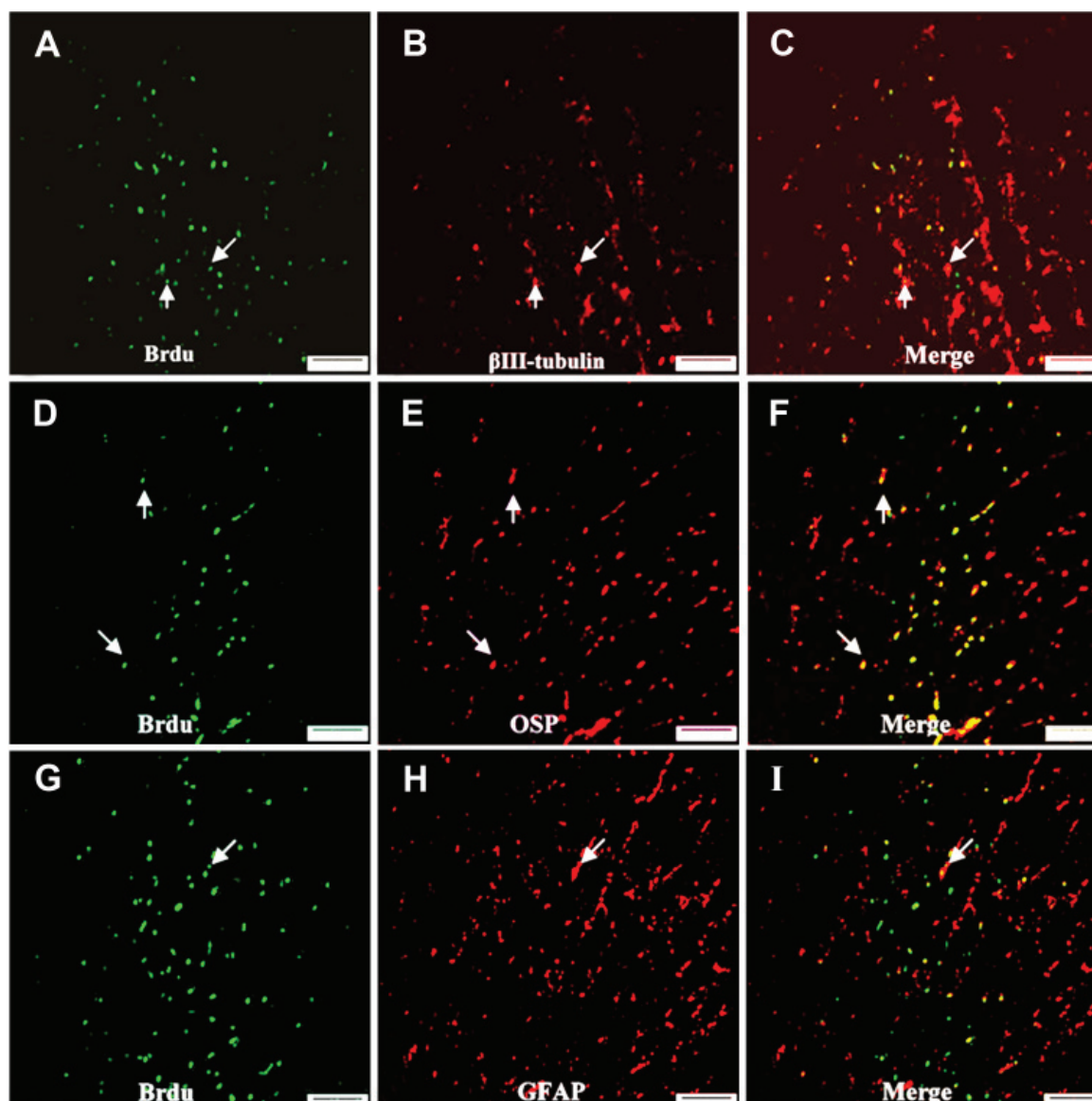
بافت‌شناسی

تعیین حجم حفره

در ضایعه نوع Contusion بعد از حدود یک هفته تا ۱۰ روز از زمان ایجاد ضایعه، بر اثر نکروز و آپوپتوز شدید در نخاع یک ضایعه مرکزی حاوی حفرات کیستیک ایجاد می‌شود که به مرور گسترش می‌یابد و با اندازه‌گیری آن می‌توان تا حدودی به وسعت ضایعه پی برد. بنابراین در پایان مطالعه از مقاطع پشت سرهم در محل ضایعه عکس گرفته شد و توسط نرم‌افزار Digimazer (یک نرم‌افزار آنالیز تصویر که با اعمال کالیبراسیون مناسب، مساحت هر قسمتی از تصویر را می‌تواند به طور دقیق محاسبه کند) مساحت متوسط حفره به دست آمد، سپس در طول حفره ضرب گردید و تخمینی از حجم حفره حاصل شد. حجم متوسط حفره در گروه‌های مختلف از نظر آماری با هم اختلاف معنی‌داری نداشت.

تعیین حجم بافت باقی‌مانده نخاع در محل ضایعه

در بررسی مقاطع تهیه شده جهت اندازه‌گیری حجم حفره، مشخص شد که حداکثر طول حفره در گروه کنترل حدود ۲ میلی‌متر و حداکثر گسترش ضایعه بعد از دو ماه حدود ۲/۵ میلی‌متر از نقطه مرکزی



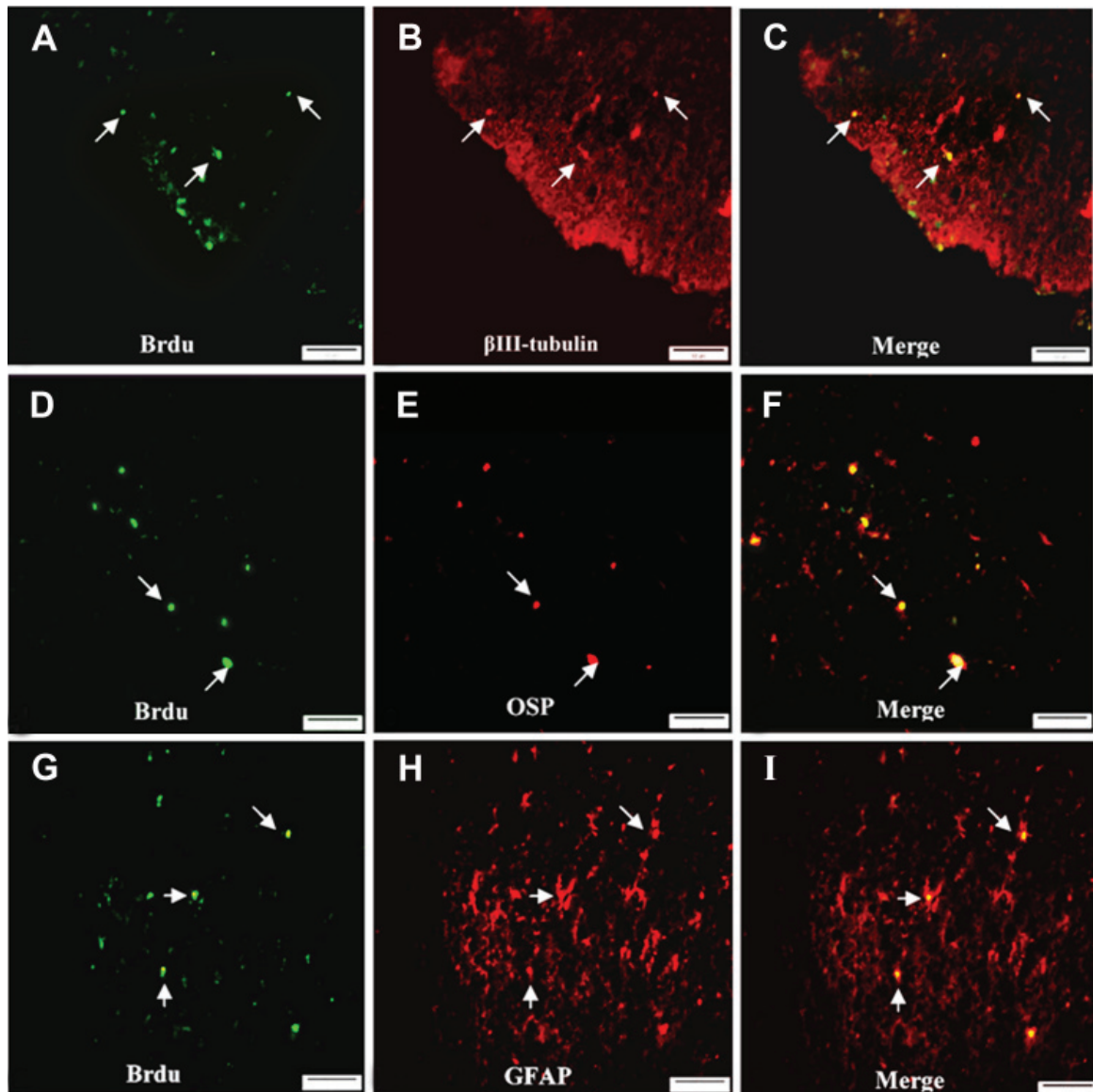
شکل ۱: تصاویر مربوط به ایمونوهیستوشیمی سلول‌های بنیادی عصبی پیوند شده به گروه NSC که تمایز نورونی (A, B, C)، الیگودندروسیتی (D, E, F) و آستروسیتی (G, H, I) را نشان دادند.

الیگودندروسیتی (شکل F, E, D) و آستروسیتی (شکل G, H, I) را نشان دادند.

در بررسی ایمونوفلوروسنس مقاطع نخاعی گروه دریافت‌کننده هم‌زمان NSCs و (-) - دپرنیل نیز تمایزات نورونی (شکل A, B, C, ۲)، الیگودندروسیتی (شکل E, F, ۲D) و آستروسیتی (شکل H, G, ۱) مشاهده گردید. هم‌چنین در گروه NSCs سلول‌های پیوند شده در اطراف حفره تشکیل شده متمرکز شده بودند و تعدادی از سلول‌ها به هیچ کدام از آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه سلول‌های موجود در CNS واکنش نشان ندادند؛ در حالی که در گروه دریافت‌کننده هم‌زمان NSCs و (-) - دپرنیل سلول‌های پیوند شده پراکنده‌تری داشتند و بیشتر به یکی از رده‌های سلولی مذکور متمایز شده بودند.

ایمونوهیستوشیمی

در پایان دوره درمان (هفته هشتم) از بخش آسیب دیده نخاع مقاطع انجمادی به ضخامت ۲۰ میکرومتر تهیه گردید و روی لام‌های Super Frost Plus قرار داده شد. جهت بررسی تمایز سلول‌های پیوند شده در بخش آسیب دیده نخاع، از تکنیک ایمونوفلوروسنس به روش Double-Staining استفاده شد. بدین صورت که در هر اسلاید، آنتی‌بادی ضد Brdu به همراه یکی دیگر از آنتی‌بادی‌ها (ضد OSP برای الیگودندروسیت، ضد GFAP برای آستروسیت و ضد βIII-Tubulin برای نورون) استفاده گردید و سپس توسط میکروسکوپ فلوروسنت مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده، تعدادی از سلول‌های تزریق شده به منطقه ضایعه دیده نخاع در گروه NSCs تمایز نورونی (شکل A, B, C)،



شکل ۲: تصاویر مربوط به ایمونوهیستوشیمی سلول‌های بنیادی عصبی پیوند شده به گروه (-) - Deprenyl + NSCs که تمایز نورونی الیگودندروسیتی (A, B, C)، الیگودندروسیتی (D, E, F) و آستروسیتی (G, H, I) را نشان دادند.

گروه دریافت‌کننده؛ هم‌زمان NSCs و (-) - دپرنیل را می‌توان به اثر (-) - دپرنیل نسبت داد زیرا مطالعات نشان داده است که (-) - دپرنیل باعث کاهش تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود (۲۷). از طرفی آسیب نخاعی باعث هیپوکسی نورون‌های موجود در نخاع می‌شود و اگر این هیپوکسی زیاد طول بکشد، منجر به مرگ سلولی خواهد شد و چون نشان داده شده است که (-) - دپرنیل آپوپتوز القا شده توسط هیپوکسی در غلظت 10^{-5} مولار را مهار می‌کند (۱۱)، به احتمال در این مطالعه هم (-) - دپرنیل از این طریق هم از مرگ نورونی جلوگیری کرده است. هم‌چنین نشان داده شده است که فعالیت نوروپروتکتیوی (-) - دپرنیل ناشی از اثر ضد آپوپتوزی آن می‌باشد. از طرفی نشان داده شده است که این دارو در غلظت‌های بالا (غلظت 10^{-3} مولار) آپوپتوز را القا می‌کند (۱۰) و چون در این مطالعه از دوز 0.1 میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ترکیب پیوند سلول‌های بنیادی عصبی و تجویز هم‌زمان (-) - دپرنیل باعث بهبودی عملکردی بیشتری نسبت به سلول‌های بنیادی عصبی به تنهایی می‌گردد (نمودار ۱) و علل احتمالی این بهبودی عملکردی را می‌توان به نتایج زیر نسبت داد. اول اینکه تعداد نورون‌های سالم در گروه‌های دریافت‌کننده هم‌زمان NSCs و (-) - دپرنیل و بیشتر از گروه کنترل بود (نمودار ۳)، لذا بخشی از بهبودی عملکردی را می‌توان به حفاظت نورون‌های حرکتی در نخاع نسبت داد. به احتمال این حفاظت عصبی در نتیجه کاهش عوامل آسیب‌رسانی مثل رادیکال‌های آزاد (که تولید آنها در نتیجه فعال شدن گیرنده‌های گلو تامات و مسیرهای داخل سلولی آن (۲۶) بعد از آسیب در نخاع زیاد می‌شود) می‌باشد. کاهش تولید رادیکال‌های آزاد در

استفاده شد و این دوز، غلظت کمتر از 10^{-3} مولار (-) - دپرنیل را در بدن حیوان ایجاد می‌نماید، می‌توان انتظار داشت (-) - دپرنیل در این مطالعه با اثر ضد آپوپتوزی باعث افزایش بقای نورون‌های موجود در نخاع شده باشد.

از طرفی علت احتمالی بیشتر بودن تعداد نورون‌های حرکتی در گروه‌های دریافت‌کننده سلول‌های بنیادی عصبی (گروه دریافت‌کننده هم‌زمان NSCs و (-) - دپرنیل و NSCs) را می‌توان به این شیوه بیان نمود که بعد از آسیب میزان خارج سلولی گلوتامات به سطح سمیت می‌رسد و این گلوتامات با اثر بر گیرنده‌های خودش پراکسیداسیون لیپیدها و تولید رادیکال‌های آزاد را افزایش می‌دهد و این رادیکال‌های آزاد منجر به آسیب و مرگ سلولی خواهند شد. مطالعات نشان داده‌اند که آنتاگونیست‌های گیرنده گلوتامات ممکن است پیامدهای رفتاری و حفاظت عصبی مفیدی داشته باشند، به طوری که بلوکر گیرنده NMDA (MK801) و NBQX (آنتاگونیست گیرنده AMPA گلوتامات) در مدل Contusion باعث اثرات نوروپروتکتیو و بهبودی رفتاری شده است (۲۸، ۲۹). مطالعات دیگر نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی عصبی از سمیت القا شده توسط گلوتامات جلوگیری به عمل آورده و بقای نورون‌های حرکتی را در شرایط *in vitro* ارتقا می‌بخشند (۳۰). بنابراین بخشی از حفاظت عصبی ایجاد شده در اثر سلول‌های بنیادی عصبی در اثر کاهش سمیت گلوتامات ایجاد شده است. از طرفی نشان داده شده است که سلول‌های بنیادی عصبی به طور ذاتی فاکتورهای نوروتروفیکی مانند GDNF و NGF را ترشح می‌کنند و چون در آسیب نخاعی، در اثر گسیختگی فیبرهای عصبی، حمایت نوروتروفیک نورون‌های موجود در نخاع و مراکز بالاتر از بین می‌رود (۳۱، ۳۲)، احتمال دارد این سلول‌ها با ترشح فاکتورهای نوروتروفیک در افزایش بقای نورون‌های نخاع نقش بازی کرده باشند.

از طرفی چون تعداد نورون‌های حرکتی سالم در گروه NSCs با گروه دریافت‌کننده هم‌زمان NSCs و (-) - دپرنیل تفاوت معنی‌داری نداشت (بر خلاف توانایی حرکتی بیشتر در گروه دریافت‌کننده هم‌زمان NSCs و (-) - دپرنیل)، این نتیجه می‌تواند بیان‌کننده این باشد که اول، حفظ موضعی نورون‌های حرکتی در نخاع سهم کمی در بهبودی عملکردی داشته است. دوم، سلول‌های بنیادی عصبی و (-) - دپرنیل از نظر حفظ بقای نورون‌های حرکتی نخاع اثر سینرژیک نداشته‌اند. سوم، چون بهبودی حرکتی گروه NSCs کمتر از گروه دریافت‌کننده هم‌زمان NSCs و (-) - دپرنیل بود، این مساله هم اهمیت کمتر از دست رفتن موضعی نورون‌های حرکتی را در نخاع خاطر نشان می‌نماید. این نتیجه از جهاتی مطالعه راویکومار و همکاران را تایید می‌کند. آنها گزارش کردند (-) - دپرنیل با دوز 0.1 میلی‌گرم بر کیلوگرم نورون‌های حرکتی نخاع را به طور کامل از آسیب ناشی از Ischemic Reperfusion محافظت نموده و بهبودی حرکتی کاملی هم ایجاد می‌نماید (۱۴). در مطالعه حاضر، تعداد نورون‌های حرکتی سالم در محل آسیب در گروه دریافت‌کننده هم‌زمان NSCs و (-) - دپرنیل و گروه NSCs نسبت به گروه شاهد افزایش و نسبت به گروه NSCs و (-) - دپرنیل در این نوع آسیب هم از نورون‌های حرکتی محافظت نموده‌اند اما این حفاظت، به طور نسبی اعمال شده است که به احتمال ناشی از ماهیت متفاوت آسیب در این مطالعه می‌باشد. هم‌چنین بیان‌کننده این نکته است که اثر بهبودی دهنده (-) - دپرنیل و NSCs

در این مطالعه به طور عمده از طریق حفظ نورون‌های حرکتی موجود در نخاع ایجاد نمی‌شود؛ چون بهبودی حرکتی مشاهده شده خیلی بیشتر از آن به نظر می‌رسد که توسط این تعداد نورون‌های حرکتی توجیه شود.

از طرفی چون میزان بافت باقی‌مانده نخاع در گروه دریافت‌کننده هم‌زمان NSCs و (-) - دپرنیل و NSCs بیشتر از گروه کنترل بود (نمودار ۲)، به احتمال بخش عمده بهبودی حرکتی به حفظ ماده سفید و اینتر نورون‌های موجود در نخاع مربوط می‌باشد که این امر می‌تواند به علت کاهش رادیکال‌های آزاد در محل آسیب و اثر ضد آپوپتوزی (-) - دپرنیل روی جسم سلولی فیبرهای ماده سفید در مراکز بالاتر و هم‌چنین اثر تروفیک سلول‌های بنیادی عصبی و اثر کاهنده سمیت گلوتامات توسط این سلول‌ها، روی اکسون‌های قطع شده در نخاع ایجاد شده باشد. تعداد کم نورون‌های حرکتی در گروه دریافت‌کننده دریافت‌کننده هم‌زمان NSCs و (-) - دپرنیل، برخلاف بهبودی به نسبت خوب عملکردی تایید‌کننده این ادعا است. این مساله تایید‌کننده گزارش سواب و بارتولدی است که اعلام کردند، برخلاف اینکه SCI باعث از بین رفتن سلول‌های عصبی و گلیال زیادی در محل آسیب می‌شود، نقص عملکردی به علت از بین رفتن اکسون‌های صعودی و نزولی در اثر آسیب مستقیم و یا مکانیسم‌های پیچیده آسیب ثانویه می‌باشد (۳۳). از طرفی، نشان داده شده است که در آسیب نخاعی در اثر گسیختگی فیبرهای عصبی، حمایت نوروتروفیک نورون‌های موجود در نخاع و مراکز بالاتر از بین می‌رود (۳۱، ۳۲). بر این اساس میتسو و همکاران فیروبلاست‌های ترشح‌کننده BDNF و NT3 را به ضایعه نخاعی Contusion پیوند کردند و گزارش نمودند که توانایی حرکتی گروه پیوند شده در مقیاس $0.7 \pm 1/2$ BBB بود (۳۴). این امر در حالی است که در مطالعه حاضر، توانایی حرکتی گروه دریافت‌کننده هم‌زمان NSCs و (-) - دپرنیل در مقیاس BBB، $0.49 \pm 17/66$ بوده که خیلی بیشتر از بهبودی حرکتی مشاهده شده در مطالعه آنها است. علت این اختلاف علاوه بر متفاوت بودن محل ایجاد ضایعه نخاعی در مطالعه آنها (سطح مهره ۹/۸ T)، به احتمال این است که فیروبلاست‌های ترشح‌کننده BDNF و NT3 حمایت نوروتروفینی را برای نخاع فراهم می‌کنند، در حالی که در این مطالعه سلول‌های بنیادی عصبی خودشان می‌توانند به طور موضعی، آن هم به طور مداوم، فاکتورهای رشدی را ترشح کنند. هم‌چنین (-) - دپرنیل هم علاوه بر القای بیان نوروتروفین‌های متعددی مانند BDNF، NGF، NT-3 و GDNF (۸، ۹، ۱۲، ۱۳)، اثر ضد آپوپتوزی و آنتی‌اکسیدانی هم دارد. از طرفی همان‌طور که اشاره شد، سلول‌های بنیادی عصبی سمیت ناشی از گلوتامات را هم کاهش می‌دهند. بنابراین احتمال دارد سلول‌های بنیادی عصبی و (-) - دپرنیل از طریق مجموع این اثرات، از مرگ جسم سلولی نورون‌های موجود در محل ضایعه و مراکز بالاتر و به تبع آن ماده سفید جلوگیری نموده و زمینه را برای پلاستی سیتی نخاع فراهم کرده باشند. هم‌چنین این مطالعه نشان داد که سلول‌های بنیادی عصبی جهت ایجاد بهبودی مطلوب به زمان بیشتری نیاز دارند، هم‌چنان که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، توانایی حرکتی در گروه NSCs فقط در هفته‌های هفتم و هشتم با کنترل اختلاف معنی‌داری دارد و علت نتایج ضد و نقیض در مورد سلول‌های بنیادی عصبی هم، علاوه بر تفاوت در مدل‌های ایجاد آسیب، مکان جداسازی سلول‌های بنیادی عصبی و شرایط کشت قبل از پیوند، به احتمال طول مدت مطالعه می‌باشد. علاوه بر این، مساله دیگری که باید به آن توجه

نیافته در محل آسیب مانده‌اند. این نتیجه توسط مطالعه کائو و همکاران در سال ۲۰۰۲ حمایت می‌شود که نشان دادند نخاع آسیب دیده از تمایز سلول‌های پیش‌ساز عصبی به سلول‌های بالغ جلوگیری می‌کند (۴۰). بنابراین در مطالعه حاضر چون سلول‌های پیوند شده در گروه NSCs کمتر تمایز پیدا کرده بودند، به احتمال تأییدکننده شدت کمتر آسیب در گروه دریافت‌کننده هم‌زمان NSCs و (-) - دپرنیل نسبت به گروه NSCs است که توسط (-) - دپرنیل ایجاد شده است و هم‌چنین بیان‌کننده این است که (-) - دپرنیل محیط نخاع را برای پیوند مناسب‌تر می‌گرداند و منجر به تمایز بیشتر در گروه ND می‌گردد که این سلول‌های تمایز یافته با جایگزین کردن سلول‌های از دست رفته، می‌توانند در بهبودی عملکردی مشاهده شده نقش ایفا کنند.

نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که سلول‌های بنیادی عصبی به تنهایی بهبودی عملکردی کمی ایجاد می‌کنند، اما به همراه (-) - دپرنیل بهبودی عملکردی بیشتری ایجاد می‌نمایند و این بهبودی عملکردی به کلی در اثر حفظ بافت نخاع و جایگزینی سلول‌های از دست رفته در اثر آسیب، ایجاد می‌شود.

تقدیر و تشکر

این مطالعه با حمایت مالی مرکز تحقیقات علوم اعصاب کاربردی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... و مساعدت دانشگاه علوم پزشکی کردستان انجام شد. نویسندگان مقاله بدینوسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را نسبت به مسوولین دانشگاه‌های علوم پزشکی بقیه ا... و کردستان ابراز می‌دارند.

References

1. Fernandez E, Mannino S, Tufo T, Pallini R, Lauretti L, Albanese A, et al. The adult "paraplegic" rat: treatment with cell graftings. *Surg Neurol*. 2006; 65(3): 223-237.
2. Bregman BS, Goldberger ME. Infant lesion effect: III. Anatomical correlates of sparing and recovery of function after spinal cord damage in newborn and adult cats. *Brain Res*. 1983; 285(2): 137-154.
3. Okano H. Stem cell biology of the central nervous system. *J Neurosci Res*. 2002; 69: 698-707.
4. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science*. 2000; 287: 1433-1438.
5. Liang P, Jin LH, Liang T, Liu EZ, Zhao SG. Human neural stem cells promote corticospinal axons regeneration and synapse reformation in injured spinal cord of rats. *Chin Med J*. 2006; 119(16): 1331-1338.
6. Hulsebosch CE. Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. *Adv Physiol Edu*. 2002; 26: 238-255.
7. Okada S, Ishii K, Yamane J, Iwanami A, Ikegami T, Katoh H, et al. In vivo imaging of engrafted neural stem cells: its application in evaluating the optimal timing of transplantation for spinal cord injury. *FASEB J*. 2005; 19(13): 1839-1841.
8. Ghorbanian MT, Tiraihi T, Mesbah-Namin SA, Fathollahi Y. Seligiline is an efficient and potent inducer for bone marrow stromal cell differentiation into neuronal phenotype. *Neurol Res*. 2010; 32(2): 185-193.
9. Esmaeili F, Tiraihi T, Movahedin M, Mowla SJ. Seligiline induces neuronal phenotype and neurotrophins expression in embryonic stem cells. *Rejuvenation Res*.

شود این است که توانایی حرکتی در گروه دریافت‌کننده هم‌زمان NSCs و (-) - دپرنیل حتی در هفته‌های اول دوم هم خیلی از گروه NSCs بیشتر بود، این مساله نشان دهنده این نکته است که در اصل اثر دپرنیل محافظت‌کننده است نه رژنراتیو، در حالی که اثر NSCs علاوه بر حفظ‌کنندگی، رژنراتیو هم هست.

از طرفی نتایج ایمونوهیستوشیمی (شکل‌های ۱ و ۲) نشان داد که سلول‌های پیوند شده در پایان مطالعه زنده بودند و به هر سه رده سلولی نورون، الیگودندروسیت و آستروسیت تمایز یافته بودند. البته در زمینه تمایز به این رده‌های سلولی گزارش‌های ضد و نقیضی وجود دارد. برخی از مطالعات نشان داده است که سلول‌های بنیادی عصبی بعد از پیوند فقط به آستروسیت تمایز می‌یابند (۳۵)، برخی دیگر گزارش نموده‌اند که به آستروسیت و الیگودندروسیت تمایز یافته‌اند (۵، ۳۶) در حالی که مطالعات دیگر نتیجه ما را تأیید می‌کنند (۳۷، ۳۸) که به احتمال به اختلاف در رده سلولی یا زمان پیوند بعد از آسیب مربوط باشد.

از طرفی چون در گروه NSCs سلول‌های پیوند شده، در محل آسیب متمرکز شده بودند و در گروه دریافت‌کننده هم‌زمان NSCs و (-) - دپرنیل پراکنندگی بیشتری به چشم می‌خورد، این مساله هم تأییدکننده اثر کاهندگی آسیب (-) - دپرنیل در نخاع است؛ زیرا نشان داده شده است که محل آسیب، فاکتورهای کموتاکتیک (۳۹) جهت جلب سلول‌های بنیادی ترشح می‌کند و هر چه شدت آسیب بیشتر باشد، تراکم این سلول‌ها بیشتر خواهد بود. از طرفی بعضی از سلول‌های پیوند شده در گروه NSCs در نزدیکی محل آسیب به هیچ کدام از آنتی‌بادی‌های اختصاصی نورونی، آستروسیتی و الیگودندروسیتی پاسخ ندادند که به احتمال نشان دهنده این است که به صورت تمایز

2006; 9(4): 475-484.

10. Magyar K, Szende B. (-)-Deprenyl, a selective MAO-B inhibitor, with apoptotic and anti-apoptotic properties. *Neurotoxicology*. 2004; 25(1-2): 233-242.
11. Xu L, Ma J, Seigel GM, Ma JX. L-Deprenyl, blocking apoptosis and regulating gene expression in cultured retinal neurons. *Biochem Pharmacol*. 1999; 58(7): 1183-1190.
12. Eklom J, Jossan SS, Ebendal T, Söderström S, Orelund L, Aquilonius SM. mRNA expression for neurotrophins and members of the trk family in the rat brain after treatment with L-deprenyl. *Acta Neurol Scand*. 1994; 89: 147-148.
13. Mizuta I, Ohta M, Ohta K, Nishimura M, Mizuta E, Hayashi K, et al. Selegiline and desmethylselegiline stimulate NGF, BDNF, and GDNF synthesis in cultured mouse astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 279(3): 751-755.
14. Ravikumar R, Lakshmana MK, Rao BS, Meti BL, Bindu PN, Raju TR. (-)-Deprenyl attenuates spinal motor neuron degeneration and associated locomotor deficits in rats subjected to spinal cord ischemia. *Exp Neurol*. 1998; 149(1): 123-129.
15. Iwasaki Y, Ikeda K, Shiojima T, Kobayashi T, Tagaya N, Kinoshita M. Deprenyl and pergolide rescue spinal motor neurons from axotomy-induced neuronal death in the neonatal rat. *Neurol Res*. 1996; 18(2): 168-170.
16. Izadpanah E, Fathi F, Rezaei MJ, Asgari A. Assessment of functional recovery of contusive spinal cord injury by administration of (-)-Deprenyl in rats. *SJKU*. 2009; 14(3): 1-10.

17. Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisén J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*. 1999; 96: 25-34.
18. Golbar M, Fathi F, Mowla SJ, Soheili F, Ahmadi A, Izadpanah E. Gene Expression Profiling of NCAM, NCAM-L1, N-Cadherin, Ninjurin-1 and Ninjurin-2 during the Course of Differentiation of Murine Neural Stem Cells. *Yakhteh*. 2010; 11: 390-399.
19. Fathi F, Jafari Kermani A, Golbar MR, Izadpanah E, Golmohammadi MGH, Mowla SJ, et al. Isolation, induction of neural and glial differentiation and evaluating the expression of five self renewal genes in adult mouse neural stem cells. *Journal of Iranian Anatomical Sciences*. 2007; 5(19): 81-92.
20. Basso DM, Beattie MS, and Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. *Exp Neurol*. 1996; 139: 244-256.
21. Balentine JD. Pathology of experimental spinal cord trauma: I The necrotic lesion as a function of vascular injury. *Lab Invest*. 1978; 39: 236-253.
22. Balentine JD. Pathology of experimental spinal cord trauma: II. Ultrastructure of axons and myelin. *Lab Invest*. 1978; 39: 254-266.
23. Basso DM, Beattie MS, and Bresnahan, JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*. 1995; 12: 1-21.
24. Zurita M, Vaquero J. Functional recovery in chronic paraplegia after bone marrow stromal cells transplantation. *Neuroreport*. 2004; 15(7): 1105-1108.
25. Copray S, Kernell D. Neurotrophins and trk-receptors in adult rat spinal motoneurons: differences related to cell size but not to 'slow/fast' specialization. *Neurosci Lett*. 2000; 289(3): 217-220.
26. Hulsebosch CE, Hains BC, Crown ED, Carlton SM. Mechanisms of chronic central neuropathic pain after spinal cord injury. *Brain Res Rev*. 2009; 60(1): 202-213.
27. Chiueh CC, Huang SJ, Murphy DL. Suppression of hydroxyl radical formation by MAO inhibitors: a novel possible neuroprotective mechanism in dopaminergic neurotoxicity. *J Neural Transm Suppl*. 1994; 41: 189-196.
28. Faden AI, Lemke M, Simon RP, and Noble LJ. N-methyl-D-aspartate antagonist MK801 improves outcome following traumatic spinal cord injury in rats: behavioral, anatomic and neurochemical studies. *J Neurotrauma*. 1988; 5: 33-45.
29. Wrathall JR, Teng YD, and Choiniere D. Amelioration of functional deficits from spinal cord trauma with systemically administered NBQX, an antagonist of non-N-methyl-D-aspartate receptors. *Exp Neurol*. 1996; 137: 119-126.
30. Llado J, Haenggeli C, Maragakis NJ, Synder EY, Rothstein JD. Neural stem cells protect against glutamate-induced excitotoxicity and promote survival of injured motor neurons through the secretion of neurotrophic factors. *Mol Cell Neurosci*. 2004; 27: 322-331.
31. de la Cruz RR, Pastor AM, Delgado-García JM. Influence of the postsynaptic target on the functional properties of neurons in the adult mammalian central nervous system. *Rev Neurosci*. 1996; 7(2): 115-149.
32. Rich KM. Neuronal death after trophic factor deprivation. *J Neurotrauma*. 1992; 9 Suppl 1: S61-69.
33. Schwab ME, Bartholdi D. Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev*. 1996; 76(2): 319-370.
34. Mitsui T, Fischer I, Shumsky JS, Murray M. Transplants of fibroblasts expressing BDNF and NT-3 promote recovery of bladder and hindlimb function following spinal contusion injury in rats. *Exp Neurol*. 2005; 194(2): 410-431.
35. Cao QL, Zhang YP, Howard RM, Walters WM, Tsoulfas P, Whittemore SR. Pluripotent stem cells engrafted into the normal or lesioned adult rat spinal cord are restricted to a glial lineage. *Exp Neurol*. 2001; 167(1): 48-58.
36. Vroemen M, Aigner L, Winkler J, Weidner N. Adult neural progenitor cell grafts survive after acute spinal cord injury and integrate along axonal pathways. *Eur J Neurosci*. 2003; 18: 743-751.
37. Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T, Miyao S, Watanabe M, Nakamura M, et al. Transplantation of in vitro-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats. *J Neurosci Res*. 2002; 69(6): 925-933.
38. Cummings BJ, Uchida N, Tamaki SJ, Salazar DL, Hooshmand M, Summers R, et al. Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102(39): 14069-14074.
39. Lepore AC, Bakshi A, Swanger SA, Rao MS, Fischer I. Neural precursor cells can be delivered into the injured cervical spinal cord by intrathecal injection at the lumbar cord. *Brain Res*. 2005; 1045(1-2): 206-216.
40. Cao QL, Howard RM, Dennison JB, Whittemore SR. Differentiation of engrafted neuronal-restricted precursor cells is inhibited in the traumatically injured spinal cord. *Exp Neurol*. 2002; 177(2): 349-359.