

## بررسی فراساختاری اثر فاکتور رشد عصب و فاکتور شبه انسولین بر روی رژئراسیون عصب محیطی موش صحرایی

غلامحسین فرجاه<sup>۱\*</sup>، محمد آهی<sup>۲</sup>، محمد علی اطلسی<sup>۳</sup>، ملک سادات نعیمی<sup>۴</sup>

(۱) استادیار دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

(۲) استادیار دانشگاه علوم پزشکی ایلام

(۳) استادیار دانشگاه علوم پزشکی کاشان

(۴) پزشک عمومی

تاریخ دریافت: ۸۵/۱۰/۲

تاریخ پذیرش: ۸۶/۱/۲

### چکیده

مقدمه: تشکیل میلین به بلوغ و تکامل سیتو اسکتال آکسون و میتو کندری وابسته است. فاکتور رشد عصب و فاکتور رشد شبه انسولین بصورت اختصاصی در تنظیم آنها نقش دارند.

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

یافته های پژوهش: در پایان هفته چهارم پس از ترمیم، تعداد آکسون های بدون میلین در گروه های اتوگرافت و فاکتورهای رشد اختلاف معنی داری نداشت ولی در پایان هفته دوازدهم، تعداد آکسون های بدون میلین در گروه اتوگرافت نسبت به گروه فاکتورهای رشد ( $P < 0.01$ ) اختلاف معنی داری داشت. چگالی میکروتوبول ها در هفته دوازدهم پس از ترمیم، در گروه نرمال و اتوگرافت اختلاف معنی داری ندارند. ستیخ میتو کندری در گروه های آزمایش موازی با محور درازشان بود.

نتیجه گیری نهایی: از نتایج این مطالعه می توان نتیجه گرفت که با توجه به اثرات مثبت فاکتورهای رشد بر روی رشد و تکامل میکروتوبول ها و میتو کندری ها، ممکن است برای ترمیم ضایعات عصب محیطی مفید باشد.

**واژه های کلیدی:** عصب سیاتیک، فاکتور رشد عصب، فاکتور شبه انسولین ۱، میکروتوبول، میتو کندری، پلی وینیلیدین فلوراید

\* نویسنده مسئول: دکتر غلامحسین فرجاه استادیار دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

E-mail: hfarjah@umsu.ac.ir

## مقدمه

در دستگاه عصب محیطی رشته عصبی، شامل یک آکسون است که در غلافی از سلول شوان قرار دارد. بسیاری از آکسون‌های عصب محیطی دارای غلاف میلین هستند که در بین سلول‌های شوان و آکسون قرار دارند. آکسون‌های بدون میلین غالباً در نودان‌های عمیق موجود در سطح سلول‌های شوان قرار می‌گیرند (۶).

نورون‌ها حاوی میتوکندری‌های فراوانی هستند که بطور گسترده پخش می‌شوند. میتوکندری‌ها میله‌ای یا رشته‌ای شکل می‌باشند و غالباً باریکتر از میتوکندری‌های سایر سلول‌ها هستند. قطر آن‌ها بین ۰/۸ تا ۰/۸ میکرون است، اما گاهی میتوکندری گرد و بزرگی نیز دیده می‌شود. میتوکندری‌ها با فاصله در طول آکسون پخش می‌شوند و مخصوصاً در پایانه‌های آکسونی فراوانند. ستیغ‌های آن‌ها همیشه به طور عرضی جهت‌گیری نمی‌کنند بلکه ممکن است در امتداد محور درازشان قرار گیرند، بطوری که در برش‌های عرضی، غشاها بصورت حلقه‌های هم مرکز تیره و روشن به نظر می‌رسند. میکروتوبول‌ها همانند میکروتوبول‌های سایر سلول‌ها هستند و در تشکیل داربست سلولی و انتقال وزیکول‌ها و اندامکها در طول آکسون اهمیت دارند. میکروتوبول‌های منفرد با فاصله کم و مساوی قرار می‌گیرند (۱۰).

به دنبال قطع اعصاب محیطی و شروع دژنراسانس والرین، قطعه انتهایی آکسون آسیب دیده توسط سلول‌های اطراف هضم و جذب می‌شوند. در روز اول حادثه، انتهای قطعه ابتدایی آکسون، به دلیل تجمع محتویات آکسوپلاسمی تازه رسیده شامل ترکیبات سیتواسکلتی همانند میکروتوبول‌ها، میتوکندری‌ها و عناصر اندوپلاسمیک صاف متورم می‌شود که اصطلاحاً به آن مخروط رشد<sup>۱</sup> می‌گویند (۶). وجود تعداد زیادی اکتین در مخروط رشد، اهمیت آن را در حرکت نشان می‌دهد (۱۰).

فاکتور رشد عصب<sup>۲</sup> یا NGF، فاکتور اختصاصی برای زنده ماندن نورون‌های حسی و

سمپاتیک در طی تکامل سیستم عصبی می‌باشد (۱۰). به دنبال قطع آکسون، سلول‌های شوان در قطعه انتهایی شروع به تولید NGF می‌کنند (۱). فاکتورهای رشد شبه انسولینی<sup>۳</sup> یا IGFs شباهت زیادی به انسولین دارند. غلظت‌های فیزیولوژیک IGFs در نورون‌های حرکتی، پاراسمپاتیک و حسی منجر به رشد آکسون می‌شوند. IGF-I جوانه زدن آکسون و ترمیم عصب را بعهده دارد. همچنین میانگین قطر آکسون و میلین را افزایش می‌دهد (۲). انسولین سبب تقویت پتانسیل غشای داخلی میتوکندری و افزایش سطح ATP در نورون‌های حسی بالغ می‌شود (۳). NGF سبب تحریک مهاجرت سلول‌های شوان و کاهش دژنره شدن و افزایش ترمیم عملی پس از صدمه اعصاب محیطی و افزایش رگ زائی می‌شود (۴). تجویز NGF سبب افزایش تعداد آکسون‌های میلین‌دار، ضخامت میلین و بلوغ بیشتر لایه‌های اندوتلیال می‌گردد (۵). استفاده از پیوند اتوگرافت شریان و ورید رانی بعنوان کانال راهنمای عصب به دلیل داشتن NGF در لایه‌های انتیما و ادوانتیس ورید و شریان، موجب تسریع ترمیم اعصاب محیطی می‌شود (۶). مقدار بالای NGF نه تنها ترمیم را تسریع می‌کند بلکه سبب توقف استحالته عصب نیز می‌گردد (۷). IGF با تاثیر بر روی DNA سلول شوان، تولید فاکتور رشد عصب را افزایش می‌دهد (۸). همچنین تحریک کننده قوی برای تزاید و تمایز سلول‌های شوان است. تجویز IGF-I در محل ضایعه عصب، سبب تقویت جوانه زدن آکسونی و افزایش تعداد آکسون‌ها در هنگام ترمیم عصب می‌گردد (۹)، و همچنین قطر رشته عصبی و ضخامت میلین را افزایش می‌دهد. مطالعات میکروسکوپ الکترونی نشان می‌دهد که IGF-I سبب افزایش تعداد میکروتوبول‌ها (که نشانه افزایش فعالیت در آکسوپلاسم است) می‌شود (۲).

IGF-I پس از ضایعه عصب محیطی، رل مهمی در رگ زائی دارد و سبب تحریک تشکیل رشته‌های عضلانی و افزایش ترمیم عصب می‌شود (۱۰).

1- Growth Cones

2-Nerve Growth Factor

3- Insulin Growth Factors

۴۸ سر موش صحرایی نر بالغ به وزن تقریباً ۲۵۰-۲۰۰ گرم انجام گرفت. حیوانات به صورت تصادفی به چهار گروه ۱۲ تایی تقسیم شدند:

- گروه PVDF با فاکتورهای رشد (IGF-I و NGF)
- گروه اتوگرافت
- گروه شم جراحی
- گروه intact

### روش جراحی

موش‌ها توسط ماده بیهوشی کتامین<sup>۳</sup> (۹۰mg/kg) و گزیلازین<sup>۴</sup> (۱۰mg/kg) به صورت داخل صفاقی بیهوش شدند. برشی در پوست ناحیه خلفی خارجی ران پای چپ حیوان ایجاد شد. عضله و فاسیا به آرامی کنار زده و عصب سیاتیک در فاصله بین بریدگی سیاتیک تا محل دو شاخه شدن اعصاب تیپیا و پروئال مشترک نمایان شد. در حد واسط بین دو نقطه فوق قطعه‌ای از عصب به اندازه ۱۰mm قطع شد. در گروه PVDF و فاکتورهای رشد، از یک قطعه لوله PVDF قطبی مثبت استریل شده با قطر داخلی ۱/۶mm و به طول ۱۴mm در محل شکاف استفاده شد. دو انتهای بریده عصب به صورت تلسکوپی داخل لوله قرار داده شد و با نخ نایلون ۱۰/۰ به دیواره لوله بخیه شد. تمام مراحل فوق در زیر میکروسکوپ جراحی<sup>۵</sup> با بزرگنمایی ۲۰ و تحت شرایط استریل انجام شد.

۳/۰ میلی لیتر از محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار حاوی ۱۰۰ng NGF و ۱۰۰ng IGF-I ۲ از طریق یک سرنگ یک میلی لیتری با سوزن شماره ۲۵ و قبل از محکم نمودن بخیه اپی‌نوریال به داخل لوله تزریق شد (۱۲). در گروه اتوگرافت قطعه بریده شده عصب را ۱۸۰ درجه جابه‌جا نموده و به دو انتهای بریده عصب توسط نخ ۱۰-۰ بخیه شد. در گروه شم، عصب سیاتیک نمایان شد ولی قطع نگردید. پس از عمل جراحی، بخش‌های بریده عضله و پوست بخیه شدند.

تغییر بار الکتریکی رل مهمی در تمایز تحریک انواع سلول‌ها از جمله نورون‌ها دارد. مواد پیزوالکتریک موادی هستند که تغییرات فشار و یا نیرو باعث تغییر بار الکتریکی لحظه‌ای در سطح آنها می‌شود. تحقیقات نشان می‌دهد که این تغییر الکتریکی نقش مهمی در تمایز و تحریک انواع سلول‌ها از جمله نورون‌ها دارد. پلی‌وینیلیدین فلوراید<sup>۱</sup> یک مجرای مصنوعی است که علاوه بر اجازه انتشار گازها و مایعات به داخل مجرا، از نفوذ ملکول‌های مه‌ار کننده جلوگیری می‌نماید، و با تولید شارژ سطحی، نقش مهمی در تمایز و تحریک انواع سلول‌ها از جمله سلول شوان و رشد آکسون دارد (۱۱).

مواد پیزوالکتریک همانند PVDF، ترمیم عصب محیطی را تقویت می‌نمایند و کانال PVDF قطبی نسبت به نوع غیر قطبی، سبب بهبودی بیشتری در افزایش کمی و کیفی ترمیم می‌شود (۱۱). به لوله‌های طبیعی یا مصنوعی که شکاف بین دو انتهای عصب بریده شده را پل می‌زنند، کانال راهنمای عصب<sup>۲</sup> یا NGCs می‌گویند (۱۲).

اگر چه فاکتورهای رشد عصب موجب تسریع روند ترمیم می‌شوند، ولی هنگامی که ترکیبی از NGF و IGF-I استفاده شود، ترمیم آکسون‌های صدمه دیده نسبت به استفاده مجزای آنها افزایش بیشتری می‌یابند (۱۲). با توجه به نتایج به دست آمده از تحقیقات مختلف، ترکیب محرک‌های بیولوژیکی و استفاده از کانال راهنمای عصب از جنس مواد پیزوالکتریک، ممکن است برای تقویت ترمیم عصب و کسب نتایج بهتر مفید باشند (۱۳). فاکتورهای رشد و خاصیت پیزوالکتریک هر یک به تنهایی موجب افزایش رژنراسیون می‌شوند. بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که تاکنون گزارشی مبنی بر بررسی فراساختاری آکسون هنگام استفاده توأم آنها منتشر نشده است.

### مواد و روشها

تحقیق حاضر یک مطالعه تجربی است که بر روی

- 1-Ploy Vinylidene Fluoride = PVDF
- 2-Nerve Guidance channels
- 3-Ketamin
- 4-Xylazine
- 5-Harvard Apparatus.Ltd
- Olympus Japan , SZX12

ملاک معنی دار بودن نتایج ( $P < 5\%$ ) تعیین گردید.

### یافته‌ها

با ثابت نمودن نمونه‌ها توسط گلو تار آلدهید و تتراکسیداسمیوم، چربی غلاف میلین حفظ شده و در برش‌های عرضی بصورت یک حلقه تقریباً سیاه که پیرامون آکسون قرار دارد، دیده می‌شود. در مطالعه میکروسکوپ الکترونی مشاهده شد که آکسون‌های فاقد میلین در ناودان‌های عمیق موجود در سطح سلول‌های شوان قرار می‌گیرند. برای تعیین تعداد آکسون‌های بدون میلین، غشای پایه و حضور نوروفیلانمت‌ها ملاک تشخیص قرار گرفت. تعداد آکسون بدون میلین در بخش‌های میانی و انتهایی محل ترمیم عصب کمتر از ناحیه ابتدایی می‌باشد. میانگین آکسون‌های بدون میلین در پایان هفته چهارم پس از ترمیم، در گروه فاکتورهای رشد ( $9043 \pm 670$ ) و گروه اتوگرافت ( $8111 \pm 417$ ) اختلاف معنی‌داری ندارد. میانگین آکسون‌های بدون میلین در پایان هفته دوازدهم پس از ترمیم، نسبت به گروه اتوگرافت اختلاف معنی‌داری داشت ( $P < 0.01$ ). میانگین تعداد آکسون‌های بدون میلین در گروه کنترل و شاهد به ترتیب  $216 \pm 10671$  و  $205 \pm 10210$  بود.

بررسی با میکروسکوپ الکترونی نشان داد که در گروه‌های آزمایشی غلاف میلین به خوبی در اطراف آکسون ایجاد شده است و میلین در واقع بخشی از سلول شوان است، که بصورت ماریچ دور آکسون می‌پیچد و با یک توالی تیره و روشن مشاهده شد. با اندازه‌گیری توالی تیره و روشن میلین و در پایان هفته چهارم پس از ترمیم مشاهده شد که ضخامت میلین در گروه فاکتورهای رشد ( $44 \text{ nm} \pm 319$ ) و اتوگرافت ( $33 \pm 310 \text{ nm}$ ) اختلاف معنی‌داری ندارد. همچنین در پایان میلین در گروه اتوگرافت ( $1052 \pm 191 \text{ nm}$ ) نسبت به هفته ۱۲ پس از ترمیم، ملاحظه گردید که ضخامت گروه فاکتورهای رشد ( $932 \pm 104 \text{ nm}$ ) اختلاف معنی‌داری ندارد. (شکل ۱).

شش عدد موش از هر گروه در پایان هفته چهارم و پایان هفته دوازدهم جهت مطالعه بافت‌شناسی پرفیوژن شدند. عصب سیاتیک ۱ میلی‌متر قبل و ۱ میلی‌متر بعد از محل ترمیم (لوله PVDF یا اتوگرافت) بریده و نمونه‌ها تمام شب در ثابت کننده گلو تار آلدهید  $2/5$  درصد و در دمای  $4^\circ\text{C}$  درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

نمونه‌ها به سه قسمت ابتدایی، میانی و دیستال تقسیم شده و پس از استفاده از تتراکسید اُسمیوم یک درصد به مدت  $1/5$  ساعت، مراحل تهیه بلوک برای میکروسکوپ الکترونی انجام گرفت. بلوک‌های تهیه شده توسط اولترامیکروتوم<sup>۱</sup> به اندازه  $500$  نانومتر برش زده و با محلول تولوئیدین بلو  $1\%$  به مدت  $2-3$  دقیقه رنگ آمیزی شدند.

پس از تهیه برش، نیمه نازک محل مناسب برای مطالعه میکروسکوپ الکترونی مشخص شد. سپس برش‌هایی به اندازه  $50$  نانومتر تهیه شد. برش‌ها بر روی شبکه مسی<sup>۲</sup> قرار گرفتند و پس از رنگ آمیزی توسط میکروسکوپ الکترونی<sup>۳</sup> در بزرگ‌نمایی‌های مختلف مطالعه شدند و توسط دوربین دیجیتال متصل به کامپیوتر عکس گرفته شدند. ابتدا با بزرگ‌نمایی  $3000\times$ ، آکسون‌های بدون میلین شمارش شدند. سپس با بزرگ‌نمایی  $6000\times$ ، تعداد لایه‌های میلین آکسون‌های میلین‌دار، شکل میتوکنندری‌ها و تعداد میکروتوبول‌های درون آکسون‌ها بررسی گردید.

تصاویر به نواحی شش گوشه<sup>۴</sup> که هر یک به مساحت  $2\mu\text{m}$ ،  $0.35$  اکسوپلاسم می‌باشند تقسیم شدند و میکروتوبول‌های هر ناحیه شمارش شدند. حداقل  $60$  آکسون ( $370$  ناحیه شش گوش) شمرده شدند. تعداد متوسط میکروتوبول‌های هر ناحیه شش گوش توسط تعداد کل میکرو توبول‌های شمارش شده به تعداد کل نواحی شش گوش بدست آمد ( $14$ ).

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

1-Leica , Ultracut  
2-Grid  
3-Leo 906  
4-Hexagons

روشن به نظر می‌رسند (شکل ۲).

### بحث و نتیجه‌گیری

فقدان یک روش استاندارد و شناخت ناکافی اصول مکانیسم‌های ترمیم عصب از جمله دلایل قصور در تحقیقات NGCs می‌باشند. بعنوان مثال اندازه شکاف ایجاد شده در عصب محیطی، خواص فیزیکی و شیمیایی NGCs به کار برده شده، ویژگی‌های ماتریکس داخل لوله، ترکیب فاکتورهای رشد عصب که به داخل لوله اضافه می‌شوند و یا تحت فشار قرار دادن عصب (بدون ایجاد شکاف در آن) بر میزان ترمیم تاثیر دارند. با توجه به روش‌های مختلف ارزیابی توسط محققین مختلف، مقایسه بین این تحقیقات سخت و دشوار است (۱۵). در بسیاری از تحقیقات انجام شده اندازه شکاف عصب کمتر از یک سانتی‌متر در نظر گرفته می‌شود که این امر مطمئناً بر نتایج حاصل از تحقیق بسیار موثر است.

تحقیقات نشان می‌دهد که استفاده از NGF برای ترمیم عصب له شده مفید است. به طوری که قطر اکسون میلین دار در انتهای هفته چهارم افزایش می‌یابد. این افزایش قطر اکسون به دلیل سالم بودن اپی نورئوم، پری نورئوم و جلوگیری از تشکیل بافت لیفی می‌باشد. بخیه زدن در پیوند اتوگرافت با تشکیل بافت لیفی سبب محدودیت رشد اکسون های ترمیم شده می‌گردد (۱۶).

در تحقیق حاضر نیز همانند سایر تحقیقات انجام شده مشاهده گردید که تعداد اکسون‌های میلین دار در ناحیه انتهایی محل ترمیم کمتر از ناحیه ابتدایی می‌باشد که این امر ممکن است به دو دلیل باشد، اولاً تعدادی از اکسون‌ها (به دنبال انتخاب مسیر غلط) نوروما تشکیل می‌دهند، ثانیاً ممکن است زمان بیشتری جهت رشد اکسون‌ها و رسیدن آن‌ها به انتهای کانال راهنمای عصب نیاز باشد. شکل گیری نرمال غشای میلین به بلوغ نرمال سیتواسکلتال وابسته است (۱۷).

استفاده از IGF-I سبب افزایش روند ترمیم می‌شود، که این امر ممکن است به دلیل تاثیر بر زنده ماندن

میانگین ضخامت میلین در گروه کنترل و شاهد به ترتیب  $215.0 \pm 15.4$  و  $195.0 \pm 19.5$  میکرون می‌باشد.

میکروسکوپ الکترونی نشان می‌دهد که سلول شوان در خارج توسط یک تیغه قاعده‌ای<sup>۱</sup> محدود شده است و آن نیز به نوبه خود توسط اندونوریوم پوشیده می‌شود، به طوری که وجه تمایز سلول‌های شوان از فیبروبلاست‌ها، حضور تیغه قاعده‌ای است (شکل ۲).

میکروسکوپ الکترونی نشان داد که میکروتوبول‌ها در آکسون عصب نرمال با فاصله کم و مساوی قرار گرفته‌اند و در فضای بین آنها نوروفیلامنت‌ها دیده می‌شود، که تعداد نوروفیلامنت‌ها بسیار زیادتر از میکروتوبول‌هاست. چگالی میکروتوبول‌ها در گروه کنترل و شاهد ( $24 \pm 3$ ) در میکرومتر مربع است. آرایش قرارگیری میکروتوبول‌ها در آکسون‌های در حال رژنره با عصب نرمال متفاوت است، به طوری که در هفته چهارم پس از ترمیم، میکروتوبول‌ها در گروه اتوگرافت بصورت دسته‌های ۴-۵ تایی دیده می‌شوند و دسته‌ها با فواصل متغیری نسبت به هم قرار دارند (شکل ۱). چگالی میکروتوبول‌ها در گروه اتوگرافت ( $16/1 \pm 2/7$ ) در میکرومتر مربع می‌باشد، در حالی که در گروه فاکتورهای رشد، میکروتوبول‌ها غالباً بصورت دوتایی دیده می‌شوند و چگالی آنها در گروه فاکتورهای رشد ( $12 \pm 2/1$ ) در میکرومتر مربع است، که از لحاظ آماری نسبت به گروه کنترل ( $19/2 \pm 3$ ) اختلاف معنی‌داری دارند ( $P < 0.01$ ). در پایان هفته ۱۲، آرایش میکروتوبول‌ها در گروه اتوگرافت تقریباً شبیه آکسون عصب نرمال است، در حالی که چگالی آنها در گروه فاکتورهای رشد ( $16/7 \pm 3/1$ ) می‌باشد ( $P < 0.01$ ) (نمودار ۱).

میتوکندری در آکسون میله‌ای شکل و غالباً باریکتر از میتوکندری در سایر سلول‌های غیر عصبی است. البته گاهی میتوکندری گرد و بزرگی نیز دیده می‌شود. میتوکندری‌ها در طول آکسون و با فواصل متغیر نسبت به هم پخش می‌شوند. ستیج‌های میتوکندری در گروه سالم بیشتر بصورت عرضی جهت‌گیری نموده ولی در گروه‌های آزمایشی موازی با محور درازشان قرار دارند، در نتیجه در برش عرضی، حلقه‌های هم مرکز تیره و

طول سطح خارجی ستون‌های سلول‌های شوان پیشروی می‌کنند و بتدریج توسط آن‌ها احاطه می‌شوند(۲).

تحقیقات نشان داده اند که NGF و NGFs با تنظیم توبولین و نوروفیلانتها، رشد جوانه آکسونی را تقویت می‌نمایند(۶).

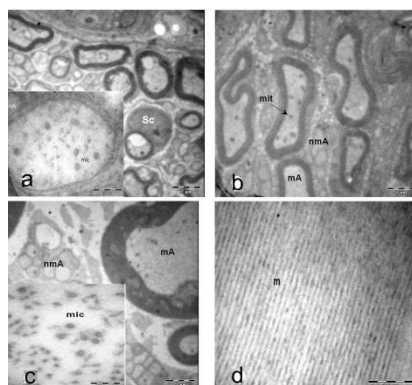
بررسی میکروسکوپ الکترونی نشان می‌دهد که چگالی میکروتوبول‌های آکسونی در گروه اتوگرافت و فاکتورهای رشد در پایان هفته چهارم با عصب نرمال اختلاف معنی داری دارد، و در پایان هفته دوازدهم در هر دو گروه افزایش می‌یابد ولی این افزایش در گروه اتوگرافت به گروه intact نزدیک است و این امر به دلیل سالم بودن پوشش‌های اپی نوریوم و پری نوریوم و حضور تعداد زیادی سلول شوان در گروه اتوگرافت است که ترمیم عصب با سرعت و سهولت بیشتری انجام می‌گیرد. در گروه فاکتورهای رشد به دلیل استفاده از کانال راهنمای عصب، با تشکیل اپی نوریوم و عروق خونی، سلول‌های شوان از دو انتهای پروگزیمال و دیستال کانال تکثیر یافته و در داخل کانال تجمع می‌یابند. میتوکندری و میکروتوبول‌ها با هم همکاری می‌کنند بطوری که میکروتوبول‌ها جهت بازسازی و افزایش طول خود نیاز به انرژی دارند که میتوکندری‌ها آن را تامین می‌نمایند. میتوکندری‌ها هم جهت انتقال به ناحیه دیستال آکسون به میکروتوبول‌ها وابسته هستند. NGF مکانیسم سوخت و ساز سازنده نوروں را تنظیم می‌کند(۱۸)، به این صورت که پتانسیل غشای داخل میتوکندری را تقویت کرده و سبب افزایش سطح ATP می‌شود. IGF نیز میانگین قطر آکسون و میلین را افزایش می‌دهد(۳). قطر رشته عصبی تعیین کننده اصلی سرعت هدایت عصب است و با چگالی میکروتوبول‌ها و ضخامت میلین ارتباط دارد.

در تحقیق حاضر با عنایت به تاثیر مثبت فاکتورهای رشد بر روی رشد و تکامل میتوکندری و میکروتوبول‌ها، به نظر می‌رسد که فاکتورهای رشد بر روی رژنراسیون عصب نیز تاثیر مهمی دارند.

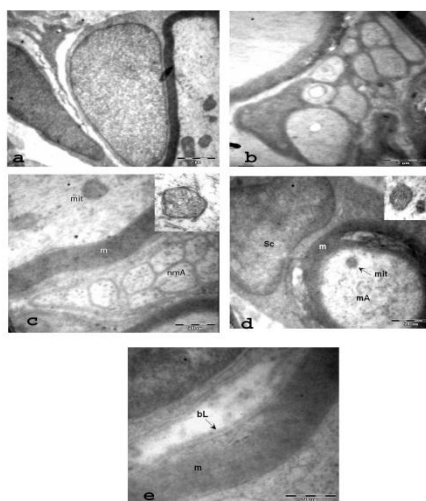
سلول شوان و ادامه میلین سازی باشد. همچنین تمایز فیبروبلاست‌ها و ماکروفازها را جهت تولید ملکول‌های اتصال دهنده و سیتوکین‌ها تسریع می‌نماید و با تسریع کردن دژنراسانس والرین و تحریک سلول‌های شوان از روند مرگ سلولی پیشگیری می‌کند. از طرفی مکانیسم عمل NGF که سبب تقویت رشد آکسون در محل شکاف عصبی می‌شود، هنوز ناشناخته است ولی می‌دانیم که بر نوروں و سلول‌های غیر نوروںی اثر دارد. تحقیقات نشان می‌دهد با استفاده از IGF-I، تعداد آکسون‌ها به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش می‌یابد. همچنین چگالی میکروتوبول‌ها در گروه دریافت کننده IGF-I نسبت به گروه کنترل بالاتر است(۲).

بزرگتر بودن مقطع آکسون در ناحیه ابتدایی نسبت به ناحیه انتهایی محل ترمیم عصب، به دلیل تعداد بیشتر نوروفیلانت‌ها و میکروتوبول‌ها و سایر پلی‌پتیدها می‌باشد. انتقال آکسونی میتوکندری به میکروتوبول‌ها وابسته است ولی به میکروفیلانت‌ها و جریان اندوپلاسمیک رتیکولوم ارتباطی ندارد. چگالی میکروتوبول‌ها در هفته دوازدهم با افزایش قطر آکسون افزایش می‌یابد. با آنالیز میکروسکوپ الکترونی تعداد میکروتوبول‌ها در گروه فاکتورهای رشد کمتر از گروه اتوگرافت مشاهده شد. افزایش تعداد میکروتوبول‌ها نشانه افزایش بیان پروتئین‌های سیتواسکلتال است که میلین سازی را تحت تاثیر قرار می‌دهد(۱۷).

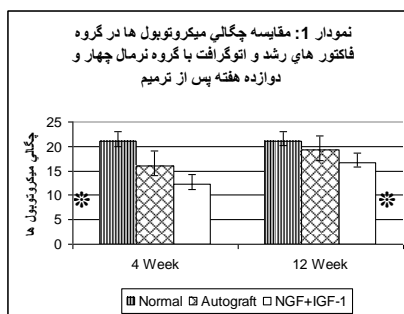
در نوروں‌های در حال رشد، میکروتوبول‌ها نقش مهمی در افزایش طول آکسون به سوی سلول هدف بازی می‌کنند. در مخروط رشد، میکروتوبول‌ها بصورت دسته قرار دارند و توسط پل‌های عرضی که در فواصل منظم قرار گرفته‌اند به یکدیگر متصل می‌شوند، این پل‌ها از پروتئینی به نام رابینین<sup>۱</sup> تشکیل شده است. این پروتئین در حضور ATP و یک کوفاکتور سبب می‌شود برخی میکروتوبول‌ها نسبت به برخی دیگر از آنها بلغزند. افزایش طول ایجاد شده در میکروتوبول‌های روی هم افتاده، به پیشروی مخروط رشد کمک می‌کند. مخروط‌های رشد بصورت پاهای نخعی شکل، آرام آرام در



شکل ۱. تصویر میکروسکوپ الکترونی، از عصب رزتره در ناحیه میانی لوله PVDF، در مقایسه با اتوگرافت و عصب سالم ۱۲ هفته پس از ترمیم (a گروه NFG+IGF-I ، b گروه Autograft ، c عصب سالم ، d غشای میلین ( $\times 60000$ )) تصویر کوچک در شکل های a و b: آرایش میکروتوبول ها در آکسون میلین دارو آکسون بدون میلین ، به دسته های ۲، ۳ و ۵ تایی میکروتوبول توجه فرمائید ( $\times 60000$ ) - میکروتوبول (mic)



شکل ۲. تصویر میکروسکوپ الکترونی، از عصب رزتره در ناحیه میانی لوله PVDF، در مقایسه با اتوگرافت و عصب سالم ۱۲ هفته پس از ترمیم (a مجاورت سلول شوان با آکسون میلین دار، هسته سلول فیبروبلاست در مجاورت سلول شوان مشاهده می شود ( $\times 4683$ )) ، b تعدادی آکسون بدون میلین که توسط یک سلول شوان احاطه می شوند ( $\times 4683$ )) ، c تعدادی آکسون بدون میلین در حد واسط دو آکسون میلین دار ( $\times 12630$ )) ، d مجاورت سلول شوان با آکسون میلین دار ( $\times 21560$ )) ، e تیغه پایه (bl) در نزدیکی غلاف میلین ( $\times 21560$ ) - آکسون میلین دار (mAG)، آکسون بدون میلین (nmA)، سلول شوان (Sc)، میتوکندری (mit)، میلین (m) - تصویر کوچک در شکل های a و b: به وضعیت قرارگیری سستخ های میتوکندری در گروه های آزمایشی (موازی با محور طولی میتوکندری) c و عصب نرمال (عمود بر محور طولی) d توجه فرمائید ( $\times 35970$ )).



\* نشانه اختلاف معنی دار است ( $p < 0.01$ ).

## References

- 1-Lundborg G: Nerve regeneration and repair- A review, *Acta Orthop* . 1987; 58: 145-169.
- 2-Thanos PK, Okajima S, and Terzis J K: Ultrastructure and cellular biology of nerve regeneration . *J of Reconstructive Microsurg*. 1998; 14(6): 423-437.
- 3-Tze-Jen Hung , Alex Verkhatsky , and Paul Fernyhough . Insulin enhances mitochondrial inner membrane potential and increases ATP levels through phosphoinositide 3-kinase in adult sensory neurons . *Mol Cell Neurosci*. 2005; 28:42-54.
- 4-Santos PM, Winterowd JG, Allen GG, et al: Nerve growth factor: increased angiogenesis without improved nerve regeneration , *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1991; 105(1): 12-25.
- 5-Chamberlain LJ, Yannas JV, Hsu HP, et al: Connective tissue response to tubular implants for peripheral nerve regeneration: the role of myofibroblasts. *J Comp Neurol*. 2000; 417 (4): 415-30.
- 6-Levine MH : Nerve growth factor is expressed in rat femoral vein. *J Oral Maxillofac Surg*. 2002; 60 : 729-739.
- 7-Tsai CC, Lu MC, Chen YS, et al: Locally administered nerve growth factor suppresses ginsenoside R b1-enhanced peripheral nerve regeneration. *Am J Chin Med*. 2003; 31(5): 665-73.
- 8-Stewart HG, Weber M, Eisen A, et al: Regulation of rat schwann cell expression and DNA synthesis by insulin-like growth factors in vitro. *Eur J Neurosci*. 1996; 8(3): 553-64.
- 9-Fortes WM, Noda EM, Liuzzi FJ, et al: End – to side neurotomy: evaluation of axonal response and upregulation of IGF-I and IGF-II in a non injury model . *J Reconstr Microsurg*. 1999; 15(6): 449-57.
- 10-Rabinovsky ED, and Draghia-Akli R: Insulin-like growth factor I plasmid therapy promotes in vivo angiogenesis . *Mol Ther*. 2004; 9(1): 46-55.
- 11-Aebischer P, Valentini RF, Dario P, Domenici C, et al: Piezoelectric guidance channels enhance regeneration in the mouse sciatic nerve after axotomy. *Brain Research*. 1987 436: 165-168 .
- 12-Kimpinski K , and Mearow K: Neurite growth promotion by nerve growth factor and insulin-like growth factor-I in cultured adult sensory neurons. *J Neuroscience Research*. 2001; 63: 486-499.
- 13-Hudson TW, Evans GR.D, and Schmidt CE. Engineering strategies for peripheral nerve repair. *Clin Plast Surg*. 1999; 26(4): 617-628.
- 14-Lura L.Kirkpatrick, Andrea S.Witt, H.Ross Payne, et al. Changes in Microtubule Stability and Density in Myelin-Deficient Shiverer Mouse CNS Axons. *The Journal of Neuroscience*. 2001; 21(7):2288-2297.
- 15-Pu LL. syed SA, Reid M, Patwa H, et al. Effects of nerve growth factor on nerve regeneration through a vein graft across a gap . *Plastic and Reconstructive Surgery*. 199; 104(5) , 1379-1385.
- 16-Chen ZW, Wang MS. Effects of nerve growth factor on crushed sciatic nerve regeneration in rats . *Microsurgery*. 1995; 16(8): 547-51.
- 17-Scott T. Brady, Andrea S.Witt, Laura L. Kirkpatrick, et al: Formation of compact myelin is required for maturation of the axonal cytoskeleton. *The journal of Neuroscience*. 1999; 19(17):7278-7288.
- 18-Grill RJ, and Tuszynski M H. CNS Regeneration : Axonal Responses to Injury. California, Academic Press , USA 1999.