بنام خداوند جان و خرد

۹۶۴۷۵

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

رساله دوره دکتری تخصصی (*Ph.D.*) رشته علوم تشریح

عنوان

ترمیم آسیب عصب سیاتیک توسط پیوند سلول های استرومایی مغز استخوان متمایز شده به سلول های شبه شوان با پروژسترون در موش صحرایی

نگارش

بهار موقر

استاد راهنما

دکتر تقی طریحی

اساتید مشاور

دکتر علیرضا مصباح نمین

دکتر محمد جوان

تابستان ۸۶

۹۶۴۷۵

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

خانم / آقای بهار موقر رساله دکتری واحدی خود را با عنوان: "ترمیم آسیب اعصاب محیطی موش صحرایی با استفاده از سلولهای استرومایی مغز استخوان تمایز یافته به سلولهای شبه شوان توسط پروژسترون در تاریخ ۸۶/۶/۳۱ ارائه کردند. اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده است و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنمای اصلی	جناب آقای دکتر تقی طریحی	استاد	
۲- استاد راهنمای دوم			
۳- استاد مشاور اول	جناب آقای دکتر سیدعلیرضا مصباح نمین	استادیار	
۴- استاد مشاور دوم	جناب آقای دکتر محمد جوان	استادیار	
۵- استاد ناظر	جناب آقای دکتر علیرضا عسگری	استاد	
۶- استاد ناظر	جناب آقای دکتر فرید ابوالحسنی	دانشیار	
۷- استاد ناظر	جناب آقای دکتر مجتبی رضازاده	استاد	
۸- استاد ناظر	جناب آقای دکتر سیدجواد میرنجفی زاده	دانشیار	
۹- نماینده شورای تحصیلات تکمیلی	سرکار خانم دکتر مژده صالح نیا	دانشیار	

دستورالعمل حق مالکیت مادي و معنوي در مورد نتایج پژوهشهاي علمي
دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست های پژوهشی دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیات علمی، دانشجویان ، دانش آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی تحت عناوین پایان نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی که با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نمایند:

ماده ۱- حقوق مادی و معنوی پایان نامه ها/ رساله های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هر گونه بهره برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین نامه ها و دستورالعمل های مصوب دانشگاه باشد.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما مسئول مکاتبات مقاله باشند.
تبصره: در مقالاتی که پس از دانش آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان نامه/ رساله نیز منتشر می شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و بر اساس آئین نامه های مصوب انجام می شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره های ملی، منطقه ای و بین المللی حاصل از نتایج مستخرج از پایان نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این دستورالعمل در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۱۳۸٤/٤/۲۵ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب لازم الاجرا است و هر گونه تخلف از مفاد این دستورالعمل، از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری خ.واهد بود.

نام و نام خانوادگي .
تاریخ و امضاء

تقدیم به

مهربانی وصمیمیت خانواده ام

با تشکر و قدردانی از:

بزرگوارانی که در تمامی مراحل تحقیق و تحصیل یاور و پشتیبانم بوده اند.

استاد گرانقدر جناب آقای دکتر تقی طریحی که دانش و رهنمود های ایشان همواره راهگشای من بوده است.

اساتید گرامی آقایان دکتر علیرضا مصباح نمین ودکتر محمد جوان که راهنمایی های ایشان سهم بسزایی در به ثمر رسیدن این پایان نامه داشت.

دیگر اساتید ارجمند گروه علوم تشریح جناب آقای دکتر رضازاده، سرکار خانم دکتر منصوره موحدین و سرکار خانم دکتر صالح نیا که همواره خود را مدیون ایشان میدانم.

کارشناسان محترم گروه علوم تشریح جناب آقای شهرام پوربیرانوند و سرکار خانم سعیده ابراهیمی به خاطر همکاری و زحمات دلسوزانه ایشان در تمام مدت تحصیلم

دانشجویان عزیز گروه علوم تشریح خصوصا همکلاسی های گرامی خانم ها ماندانا بیگی بروجنی و طاهره مازوچی و آقایان سید مرتضی کروجی، محمد تقی قربانیان و عبدالحسین شاهوردی و دوست عزیزم سرکار خانم پیغمبری.

چکیده

هدف از انجام این مطالعه بررسی نقش پروژسترون در تمایز سلول های استرومایی مغز استخوان به سلول های شوان و نقش این سلول های تمایز یافته در بهبود آسیب عصب سیاتیک در موش های صحرایی می باشد.در این تحقیق سلول های استرومایی در شش گروه تحت تاثیر دستجات مختلف القا کننده ها از جمله پروژسترون و فورسکولین قرار گرفتند و پس از طی کردن دوره تمایز با تکنیک ایمونوهیستو شیمی توسط آنتی بادی علیه S100 و P0 برای بررسی میزان تمایز به سلول های شوان مورد ارزیابی قرار گرفتند. پس از بررسی آماری بهترین گروه از لحاظ میزان بیان پروتئین S100 انتخاب و جهت پیوند به موشهای صحرایی که عصب سیاتیک آنها قطع شده بود مورد استفاده قرار گرفت. علاوه بر این در پایان مرحله القا بیان ژن های NGF, P0 وNeuroD توسط تکنیک RT-PCR بررسی شد . در بخش in vivo موشهای صحرایی که عصب سیاتیک آنها قطع شده بود به عنوان مدل مورد استفاده قرار گرفتند و در دو گروه سلول های تمایز یافته و در یک گروه سلول های متمایز نشده به محل آسیب عصب تزریق شد و در گروه کنترل هیچ سلولی تزریق نشد. الگوی راه رفتن حیوانات در هفته های دوم سوم و چهارم پس از جراحی ارزیابی شد. همچنین آزمون ایمونوهیستوشیمی دابل در هفته های سوم و چهارم پس از جراحی بر روی برشهای طولی بدست آمده از ناحیه ترمیم شده با آنتی بادی های S100 وP0 به همراه آنتی بادی علیه BrdU انجام شد. مطالعه میکروسکوپ الکترونی بر روی نمونه های منطقه ترمیم شده انجام شد. نتایج مطالعه in vitro نشان داد که S100 در پایان مرحله القا در تمام گروه های آزمایشی بیان می شود در حالیکه P0 در هیچ یک از این گروه ها بیان نمی شود. اختلاف معنی داری در درصد سلول های بیان کننده S100 در بین گروه های اول(کنترل مثبت) و دوم (متمایز شده با پروژسترون) دیده نشد. اما میزان بیان S100 در این دو گروه به شکل معنی داری از سایر گروه ها بیشتر بود. استفاده از فورسکولین در مرحله پیش القا هر چند می تواند در تمایز به سلول های شوان موثر باشد ولی میزان این تمایز نسبت به گروه هایی که در آنها از بتا مرکاپتو اتانول و رتینوییک اسید استفاده شده بود کمتر است. P0 در سطح mRNA در سلول های استرومایی تمایز تیافته و در گروه های سوم و چهارم در پایان مرحله القا و پیش القا دیده می شد. نتایج مطالعات in vivo نشان داد که اختلاف معنی داری در ایندکس آنالیز راه رفتن بین گروه های اول و دوم نه در هفته سوم و نه چهارم وجود ندارد. اما این دو گروه اختلاف معنی داری با گروه های سوم و چهارم دارند. میزان رشد طولی عصب نیز در گروه های اول و دوم اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشت ولی میزان آن درهر دوی این گروه ها از گروه های سوم و چهارم به شکل مینی داری بیشتر بود. در مقاطع بافتی هم مکانی سلول های S100 مثبت و BrdU مثبت در گروه های اول و دوم از گروه های سوم و چهارم بیشتر بود. در برشهای نیمه نازک اکسون های میلینه در گروه های اول دوم و سوم دیده میشد که در گروه های اول و دوم بیشتر به صورت باندل های سازماندهی شده دیده می شد. در گروه کنترل اکسون های میلینه به ندرت یا با میلین بسیار نازک دیده می شد. نتایج نشان داد که فورسکولین در دوره پیش القا با مدت زمان بکار رفته نمی تواند عملکردی مانند بتا مرکاپتو اتانول و رتینوییک اسید در تمایز سلول های شوان داشته باشد. از سوی دیگر پروژسترون می تواند جایگزین هرگولین در تمایز سلول های شبه شوان از سلول های استرومایی مغز استخوان باشد سلول های متمایز شده با پروژسترون میتوانند عصب سیاتیک آسیب دیده را مانند سلول های تمایز یافته با هرگولین ترمیم نمایند.

واژگان کلیدی: سلول های استرومایی مغز استخوان- شوان- پروژسترون- سیاتیک

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۱-۱- پیش گفتار ۲
۲-۱- آسیب اعصاب محیطی ۱۱
۲-۱-۱- دژنراسیون والرین ۱۲
۲-۲- منشاء و روند تکوینی سلول شوان ۱۳
۲-۲-۱- غلاف میلین و پروتئین های موجود در آن ۱۵
۲-۲-۱-۱- پروتئین *P0* ۱۶
۲-۲-۲- سلول های پیش‌ساز شوان و سلول های شوان نابالغ ۱۹
۲-۲-۳- سلول شوان بالغ (میلین‌ساز و غیر میلین‌ساز) ۲۱
۲-۲-۴- نئورگولین‌ها ۲۳
۲-۲-۴-۱- گیرنده‌های نئورگولین ۲۵
۲-۲-۵- فاکتورهای رونویسی دخیل در تمایز سلول های شوان ۲۶
۲-۲-۵-۱- *SOX-10* ۲۷
۲-۲-۵-۲- *OCT-6* ۲۸
۲-۲-۵-۳- *Krox-20* ۲۸
۲-۳- سلول های بنیادی و انواع آن ۲۹
۲-۳-۱- سلول بنیادی بالغین ۳۰
۲-۳-۲- سلول های استرومایی مغز استخوان (*BMSCs*) ۳۲
۲-۳-۲-۱- عملکرد فیزیولوژیک سلول های استرومایی مغز استخوان ۳۵
۲-۴- نورواستروئیدها ۳۸
۲-۴-۱- نقش پروژسترون در *in vitro* ۳۹
۲-۴-۲- نقش پروژسترون در *in vivo* ۴۲
۲-۴-۳- میلین‌سازی اعصاب محیطی در دو جنس ۴۴
۲-۵- پل‌های ارتباطی یا *Bridge* ها ۴۵
۲-۶-فرضیه ها ۴۸
۲-۷- اهداف ۴۸
۳-۱- بخش مطالعات *in vitro* ۵۱
۳-۱-۱- روش بدست آوردن سلول های استرومایی مغز استخوان ۵۱

۳-۱-۲- روش پاساژ سلولی ۵۱
۳-۱-۳- تعیین درجه خلوص سلول های استرومایی ۵۳
۳-۱-۳-۱- ایمونوسیتوشیمی با آنتی‌بادی ضد فیبرونکتین ۵٤
۳-۲- القا کردن سلول های استرومایی مغز استخوان به سوی رده سلولی شوان ۵۷
۳-۲-۱- طراحی گروه‌ها ۵۷
۳-۲-۲- بررسی میزان تمایز سلول های استرومایی مغز استخوان پس از القا ۵۹
۳-۲-۲-۱- ایمونوسیتوشیمی علیه آنتی‌بادی *S100* ۵۹
۳-۲-۲-۲- تکنیک *RT-PCR* ٦۱
۳-۲-۲-۲-۱- استخراج *RNA* کل از سلول ها ٦۱
۳-۱۰-۱-۲- استخراج *RNA* کل ٦۲
۳-۲-۲-۲-۲- واکنش رونویسی معکوس (*RT*) ٦۸
۳-۲-۲-۲-۳- واکنش *PCR* ٦۹
۳-۲- بخش مطالعات *in vivo* ۷۲
۳-۲-۱- طراحی گروه ها ۷۲
۳-۲-۲- تهیه مدل حیوانی ۷۳
۳-۲-۳- آماده سازی سلول ها جهت پیوند ۷٤
۳-۲-۴- بررسی رفتاری، ایمونوهیستوشیمی و میکروسکوپ الکترونی در حیوانات گروههای آزمایشی: ۷۵
۳-۲-۴-۱- بررسی رفتاری موشهای صحرایی پس از قطع عصب سیاتیک در گروه‌های مورد آزمایش ۷۵
۳-۲-۴-۲- تکنیک ایمونوهیستوشیمی ۷٦
۳-۲-۴-۲-۱- روش انجام رنگ‌آمیزی دوتایی ۷۷
۳-۲-۴-۳- مطالعه میکروسکوپ الکترونی ۷۹
۳-۲-۴-۳-۱- پردازش بافتی ۷۹
۳-۲-۴-۳-۲- تهیه برشهای نازک و نیمه نازک ۸۱
۳-۲-۴-۳-۳- رنگ‌آمیزی برشهای نازک ۸۱
۴-۱- نتایج بخش *in vitro* : ۸۵
۴-۱-۱- نتایج القا سلولی ۸۵
۴-۱-۲- نتایج مطالعات *RT-PCR*: ۸٦
۴-۲- نتایج بخش *in vivo* : ۸۷
۴-۲-۱- نتایج تستهای رفتاری ۸۷
۴-۲-۲- نتایج بررسی های بافت شناسی ۹۰
۴-۲-۲-۱- رنگ آمیزی *H & E* ۹۰
۴-۲-۲-۲- نتایج بررسی‌های ایمونوهیستوشیمی ۹۰

۴-۲-۲-۲-۱- بررسی میزان رشد طولی عصب ۹۰
۴-۲-۲-۲-۲-نتایج بررسی ایمونوهیستوشیمی دوتایی، در محل پیوند عصب سیاتیک ۹۱
۴-۲-۳- نتایج بررسی های میکروسکوپ الکترونی ۹۳
۵-۱- بخش *in vitro* ۱۱۳
۵-۱-۱- ایمونوسیتوشیمی ۱۱۳
۵-۱-۲- نتایج *RT-PCR* ۱۱۷
۵-۲- بخش *in vivo* ۱۲۰
۵-۲-۱- رشد طولی عصب ۱۲۱
۵-۲-۲- تست رفتاری ۱۲٤
۵-۲-۳- ایمونوهیستوشیمی دابل ۱۲٦
۵-۲-۴- نتایج میکروسکوپ الکترونی ۱۲۷
۵-۳- پیشنهاد ها ۱۲۹

مقدمه

۱-۱- پیش گفتار

بیماری هایی که در سیستم اعصاب محیطی و مرکزی منجر به از دست رفتن میلین می شوند و نیز صدمات تروماتیک سبب بروز اختلالات عمده عملکردی در بیماران می شود. اما ظرفیت بالای ترمیم اکسونی در PNS، آنرا از CNS متمایز می‌سازد [۱]. محیطی که در آن اکسون های PNS ترمیم می‌شوند حاوی سلول های شوان و غشاء پایه آنها، فیبروبلاستها، کلاژن، میلین دژنره شده و سلول های فاگوسیتیک است. مطالعات in vivo و in vitro نشان می‌دهند که در بین این اجزاء، سلول های شوان برای ترمیم اکسون ها ضروری هستند. بدنبال قطع عصب بر اثر آسیب، سلول های شوان از حالت سکون، با ساختمان میلینی ثابت که هدایت عصبی را تسهیل می‌کند، تغییر یافته، به یک حالت تکثیری و تغذیه‌ای تبدیل می‌شوند.این وضعیت، محیطی را فراهم می‌آورد که ترمیم عصب را تحریک می‌نماید [۲]. برخی مطالعات نشان می دهند که سلول های استرومایی مغز استخوان یا BMSCs که از دسته سلول های بنیادی می باشند می توانند به سلول های میلین ساز تمایز یافته و به بهبود عصب محیطی آسیب دیده کمک نمایند [۳].

سلول های بنیادی را به عنوان سلول هایی می‌شناسند که قادر به بازسازی خود بوده وانواع زیادی از سلول های دیگر را نیز می‌توانند بوجود آورند. این سلول ها را از لحاظ منشاء تولیدشان می‌توان به گروههای زیادی تقسیم کرد که از آن جمله می‌توان سلول های بنیادی جنینی، سلول های بنیادی کارسینومایی و سلول های بنیادی بالغ را نام برد. سلول های بنیادی بالغ در بافتها و اندامهای فراوانی از جمله مغز، بافت عضلانی، مغز استخوان، خون محیطی، نخاع، پالپ دندان، پانکراس، کبد، اپی‌تلیوم پوست، قرنیه وجود دارند و قادر به تولید انواع فراوانی از سلول ها با وجود منشاء جنینی متفاوتشان می‌باشند [٤]. برای مثال این سلول ها در محیط آزمایشگاه قادرند سلول هایی از هر یک از سه لایه جنینی اکتودرمال (سلول های نورونال و گلیال)، مزودرمال (سلول های اندوتلیالی) و اندودرمال (سلول های کبدی یا هپاتوسایتها و سلول های شبه β پانکراس) را بوجود آورند [٥]. بسیاری محققان، منشاء

منشاء سلول های بنیادی بالغ موجود در ارگانها را مغز استخوان می‌دانند. مغز استخوان، ارگانی است که حاوی دونوع سلول بنیادی بالغ می‌باشد که عبارتند از: سلول های بنیادی خونساز یا HSCs که قادر به تمایز به استخوان، غضروف ،چربی، بافت همبند فیبروز و خون می‌باشند. سلول های استرومایی مغز استخوان (BMSCs) جمعیت سلولی دیگری است که کمی پس از کشف HSCs توصیف شد و قادر است همان جمعیتهای سلولی را که HSCها تولید می‌کنند ایجاد نماید [۴]. این سلول ها در سال ۱۹۶۸ شناخته شده و به عنوان سلول هایی چسبنده، کلون‌ساز، غیر فاگوسیتوز کننده و از نظر رفتاری شبیه فیبروبلاست معرفی شدند [۶]. سلول های استرومایی مغز استخوان، مانند HSCها، در دوران جنینی از مزودرم منشاء می‌گیرند. سلول های BMSC نقش مهمی در شکل‌گیری سلول های خونی بالغ از HSCها دارد به این معنی که محیطی فراهم می‌کند که در آن، این سلول ها تمایز می‌یابند، ولی علاوه بر آن، این سلول ها، خود، قادر به تمایز به سلول های استخوانی، غضروفی و چربی نیز می‌باشند. تحقیقات اخیر نشان می‌دهند که این سلول ها علاوه بر تبدیل به سلول هایی با منشاء مزودرمی به سلول هایی با منشاء غیرمزودرمی نیز قابل تبدیلند [۴]. یکی از اهداف تحقیق بر روی سلول های BMSC، استفاده از آنها در کلینیک و جهت درمان بیماری ها و ضایعات وارد بر ارگان های مختلف بدن می‌باشد. اینکه این سلول ها چگونه در بافت میزبان می‌توانند سبب بهبود و رفع آسیب بافت ها گردند در بین محققان، مورد اختلاف است. برخی عقیده دارند که این سلول ها این عمل را توسط تولید سایتوکاین ها و فاکتورهایی که برای تحریک ترمیم بافت ضروری است انجام می‌دهند و BMSC ها را مانند کارخانه کوچک مولکولی در نظر می‌گیرند که در آن انواع مختلفی از سایتوکاین ها و فاکتورهای تروفیک ساخته می‌شود. پس BMSC را عاملی برای تسریع و بهتر ساختن روند بازگشت اعمال فیزیولوژیک بافت می‌دانند.در تحقیقی این سلول ها در شرایط یونی مختلف کشت داده شده و دیده شد که این سلول ها با ترشح فاکتورهای رشد مختلف به شرایط مختلف محیط، پاسخ می‌دهند. پس شرایط محیطی و وضعیت بافت آسیب دیده را مسئول نوع فاکتور رشدی که از این سلول ها

ترشح می‌شود دانستند [۷].

اما برخی دیگر از محققین، اعتقاد دارند که این، خود سلول های BMSC هستند که پس از ورود به بافت آسیب دیده و با توجه به شرایط محیطی بافت میزبان، به سلول های مورد لزوم برای بافت، تمایز می‌یابند. این دانشمندان با نشاندار کردن و ردیابی سلول های BMSC منتقل شده به بدن میزبان، به این نتیجه دست یافته‌اند [۷].

این سلول ها جهت کاربردهای کلینیکی نیز مورد تحقیق قرار گرفته‌اند از جمله: Kopen در سال ۱۹۹۹ این سلول ها را به داخل بطن‌های طرفی موش نوزاد تزریق کرد و مشاهده نمود که این سلول ها می‌توانند به آستروسایتها و سلول های دارای نوروفیلامنت تمایز یابند [۸]. این سلول ها جهت ترمیم ضایعه پس از ایسکمی مغزی توسط و Li همکاران در سال ۲۰۰۰ [۹]، در موش مدل پارکینسون توسط Li و همکاران در سال ۲۰۰۱ [۱۰] و پس از ضایعات تروماتیک مغز و نخاع توسط Mahmood و همکاران در سال ۲۰۰۱ استفاده شد [۱۱]. تزریق سیستمیک این سلول ها در موشهای با آسیب مغزی توسط Akiyama در سال ۲۰۰۲ منجر به تمایز این سلول ها به سلول های عصبی مغز گردید [۱۲]. با توجه به چند ظرفیتی بودن این سلول ها Chopp و همکاران درسال ۲۰۰۰ [۱۳] و Sasaki در سال ۲۰۰۱ این سلول ها را جهت بازسازی میلین فیبرهای عصبی آسیب دیده بکار بردند [۱۴].

در سال ۲۰۰۱، Dezawa و همکارانش نشان دادند که با ایجاد تمایز ابتدایی سلول های مغز استخوان به سمت سلول های شوان در in vitro و تزریق آنها به عصب قطع شده موش صحرایی ترمیم عصب آسیب دیده انجام می‌شود [۳]. در سال ۲۰۰۱، Mosahebi و همکارانش نشان دادند که انتقال سلول های شوان کشت داده شده به داخل یک Conduit که پل ارتباطی استامپ های دیستال و پروگزیمال عصب قطع شده است، ترمیم عصب را بهبود می‌بخشد [۱۵]. همچنین Cuevas و همکارانش در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که در صورت تزریق سلول های BMSC تمایز نیافته به محل عصب قطع شده سیاتیک، درصدی از این سلول ها به سلول های میلین‌ساز تبدیل شده به رژنراسیون بافت آسیب‌دیده

کمک می‌کند [۱۶].

به هر حال تأثیر مثبت این سلول ها در بهبود ضایعات، امری انکارناپذیر است و ثابت شده که استفاده از این سلول ها در بسیاری ضایعات می‌تواند سبب تسریع روند ترمیم در بافت ها گردد.جهت درک بهتر روند ترمیم اعصاب محیطی توسط سلول های BMSC تمایز یافته به سلول های میلین ساز، مروری بر مراحل و نحوه تمایز سلول شوان، ضروری بنظر می رسد.

سلول های شوان از نورال کرست، منشاء می‌گیرند. نورال کرست عبارت است از یک مجموعه سلولی چند ظرفیتی که از منطقه دورسال نورال تیوب، منشاء می‌گیرد.برای بررسی چگونگی تبدیل سلول های نورال کرست به سلول های شوان، عصب سیاتیک موش صحرایی، مدل مناسبی است [۱۷]. مهاجرت سلول های نورال کرستی تا روز ۱۱ و ۱۲ جنینی ادامه می‌یابد. در حدود روز ۱۳ و ۱٤ جنینی، یعنی دو روز پس از اتمام مهاجرت، اکسون ها به داخل اندام های تحتانی پروجکت کرده در همین زمان، تمایز سلول های شوان از سلول های نورال کرست، آغاز می‌شود. در این مرحله، سلول های کرستی مهاجر، ژنی را که نشاندهنده فنوتیپ گلیالی است بیان می‌کنند. این ژن مربوط به پروتئین اصلی میلین محیطی، یعنی P0 است (در اعصاب بالغین نرمال، بیان این ژن، تنها به سلول های شوان میلین‌ساز محدود می‌شود). در این روز، این سلول ها دارای زوائدی هستند که با یکدیگر تماس داشته، دسته‌های اکسونی را در برمی‌گیرند و عصب را به مناطقی تقسیم می‌کنند [۱۷].

برای شکل‌گیری هر سلول بالغی، از سلول های بنیادی جنینی، یعنی از مرحله سلول تمایز نیافته به سلول بالغ، سلول باید از یک مرحله گذرا و بینابینی به نام سلول پیش‌ساز عبور نماید که این موضوع در مورد سلول های شوان نیز صادق است. رده سلول های شوانی، سه نقطه انتقال یا تغییر دارد.

- از سلول های نورال کرستی به سلول های پیش‌ساز
- از سلول پیش‌ساز به سلول شوان نابالغ
- از سلول نابالغ به سلول شوان بالغ [۱۸].

برخی مطالعات in vitro نشان می‌دهد که نئورگولین ، تکوین نورون از سلول های نورال کرست را بلاک می‌کند در حالیکه سلول های شوان، با یا بدون نئورگولین تکوین می‌یابند. این مشاهده نشان می‌دهد که نئورگولین برای شکل‌گیری گلیا از سلول های نورال کرستی نیاز نیست بلکه برای مهاجرت برخی انواع سلول های نورال کرست و بقا سلول های پیش‌ساز شوان نیاز است [۱۹]. در حالیکه مشاهدات دیگری نشان می‌دهد که همین بلاک ورود به رده عصبی توسط نئورگولین، سبب رانده شدن سلول ها، به سمت رده گلیال می‌شود [۱۸]. همانطور که اشاره شد بیرون زدن اکسون ها بسوی اندامهای تحتانی در روزهای ۱۳ و ١٤ اتفاق می‌افتد و در این روز سلول های نورال کرستی مهاجر که مهاجرتشان پایان یافته شروع به بیان P0 می‌کنند که مارکری برای سلول های با سرنوشت گلیالی است. به این سلول ها، سلول های پیش‌ساز شوان گفته می‌شود که دارای زوائدی می‌باشند که با یکدیگر اتصال و ارتباط داشته جانکشن‌هایی را می‌سازند. آنها گروههای بزرگی از اکسون ها را که در این زمان اکثر آنها هم سایز هستند احاطه کرده اعصاب را به مناطقی تقسیم می‌کنند. نتایج مطالعات نشان می‌دهد که تمایز سلول شوان توسط سیگنالهای خارجی که عمده‌ترین آنها از اکسون ها می‌آید صورت می‌گیرد. این سیگنال ها باید قادر باشند که دوگونه کاملاً جداگانه سلول شوان یعنی سلول های میلین ساز و غیر میلین‌ساز را در جای مناسب خود تولید کنند [۱۷]. مطالعات نشان می‌دهد این سیگنال همان نئورگولین β است. سیگنالی اکسونی که رسپتور آن یعنی $ErbB_3$ برروی سلول های شوان قرار داشته و مهمترین عامل برای تنظیم تکوینی رده سلولی شوان در دوره جنینی می‌باشد [۱۸]. باید توجه داشت سلول های مورد بحث که در روزهای ١٦ تا ١٨ از سلول های پیش‌ساز تولید می‌شوند، سلول های شوان نابالغ هستند که پروتئین سیتواسکلتی S100 و GFAP را بیان می‌کنند [۱۹] و برای احراز سرنوشت میلین‌ساز یا غیرمیلین‌ساز به سیگنال های اکسونی نیاز دارند [۲۰]. مدل پیشنهاد شده اینست که هنگام تمایز سلول شوان، OCT-6 به عنوان نقطه تصمیم‌گیری بین سرنوشتهای مختلف سلول شوان عمل می‌کند در حالیکه Krox-20 در مراحل بعدی تکوین و به عنوان فعال کننده ژن های تمایزی و

تنها در سلول های شوانی که متعهد به میلین‌سازی هستند بیان می‌شود. در زمان جنینی بیان OCT-6 در حدود ٢٤ تا ٤٨ ساعت، پیش از Krox-20 و از بخش پروگزیمال به بخش دیستال صورت می‌گیرد و این الگو در زمان بازسازی عصب پس از آسیب نیز در استامپ دیستال رعایت می‌شود [٢٠]. پروتئین هایی که پس از تمایز و ایجاد سلول های شوان میلین‌ساز در این سلول ها تولید می‌شوند عبارتند از P0 که البته بیان ژن این پروتئین در برخی مراحل دیگر تکوینی این سلول نیزاتفاق می افتد. از آن جمله می‌توان mRNA مربوط به P0 را از جمعیتهای سلولی در حال مهاجرت کرستی که قرار است سرنوشت گلیال پیدا کنند جدا کرد. به همین خاطر، P0 می‌تواند مارکری برای تمایز سلول های گلیال باشد. این پروتئین عضوی از اعضا خانواده ایمونوگلوبولین سوپرفامیلی از مولکولهای اتصالی سلول بوده با اینتراکشن هموفیلی که در خارج سلول بین بخشهای خارجی غشاء سیتوپلاسمی مجاور در میلین برقرار می‌کند سبب متراکم شدن میلین می‌گردد. این پروتئین خاص میلین سیستم اعصاب محیطی است [٢١].

همانطور که پیشتر شرح داده شد، بدنبال قطع یک عصب بالغ پس از آسیب، سلول های شوان از حالت سکون با ساختمان میلینی ثابت به حالت تکثیری و تغذیه‌ای تبدیل می‌شوند و میلین نابود می‌گردد. که بر اثر این رویداد، محیطی فراهم می‌شود که ترمیم عصبی را تحریک می‌کند. سلول های شوان سیگنال هایی ایجاد می‌کنند که سبب تسریع پروسه بازگشت تمایزی و مراجعه ماکروفاژها به محل آسیب می‌گردند [٢].

همچنین این سلول ها در استامپ دیستال، مولکول های چسباننده و رسپتورهای مهمی برای طویل شدن اکسون ها که در اعصاب بالغ به سلول های غیرمیلین‌ساز محدود می‌شود بیان می‌کنند. اینها به همراه مکانیسم‌های اتوکرین بقا سلول های شوان، اساس رژنراسیون عصبی و ترمیم را در سیستم اعصاب محیطی تشکیل می‌دهند [١٧]. یعنی سلول های شوان در استامپ دیستال، هم فاکتورهای تروفیک و هم مواد چسباننده فراهم می‌کنند که برای رشد اکسون ها ضروری است [١٩].

مطالعات انجام شده در سالهای اخیر نشان می‌دهد که برخی استروئیدها بخصوص پروژسترون در سیستم مغز و اعصاب محیطی توسط سلول های گلیال ساخته می‌شوند که به آنها نورواستروئید اطلاق می‌شود. کلمه نورواستروئید به گروه خاصی از استروئیدها بر نمی‌گردد بلکه به محل سنتز آنها یعنی سیستم عصبی اشاره دارد.

روند استروئیدوژنز با تبدیل کلسترول به پرگنونولون توسط سایتوکروم 450scc شروع می‌شود [۲۲]. بررسی‌ها نشان می‌دهد که پروژسترون که موضوع این تحقیق است توسط سلول های شوان ساخته شده و رسپتور آن بر روی نورون ها و خود سلول های شوان قرار دارد [۲۲و۲۳]. بنابراین سلول های گلیال به عنوان هدفی برای هورمون های استروئیدی محسوب می شود. در محیط کشت تاثیرات مختلف این هورمون ها بر رشد، اتصال و شکل سلولی نشان داده شده است. به هر حال مهمترین تاثیر آن بر سلـول های شوان، تحریک سنتـز پروتئین های مخصوص میلین در طول مراحل اولیه کشت است [۲۲]. محققان نشان دادند که بر اثر پیری، میزان mRNA و پروتئین های میلین محیطی از جمله P0،PMP_{22} و MBP کاهش می‌یابد اما با درمان توسط پروژسترون می‌توان این تاثیر را به میزان زیادی کاهش داده سبب افزایش بیان این پروتئین ها شد [۲۳]. آنها معتقدند که پروژسترون، فعایت پروموتر ژن های P0 و PMP_{22} را در سلول های شوان افزایش می‌دهند. ولی این دو ژن، اهداف مستقیم پروژسترون نیستند بلکه پروژسترون، تاثیر خود را از طریق تنظیم بیان فاکتور های رونویسی از جمله Krox-20 که در میلین‌سازی نقش دارد اعمال می‌نماید [۲۴].

مطالعات اخیر نشان می‌دهند که هورمون های استروئیدی، رسپتورهای تیروزین کینازی (RTK) یا مسیرهای سیگنالی پایین دست آنها را فعال می‌کنند و برعکس لیگاندهای RTK، قادر به تغییر فعالیت رسپتورهای استروئیدی می‌باشند. رسپتور RTK نوع I، ٤ عضو دارد که عبارتند از: $ErbB_1$ ، $ErbB_2$، $ErbB_3$ و $ErbB_4$ که لیگاند آنها اعضا خانواده EGF و همه ایزوفورمهای heregulin می‌باشد و برطبق اطلاعات بدست آمده، پروژسترون، قادر به اتصال و فعال سازی این دسته رسپتورها می‌باشد [۲۵].

برخی دانشمندان با استفاده از اطلاعات راجع به روند تکامل سلول های شوان در in vivo و بکاربردن القا کننده های مربوط به تمایز این سلول ها توانسته‌اند تا حدودی روند تکوینی این سلول ها را در in vitro تقلید نمایند. برای مثال با استفاده از سلول های استرومایی مغز استخوان (BMSC) و بکارگیری فاکتور رشدی از خانواده Glial growth factor و Forskolin که یک افزاینده سطح cAMP داخل سلولی است توانستند سلول های BMSC را تا مرحله بیان S100 که یکی از مارکرهای سلول شوان است پیش ببرند [۳].

با توجه به آنچه ذکر شد سلول های شوان، جهت تکوین خود به سیگنال های مختلف داخل و خارج سلولی نیاز داشته و توسط این سیگنال ها، مسیرهای گوناگونی در داخل سلول ها فعال شده، مارکرهای خاصی که بیانگر مرحله تکوینی این سلول هاست بیان می‌شود.

سوالاتی که در این تحقیق مطرح است اینست که:

۱- آیا پروژسترون می‌تواند جانشین مناسبی برای هرگولین در مسیر تکامل سلول های شوان از BMSC باشد؟

۲- آیا می‌توان با انتقال سلول های BMSC تمایز یافته توسط پروژسترون به محل عصب محیطی آسیب دیده، به ترمیم منطقه آسیب دیده در مدتی کوتاه و با کیفیتی مطلوب دست یافت؟

مروری بر مطالعات گذشته