

## بررسی فراساختاری اثر توام ژل کلاژن و مجرای پلی وینیلیدین فلوراید بر روی رژنر اسیون عصب محیطی موش صحرایی

دکتر غلامحسین فرجاه<sup>۱</sup>، دکتر تهمنه پیروی<sup>۲</sup>، دکتر محمد تقی جغتایی<sup>۳</sup>، دکتر مهدی مهدیزاده<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> نویسنده مسئول: استادیار دانشگاه علوم پزشکی ارومیه E-mail: hfarjah@hotmail.com

<sup>۲</sup> استادیار دانشگاه علوم پزشکی ارومیه <sup>۳</sup> استاد دانشگاه علوم پزشکی ایران <sup>۴</sup> دانشیار دانشگاه علوم پزشکی ایران

### چکیده

**مقدمه:** تشکیل میلین به بلوغ و تکامل سیتو اسکلتال آکسون و میتو کندری وابسته است. ژل کلاژن بصورت اختصاصی در تنظیم و تکامل سیتواسکلتان آکسون نقش دارد.

**روش کار:** این تحقیق یک مطالعه تجربی است که از ۴۸ سر موش صحرایی نر (۲۵۰g±۲۰۰) 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 Ploy Vinyl Dene Fluoride) PVDF با ژل کلاژن، اتوگرافت، شم و کنترل). عصب سیاتیک در پایان هفته چهارم و دوازدهم توسط میکروسوپ الکترونی مورد مطالعه قرار گرفت.

**یافته ها:** در پایان هفته چهارم پس از ترمیم، تعداد آکسون های میلین در گروه های اتوگرافت و ژل کلاژن اختلاف معنی داری ندارد ولی در پایان هفته دوازدهم، تعداد آکسون های بدون میلین در گروه اتوگرافت بیشتر از گروه ژل کلاژن است ( $p < 0.01$ ). چگالی میکروتوبول ها در هفته دوازدهم پس از ترمیم، در گروه نرمال و اتوگرافت اختلاف معنی داری ندارند. ستیغ میتو کندری در گروه های آزمایش موازی با محور درازشان می باشد.

**نتیجه گیری:** با توجه به اثرات مثبت ژل کلاژن بر روی رشد و تکامل میکروتوبول ها و میتو کندری ها، ممکن است این ژل جهت ترمیم ضایعات عصب محیطی مفید باشد.

**واژه های کلیدی:** عصب سیاتیک، ژل کلاژن، میکروتوبول، میتو کندری، پلی وینیلیدین فلوراید

دریافت: ۸۵/۱۱/۷ پذیرش: ۸۶/۱۰/۱۱

### مقدمه

قطع عصب و روش ترمیم آن از دیرباز مورد توجه محققین بوده است. پیوند اتوگرافت عصب در حال حاضر بعنوان یک روش طلایی (Gold standard) برای ترمیم شکاف عصبی به کار می رود. برداشتن عصب از بدن بیمار ایده آل نیست و گاهی غیر ممکن است، تشکیل نوروما و بافت لیفی از عوارض شایع در روش اتوگرافت است [۲،۱]. به لوله های طبیعی یا مصنوعی که شکاف بین دو انتهای عصب بریده شده را پل می زنند،

کانال راهنمای عصب یا NGC<sup>۱</sup> می گویند. میزان ترمیم عصب در کانال راهنمای عصب به غلظت ژل کلاژن وابسته است [۳]. در یک تحقیق، هنگامی که از لوله سلیکون حاوی ژل کلاژن بعنوان کانال راهنمای عصب (جهت ترمیم عصب سیاتیک) استفاده گردید، مشاهده شد که سرعت جوانه زدن آکسون افزایش می یابد [۴]. استفاده از ژل کلاژن جهت تشکیل پری نوریوم در طی ترمیم عصب موثر است [۵].

<sup>۱</sup> Nerve Guidance channel

ترمیم عصب تاثیر بیشتری دارد [۱۷،۱۶]. لوله‌های قطبی شده PVDF نسبت به تغییرات مکانیکی حساس‌تر می‌باشند و بطور معنی‌داری حتی در تغییرات کم فیزیکی، شارژ سطحی تولید می‌کنند. بافت ایجاد شده در لوله‌های قطبی شده مثبت بطور معنی‌داری نسبت به لوله‌های قطبی منفی و یا غیر قطبی، تعداد آکسون میلیون‌دار و ضخامت میلین بیشتری دارد همچنین سطح مقطع عصب نیز بزرگتر است [۱۸]. در تحقیق دیگری مشخص شده است که زوائد نورون‌های کشت داده شده در روی صفحات PVDF قطبی شده بیشتر از PVDF غیر قطبی رشد می‌نمایند [۱۹].

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 باشد [۱]. ژل کلاژن و خاصیت پیزوالکتریک هر یک به تنهایی موجب افزایش رژنراسیون می‌شوند. بررسی‌های انجام شده توسط مولفان مقاله نشان می‌دهد که مطالعه ای مبنی بر بررسی فراساختاری اکسون هنگام استفاده توأم آن‌ها تاکنون گزارش نشده است.

## روش کار

پژوهش حاضر یک مطالعه تجربی است که بر روی ۴۸ سر موش صحرایی نر بالغ، نژاد Sprague-Dawley به وزن تقریباً ۲۵۰-۳۰۰ گرم انجام گرفت. حیوانات به صورت تصادفی به چهار گروه ۱۲ تایی تقسیم شدند:

- گروه PVDF با ژل کلاژن

- گروه اتوگرافت

- گروه Sham

- گروه کنترل

روش جراحی:

موش‌ها در ابتدا توسط ماده بیهوشی Ketamin به مقدار ۹۰ mg/kg و Xylazine به مقدار ۱۰ mg/kg به صورت داخل صفاقی بیهوش شدند. با ایجاد برشی در پوست ناحیه خلفی خارجی پای سمت چپ، عضله و فاسیا به آرامی کنار زده و عصب سیاتیک در فاصله بین

مطالعات نشان می‌دهد که مراحل طویل شدن اکسون به محل بافت، ماتریکس خارج سلولی، سلول‌های مجاور و عوامل هورمونی نورون در حال ترمیم وابسته است [۶]. ژل کلاژن بعنوان یک ماتریکس مناسب برای نگهداری عوامل تغذیه کننده عصب یا سلول‌ها معرفی شده است [۷]. به دنبال ترمیم اعصاب محیطی، فیبروبلاست‌های اندونوریم در تولید کلاژن نوع I و فیبرونکتین شرکت می‌نمایند [۸]. نتایج تحقیقات نشان می‌دهد هنگامی که از ورید ژوگولار پر شده با ژل کلاژن بعنوان کانال راهنمای عصب استفاده شود، ترمیم عصب افزایش می‌یابد [۹]. پس از قطع عصب (در مقایسه با له شدن) بیان Collagen mRNA در سلول‌های فیبروبلاست اپی‌نوریوم افزایش می‌یابد [۱۰]. تحقیقات نشان می‌دهد که غلظت کمتر ژل کلاژن سبب بهبودی بالای ترمیم عصب می‌شود [۱۱]. همچنین استفاده از ترکیب ژل کلاژن، لامینین و فیبرونکتین محیط مناسبی را برای ترمیم اکسون ایجاد می‌نماید [۱۲]. مطالعات نشان می‌دهد که استفاده از ترکیب کلاژن نوع I و III بعنوان ماتریکس در داخل مجرای راهنمای عصب سبب تقویت ترمیم عصب می‌شوند [۱۳]. در تحقیقی دیگر هنگامی که از لوله سلیکون جهت ترمیم ضایعه عصب محیطی استفاده نمودند، مشاهده شد که استفاده از ژل کلاژن تاثیری در افزایش ترمیم عصب ندارد [۱۴].

مواد پیزوالکتریک موادی هستند که تغییر فشار و یا نیرو باعث تغییر بار الکتریکی لحظه ای در سطح آن‌ها می‌شود. پلی وینیلیدین فلوراید (PVDF)<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 [۱۵]. تحقیقات نشان می‌دهد که PVDF، ترمیم عصب محیطی را تقویت می‌نماید. کانال PVDF قطبی نسبت به غیر قطبی در افزایش کمی و کیفی

<sup>۱</sup> Ploy Vinyli dene Fluoride

مناسب برای مطالعه میکروسکوپ الکترونی مشخص شد. سپس برش‌هایی به اندازه ۵۰ نانومتر تهیه شدند. برش‌ها بر روی شبکه مسی (Gride) منتقل و رنگ آمیزی شدند. سپس توسط میکروسکوپ الکترونی (Leo 906) در بزرگ‌نمایی‌های مختلف مطالعه و از نواحی مورد نظر توسط دوربین دیجیتال متصل به کامپیوتر عکس تهیه گردید. ابتدا در بزرگ‌نمایی ۳۰۰۰ آکسون‌های بدون میلین شمارش شدند. سپس با بزرگ‌نمایی ۶۰۰۰۰ تعداد لایه‌های میلین آکسون‌های میلین‌دار، شکل میتوکندری‌ها و تعداد میکروتوبول‌های درون آکسون‌ها بررسی گردید. تصاویر به نواحی شش گوشه که هر یک به مساحت  $0.35 \mu\text{m}^2$  اکسوپلاسم می‌باشند تقسیم و میکروتوبول‌ها در حداقل ۶۰ آکسون (۳۷۰ ناحیه شش گوش) شمرده شدند. تعداد متوسط میکروتوبول‌های هر ناحیه شش گوش توسط تعداد کل میکروتوبول‌های شمارش شده به تعداد کل نواحی شش گوش بدست آمد [۲۰].

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

### یافته‌ها

با ثابت نمودن نمونه‌ها توسط گلوکار آلدهید و تتراکسیداسمیوم، چربی غلاف میلین حفظ شده و در برش‌های عرضی بصورت یک حلقه تقریباً سیاه که پیرامون آکسون قرار دارد، دیده می‌شود. مطالعه میکروسکوپ الکترونی نشان می‌دهد که آکسون‌های فاقد میلین در ناودان‌های عمیق موجود در سطح سلول‌های شوان قرار دارند. برای تعیین تعداد آکسون‌های بدون میلین، غشای پایه و حضور نوروفیلانمنت‌ها 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 دوازدهم پس از ترمیم در گروه ژل کلاژن نسبت به گروه اتوگرافت اختلاف معنی‌داری دارد ( $p > 0.01$ ) (جدول ۱).

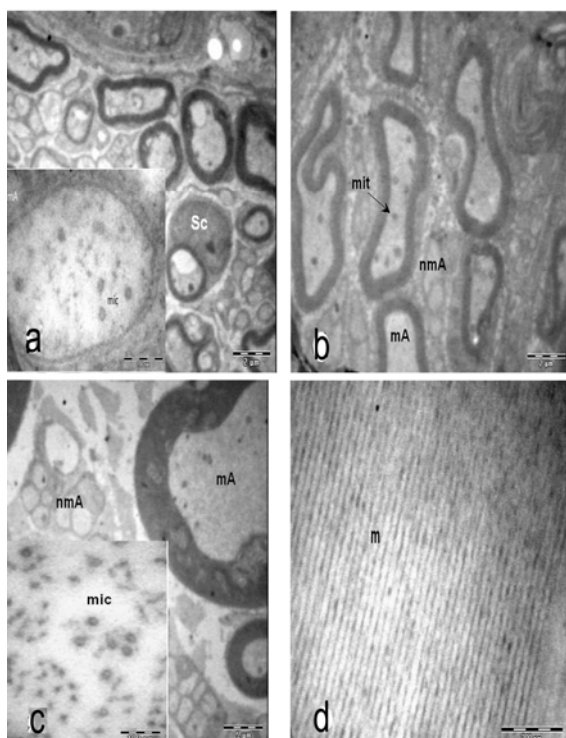
بریدگی سیاتیک تا محل دو شاخه شدن اعصاب تیپا و پروتئال مشترک نمایان گردید. سپس در حد واسط بین دو نقطه فوق و در محل یکسان برای گروه اتوگرافت و گروه PVDF + ژل کلاژن، قطعه‌ای از عصب به اندازه ۱۰mm قطع شد. از یک قطعه لوله PVDF (Harvard Apparatus.Ltd) استریل شده با قطر داخلی ۱/۶mm و به طول ۱۴mm در محل شکاف استفاده شد. دو انتهای بریده عصب به صورت تلسکوپی داخل لوله گذاشته و با نخ نایلون ۱۰-۰ به دیواره لوله بخیه زده شد. تمام مراحل فوق در زیر میکروسکوپ جراحی (Olympus , SZX12 , Japan) با بزرگ‌نمایی ۲۰ و تحت شرایط استریل انجام شد. ۰/۳ میلی لیتر از ژل کلاژن (Roche) حاوی کلاژن I و III با غلظت ۱.۲۸mg/ml از طریق یک سرنگ و قبل از محکم نمودن بخیه اپی‌نوریال به داخل لوله تزریق شد. محلول فوق در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به ژل تبدیل می‌شود.

در گروه اتوگرافت قطعه بریده شده عصب ۱۸۰ درجه جابه‌جا و به دو انتهای بریده عصب توسط نخ ۱۰-۰ بخیه شد. در گروه شاهد (Sham)، عصب سیاتیک نمایان شد ولی قطع نگردید. در گروه کنترل حیوان سالم و دست نخورده است. پس از عمل جراحی، بخش‌های بریده عضله و پوست بخیه شدند.

شش 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 گلوکار آلدهید ۲/۵ درصد و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. نمونه‌ها به سه قسمت ابتدایی، میانی و دیستال تقسیم شدند. به دنبال استفاده از تتراکسیداسمیوم یک درصد به مدت ۱/۵ ساعت، مراحل تهیه بلوک برای میکروسکوپ الکترونی انجام گرفت. توسط اولترامیکروتوم برش‌هایی به ضخامت ۵۰۰ نانومتر تهیه و با محلول تولوئیدین بلو ۱٪ به مدت ۳-۲ دقیقه رنگ آمیزی شدند. پس از تهیه برش نیمه نازک، محل

(b) گروه اتوگرافت: تعدادی آکسون بدون میلین که توسط یک سلول شوان احاطه می‌شوند (× ۴۶۸۳)  
 (c) گروه ژل کلاژن: تعدادی آکسون بدون میلین در حد واسط دو آکسون میلین‌دار (× ۱۲۶۳۰)  
 (d) مجاورت سلول شوان با آکسون میلین‌دار (× ۲۱۵۶۰)  
 (e) عصب نرمال: تیغه پایه (bl) در نزدیکی غلاف میلین (× ۲۱۵۶۰)  
 آکسون میلین‌دار (mA)، آکسون بدون میلین (nmA)، سلول شوان (Sc)، میتوکندری (mit)، میلین (m) تصویر کوچک در شکل های a و b: به وضعیت قرارگیری ستیغ‌های میتوکندری در گروه‌های ژل کلاژن و اتوگرافت (موازی با محور طولی میتوکندری) و c و عصب نرمال (عمود بر محور طولی) d توجه نمائید (× ۳۵۹۷۰)

میکروسکوپ الکترونی مشخص می‌کند، که میکروتوبول‌ها در آکسون عصب نرمال با فاصله کم و مساوی قرار گرفته‌اند و در فضای بین آنها نوروفیلانمت‌ها دیده می‌شود (شکل ۲).



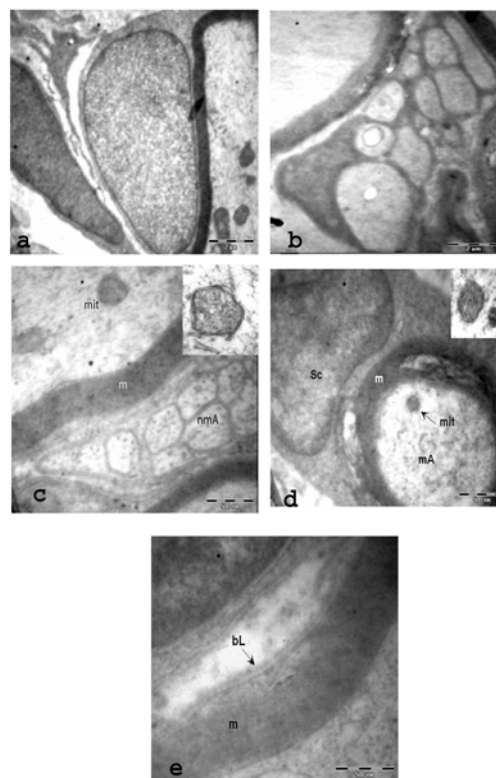
شکل ۲: تصویر میکروسکوپ الکترونی، از عصب رژنره در ناحیه میانی لوله PVDF، در مقایسه با اتوگرافت و عصب نرمال ۱۲ هفته پس از ترمیم (× ۳۵۹۷)

(a) گروه Collagen Gel (b) گروه Autograft (c) عصب نرمال (d) منظم بودن خطوط تیره و روشن غشای میلین را نشان می‌دهد (× ۶۰۰۰۰).

تصویر کوچک در شکل های a و b: آرایش میکروتوبول‌ها در آکسون میلین‌دارو آکسون بدون میلین، به دسته‌های ۲، ۳ و ۵ تایی میکروتوبول توجه فرمائید (× ۶۰۰۰۰) میکروتوبول (mic)

میکروسکوپ الکترونی نشان می‌دهد که در گروه‌های آزمایشی غلاف میلین به خوبی در اطراف آکسون ایجاد شده است و میلین در واقع بخشی از سلول شوان می‌باشد، که بصورت ماریچج دور آکسون می‌پیچد و با یک توالی تیره و روشن مشاهده می‌شود. با اندازه‌گیری توالی تیره و روشن میلین در پایان هفته چهارم و دوازدهم پس از ترمیم، ملاحظه گردید که ضخامت میلین در گروه اتوگرافت نسبت به گروه ژل کلاژن اختلاف معنی‌داری دارد ( $p < 0.01$ ) (جدول ۱).

میکروسکوپ الکترونی نشان می‌دهد که سلول شوان در خارج توسط یک تیغه قاعده‌ای (basal lamina) 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 (basal lamina) است (شکل ۱).

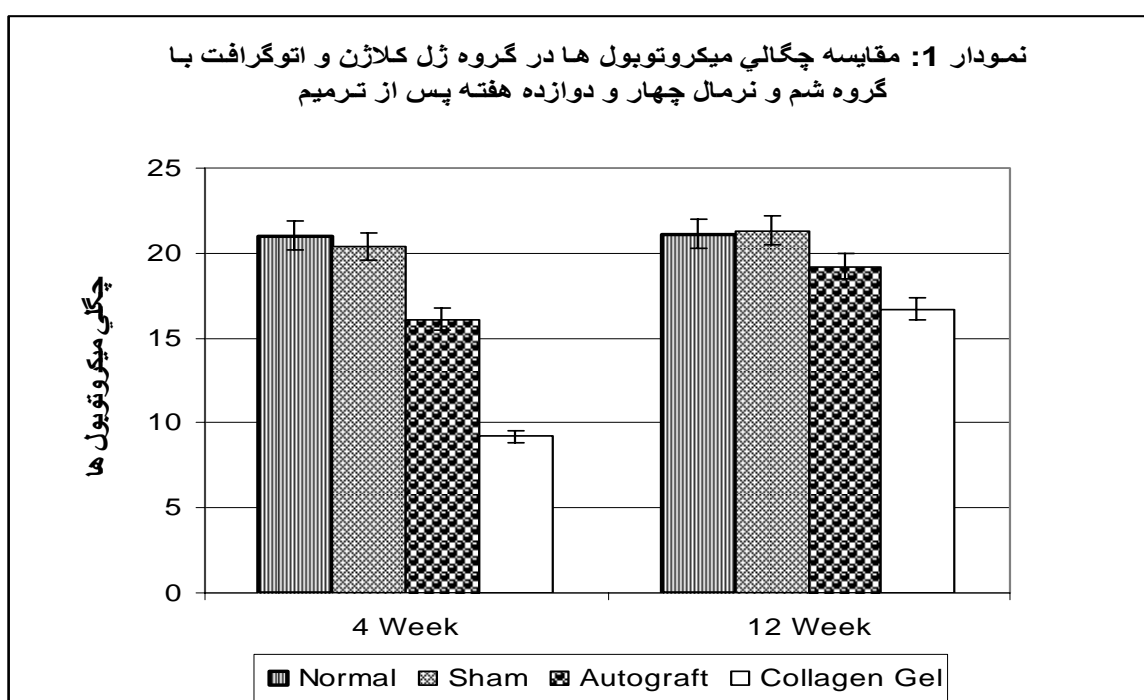


شکل ۱: تصویر میکروسکوپ الکترونی، از عصب رژنره در ناحیه میانی لوله PVDF، در مقایسه با اتوگرافت و عصب نرمال ۱۲ هفته پس از ترمیم (a) گروه ژل کلاژن: مجاورت سلول شوان با آکسون میلین‌دار، هسته سلول فیبروبلاست در مجاورت سلول شوان مشاهده می‌شود (× ۴۶۸۳)

جدول ۱: مقایسه تعداد آکسون های بدون میلین و ضخامت غلاف میلین در هفته چهارم و دوازدهم پس از ترمیم (mean±SD)

گروه	تعداد آکسون بدون میلین (هفته چهارم)	تعداد آکسون بدون میلین (هفته دوازدهم)	ضخامت غلاف میلین (هفته چهارم)	ضخامت غلاف میلین (هفته دوازدهم)
ژل کلاژن + PVDF	1053 ± 880	1127 ± 511 <sup>a</sup>	20.8 ± 25 nm <sup>a</sup>	511 ± 91 nm <sup>a</sup>
اتوگرافت	8111 ± 417	1728 ± 760	31 ± 33 nm	1052 ± 191 nm
شم	10561 ± 245	10561 ± 245	1857 ± 195 nm	1890 ± 197 nm
کنترل	11450 ± 378	11451 ± 378	1950 ± 181 nm	2050 ± 181 nm

a اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه اتوگرافت  $p < 0.01$  نانومتر = nm



نمودار ۱: مقایسه چگالی میکروتوبول ها در گروه ژل کلاژن و اتوگرافت با گروه شم و نرمال چهار و دوازده هفته پس از ترمیم

می‌شوند و چگالی آنها  $9 \pm 2/8$  در میکرومتر مربع می‌باشد، که از لحاظ آماری نسبت به عصب نرمال اختلاف معنی‌داری دارند ( $p < 0.01$ ). در پایان هفته ۱۲، چگالی میکروتوبول ها در گروه اتوگرافت نزدیک به عصب نرمال است ( $19/2 \pm 3$  در میکرو متر مربع)، در حالی که چگالی آنها در گروه ژل کلاژن ( $16/7 \pm 3/1$ ) می‌باشد ( $p < 0.01$ ) (نمودار ۱).

میتوکندری در آکسون میله‌ای شکل و غالباً باریکتر از میتوکندری در سایر سلول های غیر عصبی است. البته گاهی میتوکندری گرد و بزرگی نیز دیده می‌شود.

چگالی میکروتوبول ها در عصب نرمال  $24 \pm 3$  در میکرومتر مربع است.

آرایش فراگیری میکروتوبول ها در آکسون‌های در حال ترمیم در مقایسه با عصب نرمال متفاوت است. در پایان هفته چهارم پس از ترمیم، میکروتوبول‌ها در گروه اتوگرافت بصورت دسته‌های ۴-۵ تایی دیده می‌شوند. دسته‌ها با فواصل متغیری نسبت به هم قرار دارند و چگالی میکروتوبول ها در گروه اتوگرافت  $16/1 \pm 2/7$  در میکرومتر مربع است. در حالی که در گروه ژل کلاژن، میکروتوبول ها غالباً بصورت دوتایی دیده

میتوکندری‌ها در طول آکسون و با فواصل متغیر نسبت به هم پخش می‌شوند. ستیغ‌های میتوکندری در گروه سالم بیشتر بصورت عرضی جهت‌گیری نموده ولی در گروه‌های آزمایشی موازی با محور درازشان قرار دارند، در برش عرضی، حلقه‌های هم مرکز تیره و روشن به نظر می‌رسند. همچنین در گروه‌های آزمایشی گرانول‌های متراکم و کروی شکل (matrix granules) بیشتری نسبت به گروه کنترل در فضای بین ستیغی مشاهده می‌گردد (شکل ۱).

### بحث

اگر چه پیوند اتوگرافت در حال حاضر به عنوان روش طلایی برای ترمیم شکاف عصبی به کار می‌رود، ولی ترمیم کامل نادر است [۲۱]. فقدان یک روش استاندارد و شناخت ناکافی اصول مکانیسم‌های ترمیم عصب از جمله دلایل قصور در تحقیقات NGC می‌باشند. بعنوان مثال اندازه شکاف ایجاد شده در عصب محیطی، خواص فیزیکی و شیمیایی NGC به کار برده شده، ویژگی‌های ماتریکس داخل لوله و یا تحت فشار قرار دادن عصب (بدون ایجاد شکاف در آن) بر میزان ترمیم تأثیر دارند.

با توجه به روش‌های مختلف ارزیابی توسط محققین مختلف، مقایسه بین این تحقیقات سخت و دشوار است. 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 مؤثر است. عصب سیاتیک شایع‌ترین مدل برای مطالعه ترمیم عصب در جوندگان می‌باشد، زیرا به راحتی قابل دسترسی است، به اندازه کافی بزرگ است و نهایتاً اینکه عصب مختلط حسی و حرکتی می‌باشد [۲۱].

استفاده از پلی مرهای شارژ شده همانند PVDF، ممکن است نکات بیشتری را درباره نقش جریان الکتریکی در کنترل ترمیم روشن نماید. نتایج نشان می‌دهد که برخلاف بزرگسالان، ترمیم بافت در جنین (به دلیل عدم حضور التهاب شدید) سریع‌تر انجام

می‌شود [۲۲].

هنگامی که عصب تحت فشار (Crush) قرار می‌گیرد، پوشش‌های اپی نورایوم و پری نورایوم آن سالم است و نیازی برای بخیه زدن وجود ندارد، در نتیجه ترمیم عصب به راحتی و سریع‌تر انجام می‌گیرد. در مطالعه حاضر نیز همانند سایر تحقیقات انجام شده مشاهده گردید که تعداد آکسون‌ها در ناحیه انتهایی محل ترمیم کمتر از ناحیه ابتدایی می‌باشد که این امر ممکن است به دو دلیل باشد، اولاً تعدادی از آکسون‌ها (به دنبال انتخاب مسیر غلط) نوروما تشکیل می‌دهند، ثانیاً ممکن است زمان بیشتری جهت رشد آکسون‌ها و رسیدن آن‌ها به انتهای کانال راهنمای عصب نیاز باشد [۲۳].

میکروتوبول‌ها در عصب سالم بصورت منفرد و با فاصله کم و مساوی قرار می‌گیرند [۲۴]. آنالیز میکروسکوپ الکترونی نشان می‌دهد که چگالی میکروتوبول‌های اکسونی در گروه اتوگرافت و گروه ژل کلاژن در پایان هفته چهارم با عصب نرمال اختلاف معنی داری دارد.

در پایان هفته دوازدهم در هر دو گروه افزایش می‌یابد ولی این افزایش در گروه اتوگرافت نزدیک به نرمال است. این امر به دلیل سالم بودن پوشش‌های اپی نورایوم و پری نورایوم و حضور تعداد زیادی سلول شوان در گروه اتوگرافت است که ترمیم عصب به راحتی و سریع‌تر انجام می‌گیرد. در گروه ژل کلاژن به دلیل استفاده از کانال راهنمای عصب، با تشکیل اپی نورایوم و عروق خونی، سلول‌های شوان از دو انتهای پروگزیمال و دیستال کانال تکثیر یافته و در داخل کانال تجمع می‌یابند. تحقیق حاضر نشان می‌دهد که حضور کلاژن به عنوان ماتریکس جهت رشد آکسون در کانال راهنمای عصب اهمیت دارد.

بزرگتر بودن مقطع آکسون در ناحیه ابتدایی نسبت به انتهایی محل ترمیم عصب، به دلیل تعداد بیشتر نوروفیلانمت‌ها و میکروتوبول‌ها و سایر پلی‌پپتیدها می‌باشد. انتقال آکسونی میتوکندری به میکروتوبول‌ها وابسته است ولی به میکروفیلانمت‌ها و جریان

میکروتوبول های روی هم افتاده، به پیشروی مخروط رشد کمک می کند. مخروط های رشد بصورت پاهای نخعی شکل، آرام آرام در طول سطح خارجی ستون های سلول های شوان پیشروی می کنند و بتدریج توسط آن ها احاطه می شوند [۲۶].

در سیستم عصبی تشکیل و تکامل غلاف میلین به تکامل میکروتوبول ها وابسته است [۲۷،۲۰].

در تحقیق حاضر نیز مشاهده می گردد در گروه اتوگرافت میانگین ضخامت میلین در هفته چهارم و دوازدهم پس از ترمیم بطور معنی داری بیشتر از گروه ژل کلژن+PVDF است و این مطلب با افزایش چگالی میکروتوبول ها ارتباط دارد. بطوری که در پایان هفته دوازدهم چگالی میکروتوبول ها در گروه اتوگرافت نزدیک به چگالی عصب نرمال است.

میتوکندری و میکروتوبول ها با هم همکاری می نمایند بطوری که میکروتوبول ها جهت بازسازی و افزایش طول خود نیاز به انرژی دارند که میتوکندری ها آن را تامین می کنند. میتوکندری ها هم جهت انتقال به ناحیه دیستال اکسون به میکروتوبول ها وابسته هستند.

### نتیجه گیری

این مطالعه پیشنهاد می کند که با توجه به اثرات مثبت بر روی رشد و تکامل میکروتوبول ها و میتوکندری ها، ژل کلژن ممکن است جهت ترمیم ضایعات عصب محیطی مفید باشد.

اندوپلاسمیک رتیкулوم ارتباطی ندارد. چگالی میکروتوبول ها در هفته دوازدهم با افزایش قطر آکسون افزایش می یابد، این افزایش چگالی با افزایش قطر آکسون ها ارتباط دارد. با آنالیز میکروسکوپ الکترونی تعداد میکروتوبول ها در گروه PVDF + ژل کلژن کمتر از گروه اتوگرافت است. افزایش تعداد میکروتوبول ها نشانه افزایش بیان پروتئین های سیتواسکتال است که میلین سازی را تحت تاثیر قرار می دهد [۲۳].

در نورو ن های در حال رشد، میکروتوبول ها نقش مهمی در افزایش طول آکسون به سوی سلول هدف بازی می کنند. به دنبال قطع اعصاب محیطی و شروع دژنراسانس والرین، قطعه انتهایی آکسون آسیب دیده توسط سلول های اطراف هضم و جذب می شوند. در روز اول حادثه، انتهای قطعه ابتدایی آکسون، به دلیل تجمع محتویات آکسوپلاسمی تازه رسیده شامل ترکیبات سیتواسکتلی همانند نوروفیلانمنت ها، میکروتوبول ها و میکروفیلانمنت ها، همچنین میتوکندری و عناصر اندوپلاسمیک صاف متورم می شوند، که اصطلاحاً به آن مخروط رشد (Growth Cones) می گویند [۲۵]. در مخروط رشد، میکروتوبول ها بصورت دسته قرار دارند و توسط پل های عرضی که در فواصل منظم قرار گرفته اند به یکدیگر متصل می شوند، این پل ها از پروتئینی به نام دی نئین (Dynein) تشکیل شده است. این پروتئین در حضور ATP (Adenosine Triphosphate) و یک کوفاکتور سبب می شود برخی میکروتوبول ها نسبت به برخی دیگر از آنها بلغزند. افزایش طول ایجاد شده در

### References

- 1- Hudson TW, Evans GR.D, and Schmidt CE: Engineering strategies for peripheral nerve repair. Clin Plast Surg. 1999; 26(4): 617-628.
- 2- Anselin AD, Fink T, and Davey DF. An alternative to nerve grafts in peripheral nerve repair: Nerve guides seeded with adult schwann cells. Acta Churargica Austriaca. 1998; 30(147): 19-24.
- 3- 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.
- 4- Satou T, Nishida S , Hiruma S , Tanji K , Takahashi M , Fujita S , et al. 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.
- 5- 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.
- 6- Sephel GC, Burrous BA, and Kleinman HK. Laminin neural activity and binding proteins. *Dev Neurosci.* 1989; 11(4-5): 313-31.
- 7- Keeley R, Atagi T , Sabelman E , Padilla J , Kadlcik S , Keeley A , 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.
- 8- Siironen J, Sandberg M , Vuorinen V , and Roytta M. Expression of type I and III collagens and fibronectin after transection of rat sciatic nerve. Reinnervation compared with denervation. *Lab Invest.* 1992; 67(1): 80-7.
- 9- 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.
- 10- 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.
- 11- 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.
- 12- Chen YS, Hsieh CL, Tsai CC, Chen TH, Cheng WC, Hu CL, et al. Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin .*Biomaterials.* 2000; 21(15): 1541-7.
- 13- 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.
- 14- Terris DJ, Cheng ET , Utley DS , Tarn DM , HO PR , and Verity AN . Functional 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 .
- 15- Robert F, Pokholok DK and Hannett NM. Electrically charged Polymeric substrates enhance nerve fibre out growth in vitro. *Biomaterials.* 1992 ;13(3): 183-190.
- 16- 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.
- 17- Valentini RF , Sabatini AM , Dario P , and Aebischer P. Polymer electret guidance channels enhance peripheral nerve regeneration in mice. *Brain Research.* 1989; 480: 300-304.
- 18- Fine EG, Valentini RE , Bellamkonda R , and Aebischer P. Improved nerve regeneration through piezoelectric vinylidene fluoride trifluoroethylene copolymer guidance channels. *Biomaterials.* 1991; 12: 775-780.
- 19- 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.
- 20- Lura L, Kirkpatrick , Andrea S, Witt , H. Ross Payne , H. David Shine , and Scott T. Brady . Changes in Microtubule Stability and Density in Myelin-Deficient Shiverer Mouse CNS Axons. *The Journal of Neuroscience.* 2001; 21(7):2288-2297.
- 21- Pu LL, syed SA, Reid M , Patwa H. Effects of nerve growth factor on nerve regeneration through a vein graft across a gap. *Plastic and Reconstructive Surgery.* 1999; 104(5), 1379-1385.
- 22- Wang K, Nemeth IR, Seckel BR, Chakalis DP, Swann DA , Kuo JW , et al. Hyaluronic acid enhances peripheral nerve regeneration in vivo. *Microsurgery.* 1998; 18: 270-275.
- 23- Scott T, Brady, Andrea S. Witt, Laura L. Kirkpatrick , Sylvie M. de Waegh , Carol Readhead , Pang-Hsien Tu, and et al. Formation of compact myelin is required for maturation of the axonal cytoskeleton. *The journal of Neuroscience.* 1999; 19(17):7278-7288.
- 24- Lundborg G. Nerve regeneration and repair- A review. *Acta Orthop.* 1987; 58: 145-169.
- 25- Grill RJ, and Tuszynski M H. *CNS Regeneration: Axonal Responses to Injury*, California, Academic Press , USA , 1999 : 15-90
- 26- Thanos PK, Okajima S, and Terzis J K. Ultrastructure and cellular biology of nerve regeneration. *J of Reconstructive Microsurg.* 1998; 14(6): 423-437.