IranJPP
Iranian Journal of
Physiology and Pharmacology

مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران

سال ۱۴۰۱، دوره ٦، پیاپی ١٦، صفحه ۲۰۰-۱۸٤

مقاله پژوهشی

پیوند سلول‌های بنیادی جنینی موش سوری استرس اکسیداتیو و التهاب را در مدل حیوانی سکته مغزی کاهش می دهد

محمود رمدان[۱]، محمدرضا بیگدلی[۱*]، حسین شاهسوارانی[۲*]، سلما احمدلو[۳]

۱. گروه علوم جانوری، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
۲. گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی، دانشکده علوم و فناوری زیستی ، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
۳. گروه واکسیناسیون، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

دریافت: ۱۱ ابان ۱۴۰۱ پذیرش: ۲۵ آبان ۱۴۰۱

چکیده

زمینه و هدف: سکته مغزی دومین عامل مرگ و میر و ناتوانی جسمی در جهان می‌باشد. سلول‌درمانی به‌دلیل توانایی در ترمیم و جایگزینی نورون‌های آسیب‌دیده می‌تواند به‌عنوان گزینه مناسبی در نظر گرفته شود. سلول‌های بنیادی جنینی موش (mESCs) به‌دلیل آزادسازی فاکتورهای رشد و نوروتروفیک به عنوان کاندید بالقوه برای تحقیق حاضر در نظر گرفته شد.

روش‌ها: موش‌ها به سه گروه اصلی شاهد، کنترل و گیرنده پیوند سلول‌های بنیادی جنینی موش (mESCs) تقسیم‌بندی شدند. درگروه mESCs، القای ایسکمی مغزی به روش انسداد شریان مغزی میانی (MCAO) ، چهار روز پس از تزریق نیم میلیون سلول به استریاتوم مغز موش به روش جراحی استریوتاکسی صورت گرفت. موش‌ها به زیرگروه‌هایی جهت بررسی نواقص نورولوژیک، حجم انفارکتوس، میزان استحکام سد خونی-مغزی، ادم، بررسی فعالیت آنزیم سوپر اکسید دسموتاز (SOD) و بیان ژن‌های گیرنده یونوتروپیک گلوتامات *GRIN1* و نیتریک اکسید سنتاز *NOS1* تقسیم‌بندی شدند.

یافته‌ها: در گروه mESCs، کاهش معناداری در نواقص نورولوژیک، حجم انفارکتوس، آسیب سد خونی-مغزی و ادم نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید. همچنین بیان ژن‌های *GRIN1* و *NOS1* کاهش معناداری را در گروه mESCs نسبت به گروه کنترل نشان داد. همچنین افزایش معنادار بیان آنزیم SOD در گروه mESCs نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان داده است که پیوند mESCs موجب کاهش آسیب‌های ایسکمی گردید که احتمالا بخشی از این اثربه‌واسطه کاهش بیان ژن‌هایدمرتبط با التهاب و تحریک‌پذیری نورونی و افزایش آنزیم آنتی‌اکسیدانی است.

واژه‌های کلیدی: ادم، انفارکتوس، سد خونی-مغزی، سلول‌های بنیادی جنینی، نقایص نورولوژیک

مقدمه

سکته مغزی سالانه جان عده زیادی از مردم کشورهای مختلف را می‌گیرد به‌طوری‌که در هر سال از هر ۵۵ میلیون مرگ، ۱۰ درصد مربوط به سکته مغزی است [۱]. نکته قابل توجه این است که ایسکمی مغزی با انواع مختلف اختلالات از جمله بیماران مبتلا به کم خونی داسی شکل، آنوریسم و سابقه حمله قلبی در ارتباط مستقیم است. براین‌اساس، استفاده از راهکارهایی برای پیشگیری یا به حداقل رساندن عوارض ناشی از سکته مغزی ایسکمیک، یک رویکرد امیدوارکننده در این بیماران است. یکی از جدی‌ترین مداخلاتی که می‌تواند موثر باشد، القای تحمل ایسکمیک است [۲].

خونرسانی مجدد پس از سکته مغزی ایسکمیک باعث تولید بیش از حد گونه های فعال اکسیژن میتوکندری (ROS)[1] در

[1] Reactive oxygen species

* نویسندگان مسئول مکاتبات: bigdelimohammadreza@yahoo.com (ORCID: 0000-0003-4331-1047)
hosein.shahsavarani@gmail.com (ORCID: 0000-0002-8123-0857)

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-13]

سلول‌های مغز می‌شود که منجر به آسیب سلولی می‌شود [۳]. علاوه‌برآن، فعال‌شدن نیتریک اکسید سنتاز (NOS)[۲] در طی ایسکمی منجر به افزایش نیتریک اکسید می‌شود. نیتریک اکسید تولیدشده با سوپراکسید ترکیب شده و اکسیدان قوی تحت عنوان پراکسی نیتریت ساخته می‌شود که آسیب‌های بافتی را تشدید می‌کند [۴]. همچنین نقش گیرنده‌های یونوتروپیک گلوتامات GRIN[۳] در مرگ سلولی ناشی از ایسکمی نیز به اثبات رسیده است [۵]. درحالی‌که اتصال گلوتامات برای فعالیت‌های معمول و فیزیولوژیکی بدن از جمله پلاستیسیته‌ی نورون‌ها لازم می‌باشد، فعالیت بیش از حد و طولانی مدت آن منجر به مرگ نورون‌ها می‌شود. اتصال گلوتامات به گیرنده‌های NMDA[۴] و AMPA[۵] باعث افزایش جریان کلسیمی به داخل سلول می‌شود. غلظت بالای کلسیم سلولی منجر به آغاز فعالیت فسفولیپازها و پروتئازها شده که در نتیجه غشای سلولی و پروتئین‌های ضروری حفظ کننده‌ی ساختار سلول را تجزیه می‌کنند [۶].

یکی از جدیدترین مداخله‌ها در کاهش آسیب سکته مغزی، سلول درمانی است. این نوع درمان جهت نجات سلول‌های ناحیه پنامبرا[۶] (بافت اطراف کانون[۷] سکته است که سلول‌های مغزی زنده و غیرفعال هستند که در برخی موارد دچار مرگ سلولی آپوپتوز می‌شوند، و درصورت خون‌رسانی مغزی مجدد، ظرفیت برگشت‌پذیری دارد) و کاهش اثرات ناشی از تخریب بافت مغز می‌باشد [۷]. در سال۱۹۸۸، نتایج اولین مطالعات در زمینه درمان سکته مغزی به وسیله سلول‌های بنیادی منتشر گردید. این مطالعات و مطالعات بعدی نشان دادند که پیوند سلول‌های بنیادی اثرات مثبتی بر روند بهبود بیماری‌های نورودژنراتیو مانند آلزایمر، سندروم ALS[۸]، هانتینگتون و همچنین سکته مغزی داشته است [۸]. سلول‌های بنیادی جنینی از بلاستوسیست اولیه مشتق می‌شوند و خاصیت پرتوانی خود را هم داخل بدن و هم در محیط آزمایشگاهی حفظ می‌کنند. این سلول‌ها فعالیت تلومرازی بالایی دارند؛ به‌طوری‌که طول تلومر خود را پس از کشت طولانی مدت در محیط آزمایشگاهی هم حفظ می‌کنند. از آن‌ها به‌عنوان منبع نامحدود سلولی برای جایگزینی در تعدادی از آسیب‌های نورونی مرتبط با پیری مانند پارکینسون و بیماری آلزایمر و نیز دیگر اختلالات نورونی مانند آسیب‌های نخاع استفاده می‌کنند. همچنین این سلول‌ها می‌توانند فرآیندهای پیری سلولی را به تعویق بیاندازند؛ اما این توانایی با تبدیل به سلول‌های سوماتیک کاملا متمایز از بین می‌رود. در این راستا، مطالعات مختلف تأثیر غیرقابل انکار mESCs[۹] را بر سکته مغزی نشان داد و به‌عنوان منبع اهداکننده در انواع اختلالات عصبی مورد استفاده قرار گرفت. استفاده از mESCs به عنوان سلول‌درمانی، امیدها را برای ترمیم بافت و ترمیم عملکرد سیستم عصبی مرکزی (CNS)[۱۰] پس از آسیب افزایش داده و ترجیح داده است که به نورون‌ها تمایز یابند و بقای سلول‌های عصبی را تقویت کنند [۹].

باتوجه‌به شواهد موجود، تاکنون گزارشی مبنی بر بررسی پیش‌درمانی پیوند سلول‌های mESCs بر آسیب‌های حاصل از سکته مغزی اعلام نگردیده است. ازاین‌رو، این مطالعه طراحی شده است که پیش درمانی پیوند سلول‌های مزبور را بر مهمترین فرآیندهای پاتوفیزیولوژیکی از جمله التهاب، استرس اکسیداتیو و تحریک‌پذیری نورونی مورد مطالعه قرار دهد.

مواد و روش‌ها

حیوانات و شرایط نگهداری

موش‌های صحرایی بالغ نر نژاد ویستار و در محدوده وزنی بین ۲۵۰ الی ۳۵۰ گرم به تعداد ۶۸ عدد از مجتمع تولیدی انسیتیتو پاستور ایران خریداری شده و در شرایط استاندارد (دمای ۲۲ ± ۲ درجه سانتی‌گراد و چرخه ۱۲ ساعت روشنایی/تاریکی با شروع روشنایی در ساعت ۷ صبح) برای آزمایش نگهداری شدند. حیوانات در تمام مدت آزمایش دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. در این تحقیق سعی شده است که از حداقل موش‌های صحرایی استفاده گردد. تمامی مراحل آزمایش نیز بر اساس پروتکل تأیید شده کمیته اخلاق دانشگاه شهید بهشتی (IR.SBU.REC.1400.101) اجرا شد.

گروه‌های آزمایشی

موش‌های صحرایی نر به‌صورت تصادفی به سه گروه اصلی

[2] Nitric oxide synthase
[3] Glutamate ionotropic receptor
[4] *N*-methyl-D-aspartate
[5] α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
[6] Penumbra
[7] Ischemic core
[8] Amyotrophic lateral sclerosis
[9] Mouse embryonic stem cells
[10] Central nervous system

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-13]

(شاهد، کنترل و گیرنده پیوند سلول‌های بنیادی جنینی موش (mESCs) دسته بندی شدند. هر گروه اصلی به‌طور مجزا برای ارزیابی حجم انفارکتوس (۵ عدد موش)، ادم مغزی (۵ عدد موش)، استحکام سد خونی- مغزی (۵ عدد موش)، بررسی فعالیت‌های آنزیم آنتی‌اکسیدانی سوپراکساید دسموتاز (۵ عدد موش) و اندازه‌گیری بیان ژن با تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز کمی (RT-PCR)[11] برای ژن‌های *GRIN1* و *NOS1* (۴ عدد موش) مورد ارزیابی قرار گرفتند. درضمن، نقایص نورولوژیکی تمامی موش‌ها ۲۴ ساعت بعد از جراحی ایسکمی ثبت گردید. در گروه شاهد موش‌ها تنها متحمل استرس جراحی شدند، بدین‌صورت‌که مراحل جراحی استریوتکسی (ایجاد کانول مغزی بدون اینکه سلول در سر آن‌ها تعبیه شود) و ایسکمیک MCAO[12] (بدون اینکه فیلامنتی شریان مغزی میانی آن‌ها را مسدود کند) در این موش ها اعمال شد. موش‌های گروه کنترل بدون انجام پیوند سلولی، تحت عمل جراحی ایسکمیک MCAO (فیلامنت شریان مغزی میانی آن‌ها را مسدود می‌کند) قرار گرفتند. گروه گیرنده پیوند سلول‌های بنیادی جنینی موش (mESCs)، سلول‌های mESCs را چهار روز پیش از جراحی ایسکمی مغزی دریافت کردند. گروهی باعنوان گروه دریافت‌کننده محیط کشت سلول هم در مطالعات طراحی شده است که محیط کشت سلول‌های mESCs به حیوانات تزریق شده است.

آماده کردن سلول‌های بنیادی جنینی موش mESCs

برای این مطالعه، mESCs (C57BL/6-NCBI Code: ES1) از بانک سلول ملی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. ابتدا سلول‌های mESCs پس از رسیدن به تراکم مناسب به مدت ۵ دقیقه با محلول Hoechst (Sigma Aldrich, USA) انکوبه شدند و سپس با محلول تریپسین جدا شده و پس از سانتریفیوژ و حذف محیط رویی، سلول‌ها با رنگ تریپان بلو[13] شمارش شده و تعداد نیم میلیون سلول برای تزریق آماده شد.

جراحی استریوتاکسی

در این تحقیق برای تزریق سلول‌ها درون استریاتوم راست مغز موش صحرایی، ملزم به استفاده از جراحی استریوتکسی بودیم. پس از بیهوشی موش‌های صحرایی به وسیله تزریق کتامین (۸۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) به‌صورت درون صفاقی، سر حیوان در دستگاه استریوتاکسی (Stoelting, USA) قرار گرفته و موی سر آن تراشیده شد و سر آن به وسیله دستگاه استریوتاکسی ثابت گردید تا امکان اعمال جراحی بر روی آن وجود داشته باشد. سپس ناحیه‌ی سر، ضد عفونی شده و با تیغ بیستوری یک برش طولی روی پوست سر ایجاد شد. به‌دنبال‌آن بافت‌های زیر جلدی کنار زده شده تا استخوان جمجمه در معرض دید قرار گیرد. سپس با استفاده از مختصات استریاتوم (ناحیه عمده آسیب [۱۰]) راست مغز به‌دست‌آمده از اطلس پاکسینوس، مکان مورد نظر علامت‌گذاری شد (از برگما ۰/۹۶ میلی‌متر به طرف پوزه موش، جانبی ۳ میلی‌متر، و عمق ۵ میلی‌متر از سطح جمجمه). سلول‌ها طبق مختصات فوق در استریاتوم سمت راست تزریق شدند. برای تزریق سلول‌های mESCs داخل مغز ۱۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی نیم میلیون سلول بوسیله سرنگ همیلتون در استریاتوم راست مغز رت به مدت نیم ساعت تزریق شدند. پس از آن محل تزریق بخیه شد و حیوانات پس از ریکاوری به اتاق حیوانات منتقل شدند.

روش ایجاد مدل سکته مغزی MCAO

ابتدا بیهوشی حیوان به وسیله تزریق کتامین (۸۰ میلیگرم/کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلیگرم/کیلوگرم) به‌صورت درون‌صفاقی انجام گرفت. یک نخ بخیه نایلونی ۰-۳ به طول ۵ سانتی‌متر که نوک آن با شعله از قبل گرد شده بود و در محل ۲ سانتی‌متر، با استفاده از رنگ علامت‌گذاری شده بود از محل شکاف ایجاد شده بر روی کاروتید مشترک عبور داده شد و با استفاده از پنس، نخ به سمت جلو حرکت داده شد تاجایی‌که مقاومت در برابر عبور نخ ایجاد گردد. محل مقاومت برای ورود فیلامنت، در واقع همان محل جداشدن شاخه شریان مغزی- میانی (MCA) از حلقه ویلیس می‌باشد. نخ به مدت ۶۰ دقیقه شریان را مسدود کرد و بعد از ۶۰ دقیقه، نخ آهسته به سمت عقب کشیده شده و خارج گردید و محل ورود نخ، با استفاده از یک نخ که از قبل در قسمت بالاتر ورود نخ نایلون به داخل رگ قرار گرفته بود، مسدود شد. پس از خروج نخ، جریان خون نیمکره راست از طریق حلقه ویلیس مجدداً برقرار گردید [۱۱].

[11] Reverse transcription polymerase chain reaction
[12] Middle cerebral artery occlusion
[13] Trypan blue

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-13]

بررسی نواقص نورولوژیک

امتیاز دهی نواقص نورولوژیک ۲۴ ساعت پس از جراحی MCAO توسط ناظرانی که نسبت به جزئیات گروه‌بندی حیوانات نابینا بودند انجام شد، امتیاز نواقص نورولوژیک با مراجعه به مقیاس‌های درجه‌بندی گزارش شده توسط چن [14] و همکاران [۱۲] انجام شد (۰: طبیعی؛ ۶-۱: آسیب جزئی؛ ۱۲-۷: آسیب متوسط؛ ۱۸-۱۳: آسیب شدید؛ ۱۸: از دست دادن کامل عملکرد عصبی). نحوه محاسبه هر کدام از پارامترها طبق فرمول‌های زیر محاسبه شد.

بلند کردن حیوان از ناحیه دم (مجموعاً ۳ امتیاز) : * جمع‌کردن اندام قدامی (۱)، * جمع‌کردن اندام خلفی (۱)، * چرخش سر بیش از ۱۰ درجه نسبت به محور عمودی (۱). عملکرد حرکتی(حداکثر ۳ امتیاز) : *راه‌رفتن طبیعی (۰)، * عدم‌توانایی در راه‌رفتن مستقیم (۱)، * حرکت دورانی در یک جهت (۲)، * افتادن به یک سمت (۳). عملکرد حسی(حداکثر ۲ امتیاز) : * عدم‌پاسخ به تست بینایی و لامسه (۱)، * عدم‌پاسخ به تست تعیین وضعیت (حس عمقی با فشاردادن پنجه پا به لبه میز) (۱). عملکرد تعادلی(حداکثر ۶ امتیاز) : * حفظ تعادل با وضعیت ثابت (۰)، * چنگ‌زدن به کنار میله (۱)، * بغل‌کردن میله و افتادن یک اندام (۲)، * بغل‌کردن میله و افتادن دو اندام از میله و یا چرخش دور میله بیش از ۶۰ ثانیه (۳)، * افتادن از میله با وجود تلاش در حفظ تعادل (بیش از ۴۰ ثانیه) (۴)، * افتادن از میله با وجود تلاش در حفظ تعادل (بیش از ۲۰ ثانیه) (۵)، * افتادن از میله بدون هیچ تلاشی برای حفظ تعادل (کمتر از ۲۰ ثانیه) (۶). عملکرد رفلکسی و حرکات غیرطبیعی(مجموعاً ۴ امتیاز) : * عدم رفلکس لاله گوش (تکان‌دادن سر هنگام لمس مجرای شنوایی) (۱)، * عدم رفلکس قرنیه (چشمک زدن هنگام لمس قرنیه با نخ) (۱)، * عدم وجود رفلکس جهیدن (پاسخ حرکتی و ترسیدن در پی ایجاد صدای کوتاه و ناگهانی) (۱)، * تشنج[15]، میوکلونوس[16] و میودیستونی[17] (۱).

ارزیابی حجم انفارکتوس

بیست و چهار ساعت بعد از خون‌رسانی مجدد، به دنبال بیهوشی عمیق مغز موش‌های صحرایی خارج شده و به مدت ۱۰ دقیقه در داخل سرم فیزیولوژی سرد در دمای ۴ درجه سانتیگراد در داخل یخچال نگه داشته شد. سپس مغز از یخچال خارج شده و داخل ماتریکس مغزی قرار داده شد. برش‌گیری از مغز در مقطع کرونال، از سمت فرونتال به تمپورال با ضخامت دو میلی متر انجام گرفت. برش‌ها به ترتیب از سمت فرونتال به تمپورال در داخل پتری دیش قرار داده شد. محلول ۲٪ ۲،۳،۵ تری فنیل تترازولین کلراید (TTC)[18] بر روی برش‌ها ریخته و برش‌ها به مدت ۱۵ دقیقه بر روی بن ماری با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد برای رنگ‌آمیزی انکوبه شدند. سپس عکس‌برداری با یک دوربین دیجیتال نیکون انجام گرفت. در نهایت مساحت ناحیه ایسکمی هر برش توسط برنامه Image j(نسخه ۱/۵۰) مورد سنجش قرار گفت. به این روش حجم کلی آسیب مغزی محاسبه گردید. آسیب نواحی مغزی کورتکس، کورتکس پری فرم-آمیگدال و استریاتوم نیز به‌صورت جداگانه اندازه‌گیری و طبق فرمول زیر محاسبه شد. در نهایت حجم سکته هر قسمت به صورت جداگانه آنالیز گردید.

حجم تصحیح شده ناحیه آسیب‌دیده = حجم نیمکره چپ – (حجم نیمکره راست – حجم ناحیه آسیب‌دیده)

روش سنجش محتوی آب مغزی

یکی از روش‌های متداول برای ارزیابی میزان ادم مغزی، اندازه‌گیری وزن تر و خشک نمونه‌های مغزی است. پس از خارج‌کردن مغز پیاز بویایی، مخچه و بصل‌النخاع از مغز جدا گردید. سپس با استفاده از تیغ، نیمکره راست و چپ از روی شیار پاریتال از هم جدا گردید. نواحی مغزی کورتکس، کورتکس پری فرم- آمیگدال و استریاتوم نیمکره راست از هم جدا گردید. با استفاده از ترازوی دیجیتال توزین شدند و وزن مغز تر (WW)[19] هرکدام یادداشت گردید. سپس بافت‌ها در داخل انکوباتور با دمای ۱۲۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد تا مغز خشک شود. بعد از ۲۴ ساعت، نواحی مختلف مجدداً توزین شدند و وزن خشک (DW)[20] یادداشت شد. در نهایت، محتوی آب مغز بر اساس فرمول ([(WW-DW)/WW]×100) محاسبه شد.

[14] Chen
[15] Seizures
[16] Myoclonus
[17] Myodystony
[18] Triphenyltetrazolium
[19] Wet weight
[20] Dry weight

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-13]

سنجش میزان نفوذپذیری سد خونی-مغزی

استحکام سد خونی- مغزی با استفاده از اندازه‌گیری میزان خروج اوانس بلو (EB)[21] ارزیابی شد. برای سنجش نفوذپذیری سد خونی-مغزی نیم ساعت بعد از القاء ایسکمی، محلول آبی اوانس بلو ۲٪ به میزان ۰/۴ میلی‌لیتر به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن، از طریق ورید دم تزریق شد. ۲۴ ساعت بعد از خون‌رسانی مجدد، قفسه سینه حیوان بیهوش شده باز شد. روش ترانس کاردیال انجام شد. سپس مغز حیوان خارج گردید. نیمکره‌های مغز از هم جدا شده و نواحی مغزی کورتکس، کورتکس پری فرم- آمیگدال و استریاتوم نیمکره راست از هم جدا گردید. هر کدام جداگانه وزن گردید و به داخل یک تیوپ منتقل شد. ابتدا وزن هر ناحیه در ۴ ضرب شده و نتایج به صورت سی‌سی از محلول بافر فسفات (PBS)[22]، با pH ۷/۴ به هر لوله اضافه شد و با استفاده از همزن به مدت ۱۰ دقیقه هم زده شد تا بافت یکنواخت شد. در مرحله بعد، وزن نواحی مغز ضرب در ۴ به صورت سی‌سی از اسی تری‌کلرواستیک اسید ۶۰٪ جهت رسوب پروتئین‌ها به هر میکروتیوپ اضافه شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه با همزن هم زده شد. سپس میکروتیوپ‌ها به‌مدت ۲ دقیقه ورتکس گردید و ۳۰ دقیقه در یخچال و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در مرحله بعد نمونه‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس میزان ۵۰ سی‌سی از هر تیوپ حاوی ناحیه مغزی به داخل بلات منتقل و بلات داخل دستگاه الایزا گذاشته شد. سپس جذب نوری محلول مغز در طول موج ۶۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. با منحنی غلظت استاندارد مقایسه و غلظت ماده اوانس بلو به ازای هر گرم بافت محاسبه گردید.

بررسی میزان فعالیت آنزیم سوپراکساید دسموتاز SOD[23]

نیمکره های مغز از هم جدا شده و نواحی مغزی کورتکس، کورتکس پری فرم-آمیگدال و استریاتوم نیمکره راست از هم جدا گردید. هر کدام جداگانه وزن گردید و به داخل یک تیوپ منتقل شد. فعالیت سوپراکساید دسموتاز SOD با استفاده از کیت تشخیصی SOD (Cat.no. NS-15032) (نوند سلامت، ارومیه، ایران) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده تعیین شد.

[21] Evans Blue
[22] Phosphate-buffered saline
[23] Superoxide dismutase

بررسی بیان ژن‌ها *GRIN1* و *NOS1*

نیمکره های مغز از هم جدا شده و نواحی مغزی کورتکس، کورتکس پری فرم- آمیگدال و استریاتوم نیمکره راست از هم روی یخ جدا گردید. RNA توتال طبق دستورالعمل شرکت سازنده (پارس طوس، تهران، ایران، Cat.A101231) از بافت‌های مغز استخراج شد و سپس با کیت سنتز cDNA (پارس طوس، cDNA EasyTM، Cat.no.A101161) به cDNA تبدیل شد. واکنش PCR[24] با استفاده از کیت (2×) SYBR® Green Master Mix (پارس طوس، تهران، ایران، Cat.A101022) به صورت دو تکراری از طریق دستگاه Step One plus, Applied Biosystems) انجام شد. از ابزار Primer Quest ™ برای طراحی پرایمر استفاده شد (جدول ۱). برای محاسبه نتایج از فرمول ۲ به توان $^{-\Delta\Delta CT}$ و برای نرمال‌سازی داده‌ها از ژن β-اکتین به‌عنوان کنترل خانه‌داری استفاده شد. برای کنترل کیفی محصول واکنش مربوط به نمونه بر روی ژل ۲٪ انتقال داده شد و از نظر وجود یا عدم وجود محصول بررسی شد.

تجزیه و تحلیل آماری

آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار گراف پد (نسخه ۸)[25] انجام گرفت. داده‌های حاصل از نواقص نورولوژیک با استفاده از آزمون ناپارامتری کروسکال والیس[26] و تست تعقیبی دان[27] مورد تجزیه و آنالیز قرار گرفت. داده‌های حجم آسیب بافتی به وسیله نرم افزار ImageJ (نسخه ۱/۵۰) کمی سازی شد و با استفاده از آزمون مقایسه زوجی[28] مورد آنالیز قرار گرفت. داده‌های حاصل از سد خونی-مغزی، ادم، فعالیت آنزیم سوپراکساید دسموتاز و بیان ژن‌ها با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه[29] و روش مقایسه میانگین توکی[30] مورد آنالیز قرار گرفت. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار از میانگین گزارش شد. معیار معناداری برای هر گروه $p < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

[24] Polymerase chain reaction
[25] GraphPad Prism
[26] Kruskal-Wallis
[27] Dunn
[28] Paired t-test
[29] ANOVA One-way
[30] Tukey

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-13]

جدول ۱- پرایمرهای ژن‌های اصلی *GRIN1*، *NOS1* و ژن کنترل *β-actin*

ژن	توالی		(bp)	ذوب (°C)
GRIN1	پیشرو	5′-CCAGATGTCCACCAGACTAAAG-3′	۱۳۷	۶۲
	معکوس	5′-CCGTACAGATCACCTTCTTCAC-3′		
NOS1	پیشرو	5′-CAACAGCGTCTCCTCCTATT-3′	۲۱۲	
	معکوس	5′-CCCTCATCTTCAGAATCCTCTC-3′		
β-actin	پیشرو	5′-CAACTGGGACGATATGGAGAAG-3′	۲۰۶	
	معکوس	5′-CAGAGGCATACAGGGACAAC-3′		

یافته‌ها

اثر پیوند سلول‌های mESCs بر نواقص نورولوژیک

بررسی نقایص نورولوژیکی ۲۴ ساعت پس از خون رسانی مجدد انجام گرفت. امتیاز حاصل از کل تست‌های رفتاری گروه شاهد نسبت به گروه کنترل نیز کاهش قابل‌توجهی داشت که این نتیجه کاملاً قابل انتظار بود ($p < ۰/۰۰۰۱$) زیرا در گروه شاهد آسیب ایسکمی اتفاق نیفتاد؛ در نتیجه رفتارهایی که حاکی از نقایص نورولوژیکی باشد نیز بروز نخواهد کرد. گروه گیرنده پیوند سلول‌های mESCs، نقایص نورولوژیکی ایجاد شده را در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد که به‌صورت معنادار نبود ($p = ۰/۰۵$). این نتیجه حاصل آنالیز مجموع امتیازهای کل تست‌های رفتاری در گروه‌های آزمایشی است. در گروه دریافت کننده محیط کشت سلول تفاوت معناداری در نتایج حاصل شده در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نشد. بنابراین از واردکردن نتایج آن چشم پوشی شده است. همچنین امتیاز تست‌ها به طور مجزا در گروه‌های آزمایشی مورد آنالیز آماری قرار گرفت (نمودار ۱).

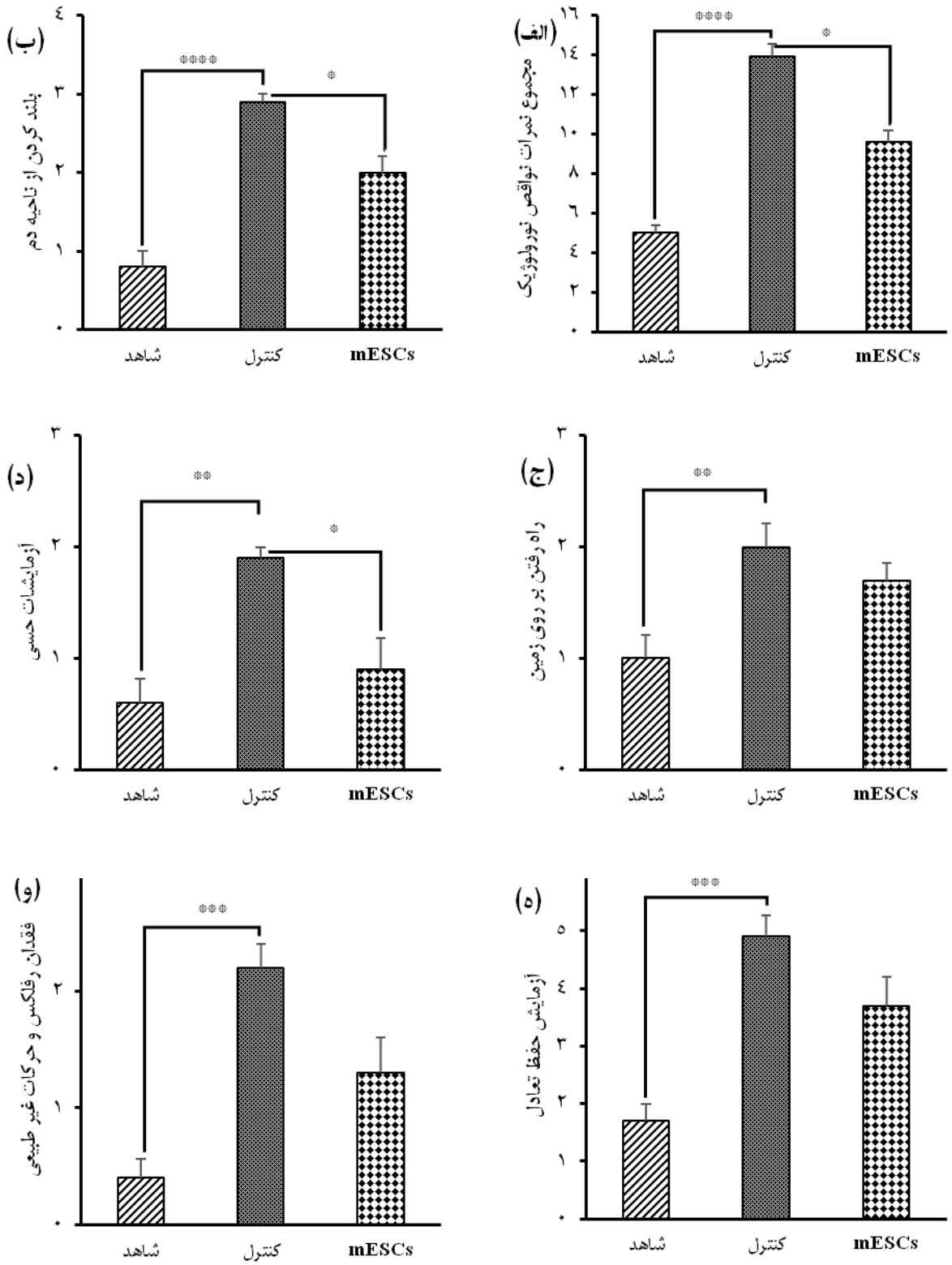
اثر پیوند سلول‌های mESCs بر حجم انفارکتوس

تأثیر پیوند سلول‌ها mESCs بر آسیب بافتی، بیست و چهار ساعت پس از خون‌رسانی مجدد مورد سنجش قرار گرفت. نواحی قرمز مغزی مؤید ناحیه سالم و نواحی سفید مؤید ناحیه آسیب‌دیده و انفارکتوس بود (شکل ۱). حجم سکته به‌صورت کلی و در سه بخش کورتکس، کورتکس پری فرم-آمیگدال و استریاتوم اندازه‌گیری شد. در گروه کنترل، میزان کل حجم آسیب بافتی ۱۲/۲ ± ۲۳۷/۷ میلی‌متر مکعب بود. نتایج نشان می‌دهد که استفاده از سلول‌های mESCs باعث کاهش در حجم کل آسیب مغزی (۲/۷ ± ۱۱۸/۲ میلی‌متر مکعب) به‌صورت معناداری شد ($p < ۰/۰۰۰۶$). علاوه‌برآن گروه گیرنده سلول‌های mESCs ($p = ۰/۰۰۰۶$، ۱۶/۳ ± ۳۱/۶ میلی‌متر مکعب) به‌طور معناداری حجم انفارکتوس را در ناحیه کورتکس مغزی در مقایسه با کورتکس مغزی گروه کنترل (۴/۵ ± ۹۲/۴ میلی‌متر مکعب) کاهش داد. کاهش معناداری نیز در حجم سکته به وسیله سلول‌های mESCs در استریاتوم ($p = ۰/۰۰۸$ ، ۰/۷ ± ۲۰/۹ میلی‌متر مکعب) در مقایسه با ناحیه استریاتوم گروه کنترل (۵/۱ ± ۴۳/۲ میلی‌متر مکعب) دیده شد. در منطقه کورتکس پری فرم-آمیگدال نیز گروه گیرنده سلول‌های mESCs حجم سکته ($p = ۰/۰۰۰۴$ ، ۰/۶ ± ۱۲/۸ میلی‌متر مکعب) در مقایسه با ناحیه کورتکس پری فرم-آمیگدال گروه کنترل (۳/۱ ± ۳۵/۹ میلی‌متر مکعب) را کاهش داد. در گروه دریافت‌کننده محیط کشت سلول تفاوت معناداری در نتایج حاصل شده در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نشد. بنابراین از وارد کردن نتایج آن چشم پوشی شده است.

اثر پیوند سلول‌های mESCs بر ادم مغزی

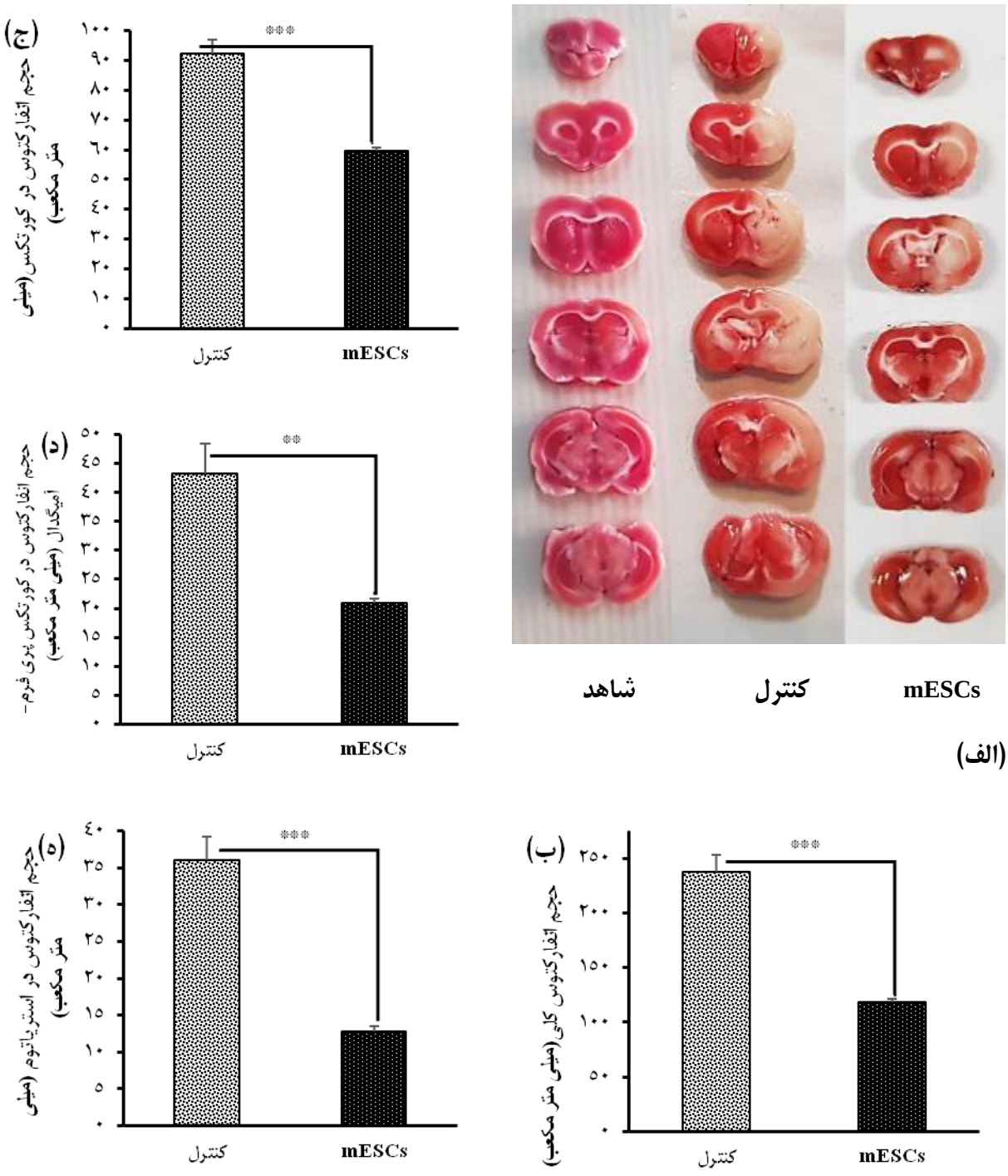
در بررسی محتوای آب مغزی ۲۴ ساعت پس از القاء ایسکمی مغزی، اندازه‌گیری وزن نواحی کورتکس، کورتکس پری فرم-آمیگدال و استریاتوم راست به‌صورت مجزا طبق فرمول ذکرشده در بخش مواد و روش‌ها انجام گرفت. با توجه به نمودار ۲ مقایسه بین ناحیه کورتکس گروه‌های آزمایشی نشان داد که گروه گیرنده پیوند سلول‌های mESCs ($p = ۰/۰۰۰۳$، ۰/۸ ± ۷۹٪) موجب کاهش معناداری در ادم مغزی نسبت به گروه کنترل (۰/۴ ± ۸۳/۶) گردید. در

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-13]



نمودار ۱– اثر پیوند سلول‌های mESCs بر نواقص نورولوژیک در گروه‌های شاهد، کنترل و mESCs ۲۴ ساعت پس از جراحی MCAO. (الف): مجموع نمرات، (ب): بلند کردن از ناحیه دم، (ج): راه رفتن، (د): آزمایشات حسی، (ه): آزمایش حفظ تعادل، (و): رفلکس. هر ستون نشانگر میانگین ± انحـراف معیـار از میـانگین است. ****: $p < ۰/۰۰۰۱$، ***: $p < ۰/۰۰۱$، **: $p < ۰/۰۱$، *: $p <۰/۰۵$.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-13]



شکل ۱- اثر پیوند سلول‌های mESCs بر حجم انفارکتوس ۲۴ ساعت پس از جراحی MCAO. (الف): رنگ آمیزی اسلایدهای بافت مغز در گروه های شاهد، کنترل و mESCs با مشخصه قرمزی در نواحی سالم و سفیدی در نواحی انفارکتوس، (ب): حجم انفارکتوس کلی، (ج): حجم انفارکتوس در کورتکس، (د): حجم انفارکتوس در کورتکس پری فرم-آمیگدال، (ه): حجم انفارکتوس در استریاتوم. هر ستون نشانگر میانگین ± انحراف معیار از میانگین است.***: $p < ۰/۰۰۱$، **: $p <۰/۰۱$.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-13]

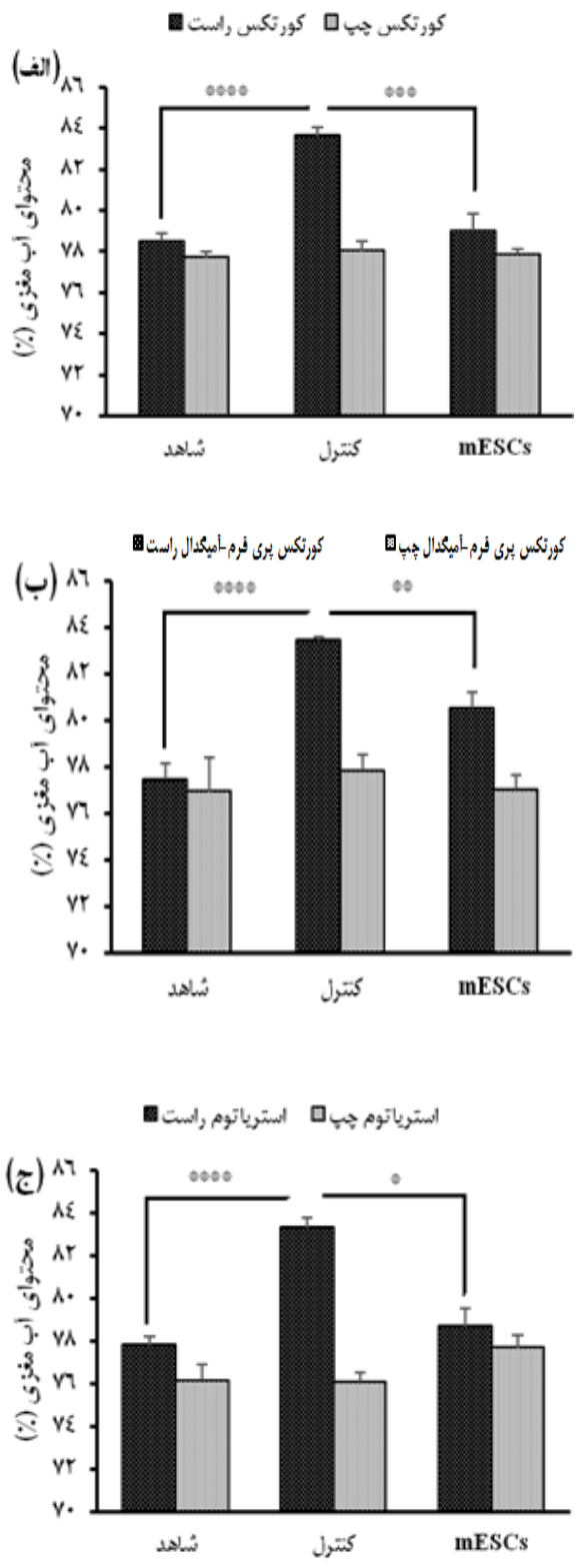
مقایسه آماری بین ناحیه کورتکس پری فرم- آمیگدال گروه‌های آزمایشی، گروه mESCs ($p = ۰/۰۰۴$ ، ۰/۶ ± ۸۰/۵) موجب کاهش معناداری در ادم مغزی نسبت به گروه کنترل (۰/۱ ± ۸۳/۴٪) گردید. همچنین گروه mESCs (۰/۸ ± ۷۸/۶) محتوای آب مغزی را در ناحیه استریاتوم در مقایسه با ناحیه استریاتوم گروه کنترل (۰/۴ ± ۸۳/۲) به‌صورت معناداری کاهش داد ($p = ۰/۰۳$) (نمودار ۲). در گروه دریافت‌کننده محیط کشت سلول تفاوت معناداری در نتایج حاصل شده در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نشد. بنابراین از وارد کردن نتایج آن چشم‌پوشی شده است.

اثر پیوند سلول‌های mESCs بر استحکام سد خونی-مغزی

مشاهده میزان بالایی از ماده آبی اوانس بلو در بافت مغزی ۲۴ ساعت بعد از القاء ایسکمی مغزی، مؤید شکسته‌شدن سد خونی-مغزی و خروج این ماده رنگی از رگ‌های مغزی است. در مقایسه آماری بین ناحیه کورتکس پری فرم-آمیگدال گروه‌های آزمایشی، گروه mESCs ($p = ۰/۰۳$، ۰/۰۰۶ ± ۰/۲) موجب کاهش معناداری در غلظت اوانس بلو نسبت به گروه کنترل (۰/۰۴ ± ۰/۳) گردید. همچنین گروه mESCs (۰/۰۳ ± ۰/۲) غلظت ماده آبی اوانس بلو را در ناحیه استریاتوم در مقایسه با ناحیه استریاتوم گروه کنترل (۰/۰۳ ± ۰/۵) به صورت معناداری کاهش داد ($p = ۰/۰۱$) (شکل ۲). در گروه دریافت‌کننده محیط کشت سلول تفاوت معناداری در نتایج حاصل شده در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نشد. بنابراین از وارد کردن نتایج آن چشم پوشی شده است.

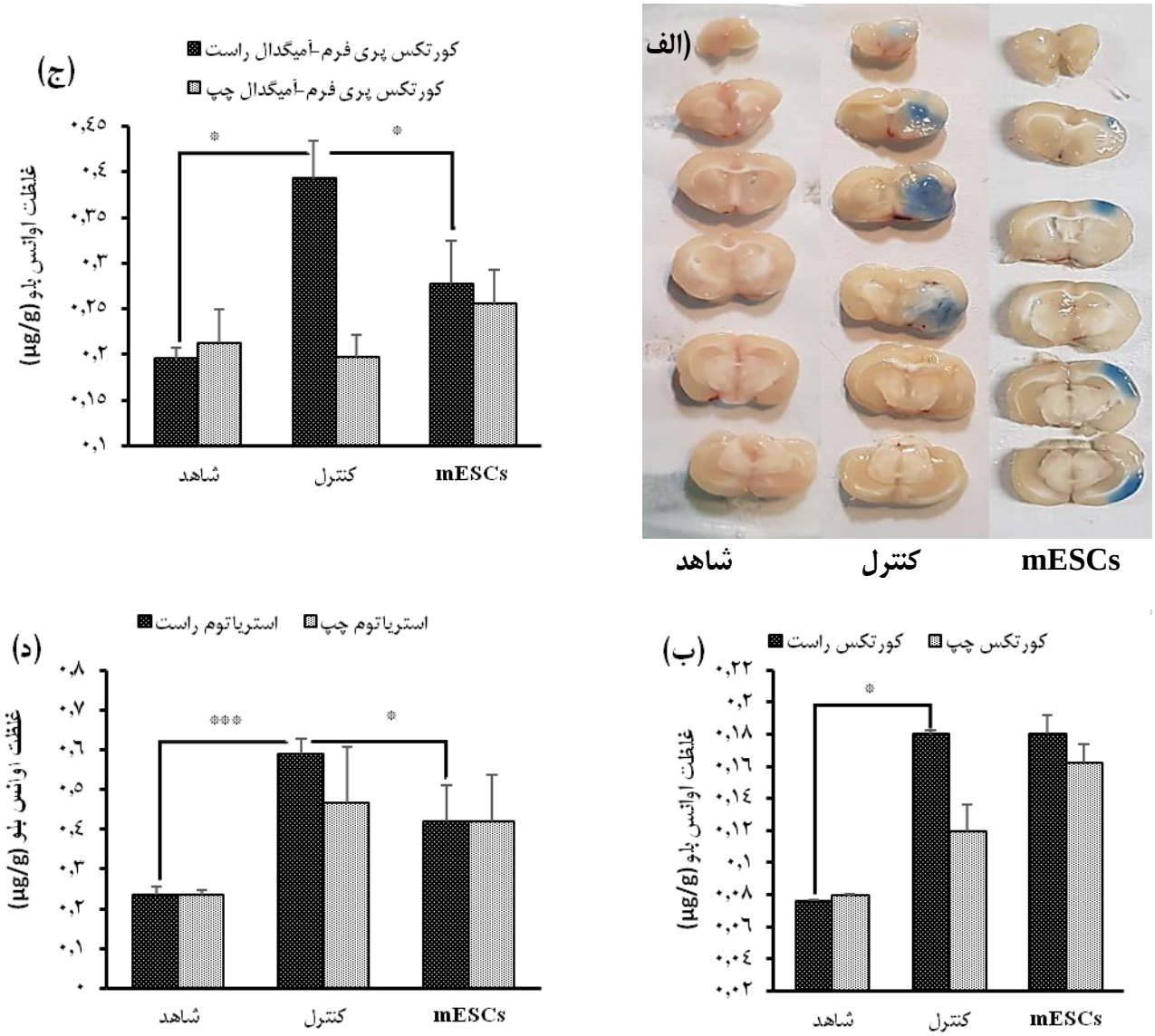
اثر پیوند سلول‌های mESCs بر فعالیت آنزیم سوپراکساید دسموتاز SOD

نتایج مقایسه بین ناحیه کورتکس گروه‌های آزمایشی نشان داد که گروه پیوند سلول‌های mESCs ($p = ۰/۰۰۰۱$ ، ۰/۳ ± ۵۳۸/۵) موجب افزایش معناداری در فعالیت آنزیمی آنزیم SOD نسبت به گروه کنترل (۵/۲ ± ۳۶۳/۳) گردید. در مقایسه آماری بین ناحیه کورتکس پری فرم-آمیگدال گروه‌های آزمایشی، گروه پیوند سلول‌های mESCs ($p = ۰/۰۰۰۱$، ۲/۴ ± ۴۹۵/۹) موجب افزایش معناداری در فعالیت آنزیمی آنزیم SOD نسبت به گروه کنترل



نمودار ۲- اثر پیوند سلول‌های mESCs بر ادم مغزی ۲۴ ساعت پس از جراحیMCAO. (الف): محتوای آب مغزی در کورتکس، (ب): محتوای آب مغزی در کورتکس پری فرم-آمیگدال، (ج): محتوای آب مغزی در استریاتوم. هر ستون نشانگر میانگین ± انحراف معیار از میانگین است. ****:$p < ۰/۰۰۰۱$، ***: $p < ۰/۰۰۱$، **: $p < ۰/۰۱$، *: $p < ۰/۰۵$

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-13]



شکل ۲- اثر پیوند سلول های mESCs بر استحکام سد خونی-مغزی ۲۴ ساعت پس از جراحیMCAO. (الف): مناطق نفوذ ماده آبی اوانس بلو به داخل مغز، (ب): غلظت اوانس بلو در کورتکس، (ج): غلظت اوانس بلو در کورتکس پری فرم-آمیگدال، (د): غلظت اوانس بلو در استریاتوم. هر ستون نشانگر میانگین ± انحراف معیار از میانگین است. ****:$p < ۰/۰۰۰۱$، ***:$p < ۰/۰۰۱$، **:$p < ۰/۰۱$، *:$p <۰/۰۵$.

(۲/۲ ± ۳۲۸) گردید. همچنین گروه پیوند سلول‌های mESCs (۰/۷ ± ۵۰۴/۳) فعالیت آنزیمی آنزیم SOD را در ناحیه استریاتوم در مقایسه با ناحیه استریاتوم گروه کنترل (۱/۹ ± ۳۲۸/۵) به صورت معناداری افزایش داد ($p = ۰/۰۰۰۱$) (نمودار ۳). در گروه دریافت کننده محیط کشت سلول تفاوت معناداری در نتایج حاصل شده در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نشد. بنابراین از وارد کردن نتایج آن چشم‌پوشی شده است.

اثر پیوند سلول‌های mESCs بر بیان ژن‌های *GRIN1* و *NOS1*

اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌های *GRIN1* و *NOS1* نواحی کورتکس، کورتکس پری فرم-آمیگدال و استریاتوم راست به صورت مجزا انجام گرفت که نتایج نشان داد که ایسکمی مغزی به‌طورقابل‌توجهی موجب افزایش میزان بیان ژن‌های *GRIN1* و *NOS1* در نیمکره ایسکمی گردید که نشان از التهاب مغزی در نیمکره‌های ایسکمی به دنبال جراحی MCAO می‌باشد. نتایج مقایسه بین ناحیه کورتکس گروه‌های

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-13]

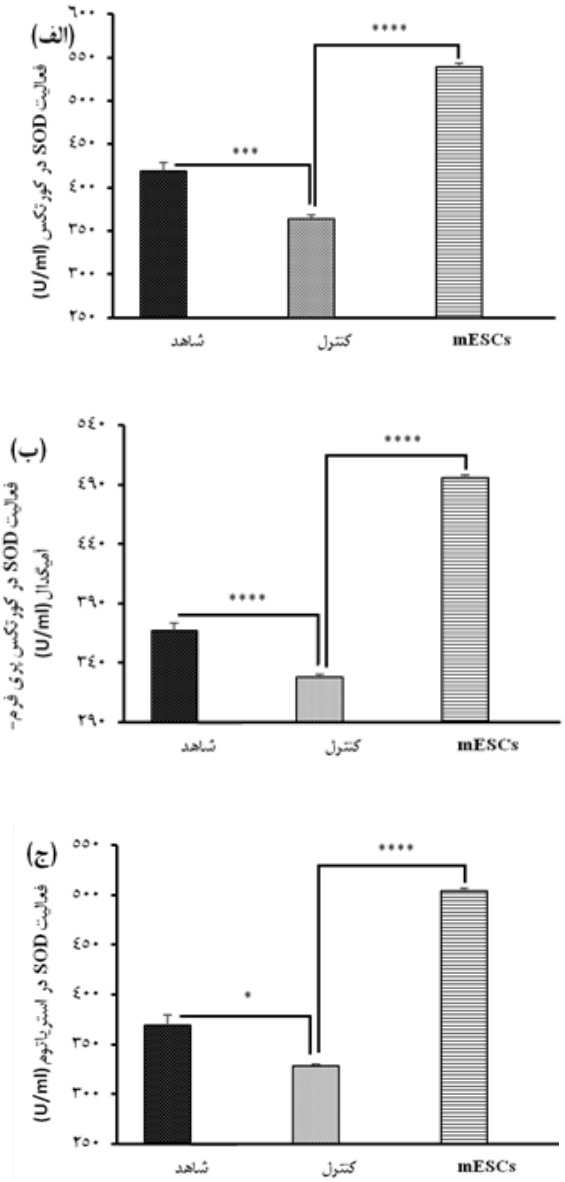
آزمایشی نشان داد که گروه دریافت‌کننده سلول‌های mESCs (۱ ±۰/۲، p = ۰/۰۱) موجب کاهش معناداری در میزان بیان ژن *GRIN1* نسبت به گروه کنترل (۰/۶ ± ۳) گردید. در مقایسه آماری بین ناحیه کورتکس پری فرم-آمیگدال گروه‌های آزمایشی، گروه دریافت کننده سلول‌های mESCs (۰/۶ ± ۰/۰۵، p = ۰/۰۲) موجب کاهش معناداری در میزان بیان ژن *GRIN1* نسبت به گروه کنترل (۰/۶ ± ۲/۲) گردید. همچنین گروه دریافت‌کننده سلول‌های mESCs (p <۰/۰۰۲، ۰/۳ ± ۰/۰۳) میزان بیان ژن *GRIN1* را در ناحیه استریاتوم در مقایسه با ناحیه استریاتوم گروه کنترل (۰/۱ ± ۱/۷) به صورت معناداری کاهش داد.

نتایج مقایسه بین ناحیه کورتکس گروه‌های آزمایشی نشان داد که گروه دریافت‌کننده سلول‌های mESCs (p = ۰/۰۰۷، ۰/۱ ± ۰/۷) موجب کاهش معناداری در میزان بیان ژن *NOS1* نسبت به گروه کنترل (۰/۳ ± ۱/۸) گردید. در مقایسه آماری بین ناحیه کورتکس پری فرم-آمیگدال گروه‌های آزمایشی، گروه دریافت‌کننده سلول‌های mESCs (p =۰/۰۰۳، ۰/۵ ± ۰/۹) موجب کاهش معناداری در میزان بیان ژن *NOS1* نسبت به گروه کنترل (۰/۵ ± ۲/۷) گردید. همچنین گروه دریافت‌کننده سلول‌های mESCs (۰/۰۵± ۰/۹، p = ۰/۰۰۸) میزان بیان ژن *NOS1* را در ناحیه استریاتوم در مقایسه با ناحیه استریاتوم گروه کنترل (۰/۵ ± ۲/۷) به‌صورت معناداری کاهش داد (نمودار ۴). در گروه دریافت‌کننده محیط کشت سلول تفاوت معناداری در نتایج حاصل شده در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نشد. بنابراین از وارد کردن نتایج آن چشم پوشی شده است.

بحث

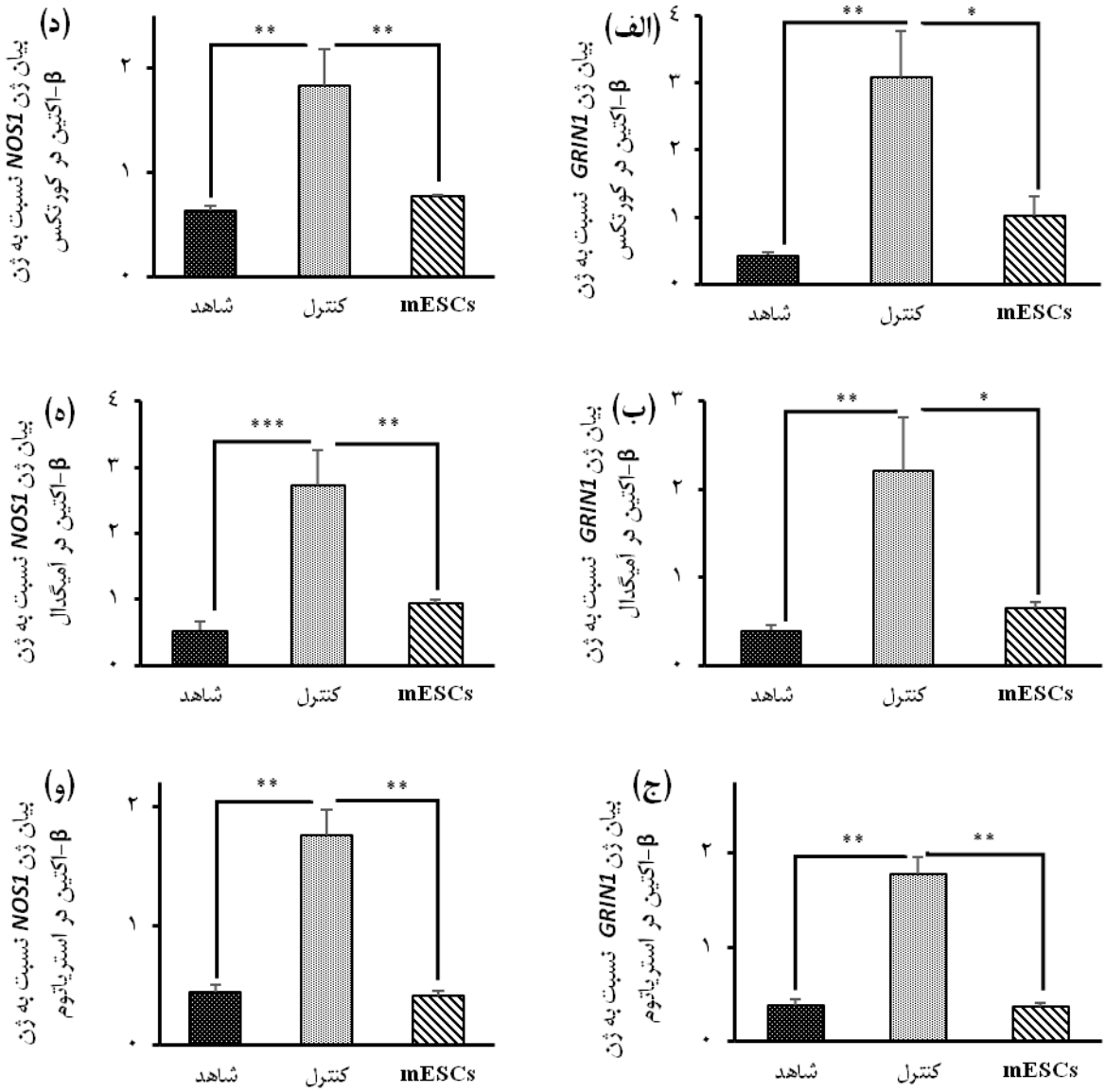
در این مطالعه برای اولین بار اثر پیش درمانی سلول های بنیادی جنینی موش سوری mESCs برای تحمل به سکته مغزی ایسکمیک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که سلول‌های mESCs، موجب کاهش حجم انفارکتوس، ادم مغزی، بهبود فعالیت حرکتی حیوانات و افزایش استحکام سد خونی-مغزی شد. این احتمال وجود دارد که سلول‌های mESCs با افزایش بیان آنزیم آنتی‌اکسیدان SOD و کاهش بیان ژن التهابی GRIN1 به وسیله ترشح فاکتورهای تروفیک توانسته صدمات ناشی را در مغز کاهش دهد.

با این‌که در اکثر مطالعات جهت ترجمه به بالین، تزریق سلول ها و سلول درمانی در زمان های نخستین پس از ایسکمی انجام شده، اما ما در این مطالعه سلول درمانی را به‌صورت پیشگیرانه و قبل از وقوع سکته انجام دادیم. هدف از این نوع مداخله می‌تواند کاربرد پیشگیرانه آن در افراد با ریسک بالا همچون سالمندان، بیماران دارای اختلالات عروقی، مشاغل پرمخاطره، کمخونی سلول داسی‌شکل، آنوریسم، بیماران مبتلا



نمودار ۳- اثر پیوند سلول‌های mESCs بر فعالیت آنزیم سوپراکساید دسموتاز SOD ۲۴ ساعت پس از جراحیMCAO. (الف): فعالیت SOD در کورتکس، (ب): فعالیت SOD در کورتکس پری فرم-آمیگدال، (ج): فعالیت SOD در استریاتوم. هر ستون نشانگر میانگین ± انحراف معیار از میانگین است. ****:۰/۰۰۰۱ >p، ***: ۰/۰۰۱ >p، **: ۰/۰۱ >p، *: ۰/۰۵>p.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-13]



نمودار ٤- اثر پیوند سلول های mESCs بر بیان ژن های *GRIN1* و *NOS1* ۲۴ ساعت پس از جراحیMCAO. (الف): بیان ژن *GRIN1* در کورتکس، (ب): بیان ژن *GRIN1* در کورتکس پری فرم-آمیگدال، (ج): بیان ژن *GRIN1* در استریاتوم، (د): بیان ژن *NOS1* در کورتکس، (ه): بیان ژن *NOS1* در کورتکس پری فرم-آمیگدال، (و): بیان ژن *NOS1* در استریاتوم.هر ستون نشانگر میانگین ± انحراف معیار از میانگین است. ****:$p < ۰/۰۰۰۱$، ***: $p < ۰/۰۰۱$، **: $p < ۰/۰۱$، *: $p <۰/۰۵$.

به سابقه حمله قلبی و موارد مشابه باشد. بنابراین، پیشگیری از ایسکمی و القاء تحمل به ایسکمی محورهای اصلی مطالعات سکته مغزی می‌باشد [۱۳]. هدف ما بررسی اثر سلول‌های mESCs در تحمل به سکته مغزی بوده است. مدت چهار روز به هدف اجازه دادن مدت زمان مناسب برای سلول‌های بنیادی جنینی mESCs تا خودشان پیدا کنند در محیط بافتی جدید و همچنین افزایش مقدار ترشحات فاکتورهای این سلول‌ها که یک عامل خیلی حائز اهمیت در نتایج مثبت استفاده از این سلول‌ها به عنوان دارو بازی می کند [۱۴].

در مدل ایجاد ایسکمی مغزی ازطریق انسداد شریان میانی مغزی، عمده‌ترین مناطق آسیب‌دیده مغزی کورتکس و استریاتوم است. استریاتوم (جسم مخطط) به‌عنوان مرکز هماهنگی برای فعالیت‌های شناختی از جمله برنامه‌ریزی عملکردی و محرکی، انگیزه، تصمیم‌گیری، تقویت و درک پاداش است. یا به عبارت ساده‌تر استریاتوم دخالت در برنامه‌ریزی و کنترل طرح‌های پیچیده حرکات عضلات و شدت

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-13]

حرکات متوالی را برعهده دارد. برای انجام همه این‌ها، استریاتوم ابتدا باید اطلاعات دریافتی از دیگر مناطق مغز را یکپارچه‌سازی کند و سپس برطبق آن پاسخ دهد. اطلاعات ورودی حسی و حرکتی عمدتاً از طریق نورون‌ها به استریاتوم و نئوکورتکس می‌رسند. از روی این اطلاعات می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که بسیاری از نقایص نورولوژیکی که با تست‌های رفتاری سنجیده شد؛ به آسیب در نواحی کورتکس حسی، حرکتی و استریاتوم به دنبال ایسکمی مغزی مرتبط می‌شود[۱۰].

بر طبق مطالعات انجام شده در رابطه با تزریق تیمار درون استریاتوم و کورتکس، ثابت شده است که یک شبکه نورونی و ارتباط عصبی منسجمی بین استریاتوم و کورتکس وجود دارد. بدین‌صورت که در مطالعه انجام شده در سال ۱۹۹۷ ثابت شده است که تزریق آنتاگونیست رسپتور اینترلوکین۱- به استریاتوم موجب کاهش انفارکتوس در استریاتوم و کورتکس شده است و همچنین تزریق این آنتاگونیست به استریاتوم در نیمکره غیر ایسکمیک توانسته است آسیب را در کورتکس نیمکره ایسکمیک نیز کاهش دهد. درحالی‌که به‌طور جالبی، تزریق این آنتاگونیست به کانون اصلی انفارکتوس نتوانسته است بر آسیب‌های ناشی از ایسکمی مغزی تاثیری داشته باشد. تنها مکانیسم احتمالی این بوده است که اینترلوکین۱- یا در محل کورتکس موجب آسیب‌های ایسکمیک نمی‌شود یا این‌که به‌دلیل کانون اصلی بودن ایسکمی در کورتکس، اعم نورون‌ها از بین رفتند و توانایی نجات آنها به واسطه تیمار مذکور وجود ندارد. بنابراین سوالی که مطرح می شود این است که چگونه تزریق استریاتوم توانسته است که آسیب ایسکمی را هم در استریاتوم و هم در کورتکس کاهش دهد؟ در مطالعه اشاره شده، بیان کردند که ۱۳ درصد از نورون‌های کورتکسی که به سمت استریاتوم پیش می‌روند به‌صورت دوطرفه به هر دو نیمکره می‌رسند که نشان‌دهنده وجود یک ارتباط دو طرفه بین کورتکس و استریاتوم نه تنها در یک نیمکره بلکه در نیمکره دیگر هم است که می‌تواند بر حیات یا مرگ نورون‌های طرف مقابل تأثیر بگذارند [۱۵]. در مکانیسم دیگری این طور مطرح شده است که احتمالا تزریق تیمار در استریاتوم ممکن است از طریق انتشار مواد خاصی مانند فاکتورهای رشد یا القاء فعال‌سازی ارتباطات پلی‌سیناپسی بین استریاتوم و کورتکس بر آسیب‌های ناشی از سکته مغزی تاثیر بگذارد. این یافته ها مانند نتایج مطالعه حاضر شواهدی را ارائه می‌دهند که مدارهای استریاتوم به صورت رتروگرید (دسترسی معکوس) یا ارتوگرید (دسترسی مستقیم)، بر فرایندهای پاتولوژیک در کورتکس در ایسکمی تأثیر می‌گذارند [۱۵، ۱۶]. در عین حال در مطالعه دیگری با طراحی مشابه با مطالعه ما نشان دادند که اثرات مهاری یا تحریکی آسیب ایسکمیک از منطقه استریاتوم به کورتکس، به واسطه خروجی های پلی سیناپسی استریاتوم به کورتکس از طریق هیپوتالاموس پیش می‌روند [۱۷]. بنابراین با توجه به مکانیسم‌های احتمالی ذکر شده می‌توان تا حدودی در مطالعه حاضر توجیه کرد که تزریق سلول‌های بنیادی در استریاتوم نه تنها موجب بهبود آسیب‌های ایسکمی در استریاتوم شده است بلکه موجب کاهش آسیب در ناحیه کورتکس نیز شده است.

در طی فاز خونرسانی مجدد تولید رادیکال‌های آزاد نظیر سوپراکسید و هیدروکسیل به‌شدت افزایش می یابد که به‌طور مستقیم به DNA، پروتئین، لیپید و کربوهیدرات‌ها آسیب می‌رساند. علاوه بر آن فعال‌شدن نیتریک اکسید سنتاز (NOS1) در طی ایسکمی منجر به افزایش نیتریک اکسید می شود. نیتریک اکسید تولید شده با سوپراکسید ترکیب شده و اکسیدان قوی تحت عنوان پراکسی نیتریت ساخته می شود که آسیب‌های بافتی را تشدید می کند. رادیکال های آزاد (FR)[31]، گونه های فعال اکسیژن (ROS) و نیتریت (RNS)[32] واکنشگرهای شناخته شده‌ایی در آسیب‌های مغزی می‌باشد. رادیکال‌های آزاد موجب تسهیل تخریب عملکردی غشای داخلی میتوکندری و اکسیدشدن پروتئین‌های دخیل در زنجیره‌ی انتقال الکترون شده و در نتیجه منجر به اختلال در تولید ATP می‌شود. درنتیجه، نفوذپذیری غشای میتوکندری افزایش یافته و باعث ورم میتوکندری و تولید رادیکال‌های آزاد بیشتری می‌شود. با توجه به وفور چربی‌های اشباع نشده در غشای سلول، تولید محصولات پراکسیداسیون اسید چرب به علت وجود مقادیر بالایی از رادیکال‌های آزاد افزایش می یابد. این محصولات روی سلامتی غشای سلولی، مسیرهای سیگنال‌دهی سلول‌ها اثر می‌گذارند [۱۸]. ازطرف‌دیگر، همین رادیکال‌های سلولی در شرایط فیزیولوژیکی نقش به سزایی در شروع سیگنال‌های التهابی سلولی دارا هستند.

[31] Free radical
[32] Reactive nitrogen species

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-13]

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به‌عنوان اولین سد دفاعی در تخریب رادیکال‌های آزاد در بدن عمل می‌کنند. آنزیم SOD دسته ایی از واکنش‌های مربوط به تبدیل سوپراکسید به اکسیژن و هیدروژن پراکسید را کاتالیز می‌کند. آنزیم SOD حاوی کوفاکتورهای یونی فلزی می‌باشد که بسته به ایزوفرم‌های مختلف آنزیم می‌تواند مس، روی و یا منگنز باشد. سه نوع ایزوفرم از آنزیم SOD در مغز انسان وجود دارد. مس/روی (Cu/Zn SOD) یا SOD1 که در سیتوزول و لیزوزوم‌ها به‌طور عمده وجود دارد اما می‌تواند در فضای بین غشایی میتوکندری نیز یافت شود. آنزیم SOD حاوی منگنز یا SOD2 فقط در ماتریکس میتوکندری وجود دارد. آنزیم SOD خارج‌سلولی مغزی یا (ECSOD)[33] یا SOD3 در ماتریکس خارج‌سلولی در غلظت‌های پایین ترشح می‌شود. هر دو ایزوفرم حاوی منگنز و مس/روی نقش بسیار مهمی را در دفاع از سلول در زمان افزایش سوپراکسید در حین ایسکمی بازی می‌کنند. کاهش فعالیت هر یک از این آنزیم ها منجر به افزایش آسیب و افزایش حجم سکته می‌شود [۱۹]. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که پیوند سلول‌های mESCs به‌طور قابل‌توجهی توانست باعث افزایش آنزیم آنتی‌اکسیدان SOD و کاهش بیان ژن *NOS1* شود.

درحالی‌که اتصال گلوتامات برای فعالیت‌های معمول و فیزیولوژیکی بدن از جمله پلاستیسیته نورون‌ها لازم می‌باشد، فعالیت بیش‌ازحد و طولانی‌مدت آن منجر به مرگ نورون‌ها می‌شود. اتصال گلوتامات به گیرنده‌های NMDA باعث افزایش جریان کلسیمی به داخل سلول می‌شود [۲۰]. غلظت بالای کلسیم سلولی منجر به آغاز فعالیت فسفولیپازها و پروتئازها شده که در نتیجه غشای سلولی و پروتئین‌های ضروری حفظ‌کننده ساختار سلول را تجزیه می‌کنند [۶]. نقش گیرنده‌های یونوتروپیک گلوتامات در مرگ سلولی ناشی از ایسکمی نیز به اثبات رسیده است [۵]. همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که پیوند سلول‌های mESCs به‌طور قابل‌توجهی توانست باعث کاهش بیان ژن *GRIN1* شود.

در ضمن، نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که پیوند سلول‌های بنیادی جنینی موش mESCs به‌طور قابل‌توجهی توانست باعث بهبود در نقایص نورولوژیکی شود. همان‌طوری‌که در شکل شماره ۱ اشاره شد امتیازبندی نقایص نورولوژیکی بر اساس تست‌های ارزیابی رفتارهای حسی-حرکتی انجام گرفته شد. نتایج گویای عملکرد مثبت سلول‌های mESCs و اثر نوروپروتکتیو آن‌ها بر نواحی کنترل حسی و حرکتی مغز می باشد. در این راستا مطالعات گذشته نشان دهنده تاثیر غیرقابل‌انکار ترشحات سلول‌های mESCs مانند فاکتور رشد ترانسفورمینگ (TGF)[34]، فاکتور رشد فیبروبلاست (FGF) [35]، فاکتور رشد شبه انسولینی (IGF)[36]، فاکتور رشد عروقی (VEGF)[37] و فاکتور نوروتروفیک مشتق شده از سلول های گلیال (GDNF)[38] بر کاهش امتیازات نقایص نورولوژیک می باشد. تحقیقات در سال ۲۰۰۱ نشان داد که تزریق IGF در دوز مشخصی موجب بهبود نقایص نورولوژیک در مدل جانوری سکته مغزی گردید [۲۱]. در سال ۲۰۰۱ طی مطالعه ای اثر نوروپروتکتیو IGF را بر روی نقایص نورولوژیک در سکته مغزی نیز بررسی کرده و بهبود آن را اعلام نمودند [۲۲].

در این مطالعه همچنین مشاهده گردید که حجم سکته در ناحیه کورتکس،کورتکس پری فرم آمیگدال و استریاتوم، که در واقع محل پیوند سلول‌های mESCs است، نسبت به گروه کنترل کاهش معنادار یافته است. این نشان‌دهنده عملکرد مناسب سلول‌های mESCs با ایجاد شرایط مساعد جهت بقای نورون ها، ممانعت از مرگ سلولی در ناحیه پنامبرا و به دنبال آن کاهش حجم انفارکتوس می باشد. اثرات مشاهده شده در مطالعه حاضر را می‌توان تا حدودی به فاکتورهای مترشحه از سلول‌های بنیادی اعم از فاکتورهای رشد و نوروتروفیک نسبت داد. فاکتورهای رشد اهمیت ویژه‌ای در اعمال اثرات سلول‌های بنیادی دارد. فاکتورهای رشد، امکان رشد سلول‌ها و بقای آن‌ها را فراهم ساخته و از مغز در برابر آسیب‌های حاصل از ایسکمی محافظت می‌کنند [۲۳]. فاکتور رشد ترانسفورمینگ (TGF)، نورون‌ها را در برابر تحریک‌پذیری بیش از حد سلول (اگزایتوتوکسیسیتی) [39] و مرگ سلولی ایمن می‌کند. در سال ۲۰۰۱ نتایج مطالعه‌ای مبنی بر کاهش حجم انفارکتوس به روش پیش‌درمان و پس‌درمان با TGF، منتشر شد. به این صورت که چهار روز پس از ایسکمی، حجم سکته ۵۰٪ کاهش یافته بود [۲۳]. همچنین، مطالعات مختلف تأثیر غیرقابل‌انکار

[33] Extra-cellular SOD

[34] Transforming growth factor
[35] Fibroblast growth factor
[36] insulin-like growth factor
[37] Vascular endothelial growth factor
[38] Glial cell line-derived neurotrophic factor
[39] Excitotoxicity

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-13]

mESCs را بـر سـکته مغـزی نشـان داد و بـه عنـوان منبـع اهداکننده در انواع اختلالات عصبی مورد استفاده قـرار گرفـت. اثرات مثبت mESCs به عنوان سلول‌درمـانی، تـرمیم بافـت و ترمیم عملکرد سیستم عصبی مرکزی (CNS) پـس از آسـیب، به نورون ها تمایز می‌یابند و بقای سلول های عصبی را تقویـت می کنند [۹].

ادم نوعی عارضه بالینی خطرناک در نتیجـه سـکته مغـزی است[۲۴]. در واقع پیرو شکستن سد خونی-مغزی طی ایسکمی، پروتئین‌های پلاسما وارد بافت مغز شده و این افـزایش غلظـت سبب کشیده‌شدن آب به درون بافت به روش اسـمز مـی‌شـود. فشار ایجاد شده در نتیجه تورم، آسیب‌های بسیار جدی به مغـز وارد می کند. در میان فاکتورهـای رشـد تعریـف شـده در ایـن تحقیق که به‌وسیله سلول‌های mESCs ترشح می شود، فاکتور GDNFجزء فاکتورهای شناخته شده در مهار ادم مغزی است. این فاکتور به‌طور غیرمسـتقیم و بـا مهـار مسـیر فعـال‌سـازی کاسپازها و فاکتورهای التهابی، تخریب سد خـونی-مغـزی و در نتیجه ادم را کاهش می‌دهند [۲۵].

نتیجه‌گیری

بر اساس مطالعات و نتایج مطالعه حاضـر مـی‌تـوان اظهـار داشت که پیش‌درمانی با پیوند سلول‌های بنیادی جنینـی مـوش mESCs کاهش آسیب‌های ناشی از ایسکمی به واسطه کاهش حجم انفارکتوس، نفوذپذیری سد خونی-مغزی، ادم مغزی، بهبود نواقص نورولوژیک، افزایش فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان SOD و کاهش بیان ژن‌های *GRIN1* و *NOS1* را موجب شد. احتمـال می‌دهیم کاهش آسیب‌های ایسـکمی مشـاهده‌شـده بـه دنبـال اسـتفاده از سـلول‌هـای mESCs، بخشـی بـه‌واسـطه ترشـح فاکتورهای رشد، نوروتروفیک، تحریک آنژیوژنز، مهـار ژن‌هـای التهاب‌مانند *GRIN1* و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسـیدان مانند SOD صورت گیرد. درنهایت می‌تـوان پیونـد ایـن گـروه سلولی را به‌عنوان روشی موثر در محافظت عصبی افراد مسـتعد به سکته مغزی پیشنهاد کرد. جهت تایید کامل این احتمال لازم اسـت تـا بیـان پـروتئین فاکتورهـای رشـد درگیـر در اثـرات نوروپروتکتیو mESCs بر سـکته مغـزی انـدازه گیـری شـده و شواهد بافتی مبنی بر زنـده‌بـودن سـلول‌هـای پیونـدی بعـد از ایسکمی بدست آید.

سپاسگزاری

این مطالعه بخشی از رساله آقای محمود رمدان بـه شـماره ۹۵۵۳۱۰۰۷ از دانشگاه شهید بهشتی است. نویسندگان مراتـب قدردانی خود را بابت حمایت مالی دانشگاه شهید بهشتی اعـلام می‌دارند.

ملاحظات مالی

هزینه مالی این مطالعه از محل رساله شماره ۹۵۵۳۱۰۰۷ از دانشگاه شهید بهشتی تامین شده است.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

نقش نویسندگان

م.ر: اجراء، نظارت بر مطالعه، آنالیز آماری و نگارش مقاله؛ م.ب: ایده، طراحی، نظارت بر مطالعه، آنالیز آماری و نگارش مقاله؛ ح.ش: نظارت بر مطالعه و نگارش مقاله؛ س.ا: نظارت بر مطالعه و نگارش مقاله.

فهرست منابع

[1] Daneshfard B, Izadi S, Shariat A, Toudaji MA, Beyzavi Z, Niknam L, Epidemiology of stroke in Shiraz, Iran. ***Iran J Neurol*** 14 (2015) 158-163.

[2] Lehotský J, Burda J, Danielisová V, Gottlieb M, Kaplán P, Saniová B, Ischemic tolerance: the mechanisms of neuroprotective strategy. ***Anat Rec (Hoboken)*** 292 (2009) 2002-2012.

[3] Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Aksentijević D, Sundier SY, Robb EL, Logan A, Nadtochiy SM, Ord EN, Smith AC, Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. ***Nature*** 515 (2014) 431-435.

[4] Sumimoto H, Minakami R, Miyano K, The Nox family of NADPH oxidases that deliberately produce reactive oxygen species. In: Naito Y, Suematsu M, Yoshikawa T, eds, Free Radical Biology in Digestive Diseases. Basel: Karger AG, 2011: 23-34.

[5] Bruno V, Battaglia G, Copani A, D'Onofrio M, Di Iorio P, De Blasi A, Melchiorri D, Flor PJ, Nicoletti F,

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-13]

Metabotropic glutamate receptor subtypes as targets for neuroprotective drugs. ***J Cereb Blood Flow Metab*** 21 (2001) 1013-1033.

[6] Furukawa K, Fu W, Li Y, Witke W, Kwiatkowski DJ, Mattson MP, The actin-severing protein gelsolin modulates calcium channel and NMDA receptor activities and vulnerability to excitotoxicity in hippocampal neurons. ***J Neurosci*** 17 (1997) 8178-8186.

[7] Kalluri HSG, Dempsey RJ, Growth factors, stem cells, and stroke, ***Neurosurg Focus*** 24 (2008) E14.

[8] Willing AE, Shahaduzzaman M, Delivery routes for cell therapy in stroke. In: Jolkkonen J, Walczak P, eds, Cell-based therapies in stroke. Wien: Springer, 2013: 15-28

[9] Taei AA, Nasoohi S, Hassanzadeh G, Kadivar M, Dargahi L, Farahmandfar M, Enhancement of angiogenesis and neurogenesis by intracerebroventricular injection of secretome from human embryonic stem cell- derived mesenchymal stem cells in ischemic stroke model. ***Biomed Pharmacother*** 140 (2021) 111709.

[10] Memezawa H, Minamisawa H, Smith ML, Siesjo BK, Ischemic penumbra in a model of reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. ***Exp Brain Res*** 89 (1992) 67-78.

[11] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R, Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. **S*troke*** 20 (1989) 84-91.

[12] Chen J, Li Y, Wang L, Lu M, Zhang X, Chopp M, Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. ***J Neurol Sci*** 18۹ (2001) 49-57.

[13] Yunoki M, Kanda T, Suzuki K, Uneda A, Hirashita K, Yoshino K, Ischemic tolerance of the brain and spinal cord: a review. ***Neurol Med Chir (Tokyo)*** 57 (2017) 590-600.

[14] Ramdan M, Bigdeli MR, Khaksar S, Aliaghaei A, Evaluating the effect of transplanting umbilical cord matrix stem cells on ischemic tolerance in an animal model of stroke. ***Neurol Res*** 43 (2021) 225-238.

[15] Stroemer RP, Rothwell NJ, Cortical protection by localized striatal injection of IL-1ra following cerebral ischemia in the rat. ***J Cereb Blood Flow Metab*** 17 (1997) 597-604.

[16] Stroemer RP, Rothwell NJ, Exacerbation of ischemic brain damage by localized striatal injection of interleukin-1β in the rat. ***J Cereb Blood Flow Metab*** 18 (1998) 833-839.

[17] Allan SM, Parker LC, Collins B, Davies R, Luheshi GN, Rothwell NJ, Cortical cell death induced by IL-1 is mediated via actions in the hypothalamus of the rat. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 97(2000) 5580-55۸۵.

[18] [18] Halliwell B, The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. ***Haemostasis*** 23 (1993) 118-126.

[19] Kim GW, Kondo T, Noshita N, Chan PH, Manganese superoxide dismutase deficiency exacerbates cerebral infarction after focal cerebral ischemia/reperfusion in mice: implications for the production and role of superoxide radicals. ***Stroke*** 33 (2002) 809-815.

[20] Park CK, Nehls DG, Teasdale GM, McCulloch J, Effect of the NMDA antagonist MK-801 on local cerebral blood flow in focal cerebral ischaemia in the rat. ***J Cereb Blood Flow Metab*** 9 (1989) 617-622.

[21] Liu X-F, Fawcett JR, Thorne RG, DeFor TA, Frey II WH, Intranasal administration of insulin-like growth factor-I bypasses the blood–brain barrier and protects against focal cerebral ischemic damage. ***J Neurol Sci*** 187 (2001) 91-97.

[22] Schäbitz W-R, Hoffmann TT, Heiland S, Kollmar R, Bardutzky J, Sommer C, Schwab S, Delayed neuroprotective effect of insulin-like growth factor-I after experimental transient focal cerebral ischemia monitored with MRI. ***Stroke*** 32 (2001) 1226-1233.

[23] Justicia C, Pérez-Asensio FJ, Burguete MC, Salom JB, Planas AM, Administration of transforming growth factor-α reduces infarct volume after transient focal cerebral ischemia in the rat. ***J Cereb Blood Flow Metab*** 21 (2001) 1097-1104.

[24] Obrenovitch T, Richards D, Extracellular neurotransmitter changes in cerebral ischaemia. ***Cerebrovasc Brain Metab Rev*** 7 (1994) 1-54.

[25] Chen B, Gao X-Q, Yang C-X, Tan S-K, Sun Z-L, Yan N-H, Pang Y-G, Yuan M, Chen G-J, Xu G-T, Neuroprotective effect of grafting GDNF gene-modified neural stem cells on cerebral ischemia in rats. ***Brain Res*** 1284 (2009) 1-11.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-13]

Research paper

Transplantation of mouse embryonic stem cell reduces oxidative stress and inflammation in an animal model of stroke

Mahmoud Ramdan[1], Mohammad Reza Bigdeli[1*], Hosein Shahsavarani[2*], Salma Ahmadloo[3]

[1]*Department of Animal Sciences, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran*
[2]*Deptartment of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran*
[3]*Vaccination Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran*

Received: 2 November 2022 Accepted: 16 November 2022

Abstract

Background and Aim: Stroke is the second cause of death and disability in the world. Cell therapy can be considered as a suitable option due to its ability to restore and replace damaged neurons. Mouse embryonic stem cells (mESCs) were considered as potential candidates for the present research due to the release of growth and neurotrophic factors.

Methods: Rats were divided into three main groups: Intact, control, and mouse embryonic stem cell (mESCs) transplant recipients. In mESCs group, ischemia was induced by middle cerebral artery occlusion (MCAO) method four days after injection of half a million cells into striatum of rat brain by stereotaxic method. Rats were divided into subgroups to investigate neurological deficits, infarct volume, blood-brain barrier integrity, edema, superoxide dismutase (SOD) enzyme activity, and the expression of glutamate ionotropic receptor (GRIN1) and nitric oxide synthase (NOS1) genes.

Results: A significant reduction in neurological deficits, infarct volume, blood-brain barrier damage and edema was observed in the mESCs group compared to the control group. Also, the expression of *GRIN1* and *NOS1* showed a significant decrease in the mESCs group compared to the control group. In addition, a significant increase in SOD enzyme expression was observed in the mESCs group compared to the control group.

Conclusion: The present results showed that transplantation of mESCs reduced ischemic damages. This effectiveness is probably due to reduction of inflammatory and excitotoxicity related-genes and increase of antioxidant enzyme.

Keywords: Edema, Infarct volume, Blood-brain barrier, Embryonic stem cells, Neurological defects

Please cite this article as follows:

Ramdan M, Bigdeli MR, Shahsavarani H, Ahmadloo S, Transplantation of mouse embryonic stem cell reduces oxidative stress and inflammation in an animal model of stroke. ***Iran J Physiol Pharmacol*** 6 (2022) 184-200.

*Corresponding authors: bigdelimohammadreza@yahoo.com (ORCID: 0000-0003-4331-1047)
hosein.shahsavarani@gmail.com (ORCID: 0000-0002-8123-0857)

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2026-11-13]