

ORIGINAL ARTICLE

Behavioral and electrophysiological study of the healing process of severed sciatic nerve in male Wistar rats with the help of umbilical cord stromal cells cultured on Plga nanofiber scaffolds

Amir Hossein Fazlali¹, Nasim Hayati Roodbari^{1*}, Gholamreza Kaka², Kazem Privar¹,
Seyed Homayoon Sadraei²

¹Department of Biology, SR.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran.

²Department of Anatomy, Baqiyatalah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Correspondence

Nasim Hayati Roodbari
Email: hayati@iau.ac.ir

How to cite

Fazlali, A. H., Hayati Rodbari, N., Kaka, Gh., Privar, K., & Sadraei, S. H. (2024). Behavioral and electrophysiological study of the healing process of severed sciatic nerve in male Wistar rats with the help of umbilical cord stromal cells cultured on Plga nanofiber scaffolds. *Experimental Animal Biology*, 13(49), 69-80.

ABSTRACT

Objective background: This study evaluated the therapeutic effect of umbilical cord blood cells on PLGA membrane scaffold on the repair of severed sciatic nerve of male Wistar rats by behavioral and electrophysiological studies.

Materials and Methods: After cutting the sciatic nerve, male rats were divided into 4 groups of 7 Healthy rats, sciatic nerve cut rats without therapeutic intervention, rats with umbilical cord blood cells on PLGA membrane scaffold at the nerve cut site, rats were treated with umbilical cord blood cell injection at the injury site. The degree of recovery was evaluated by the sensorimotor activity of the sciatic nerve, electrophysiological studies.

Findings: motor evaluation of the sciatic nerve, the control group was not observed to return to the normal state in the eighth week, the cell therapy group was repaired on the PLGA membrane scaffold in the eighth week. The level of AMP in the 8th week after recovery of the cell therapy group with a gentle slope is a sign of the healing process of the cell therapy group. Counting the number of nerve fibers in a surface equal to 1000 square meters, the number of nerve fibers in the cell therapy groups increased after the eighth week of repair, compared to the control group and the PLGA membrane group. At the end of the eighth week, the sensory activity index of the sciatic nerve (Hot Plate test), the healing process of the cell therapy group on the PLGA membrane scaffold was more evident than the other groups.

Conclusion: Umbilical cord blood cell transplantation causes sciatic nerve repair and PLGA membrane scaffold with cord blood cells accelerates sciatic nerve repair.

KEYWORDS

Umbilical cord blood cells, PLGA membrane, sciatic nerve.

نشریه علمی

زیست‌شناسی جانوری تجربی

«مقاله پژوهشی»

مطالعه رفتاری و الکتروفیزیولوژی روند ترمیم عصب سیاتیک قطع شده در موش صحرایی نر نژاد ویستار به کمک سلول‌های استرومایی بند ناف کشت داده شده بر داربست نانو الیاف PLga

امیرحسین فضلعلی^۱، نسیم حیاتی رودباری^{۱*}، غلامرضا کاکا^۲، کاظم پریور^۱، سید همایون صدرایی^۲

چکیده

سابقه هدف: این مطالعه اثر درمانی سلول‌های خون بند ناف بر داربست غشا PLGA بر ترمیم عصب سیاتیک قطع شده موش صحرایی نر نژاد ویستار توسط بررسی رفتاری، الکتروفیزیولوژی ارزیابی شد. **مواد و روش‌ها:** موش‌های صحرایی نر در پنج گروه هفت‌تایی تقسیم شدند. که شامل گروه سالم؛ گروه دوم گروهی که عصب سیاتیک قطع شده و غشا PLGA در محل ضایعه بسته شد؛ گروه سوم فقط تزریق سلول‌های خون بند ناف در محل آسیب انجام شد گروه چهارم سلول‌های خون بند ناف بر داربست غشا PLGA در محل قطع عصب تزریق شد و گروه کنترل که عصب سیاتیک بدون مداخله درمانی قطع شد. میزان بهبودی به وسیله فعالیت حسی حرکتی عصب سیاتیک، مطالعات الکتروفیزیولوژی ارزیابی گردید. **یافته‌ها:** ارزیابی حرکتی عصب سیاتیک، گروه کنترل بازگشت حالت طبیعی در هفته هشتم مشاهده نشد، گروه سلول درمانی بر داربست غشا PLGA هفته هشتم ترمیم شد. میزان AMP هفته هشتم بعد از ترمیم گروه سلول درمانی با شیب ملایم نشانه روند بهبودی گروه سلول درمانی است. شمارش تعداد رشته‌های عصبی در سطحی برابر ۱۰۰۰ میکرومتر مربع، تعداد رشته‌های عصبی گروه‌های سلول درمانی هفته هشتم بعد از ترمیم، مقایسه با گروه کنترل و گروه غشا PLGA افزایش داشت. پایان هفته هشتم شاخص فعالیت حسی عصب سیاتیک (تست Hot Plate)، روند ترمیم گروه سلول درمانی بر داربست غشا PLGA به سایر گروه‌ها مشهودتر بود. **نتیجه‌گیری:** پیوند سلول خون بند ناف سبب ترمیم عصب سیاتیک شده و داربست غشا PLGA همراه سلول‌های خون بند ناف موجب تسریع ترمیم عصب سیاتیک می‌شود.

واژه‌های کلیدی

سلول‌های خون بند ناف، غشا PLGA، عصب سیاتیک، موش صحرایی.

^۱گروه علوم شناختی، دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
^۲گروه آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بقیه‌الله، تهران، ایران.

نویسنده مسئول:

نسیم حیاتی

رایانامه: hayati@iau.ac.ir

استناد به این مقاله:

حیاتی، نسیم؛ فضلعلی، امیرحسین؛ کاکا، غلامرضا؛ پریور، کاظم و صدرایی، سید همایون (۱۴۰۳). مطالعه رفتاری و الکتروفیزیولوژی روند ترمیم عصب سیاتیک قطع شده در موش صحرایی نر نژاد ویستار به کمک سلول‌های استرومایی بند ناف کشت داده شده بر داربست نانو الیاف PLga. فصلنامه زیست‌شناسی جانوری تجربی، ۱۳(۴۹)، ۶۹-۸۰.

<https://eab.journals.pnu.ac.ir/>

مقدمه

آسیب عصب سیاتیک (SNI) از جمله مشکلاتی است که در اثر فشار تروماتیک، کشش و برش عصب در حین ورزش ایجاد شده و منجر به مشکلات بالینی جدی از جمله نقص حرکتی و حسی و همچنین درد نوروپاتی می‌شود (Joo-In *et al.*, 2023). روش‌های مختلف درمانی که می‌تواند باعث افزایش بازسازی عصب ریفرال شود شامل پیاده روی منظم، شنا، پیوند سلولی و درمان‌های دارویی است که منجر به ایجاد تغییرات بافتی و عملکردی مثبت در سلول‌های شوان می‌شود (Zainul *et al.*, 2022).

آسیب عصب سیاتیک از نوروپاتی‌های محیطی شایع است که معمولاً در اثر تروما ایجاد شده و باعث از بین رفتن عملکردهای حرکتی و حسی می‌شود (Dadon-Nachum *et al.*, 2011; Wang & Jia, 2023). بیمارانی که از چنین آسیبی رنج می‌برند می‌توانند علائمی مانند درد، ضعف عضلانی، اختلال حرکتی و حتی ناتوانی طولانی‌مدت را تجربه کنند (Dadon-Nachum *et al.*, 2011; Wang & Jia, 2023). متأسفانه توانایی عصب سیاتیک برای تولید و ترمیم محدود است و بازیابی عملکردی آن ضعیف است (Molina-Gonzalez *et al.*, 2023). سرعت آهسته بازسازی عصب سیاتیک می‌تواند منجر به آسیب دائمی به ساختار و عملکرد اندام‌های مرتبط با آن شده و در نتیجه یک عارضه دائمی قبل از عصب‌دهی مجدد آکسون‌های بازسازی‌کننده را ایجاد کند (Cattin & Lloyd, 2016).

در حال حاضر، پیوند اتولوگ اغلب برای ترمیم اعصاب محیطی و اعصاب سیاتیک از نظر بالینی استفاده می‌شود، اما حفظ شرایط پیوند به دلیل میزان بقای پایین آن در محل گیرنده دشوار است (Paskal *et al.*, 2020). روش دیگر پیوند آلو است که در کارآزمایی‌های بالینی آزمایش شده اما در نتیجه این نوع پیوند رگ‌های خونی و فیبرهای عضلانی تحلیل می‌رود، لذا میزان موفقیت بسیار پایین داشته و نتایج ضعیف است (Bateman *et al.*, 2024). از دلایل ناموفق بودن روش‌های فوق می‌توان به عوامل متعددی مانند ناتوانی آنزیم‌های نوروتروفیک تولیدشده توسط استامپ پروگزیمال و نرسیدن عصب به ناحیه دیستال و عدم وجود سلول‌های شوان (SCs) نسبت داد (Zau *et al.*, 2024). به همین دلیل، اکثر پژوهش‌گران مهندسی بافت، تحقیق بر روی اعصاب محیطی را جهت بازسازی اعصاب آسیب‌دیده مناسب‌تر از کار روی اعصاب مرکزی می‌دانند.

با وجود پیشرفت‌هایی که در تکنیک‌های جراحی صورت گرفته است، نتیجه عملکردی ضربه‌های اعصاب محیطی به ندرت رضایت بخش بوده است و نیازمند پژوهش‌های گسترده برای بهبود روش‌های ترمیم است. دلیل انتخاب عصب سیاتیک جهت تحقیق محققان بر روی اعصاب محیطی به این دلیل است که ترمیم عصب سیاتیک کارا و سریع می‌باشد و علاوه بر این روشی نسبتاً ارزان محسوب می‌شود (Xu *et al.*, 2023).

در سیستم اعصاب مرکزی به علت وجود فاکتورهای بازدارنده و مهارتی که توسط سلول‌های پشتیبان اعصاب مرکزی ترشح می‌شود، ترمیم آکسون‌ها پس از چنین ضایعاتی متوقف می‌گردد. چنین فاکتورهای بازدارنده‌ای را در سیستم اعصاب محیطی کم‌تر می‌توان یافت به همین علت پتانسیل ترمیم نسبتاً بالایی را در آکسون‌های سیستم اعصاب محیطی می‌توان مشاهده کرد. توانایی خاص اعصاب محیطی برای رشد دوباره به سمت هدف به خصوصیت بازسازی گلیای آن یعنی سلول شوان برمی‌گردد. اعصاب محیطی بالغ فاقد جمعیت سلول بنیادی برای تولید گلیای جدید هستند. در مقابل آن سلول‌های شوان بالغ تمایز یافته دارای درجه بالای پلاستیسیته در طول زندگی بالغ بوده و با ایجاد آسیب، غلاف میلین را از دست داده و با تمایززدایی به حالت مشابه سلول‌های بنیادی یا پروژنیاتور بر می‌گردند (Kerosuo *et al.*, 2015).

سلول‌های شوان تمایززدایی‌شده، به دو دلیل، کلید ترمیم عصب هستند. اول اینکه آن‌ها جای بافت آسیب‌دیده یا از بین‌رفته را پر می‌کنند. دوم اینکه آن‌ها با ایجاد محیط مناسب برای رشد دوباره آکسون به پاکسازی مواد زائد میلین کمک کرده و مسیری را برای رشد سلولی ایجاد می‌کنند که به نام مسیر بونگر خوانده می‌شوند که آکسون را به سمت هدف شان هدایت می‌کنند (Sulaiman & Gordon, 2013).

عوارض این آسیب‌ها به‌عنوان یک مشکل کاملاً جدی در جراحی ترمیمی است. هدف اصلی در درمان ضایعاتی که باعث قطع کامل اعصاب محیطی شده‌اند برقراری مجدد امتداد عصب است تا عصب قادر به رشد مجدد به سمت بخش دیستال و برقراری ارتباط فیزیولوژیک با این بخش باشد.

شواهد قابل اعتمادی ارائه‌شده مبنی بر اینکه درمان با سلول‌های بنیادی مزانشیمی (BMSC) می‌تواند منجر به ترمیم طولانی‌مدت عصب بدون عوارض جانبی شود (Guo *et al.*, 2018). همچنین پژوهش‌ها نشان می‌دهد که انجام تمرینات فیزیکی پایدار از جمله پیاده‌روی و شنا منجر به بهبود عملکردی

(glycolic acid) که مورد تأیید اداره غذا و دارو است (FDA). این ماده کوپلیمری از دو پلیمر پلی لاکتیک اسید و پلی گلیکولیک اسید تشکیل شده که از این دو پلیمر نیز به عنوان داربست در مهندسی بافت به تنهایی یا به صورت ترکیب با سایر مواد استفاده می شود.

PLGA علاوه بر استفاده به عنوان داربست در مهندسی بافت، در دارورسانی و ساخت کانال های راهنمای عصبی استفاده می شود. این ماده دارای خصوصیات نظیر زیست سازگاری و زیست تخریب پذیری بوده و می تواند براساس نسبت پلی لاکتیک اسید به پلی گلیکولیک اسید از چند هفته تا چند سال زمان تخریب پذیری آن را کنترل کرد. این ماده در بدن به آرامی هیدرولیز، تخریب و به مونومرهای سازنده خود شکسته و در نهایت از طریق چرخه کربس به صورت کربن دی اکسید و آب دفع می شود (Zolfagari et al., 2014).

پژوهش ها نشان می دهند که سلول ها روی سطوح دارای ساختار نانویی بهتر رشد می کنند. PLGA به طور وسیعی برای ساخت داربست های دو بعدی و سه بعدی نظیر کانال های راهنمای عصبی (کاندوتیو) استفاده می شود (Mehrasa et al., 2015).

مواد و روش کار

در این پژوهش از ۳۵ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار به وزن ۲۵۰-۲۳۰ گرم استفاده شد که از انستیتو پاستور تهران تهیه شدند (Ethical code: IR.IAU.SRB.REC.1396.893). حیوانات به صورت تصادفی به پنج گروه نرمال، گروه غشا PLGA، گروه سلول درمانی، گروه سلول درمانی بر روی داربست غشا PLGA و گروه کنترل تقسیم گردیدند. در مدت پژوهش حیوانات در حیوان خانه دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات در شرایط نور، آب، غذای مناسب و قفس های پلاستیکی نگهداری شدند. در این پژوهش تمامی اصول اخلاقی کار با حیوان براساس ویژه نامه علمی اخلاق پزشکی دانشگاه بابل و مقالات اخلاق در پزشکی و کار با حیوان چاپ شده در SID از جمله مقاله Mobasher et al. (2008) رعایت شده است.

۱. آماده کردن حیوان آزمایشگاهی و جراحی

مشاهده پلاک موکوسی (پلاک واژنی یا پلاک تاریخ گذاری) در ابتدای واژن روز صفر در نظر گرفته و موش های حامله در روزهای آخر، به طور معمول بالای روز ۱۸، جراحی و جنین ها بیرون آورده شدند.

اندام عقبی موش با کمک تسریع SNI شده و بیان پروتئین مرتبط با درد نوروپاتییک را در DRG همان طرف تنظیم کند (Cho & Seo, 2022). به این دلایل، بسیاری از پژوهشگران در زمینه فیزیولوژی ورزش و علوم اعصاب پیشنهاد کرده اند که ورزش منظم بدنی ممکن است یکی از اصول درمانی برای تسهیل افزایش طول آکسون های عصب سیاتیک و کاهش درد نوروپاتییک پس از SNI باشد.

سلول های بنیادی سلول هایی هستند که قادر به بازسازی خود و انواعی دیگر از سلول ها می باشند. این سلول ها از لحاظ منشأ تولید دارای انواع گوناگونی هستند که از آن جمله می توان به سلول های بنیادی جنینی و سلول های بنیادی بالغ نام برد. اگرچه مغز استخوان منبع اصلی سلول های بنیادی مزانشیمی است اما به دلیل امکان تهاجمی بودن جداسازی آن، بروز عفونت های ویروسی و کاهش قابلیت تکثیر و تعداد سلول های بنیادی با افزایش سن فرد، استفاده از آن با محدودیت روبه رو است (Gholam et al., 2018).

در سال های اخیر بند ناف انسان، مورد توجه فراوانی قرار گرفته است. سلول های بنیادی موجود در بند ناف انسان از نوع چند توان بوده، قدرت تکثیر زیاد و ظرفیت خود نوزایی داشته و حدواسط سلول های بنیادی جنینی و سلول های بنیادی بالغ هستند. برای اولین بار در سال ۲۰۰۶ سلول های بنیادی از ژله وارزون بند ناف انسان جداسازی و تخلیص شد (Cao & Feng, 2009). یک سال بعد پژوهشگران توانستند سلول های بنیادی مزانشیمی را از ماتریکس بند ناف اسب جدا ساخته و به سلول های عصبی تمایز دهند (Joyce et al., 2012). نشان داده شده که سلول های بنیادی بند ناف، مولکول های نوروتروفیکی مثل فاکتور رشد عصب، فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز و فاکتور نوروتروفیک سیلیاری را ساخته و ترشح می کنند (Lotfinia et al., 2017).

ساخت داربست زیست تخریب پذیر مناسب برای کشت سلول یکی از مهم ترین پارامترهای مهندسی بافت می باشد. یک داربست خوب باید بتواند ساختار فیزیکی و شیمیایی ماتریکس خارج سلولی که شبکه ای متخلخل از انواع فیبرها و پروتئین ها است را شبیه سازی نماید در این میان سنتز نانوالیاف با استفاده از تکنیک الکتروروسی به علت ویژگی های خوب آن نظیر افزایش سطح تماس، انعطاف، تخلخل اندازه های نانومتری تا چند میکرون می تواند جایگزین مناسبی برای ماتریکس خارج سلولی باشد.

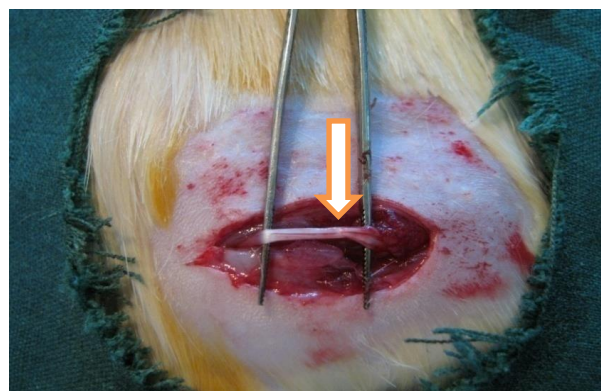
یکی از مهم ترین مواد برای این منظور استفاده از پلی استر پلی لاکتید کو پلی گلیکولید است (PLGA poly (lactic-co-

روش جراحی

بی‌هوش کردن حیوان با استفاده از ketamin با دوز ۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم و xylazin با دوز ۸ میلی گرم بر کیلوگرم انجام می‌شود. پس از shaving ناحیه میانی سطح خارجی ران شست‌وشو با بتادین صورت می‌گیرد و با استفاده از روش کاملاً استریل محل‌های عمل به ترتیب باز می‌شود.

Rat‌های نر بالغ با تزریق ۰/۳ واحد از مخلوط داروی کتامین و زایلیزین بی‌هوش شده و عصب سیاتیک راست آن‌ها در میانه ران قطع شده و سپس دو سر عصب به یکدیگر مرتبط می‌شود. ابتدا سر دیستال و سپس سر پروگزیمال آن دوخته می‌شود.

سپس در گروه‌های تجربی، با توجه به عنوان گروه، سلول‌های استرومایی در ۳ میلی متر پایین تر از محل ضایعه و ۳ میلی متر بالاتر از محل قطع عصب تزریق می‌شود. در گروه‌هایی که سلول‌های استرومایی از قبل در روی غشا PLGA کشت داده شده‌اند، غشای نانو الیاف به دور عصب پیچیده می‌شود (شکل ۱).



شکل ۱. عصب سیاتیک نمایان شده در قسمت خلفی ران پای راست

پس از قطع عصب سیاتیک پای راست حیوان موش‌ها به‌طور تصادفی در پنج گروه تقسیم شدند:

۱. گروه نرمال: بدون هیچ آسیبی به عصب سیاتیک.
۲. گروه غشا PLGA: غشا در محل ضایعه بسته شد.
۳. گروه سلول بندناف: تزریق ۱۰۰ هزار سلول خون بند ناف توسط سرنگ همیلتون در محل قطع عصب.
۴. گروه سلول + غشا PLGA: تزریق ۱۰۰ هزار سلول خون بند ناف در محل ضایعه روی داربست غشا PLGA.
۵. گروه کنترل: قطع عصب سیاتیک بدون هیچ مداخله‌ای.

۲. جدا کردن سلول‌های بنیادی استرومای بندناف

و کشت اولیه آن‌ها

۱. جنین‌ها در داخل پتری‌دیش استریل حاوی محلول Dissection Balanced salt solution (DBSS) قرار گرفتند.

۲. بندناف‌ها تا حد امکان به قطعه‌های ۳ میلی متری قطعه شدند و قطعه‌های ریز شده به پتری‌دیش حاوی Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) (B.I.R.D Baharafshan) منتقل گردیدند.

۳. دو سی‌سی محلول آنزیم کلاژناز (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) بر روی تکه‌های بافت ریخته شد و بعد از ۵ دقیقه عمل پیپت کردن Pipetting انجام گرفت (جدا کردن مکانیکی سلول‌ها).

۴. سلول‌ها با غلظت‌های 2×10^5 سلول در هر سانتی مترمربع (5×10^6 سلول در یک فلاسک T-25) از فلاسک T-25 (Greiner bio-one) بدون پوشش پلی-D - لیزین حاوی محیط کشت Dulbeco's Modified Eagle's Medium (DMEM) و دارای L-glutamine و سدیم بی‌کربنات (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) و یک درصد پنی‌سیلین / استرپتومایسین (Gibco) به همراه ۱۰ درصد (Sigma-Fatal bovine serum) (FBS) (Aldrich, St Louis, USA) کشت داده شدند و فلاسک‌های کشت در انکوباتور دارای رطوبت و با ۵ درصد CO_2 دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۳. شناسایی سلول‌های بنیادی در محیط کشت

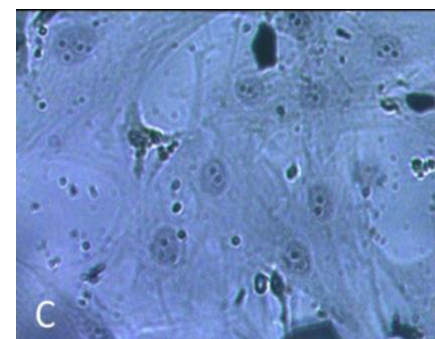
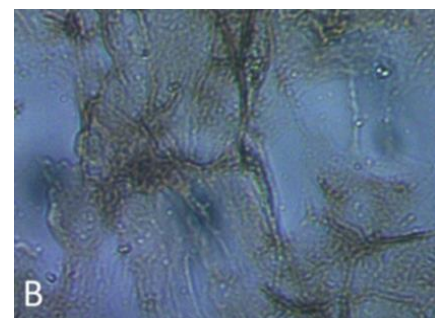
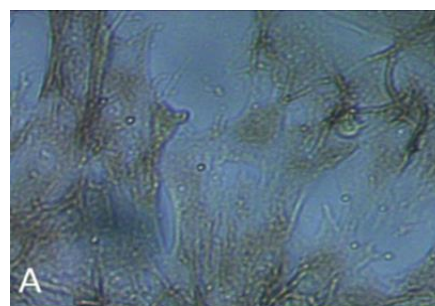
در این مطالعه بعد از پاساژ اول، از کیت شناسایی برای (CHEMICON) فعالیت آلکلین فسفاتازی نشان دادن سلول‌های بنیادی تمایز نیافته استفاده گردید (شکل ۲).



شکل ۲. تصویر میکروسکوپی سلول‌های خون بند ناف ۲۴ ساعت بعد از پاساژ ۲. (بزرگنمایی ۱۰۰)

۴. بررسی خلوص سلول‌های خون بند ناف

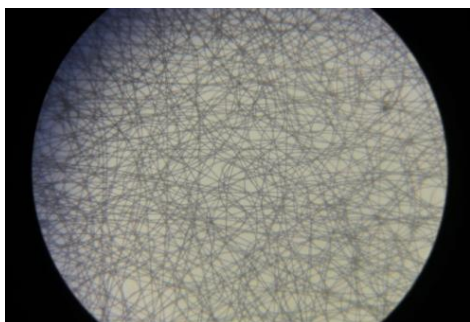
در این ارزیابی از رنگ آمیزی ایمونوسایتوشیمی انجام شد و برای این منظور از آنتی بادی اولیه فیبرونکتین و CD44 استفاده گردید. ابتدا پلیت‌های مورد نظر با PBS به مدت ۵ دقیقه شست‌وشو داده شد، سپس سلول‌ها محلول ۴ درصد پارافرمالدئید به مدت نیم ساعت ثابت شده و پس از شست‌وشوی مجدد با PBS و افزودن محلول بلاک‌کننده به مدت یک ساعت در دمای اتاق و شست‌وشوی مجدد، آنتی بادی اولیه به مدت یک شب بر روی سلول‌ها ریخته شد. پس از شست‌وشوی آنتی بادی ثانویه بیوتین اویدین متصل به آنزیم Peroxidase و رنگ DAB برای رنگ آمیزی سلول‌ها استفاده و در انتها، شست‌وشو با PBS انجام شد (شکل ۳).



شکل ۳. تصویر میکروسکوپی سلول‌های خون بند ناف، پس از انجام ایمونوسیتوشیمی با بزرگمایی $\times 400$ A, B, C به ترتیب مربوط به آنتی بادی اولیه فیبرونکتین، آنتی CD44 و کنترل منفی سلول‌های تمایز نیافته BMSC در پایان پاساژ دوم.

۵. تهیه نانو الیاف PLGA

محلول PLGA با نسبت ۱:۱ گلیکولیک اسید به لاکتیک اسید (mol wt 30,000-60,000, Sigma) با غلظت ۲۲,۵ درصد در حلال ترکیبی دی‌متیل‌فرامید (DMF) کلروفرم با نسبت ۱ به ۳ (۵/۰ سی سی DMF با ۱/۵ سی سی کلروفرم) تهیه شد. ولتاژ دستگاه ۹ کیلوولت با چرخش هشت دور (rpm180/240) با دبی ۰/۳ و G23، فاصله بین سوزن (آند) تا جمع‌کننده لیف (کاتد)، ۱۲ سانتی متر و سرعت پمپ شدن محلول پلیمر به نوک سوزن ۱ میلی‌لیتر بر ساعت تعبیه شد. برای تهیه فیبرهای منظم و تصادفی از یک جمع‌کننده استوانه‌ای پوشیده شده با ورقه آلومینیومی با ضخامت ۵۰ سانتی متر با سرعت چرخش قابل تنظیم استفاده گردید (شکل‌های ۴ و ۵).



شکل ۴. تصویر غشا PLGA زیر میکروسکوپ با بزرگمایی ۴۰



شکل ۵. دستگاه الکتروریسی در حال پرتاب غشا PLGA روی فایل آلومینیومی

۶. ارزیابی حرکتی با تست فوت پرینت

در پایان هفته های دوم، چهارم، ششم و هشتم بعد از عمل جراحی، به منظور ارزیابی میزان بهبود حرکتی تست رفتاری foot print انجام شد. این آزمون روشی در جهت ارزیابی بالینی میزان بازگشت عملکرد حرکتی عصب ترمیم شده می باشد که در ابتدا کف پای مربوط به عصب قطع شده حیوان با جوهر رنگی شده است، سپس حیوان بر روی کاغذ سفیدی که در کف راهرویی به ابعاد $60 \times 20 \times 7$ سانتی متر راه می‌رود،

۸. مطالعات الکترومیوگرافی

در پایان هفته هشتم موش‌های هر گروه از طریق داخل صفاقی کاملاً بی‌هوش شدند. در طول دوره بی‌هوشی دمای بدن موش‌ها با استفاده از لامپ حرارتی در حد دمای اطاق (۳۰ درجه سانتی‌گراد) کنترل شد. پس از برش پوست و بافت‌های عضلانی عصب سیاتیک را در سمت جراحی شده مشاهده شد. ضمن تست نمودن دستگاه ثبت الکترومیوگرافی، تحریک‌کننده سوزنی روی تنه عصب (بالاتر از محل ضایعه اصلی) قرار گرفت. برای ثبت تغییرات پتانسیل ناشی از تحریک، دو الکترود کفه‌ای، یکی بر روی عضله گاستروکنیموس و دیگری یک سانتی‌متر زیر برجستگی تیپا فرو برده شد. برای ثابت نگه داشتن فاصله بین الکترودهای سوزنی و کفه‌ای به دقت اندازه‌گیری شد. با روشن نمودن دستگاه تغییرات پتانسیل دریافتی به هر نمونه پس از عبور از تقویت‌کننده توسط نوسان نگار ثبت گردید. ابتدا از عضله گاستروکنیموس-سولپوس در حالت استراحت الکترومیوگرافی به دست آمد. وقتی عضله از لحاظ عصب‌گیری سالم باشد هیچ گونه فعالیت الکتریکی در حالت استراحت در آن وجود ندارد که در اصطلاح به آن سکوت الکتریکی می‌گویند.

سرعت هدایت پیام عصبی (NCV) و دامنه پتانسیل فعالیت حرکتی (AMP)، جهت بررسی و تجزیه و تحلیل ثبت گردید (شکل ۷).

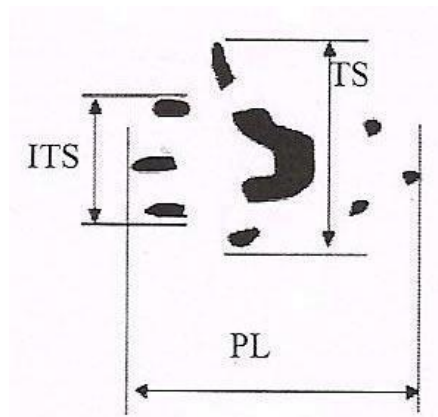


شکل ۷. الکترومیوگرافی بر روی پای جراحی شده رت

تجزیه و تحلیل داده‌ها

نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS 23 و آنالیز واریانس دو طرفه (One-Way Anova) و تست Tukey مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد و نیز نمودارهای مربوطه با نرم‌افزار Microsoft Excel 2017 ترسیم شدند.

سپس SFI براساس فرمول زیر برای پای جراحی شده و پای سالم محاسبه گردید (شکل ۶).



شکل ۶. نمایش کف پای رت

$$SFI = -38.5 \left(EPL - \frac{NPL}{NPL} \right) + 109.5 \left(ETS - \frac{NTS}{NTS} \right) + 13.3 \left(EIT - \frac{NIT}{NIT} \right) - 8.8$$

که در آن، PL نشان‌دهنده طول کف پا، TS نشان‌دهنده فاصله بین سرانگشتان ۱ و ۵، IT نشان‌دهنده فاصله بین سرانگشتان ۲ و ۴ (شکل ۶).

اعداد بین ۱۰۰- الی ۱۰- مسیر بهبودی حرکتی را نشان می‌دهند، عدد ۱۰۰- به معنای قطع کامل عصب و نتایج اعداد بین ۱۰- تا ۱۰+ علامت طبیعی بودن حرکت پای حیوان می‌باشد. این روش بهترین ارزیابی برای سنجش رفتار حرکتی می‌باشد.

۱۲. ارزیابی شاخص عملکرد حسی عصب سیاتیک

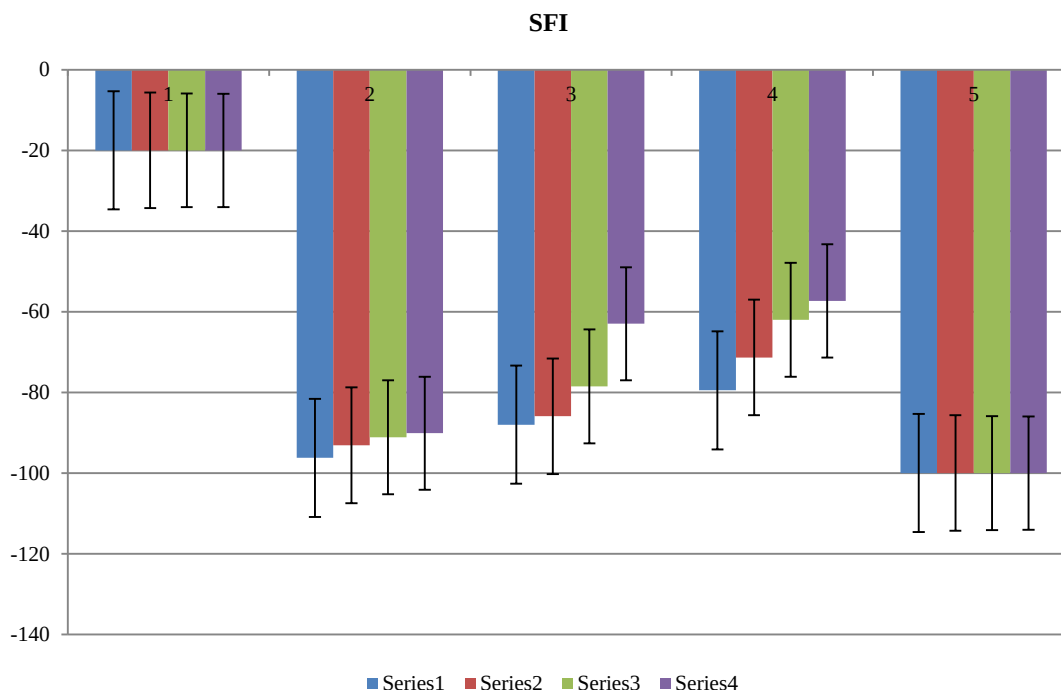
در هفته‌های دو، چهار، شش و هشت بعد از عمل جراحی، جهت ارزیابی حسی عصب سیاتیک از تست رفتاری (Hot Plate) که روشی برای سنجش درک حس درد در حیوانات می‌باشد، استفاده شد. دستگاه مورد استفاده (Heater) ساخت شرکت پارس آزما- اصفهان- ایران بود. که با یک پیچ تنظیم درجه حرارت آن در ۴۸ درجه سانتی‌گراد ثابت گردید. در این روش رت روی صفحه قرار گرفت. مدت زمانی که طول کشید تا حیوان پای مجروح خود را از روی سطح بلند کند به عنوان زمان پاسخ در نظر گرفته شد. این عمل برای هر حیوان سه بار به‌طور جداگانه و به فواصل ۱۰ دقیقه‌ای انجام گرفت و میانگین این سه بار به عنوان پاسخ حیوان ثبت شد.

نتایج

در تحقیق حاضر بعد از قطع عصب سیاتیک، هیچ کدام از حیوانات توانایی راه رفتن روی کف پای آسیب دیده را نداشتند. در ارزیابی حرکتی عصب سیاتیک براساس قانون *Beain et al.* (۱۹۸۹)، ۱۰۰- به معنای قطع کامل عصب و ۱۰- تا ۱۰۰+ نمونه طبیعی می باشد. در گروه کنترل با توجه به اعداد به دست آمده، بازگشت به حالت طبیعی در پایان هفته هشتم مشاهده نشده است، اما در گروه سلول درمانی که روی داربست غشا PLGA قرار داشتند، ترمیم بهتری نسبت به سایر گروه ها در پایان هفته هشتم حاصل گردید، در مقایسه با گروه کنترل، در واقع روند بهبودی در گروه سلول درمانی که روی داربست غشا PLGA قرار داشتند در مقایسه با گروه سلول درمانی بدون داربست غشا PLGA در پایان هفته هشتم سریع تر بوده است (نمودار ۱). میانگین تأخیر پاسخ حسی در پایان هفته هشتم پس از ترمیم در گروه های سلول درمانی نسبت به گروه کنترل در مقایسه با گروه نرمال از نظر عددی روند مثبتی را نشان داد، که این اتفاق بیانگر روند ترمیم و بازگشت عملکرد حسی عصب سیاتیک در گروه های سلول درمانی

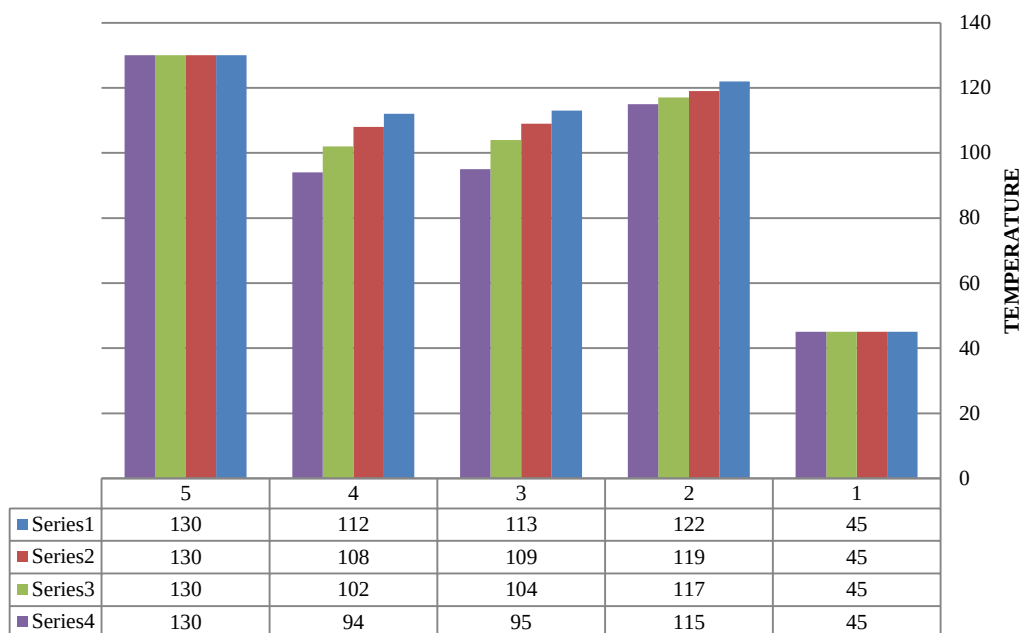
در مقایسه با گروه کنترل می باشد (نمودار ۲). همچنین در پایان هفته هشتم از تمام گروه های مورد آزمایش سنجش الکتروفیزیولوژی به عمل آمد، همانطور که می دانیم با استفاده از میزان AMP می توان مقدار تخریب و ترمیم آکسون ها را به دست آورد. همچنین با توجه به میزان عددی NCV می توان میزان بهبودی در روند میلین سازی را به دست آورد.

میزان عددی AMP در هفته هشتم پس از ترمیم، در گروه سلول درمانی دارای شیب ملایمی است این امر نشان دهنده روند بهبودی در گروه سلول درمانی است، روند بهبودی در گروه سلول درمانی که روی داربست غشا PLGA قرار داشتند نسبت به گروه کنترل و گروه سلول درمانی فاقد داربست غشا PLGA بهتر بوده و به نمونه نرمال نزدیک تر شده است (نمودار ۳). همچنین اتفاقی مشابه به نتایج بررسی AMP در بررسی آماری NCV مشاهده گردید. با توجه به میزان عددی نتایج NCV در بررسی الکتروفیزیولوژی، گروه سلول درمانی که روی داربست غشا PLGA قرار داشتند نسبت به سایر گروه ها ترمیم بهتری در میلین سازی رشته های عصبی مشاهده گردید (نمودار ۴).



نمودار ۱. ارزیابی شاخص عملکرد حرکتی عصب سیاتیک (sfi=sciatic function index) در پایان هفته هشتم بعد از ترمیم در گروه های مورد آزمایش گروه (۱) (نرمال)؛ گروه (۲) (غشا PLGA)؛ گروه (۳) (سلول بندناف)؛ گروه (۴) (سلول + غشا PLGA)؛ گروه (۵) (کنترل). در پایان هفته هشتم پس از ترمیم، میزان عددی SFI در گروه های سلول درمانی در مقایسه با گروه کنترل نشان از روند بهبودی و نزدیک شدن به حالت طبیعی (SFI) در حد فاصل ۱۰+ و ۱۰- و گروه نرمال می باشد. توانایی راه رفتن در پای جراحی شده در گروه سلول درمانی (۳) و گروه سلول درمانی غشا PLGA (۴) در پایان هفته هشتم ایجاد گردید.

HOT PLATE

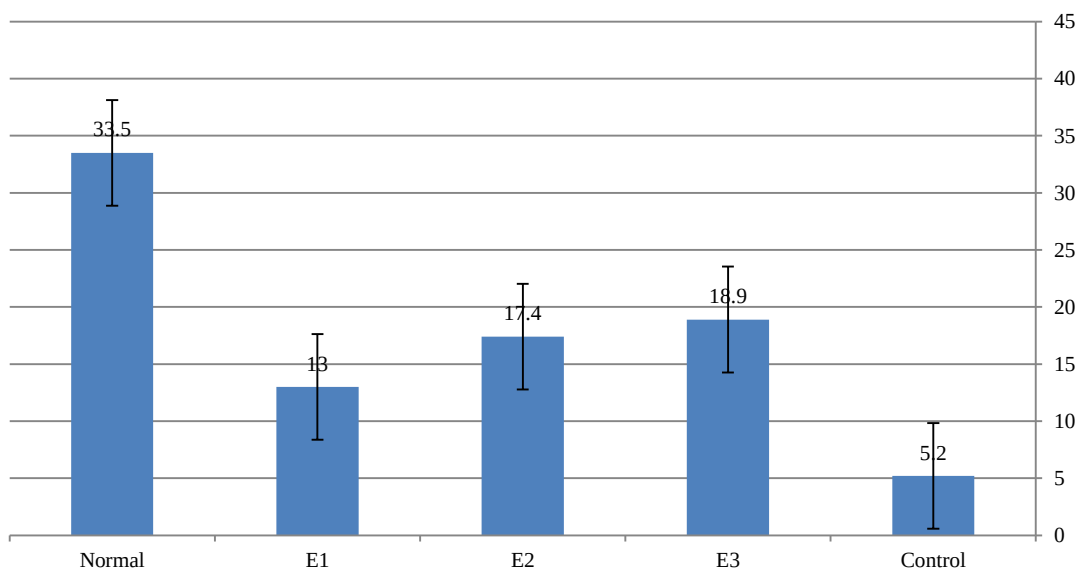


نمودار ۲. آزمون حسی با استفاده از تست Hot Plate.

در گروه‌های مورد آزمایش در پایان هفته‌های دو، چهار، شش و هشت بعد از جراحی (به ترتیب رنگ آبی، قرمز، سبز، بنفش) - گروه ۱ (نرمال)؛ گروه ۲ (غشا PLGA)؛ گروه ۳ (سلول بندناف)؛ گروه ۴ (سلول + غشا PLGA)؛ گروه ۵ (کنترل)

با افزایش درجه حرارت میزان درک حس حرارت در گروه‌های سلول درمانی (۳) در مقایسه به گروه کنترل بیش‌تر شده است. یا به عبارت دیگر، آستانه تحمل با گذشت زمان کاهش یافته است. در گروه سلول درمانی همراه غشا PLGA (۴) مقدار آستانه تحمل بهتر شده است و آستانه تحمل حرارت نسبت به گروه ۲ و ۳ پایین‌تر (روبه بهبود) است.

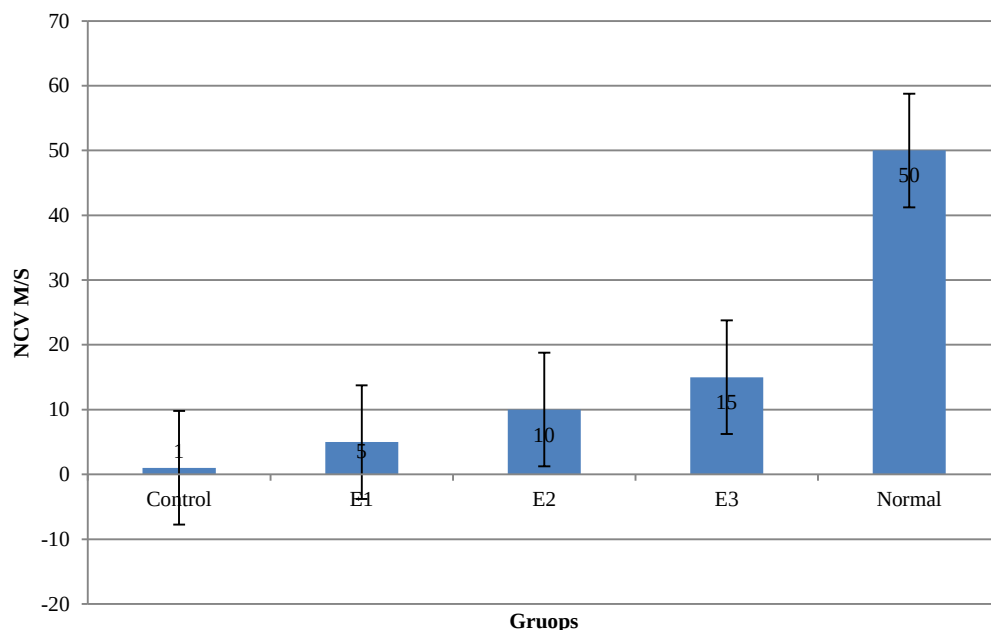
AMP(MV)



نمودار ۳. نتایج AMP (Amplitude Muscle Action Potential) (دامنه پتانسیل فعالیت حرکتی) هفته هشتم بعد از جراحی گروه‌های مورد آزمایش.

E1 (گروه غشا PLGA)؛ E2 (گروه سلول بندناف)؛ E3 (گروه سلول بر روی غشا PLGA).

با توجه به نمودار و مقدار عددی AMP، میزان ترمیم آکسون در گروه سلول بر روی غشا PLGA (E3) نسبت به سایر گروه‌ها بهتر می‌باشد. محور افقی نوع گروه‌ها و محور عمودی میزان تغییرات عددی در تست AMP را نشان می‌دهد.



نمودار ۴. نتایج سرعت هدایت عصبی (NCV (Nerve conduction velocity) در هفته هشتم پس از ترمیم در گروه‌های مورد آزمایش.

E1 (گروه غشا PLGA)؛ E2 (گروه سلول بندناف)؛ E3 (گروه سلول بر روی غشا PLGA).

با توجه به نمودار و مقدار عددی NCV، میزان ترمیم میلین در گروه‌های سلول درمانی نسبت به گروه کنترل بهتر می‌باشد. از لحاظ آماری بین گروه کنترل و نرمال اختلاف معنی‌دار وجود دارد. اما هیچ اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های سلول درمانی (E1) با سایر گروه‌ها دیده نشد. روند ترمیم میلین در گروه سلول درمانی روی داربست غشا PLGA (E3) نسبت به سایر گروه‌ها بهتر می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر نشان داده شد که در پایان هفته هشتم ترمیم و انجام الکترومیوگرافی بر روی حیوانات مقدار دامنه پتانسیل فعالیت حرکتی (Amplitude Muscle Action Potential) در گروه سلول درمانی رشد قابل ملاحظه‌ای در مقایسه با گروه کنترل داشته و این میزان به نمونه نرمال در حال نزدیک شدن می‌باشد که این اتفاق می‌تواند در مورد ترمیم عصب قطع شده در هفته هشتم پس از ترمیم، در ترمیم آکسون‌ها دارای اهمیت باشد. هم چنین اندازه‌گیری AMP می‌تواند اطلاعاتی در مورد کانال‌های سدیم و پتاسیم در عصب ارائه دهد. به‌طور حتم میزان AMP با محل و میزان سدیم در کانال‌های موجود در عصب مرتبط است و با استفاده از میزان AMP می‌توان مقدار تخریب و ترمیم آکسون‌ها را مشاهده کرد (Moazami et al., 2013). در این رابطه می‌توان به پژوهش‌های Moazami et al. (2013) و تاجیک و همکاران (۲۰۱۴) اشاره کرد که در هر دو مورد در گروه سلول درمانی در پایان هفته هشتم پس از ترمیم، مقدار AMP به نمونه

نرمال نزدیک شده که این خود بیانگر روند ترمیم عصب آسیب دیده و ترمیم آکسون‌ها می‌باشد.

پژوهش‌ها در زمینه پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC)، نشانگر خواص بازسازی و ظرفیت بسیار بالای تکثیر این سلول‌ها، به عنوان یک گزینه درمانی امیدوار کننده برای بازسازی عصب محیطی است (Bojanic et al., 2020). MSC سلول‌های تمایز نیافته و چند توانی هستند که می‌توانند از مکان‌های متعدد موجود در بدن شامل مغز استخوان، بافت چربی، پالپ دندان، مایع آمنیوتیک و بند ناف برداشته می‌شوند (Bojanic et al., 2020; Ma et al., 2019; Viswanathan et al., 2021).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بند ناف (UCMSC) می‌توانند یک سلول‌های شوان را تولید کنند و قادر به تقویت بازسازی آکسون و بازسازی عملکرد عصب محیطی از این طریق هستند (Wakao et al., 2010).

سلول‌های بنیادی بند ناف، از طریق ساخت و ترشح فاکتور رشد عصب، ترمیم عصبی را بهبود می‌بخشند.

روند ترمیم در گروه سلول درمانی پیشرفت بهتری نسبت به گروه‌های دیگر دارد. Ishii et al. (2017) نیز نشان دادند که با انتقال سلول‌های خون بند ناف به محل عصب قطع شده، ترمیم عصب انجام می‌گیرد و تعداد رشته‌های عصب افزایش پیدا می‌کند.

همچنین در نمودار (۴) این پژوهش نیز میزان سرعت هدایت عصبی (NCV) در گروه سلول درمانی بر روی غشا PLGA (E2) نسبت به گروه‌های دیگر بیش‌تر است و این قابلیت به‌دلیل اثر مثبت غشا PLGA در هدایت سلول بنیادی جهت ترمیم و بازسازی محل عصب است.

از طرفی میزان ترمیم عصب از طریق واکنش گرمایی (HOT PLATE) پای آسیب‌دیده در نمودار ۲ نشان از درک حسی بهتر گروه سلول درمانی بر روی بستر غشا PLGA است که عددی نزدیک‌تر به گروه نرمال را نشان می‌دهد.

براساس داده‌های مقاله‌های مذکور حضور سلول بنیادی بند ناف بر روی غشا PLGA موجب بازسازی عصب سیاتیک و نزدیک‌شدن داده‌ها به گروه طبیعی می‌شود.

غشا PLGA نیز به عنوان یک داربست نقش زیادی در کارایی بهتر سلول‌های بنیادی بند ناف در محل قطع شده دارند.

با توجه به شواهد به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که پیوند سلول خون بند ناف سبب ترمیم عصب سیاتیک قطع شده می‌شود و همچنین داربست غشا PLGA بستر مناسبی جهت اثرگذاری مناسب‌تر سلول‌های خون بند ناف در روند ترمیم عصب سیاتیک دارند که با مطالعات الکتروفیزیولوژی و بررسی رفتاری SFI و بررسی شاخص حسی عصب سیاتیک (Hot Plate) مورد بررسی قرار گرفت.

UCMSC همچنین قادر است به‌طور غیر مستقیم بیان انتقال دهنده‌های عصبی مانند BDNF و نوروتروفین ۳ (NTF3) را افزایش دهد. این دو فاکتور در بازسازی عصبی کمک کند (Li et al., 2024).

در این تحقیق نیز بهبود شاخص عملکرد عصب آسیب دیده در آزمون (SFI) به‌خوبی قابل مشاهده است. در پروژه حاضر شاخص عملکرد حرکتی عصب سیاتیک (sciatic function index) در پایان هفته هشتم بعد از ترمیم در گروه‌های مورد آزمایش مورد ارزیابی قرار گرفت. در پایان هفته هشتم پس از ترمیم، میزان عددی SFI در گروه‌های سلول درمانی در مقایسه با گروه کنترل نشان از روند بهبودی و نزدیک شدن به حالت طبیعی (SFI) در حد فاصل +۱۰ و -۱۰ و گروه نرمال می‌باشد که نشان دهنده ترمیم عصب آسیب دیده توسط سلول‌های بندناف است.

همچنین Gan Zhou et al. (2020) طی پژوهشی تأثیر مثبت سلول‌های خون بند ناف در روند ترمیم عصب سیاتیک و افزایش تعداد آکسون‌ها نسبت به گروه کنترل را نشان دادند. افزایش AMP نشان از ترمیم آکسون‌ها در عصب سیاتیک آسیب دیده می‌باشد که مطالعه بافت‌شناسی و همچنین شمارش تعداد رشته‌های عصبی این مطلب را تأیید می‌کند. در پژوهش حاضر در پایان هفته هشتم پس از جراحی تعداد رشته‌های عصبی در گروه سلول درمانی در مقایسه با گروه کنترل افزایش داشته، اما در مقایسه با گروه نرمال اختلاف معنی‌دار وجود دارد. افزایش تعداد رشته‌های عصبی در پایان هفته هشتم بیانگر روند ترمیم در گروه سلول درمانی نسبت به سایر گروه‌ها می‌باشد. مطالعات رفتاری و الکتروفیزیولوژی نیز این مسئله را تأیید می‌کند که با گذشت زمان

References

- Azadeh Tajik et al. (2014). Effect of non-autologous adipose-derived stem cells transplantation and nerve growth factor on the repair of crushed sciatic nerve in rats. *Journal of Birjand University of Medical Sciences*. 20 (4), 357-365.
- Bateman, E. A., Pripotnev, S., Larocerie-Salgado, J., Ross, D. C., & Miller, T. A. (2024). Assessment, management, and rehabilitation of traumatic peripheral nerve injuries for non-surgeons. *Muscle & Nerve*.
- Bojanic, C., To, K., Zhang, B., Mak, C., & Khan, W. S. (2020). Human umbilical cord derived mesenchymal stem cells in peripheral nerve regeneration. *World journal of stem cells*, 12(4), 288.
- Cao, F. J., & Feng, S. Q. (2009). Human umbilical cord mesenchymal stem cells and the treatment of spinal cord injury. *Chinese medical journal*, 122(02), 225-231.
- Cattin, A. L., & Lloyd, A. C. (2016). The multicellular complexity of peripheral nerve regeneration. *Current opinion in neurobiology*, 39, 38-46.
- Cho, Y. H., & Seo, T. B. (2022). The timing point of exercise intervention regulates neuropathic pain-related molecules in the ipsilateral dorsal root ganglion neurons after sciatic nerve injury. *Journal of exercise rehabilitation*, 18(5), 286.
- Dadon-Nachum, M., Melamed, E., & Offen, D. (2011). Stem cells treatment for sciatic nerve injury. *Expert opinion on biological therapy*, 11(12), 1591-1597.

- Galhom, R. A., Abd El Raouf, H. H. H., & Ali, M. H. M. (2018). Role of bone marrow derived mesenchymal stromal cells and Schwann-like cells transplantation on spinal cord injury in adult male albino rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 108, 1365-1375.
- Gordon, T. (2016). Electrical stimulation to enhance axon regeneration after peripheral nerve injuries in animal models and humans. *Neurotherapeutics*, 13(2), 295-310.
- Guo, W., Imai, S., Yang, J. L., Zou, S., Li, H., Xu, H., ... & Ren, K. (2018). NF-KappaB pathway is involved in bone marrow stromal cell-produced pain relief. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 12, 49.
- Ishii, T., Sakai, D., Schol, J., Nakai, T., Suyama, K., & Watanabe, M. (2017). Sciatic nerve regeneration by transplantation of in vitro differentiated nucleus pulposus progenitor cells. *Regenerative Medicine*, 12(4), 365-376.
- Joyce, N. C., Harris, D. L., Markov, V., Zhang, Z., & Saitta, B. (2012). Potential of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells to heal damaged corneal endothelium. *Molecular Vision*, 18, 547.
- Kerosuo, L., Nie, S., Bajpai, R., & Bronner, M. E. (2015). Crestospheres: long-term maintenance of multipotent, premigratory neural crest stem cells. *Stem cell reports*, 5(4), 499-507.
- Li, C., Luo, Y., & Li, S. (2024). The roles of neural stem cells in myelin regeneration and repair therapy after spinal cord injury. *Stem Cell Research & Therapy*, 15(1), 204.
- Lotfinia, M., Lak, S., Ghahhari, N. M., Johari, B., Maghsood, F., Parsania, S., ... & Kadivar, M. (2017). Hypoxia pre-conditioned embryonic mesenchymal stem cell secretome reduces IL-10 production by peripheral blood mononuclear cells. *Iranian biomedical journal*, 21(1), 24.
- Ma, Y., Dong, L., Zhou, D., Li, L., Zhang, W., Zhen, Y., ... & Wang, X. (2019). Extracellular vesicles from human umbilical cord mesenchymal stem cells improve nerve regeneration after sciatic nerve transection in rats. *Journal of cellular and molecular medicine*, 23(4), 2822-2835.
- Mehrasa, M., Asadollahi, M. A., Ghaedi, K., Salehi, H., & Arpanaei, A. (2015). Electrospun aligned PLGA and PLGA/gelatin nanofibers embedded with silica nanoparticles for tissue engineering. *International journal of biological macromolecules*, 79, 687-695.
- Moazami Goudarzi, M., Azarnia, M., Kaka, G., Sadraei, S. H., & Khatibi Aghda, A. (2013). Study of bone marrow stromal cells, nerve growth factor, and marginal on nerve regeneration in rat crushed sciatic nerve. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, 23(102), 96-105.
- Mobasher, M., Aramesh, K., Ale Davous, S.J., Ashraf Gangoie, N., Divsalar, K., Philips, C.J.C., & Larijani Mohamad Bagher, A. (2008). Proposing A National Ethical Framework for animal research in Iran. *Iranian Journal of Public Health*, 37(1) (supplementary issue on bioethics), 39-46.
- Molina-Gonzalez, I., Holloway, R. K., Jiwaji, Z., Dando, O., Kent, S. A., Emelianova, K., ... & Miron, V. E. (2023). Astrocyte-oligodendrocyte interaction regulates central nervous system regeneration. *Nature Communications*, 14(1), 3372.
- Paskal, A. M., Paskal, W., Pietruski, P., Kusmierczyk, Z., Jankowska-Steifer, E., Andrychowski, J., & Wlodarski, P. K. (2020). Neuroregenerative effects of polyethylene glycol and FK-506 in a rat model of sciatic nerve injury. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 73(2), 222-230.
- Sulaiman, W., & Gordon, T. (2013). Neurobiology of peripheral nerve injury, regeneration, and functional recovery: from bench top research to bedside application. *Ochsner Journal*, 13(1), 100-108.
- Viswanathan, S., Ciccocioppo, R., Galipeau, J., Krampera, M., Le Blanc, K., Martin, I., ... & Ashford, P. (2021). Consensus International Council for Commonality in Blood Banking Automation—International Society for Cell & Gene Therapy statement on standard nomenclature abbreviations for the tissue of origin of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 23(12), 1060-1063.
- Wakao, S., Hayashi, T., Kitada, M., Kohama, M., Matsue, D., Teramoto, N., ... & Dezawa, M. (2010). Long-term observation of auto-cell transplantation in non-human primate reveals safety and efficiency of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in peripheral nerve regeneration. *Experimental neurology*, 223(2), 537-547.
- Wang, Z., & Jia, X. (2023). Treating peripheral nerve injury-induced spinal cord degeneration and neuropathic pain with peripherally administered stem cells. *Neural Regeneration Research*, 18(3), 537-538.
- Xu, X. D., Lin, L., Qiu, Y. B., Zeng, B. W., Chen, Y., Liu, J. L., ... & Zhang, L. C. (2023). Ultrasonic visualization technique for anatomical and functional analyses of the sciatic nerve in rats. *Frontiers in Neuroscience*, 17, 1187669.
- Yu, J. I., Cho, Y. H., Seo, T. B., & Kim, Y. P. (2023). Effect of combined intervention of exercise and autologous bone marrow stromal cell transplantation on neurotrophic factors and pain-related cascades over time after sciatic nerve injury. *Journal of exercise rehabilitation*, 19(1), 19.
- Zainul, Z., Ma, B., Koka, M., Wilkerson, J. L., Ortiz, Y. T., Kerosuo, L., & Chandran, V. (2022). Novel roles of phentolamine in protecting axon myelination, muscle atrophy, and functional recovery following nerve injury. *Scientific Reports*, 12(1), 3344.
- Zhou, G., Chang, W., Zhou, X., Chen, Y., Dai, F., Anwar, A., & Yu, X. (2020). Nanofibrous nerve conduits with nerve growth factors and bone marrow stromal cells pre-cultured in bioreactors for peripheral nerve regeneration. *ACS applied materials & interfaces*, 12(14), 16168-16177.
- Zolfagari, D., Kaka, G., Sadraee, S. S. H., & Herfehdoost, G. (2014). Characterization of bone marrow stromal cell growth on substrate PLGA nanofibers. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, 24(117), 65-73.
- Zou, X., Dong, Y., Alhaskawi, A., Zhou, H., Ezzi, S. H. A., Kota, V. G., ... & Wang, C. (2024). Techniques and graft materials for repairing peripheral nerve defects. *Frontiers in Neurology*, 14, 1307883.