مقاله تحقیقی

بررسی فاکتور رشد عصب، فاکتور رشد شبه انسولینی - ۱ و ژل کلاژن بر رژنراسیون عصب محیطی از طریق مجرای پیزوالکتریک: مطالعه حسی، حرکتی و الکتروفیزیولوژی

✎ غلامحسین فرجاه .Ph.D*، محمدتقی جغتایی .Ph.D*، مهدی مهدی‌زاده .Ph.D*، ملیحه نوبخت .Ph.D*، فریدون لایقی .M.D**
مجتبی عظیمیان .M.D**

* گروه علوم تشریحی دانشگاه علوم پزشکی ایران

** گروه بالینی دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی

تاریخ وصول: شهریور ماه ۸۳، تاریخ پذیرش: آبان ماه ۸۳

چکیده

هدف: محدویت دسترسی به محلهای‌دهنده مناسب برای پیوندعصب، ضرورت تحقیق برای یافتن جانشین مناسب را توجیه می‌نماید.

مواد و روشها: در این تحقیق، تجویز مستقیم فاکتور رشد عصب (NGF: Nerve Growth Factor) فاکتور رشد شبه انسولین ۱ (IGF-I) و ژل کلاژن داخل کانال پلی وینیلیدین فلوراید (PVDF: Polyvinelidene Fluoride) از طریق بریدگی در عصب سیاتیک موش صحرایی مطالعه شد. یک سانتی‌متر از عصب سیاتیک سمت چپ بریده شد و توسط روشهای زیر ترمیم شد. گروه اول (NGF+IGF-I, n=۱۲)، لوله PVDF با (۱۰۰ نانوگرم) NGF و (۱۰۰ نانوگرم) IGF-I در ۰/۳ml بافر فسفات سالین یا PBS ؛ گروه دوم (Collagen gel, n=۱۲) لوله PVDF با ژل کلاژن (به غلظت ۱/۲۸ mg/ml در PBS)؛ گروه سوم (NGF+IGF-I+collagen gel, n=۱۲)، لوله PVDF پر شده با (۱۰۰ نانوگرم) NGF، (۱۰۰ نانوگرم) IGF-I و ژل کلاژن (به غلظت ۱/۲۸ mg/ml در PBS) ؛ گروه چهارم (Autograft, n=۱۲) و گروه پنجم (sham, n=۱۲). همه حیوانات در روزهای ۷، ۲۱، ۳۵، ۴۹، ۶۰ و ۹۰ بعد از جراحی توسط تستهای حسی، حرکتی (SFI: Sciatic Functional Index) و در روز ۹۰ به‌وسیله الکتروفیزیولوژی ارزیابی شدند.

یافته‌ها: تستهای حسی در روز ۳۵، نشان می‌دهند میانگین تاخیر پاسخ به تحریکات دردناک در گروه سوم (۵/۸±۲/۱ ثانیه) از لحاظ آماری به‌طور معنی‌داری ($p<0.005$) کمتر از گروههای اول (۹/۲۴±۲/۷ ثانیه) و دوم (۱۱/۹۸±۸/۱۱ ثانیه) است، و این نشان می‌دهد که بازگشت حسی در موشهایی که NGF, IGF-I و ژل کلاژن دریافت کرده بودند، بالاتر است. میانگین تاخیر پاسخ گویی در گروه چهارم (۷/۴۷±۲/۲۱ ثانیه) است، و از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری بین گروههای سوم و چهارم مشاهده نشد. در روز ۹۰ اختلاف معنی‌داری از لحاظ تاخیر پاسخ به تحریکات دردناک حسی در گروههای آزمایشی مشاهده نشد. میانگین SFI، ۶۰ روز پس از جراحی در گروههای سوم (۶۶±۵/۹-) و چهارم (۶۸±۶/۱-) بالاتر از گروه اول (۷۳/۲±۸/۹-) و دوم (۷۴±۷/۱۱-) است ($p<0.01$). میانگین سرعت هدایت عصب حرکتی (MNCV: Motor Nerve Conduction Velocities)، ۲۴±۱/۶۳، ۱۹/۷±۴/۳ ، ۳۲±۴/۴۷ و ۲۹/۶+۵/۰۷ متر بر ثانیه به ترتیب در گروههای اول تا چهارم است. اختلاف بین گروههای اول، سوم و چهارم معنی‌دار نیست، ولی میانگین MNCV گروه دوم به طور معنی‌داری از گروه سوم کمتر است ($p<0.002$).

نتیجه‌گیری: این مطالعه پیشنهاد می‌کند که با توجه به آثار مثبت NGF , IGF-I و ژل کلاژن روی رژنراسیون عصب از طریق کانال PVDF، ممکن است، برای ترمیم ضایعات عصب محیطی مفید باشند.

کلید واژه‌ها: فاکتور رشد عصب، فاکتور رشد شبه انسولین-۱، کلاژن، کانال پلی وینیلیدین فلوراید، رژنراسیون آکسون

✎ آدرس مکاتبه : تهران، دانشگاه علوم‌پزشکی ایران، گروه علوم تشریح،
صندوق پستی ۶۱۸۳-۱۴۱۵۵ Email:hfarjah@hotmail.com

مقدمه

قطع عصب و روش ترمیم آن از دیرباز مورد توجه دانشمندان بوده است. طبق نوشته‌های موجود ابن سینا اولین فردی بود که دو سر عصب قطع شده را بخیه نمود. والر (Waller) تعریف کلاسیک تحلیل یا دژنرسانس آکسون را ارایه نمود و نتیجه گرفت که برای ارزیابی حسی و حرکتی، دو سر قطع شده عصب را باید به هم متصل نمود و اگر فاصله بین آنها زیاد باشد، باید از اتوگرافت عصب یا عروق خونی (ورید) استفاده شود [۱]. پیوند اتوگرافت در حال حاضر به عنوان روش طلایی[1] برای ترمیم شکاف عصبی به‌کار می‌رود، ولی برداشتن عصب از ناحیه دهنده ایده‌آل نبوده و ممکن است سبب اختلالات حسی در نواحی از پوست بیمار شود، همچنین ترمیم عملکردی کامل براین اساس نادر است و ناحیه دهنده مناسب محدود است [۲ و ۳]. در سال ۱۶۰۸ کوششهای اولیه برای ترمیم عصب انجام گرفت. در قرن ۱۹ تلاش مجدد برای بهبود ترمیم عصب و استفاده از مواد گوناگون مانند ورقه‌های چربی، استخوان، فلز، غضروف ..... به‌کار رفت. تکنیکهای میکرو جراحی در سال ۱۹۶۰ ابداع شد. تحقیقات نشان می‌دهد که در ترمیم عصب مدیان به روش اتوگرافت در ناحیه مچ دست کمتر از ۳-۱درصد بهبودی حسی نرمال در ۵-۳ سال بعد از ترمیم به‌دست می‌آید. بهبودی حرکتی نتایج بهتری نسبت به حسی‌دارد، به طوری که کمتر از ۲۵ درصد بیماران بهبودی حرکتی طبیعی را بعد از ترمیم به‌دست می‌آورند. در ترمیم عصب مدیان در نواحی پروگزیمالتر (بالای ساعد یا بازو) هیچ بیماری به طور کامل حس طبیعی را به‌دست نمی‌آورد و کمتر از ۲ درصد بهبودی کامل حرکتی دارند [۴]. برای بیشتر از یک قرن تحقیقات زیادی برای یافتن روشهای ترمیم ضایعات اعصاب محیطی انجام گرفته است. در حال حاضر روش رضایت‌بخشی برای رژنراسیون اعصاب محیطی برای رسیدن به شرایط و فعالیتهای در حد طبیعی وجود ندارد [۵].

در نتیجه تلاش مشترک بین پزشکان، مهندسین و بیولوژیست‌ها، کانالهای راهنمای عصب (NGCs)[2] طراحی و ساخته می‌شوند. NGCs مجاری طبیعی یا مصنوعی هستند که به‌عنوان پلی برای ترمیم شکاف بین دو انتهای بریده عصب به کار می‌روند و می‌توانند به عنوان جانشین مناسب برای اتوگرافت عصب استفاده شوند. NGCs دارای مزایایی از جمله قدرت سازگاری، کاهش آثار سمی تا حد امکان، تقویت فعالیت سلولهای شوان و آکسونهای عصب در جریان رژنراسیون و به حداقل رساندن نفوذ بافت فیبروزی هستند، و از انحراف آکسونهای رژنراسیون شده به بافتهای اطراف جلوگیری می‌کنند. با این حال ممکن است سبب بروز پاسخ ایمنی ناخواسته شوند و امکان کلاپس مجرا نیز وجود دارد [۱ و ۶]. کاهش کشش خط سوچور، افزایش مواد اندروژن و حفظ آنها، انتخاب عبور ماکرومولکولها و نیاز به تعداد کم سوچور اپی‌نوریال از دیگر مزایای NGCs هستند [۴]. NGCs می‌توانند از مواد طبیعی (ورید، کلاژن)، مواد مصنوعی غیرقابل جذب (سلیکون)، مواد مصنوعی قابل جذب (پلی اوراتال) و مواد فعال الکتریکی (پیروالکتریک) ساخته شوند. خواص فیزیکی این کانالها بر کیفیت و اندازه رژنراسیون تاثیر دارد [۶]. پلی وینیلیدین فلوراید (PVDF) یک فلوروپلیمر سمی کریستالین با فرمول شیمیایی $[CH\text{-}CF2]n$ است که کشش سبب تغییر در زنجیر پلی مری آن شده و این امر موجب تولید شارژ سطحی می‌شود [۷ و ۸]. به این گونه مواد، پیزوالکتریک می‌گویند، که نقش مهمی در تمایز و تحریک انواع سلولها از جمله سلول شوان و رشد آکسون دارد [۹]. PVDF به راحتی به شکل یک کانال که حاوی قطر مطلوب است در می‌آید [۶]. ابعاد کانال خیلی مهم است، اگر ابعاد خیلی کوچک باشد عصب در هنگام ورود به داخل آن صدمه می‌بیند و اگر خیلی بزرگ باشد سبب نفوذ فیبروبلاست‌ها به داخل کانال شده و انتشار فاکتورهای حیاتی نوروتروفیک و نوروتروپیک به خارج کانال تسهیل می‌شود [۹]. PVDF به راحتی قابل استفاده و استریل شدن است و تا حدودی انعطاف‌پذیر است. قابلیت نگهداری شکل خود را در طول رژنداسیون دارد و در مقابل کلاپس (انسداد کانال) در هنگام جاگذاری مقاوم است غیر سمی، بدون آنتی ژن و غیر سرطانزا است، همچنین رشد آکسون را تحریک نموده و استحکام کافی برای نگهداری سوچور دارد [۶]. نیمه تراوایی کانال سبب انتشار مواد غذایی، گازها و فاکتورهای رشد مفید به داخل مجرا شده و از نفوذ

1. Golden Standard
2. Nerve Guidance Channels

ماکرومولکولهای مهارکننده جلوگیری می‌کند [۷ و ۹]. تحقیقات نشان می‌دهد که رژنراسیون در کانالهای نیمه تراوا نسبت به کانالهای سلیکون (غیر قابل نفوذ) نتایج بهتری دارد [۶].

ابی‌شر (Aebischer) و همکارانش پیشنهاد نمودند که با استفاده از جریان ولتاژ قوی، مولکولهای PVDF را می‌توان قطبی نمود و کانال PVDF قطبی نسبت به غیر قطبی آن، سبب بهبودی بیشتری در افزایش کمی و کیفی رژنراسیون عصب محیطی می‌شود [۸]. فاین (Fine) و همکارانش نشان دادند که لوله‌های قطبی شده PVDF نسبت به تغییرات مکانیکی حساس‌تر هستند و به‌طور معنی‌داری حتی در تغییرات کم فیزیکی، شارژ سطحی تولید می‌کنند. همچنین اعصاب ایجاد شده در لوله‌های قطبی شده مثبت به‌طور معنی‌داری نسبت به لوله‌های قطبی منفی یا غیر قطبی، تعداد آکسون میلین‌دار و ضخامت میلین بیشتری دارد و سطح مقطع عصب نیز بزرگتر است [۱۰]. از آنجایی‌که خواص شیمیایی، فیزیکی و الکتریکی NGCs روی رژنراسیون تاثیر دارد [۷]، بنابراین PVDF می‌تواند به عنوان جانشین مناسب برای جراحیهای ترمیمی اعصاب محیطی به کار رود [۲]. ماتریکس سه بعدی داخل کانال و نیز وجود فاکتورهای رشد عصب (که به طور طبیعی از سلولهای شوان ترشح می‌شوند) در رشد آکسونها تاثیر مهمی دارند [۹]. ماتریکس داخل مجرا همانند کلاژن، با ایجاد سطح اختصاصی برای اتصال آکسون در حال رشد، رژنراسیون آکسون را تسریع می‌نماید [۱۱].

غلظت ماتریکس اهمیت فراوانی دارد، زیرا غلظت زیاد آن موجب جلوگیری از رشد آکسون می‌شود و غلظت کم آن تاثیر چندانی ندارد. لابرادور (Labrador) و همکارانش با تحقیق در مورد غلظتهای مختلف ژل کلاژن برای رژنراسیون عصب محیطی، پیشنهاد نمودند که غلظت ۱/۲۸ mg/ml کلاژن محلول در بافر فسفات سالین ۰/۱ مولار نتایج بهتری نسبت به غلظتهای کمتر یا بیشتر از آن نشان می‌دهد [۱۲]. در صورتی که از ماتریکس سه بعدی در داخل مجرا استفاده می‌نماییم، سطح دیواره مجرا (صاف یا خشن) روی رژنراسیون اهمیت نخواهد داشت [۶]. مولکولهای ماتریکس خارج سلولی یک سوبسترای مناسب برای رشد آکسون ایجاد می‌نمایند [۱۳]. یوشی (Yoshii) و همکارانش نشان دادند که فیلامانهای کلاژن به‌عنوان راهنمایی برای رشد آکسون، به دنبال رژنراسیون عصب سیاتیک هستند [۱۴]. ترشح مواد شیمیایی از انتهای دیستال عصب آسیب دیده سبب رژنراسیون انتهای پروگزیمال آکسون می‌شود. رژنراسیون عصب در امداد مسیرهای فیزیکی انجام می‌گیرد و مجاری نسبت به فاکتورهای رشد اهمیت بیشتری دارند [۴]. فاکتور رشد عصب (NGF) در نورون، عضله و غدد، توسط سلولهای اپی‌تلیال، عضله صاف، فیبروبلاست‌ها و شوان تولید می‌شود [۱۵]. NGF در نورون توسط استروما، دندریتها و انتهای آکسون ترشح می‌شود. سلولهای شوان علاوه بر NGF، فاکتور رشد شبه انسولینی -۱ را ترشح می‌کنند. در سیستم اعصاب محیطی، NGF روی رشد اعصاب حسی، درد و سمپاتیک و IGF-I روی رشد اعصاب سمپاتیک، حسی، حرکتی و عضله اثر می‌گذارند [۳ ، ۱۱ و ۱۶]. NGF به‌طور مستقیم مکانیسم آنابولیک نورون را تنظیم می‌نماید و در طویل شدن آکسون اهمیت دارد، سبب زنده ماندن سلولهای سمپاتیک و حسی جنین شده و طویل شدن نوریت آنها را تسریع می‌کند؛ همچنین برای تکامل اولیه نورونهای حسی ریشه پشتی نخاع و سمپاتیک ضروری است. NGF به مقدار زیاد در سلولهای شوان اعصاب آسیب دیده نزدیک به محل ضایعه دیده می‌شود [۱۷]. IGF-I جوانه زدن آکسون و طویل شدن آن را تسریع می‌کند [۶]. به کار بردن موضعی IGF-I ممکن است میزان رشد آکسونهای حسی [۱۵] و حرکتی آسیب دیده عصب سیاتیک موش صحرایی را افزایش دهد و از مرگ نورونها جلوگیری نماید و ممکن است بازسازی مجدد سیناپس‌ها را پشتیبانی کند [۱۸]. اگر چه NGF برای زنده ماندن نورونهای گانگلیون پشتی نخاع ضروری نیست ولی برای تسریع رشد نوریت آنها در محیط کشت لازم است [۱۹]. NGF سلولهای شوان را تحریک نموده و تشکیل باند Bungher را پس از صدمه اعصاب محیطی در مدل حیوانی تسریع می‌نماید [۲۰]. ونگ (wang) و همکارانش با اضافه کردن یک دوز منفرد از NGF مشاهده نمودند که تعداد و ضخامت آکسونها افزایش می‌یابد [۲۱]. اگر چه فاکتورهای رشد عصب موجب تسریع روند رژنراسیون می‌شوند، هنگامی که ترکیبی از NGF , IGF-I استفاده شود، رژنراسیون آکسونهای

صدمه دیده نسبت به استفاده مجزای آنها افزایش بیشتری پیدا می‌کند [۲۲]. همچنین در روند رژنراسیون عصب، فاکتورهای مختلفی مثل سن، نوع ضایعه [۲۳] و اندازه شکاف بین دو انتهای بریده عصب [۲۴] روی نتایج عملکردی ترمیم اعصاب محیطی تاثیر دارند. عصب سیاتیک حیوان آزمایشگاهی موش صحرایی بزرگترین عصب محیطی است که قطر متوسط آن در حیوان بالغ ۱/۵ میلی‌متر است و غالباً در کارهای تحقیقاتی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۰]. فاکتورهای رشد عصب، ماتریکس سه بعدی (ژل کلاژن) و خاصیت پیزوالکتریک کانال PVDF هر یک به تنهایی موجب افزایش رژنراسیون اعصاب محیطی می‌شوند و بررسیهای انجام شده توسط نویسندگان مقاله حاضر، نشان می‌دهد که گزارشی مبنی بر استفاده توام آنها تاکنون ارایه نگردیده است. بنابراین مقصود از این تحقیق ارزیابی رژنراسیون عصب سیاتیک توسط روشهای عملکردی، حسی و الکتروفیزیولوژی با استفاده از کانال PVDF، فاکتورهای رشد عصب (NGF+IGF-I) و ژل کلاژن در مقایسه با روش اتوگرافت است.

مواد و روشها

۶۰ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد Sprague-Dawely به وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم به پنج گروه دوازده تایی به طور مساوی و تصادفی تقسیم شد. موشها توسط ماده بیهوشی کتامین (Ketamin) (۹۰mg/kg) و Xylazine (۱۰mg/kg) به صورت داخل صفاقی بیهوش شدند. در صورت نیاز، دوز بیهوشی در حین عمل جراحی تکرار شد. پس از تراشیدن موی پای چپ حیوان و برش پوست ناحیه خلفی خارجی ران، عصب سیاتیک چپ در فاصله بین حفره پوپلیتئال و خار ایسکیال به اندازه ۱۰ میلی‌متر قطع شد. در گروه اول، دوم و سوم از لوله PVDF (Harvard Apparatus, Ltd) استریل شده، با قطر داخلی ۱/۶mm و طول ۱۴mm برای ترمیم شکاف ایجاد شده استفاده شد. دو انتهای بریده عصب به‌صورت تلسکوپی داخل لوله قرار داده شد و با نخ نایلون ۰-۱۰ به دیواره لوله سوچور زدیم. به منظور تسهیل در سوچور زده شد، سوراخ کوچکی به اندازه ۲۰۰ میکرومتر در فاصله یک میلی‌متری هر انتهای لوله تعبیه شد. در گروه اول NGF 7S و IGF-I (Roche) هر کدام به مقدار ۱۰۰ نانوگرم در محلول بافر فسفات سالین ۰/۱ مولار، گروه دوم ژل کلاژن (Roche) که حاوی کلاژن I , III است و به غلظت ۱/۲۸mg/ml رقیق شده در محلول بافر فسفات سالین ۰/۱ مولار، گروه سوم، NGF، IGF-I (هر یک 100ng) و کلاژن (به غلظت 1/28mg/ml) توسط یک سرنگ ۵۰ میکرولیتری قبل از محکم نمودن سوچور اپی نوریال به داخل لوله PVDF تزریق شد. محلول کلاژن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بدن حیوان به ژل تبدیل می‌شود. در گروه چهارم عصب سیاتیک به اندازه ۱۰ میلی‌متر قطع شده و قطعه بریده شده ۱۸۰ درجه جابه جا شد و به‌صورت اتوگرافت به دو انتهای بریده عصب سوچور شد. گروه پنجم به عنوان شاهد (sham) است که پس از بیهوشی داخل صفاقی، عصب سیاتیک نمایان شد ولی قطع نشد. بخشهای بریده عضله و پوست حیوان با اتیکون ۰-۵ سوچور زده شد. تمام مراحل فوق در زیر میکروسکوپ جراحی با بزرگنمایی ۲۰× و تحت شرایط استریل انجام شد. موشها به مدت ۲۴ ساعت بعد از جراحی در قفس هوای گرم قرار داده و سپس در وضعیت عادی نگهداری شدند. آب، غذا، دما و رطوبت برای همه آنها یکسان بود. حیوانات در سیکل ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی کنترل شده نگهداری شدند. به منظور استریل نمودن لوله PVDF، آن را در متانول ۱۰۰ درصد و بعد از خشک کردن به مدت یک ساعت در اتانول ۷۰ درصد گذاشته شد و قبل از استفاده با بافر فسفات سالین ۰/۱ مولار شستشو داده شد [۱۰].

روش قطبی نمودن PVDF

میله فلزی به قطر ۱/۶ میلی‌متر را که به‌عنوان الکترود داخلی محسوب می‌شود و به زمین اتصال دارد، داخل مجرا و الکترود خارجی که با سطح خارجی با سطح خارجی لوله تماس دارد، به قطب مثبت منبع تولید کننده ولتاژ مرتبط شد. ولتاژ به تدریج در مدت ۲ ساعت تا ۲۱ کیلوولت بالا برده شد و به مدت ۱۲ ساعت در این حالت نگهداری شد [۱۰]. به‌منظور ارزیابی رژنداسیون عصب از تستهای حسی، حرکتی و الکتروفیزیولوژی استفاده شد.

تست حسی

موشها در روزهای ۷، ۲۱، ۳۵، ۶۰ و ۹۰ بعد از جراحی تحت بررسی حسی قرار داده شد. برای این کار حیوان در بالای ظرف آب گرم ۵۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد و پای سالم حیوان نزدیک بدنش قرار گرفت و پای جراحی شده در ظرف آب فرو برده شد؛ به طوری که کف پای حیوان با کف ظرف در تماس باشد. زمان بین شروع تماس و بیرون کشیدن پا از آب ثبت شد. این آزمایش سه بار هر دفعه با فاصله ۳۰ ثانیه تکرار شد و میانگین آنها محاسبه شد. آزمایش برای پای سالم حیوان تکرار شد و اجازه داده نشد که پای هیچ حیوانی بیش از ۲۰ ثانیه در آب ۵۰ درجه سانتیگراد باقی بماند.

تست حرکتی

در روزهای ۷، ۲۱، ۳۵، ۶۰ و ۹۰ پاهای عقب موش با جوهر (Stamp pad) رنگی شد، سپس اجازه داده شد که روی کاغذ سفیدی که در کف راهرویی به ابعاد ۲۵×۲۵×۱۳۰ سانتیمتر قرار دارد و در انتها به‌اتاقک تاریکی منتهی می‌شود، راه برود. برای تمرین موشها، آزمایش سه بار تکرار شد. سپس Sciatic Functional Index (SFI) را بر اساس فرمول زیر برای پای جراحی شده و پای سالم محاسبه شد [۲۵ و ۲۶]:

$$SFI= -38.3(\frac{EPL-NPL}{NPL})+109.5(\frac{ETS-NTS}{NTS})+13.3(\frac{EIT-NIT}{NIT})-8.8$$

طول کف پا (PL)[1] طول اثر کف پا در سمت آزمایش (Experimen tal side) و سمت نرمال (Normal side) بر حسب میلی‌متر

فاصله بین انگشتان ۱ و ۵ (TS)[2] خطی که فاصله بین مرکز انگشت پنجم را به مرکز انگشت اول متصل می‌کند (بر حسب میلی‌متر).

فاصله بین انگشتان ۲ و ۴ (IT)[3] خطی که فاصله بین مرکز انگشت دوم را به مرکز انگشت چهارم متصل می‌کند (بر حسب میلی‌متر).

الکتروفیزیولوژی

در آخر هفته دوازده، موشها از طریق داخل صفاقی کاملاً بیهوش شد. در طول دوره بیهوشی دمای بدن موشها با استفاده از لامپ حرارتی کنترل شد. پس از برش پوست و بافتهای عضلانی، عصب سیاتیک در سمت جراحی و سمت کنترل مشاهده شد. سپس الکترود دو کفه‌ای استیمولاتور روی تنه عصب سیاتیک (بالاتر از محل ضایعه عصبی) قرار داده شد. برای ثبت تغییرات پتانسیلی ناشی از تحریک (Toennies, Duoliner, England) نیز الکترود سوزنی دو قطبی استریل به آرامی داخل عضله گاستروکنمیوس، یک سانتی‌متر زیر تکمه تیبیا فرو برده شد. برای ثابت نگه داشتن فاصله بین الکترودهای سوزنی و کفه‌ای، طول مسیر در هر مورد به دقت اندازه‌گیری شد. شاخه پرونئال مشترک عصب سیاتیک به منظور پیشگیری از سیگنالهای هدایتی خارجی، قطع شد. پس الکترومیوگرافی عضله در حالت استراحت، سرعت هدایت عصب حرکتی و حسی (MNCV, SNCV)[4] و دامنه پتانسیل فعالیت (Amplitude) برای بررسی و تجزیه و تحلیل ثبت شد. سپس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS به‌وسیله آزمونهای آماری *t*-test , ANOVA مقایسه و بررسی شدند.

یافته‌ها

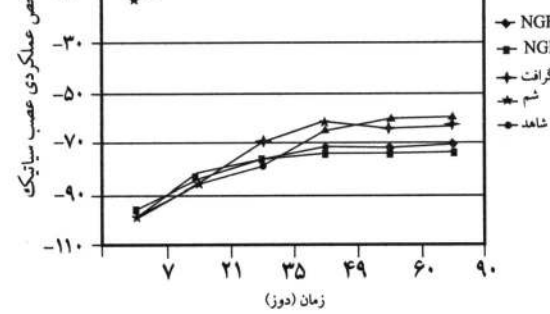
تست حسی

میانگین تاخیر پاسخ حسی پای نرمال، به تحریک حرارتی دردناک ۰/۹±۲/۲ ثانیه بود. تاخیر حسی عصب سیاتیک در گروههای ترمیم شده با لوله PVDF و اتوگرافت به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود ($p<0.001$). در هفته پنجم، اختلاف میانگین پاسخ گویی به تحریک حرارتی دردناک در گروه سوم (۲/۱±۵/۸۶) نسبت به گروه اول (۲/۷±۹/۲۴) و دوم (۳/۱۱±۱۱/۹۸) از لحاظ آماری معنی‌دار است ($p<0.005$). اگر چه میانگین تاخیر پاسخ به تحریکات حسی در گروه سوم کمتر از گروه چهارم (۲/۲۱±۷/۴۷) است ولی این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نیست ($p=0.08$). در آخر هفته دوازدهم هم هیچ اختلاف معنی‌داری بین گروههای آزمایشی اول تا چهارم مشاهده نشد ($p=0.07$) ولی در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار بود ($p<0.003$).

1. Foot Print Length
2. Total spreading
3. Intermediary Toes
4. Motor and Sensory Nerve Condultion Velocity

تست حرکتی

بعد از قطع عصب سیاتیک هیچ کدام از حیوانات توانایی راه رفتن روی کف پای آسیب دیده را نداشتند. توانایی راه رفتن در پای جراحی شده از هفته سوم شروع شد. به هر حال برگشت به حالت طبیعی (SFI=±11) در هیچ حیوانی مشاهده نشد. کف پاهای عقب موشها را با جوهر رنگی نموده، سپس اجازه داده شد که روی کاغذ سفیدی راه بروند (شکل ۱). با اندازه‌گیری طول کف پا، فاصله بین انگشتان ۱-۵ و فاصله بین انگشتان ۲-۴، مقدار SFI را براساس فرمول Bain و همکاران (۱۹۸۹) محاسبه شد (شکل ۱) [۲۵]. تا انتهای هفته پنجم از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری بین گروههای آزمایشی مشاهده نشد (p=0.06). از هفته پنجم به بعد مقدار SFI در گروههای سوم و چهارم به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروههای اول و دوم بود (p<0.026)، ولی اختلاف معنی‌داری بین گروههای سوم و چهارم مشاهده نشد (نمودار ۱).



نمودار ۱. مقادیر SFI در روزهای مختلف در گروههای آزمایش. SFI در گروه سوم (فاکتور رشد و کلاژن) به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه اول (فاکتور رشد) و گروه دوم (کلاژن) است (p<0.011 : ✱)

افزایش SFI تا هفته دهم مشاهده می‌شود و پس از آن تقریباً ثابت می‌ماند در هفته دهم میانگین SFI، در گروههای اول تا چهارم به ترتیب ۸/۹±۷۴-، ۷/۱۱±۷۶-، ۱۱/۶±۶۶-، و ۶±۶۸- است. اختلاف میانگین SFI در گروه سوم نسبت به گروههای اول و دوم از لحاظ آماری معنی‌دار است (p<0.011) ولی اختلاف معنی‌داری بین گروههای سوم و چهارم مشاهده نشد (p=0.05) در آخر هفته ۱۲، از کلیه موشها الکترومیوگرافی به عمل آمد که علایمی دال بر بی‌عصب بودن (Denervation) مشاهده نشد. این نتیجه نشانه برقراری ارتباط عصب با عضله است و سالم بودن راه عصبی است. میانگین سرعت هدایت عصبی حرکتی و حسی عصب سیاتیک نرمال به ترتیب ۲/۷±۴۵، ۱/۷±۴۱/۵ متر بر ثانیه است. در هفته دوازده، میانگین MNCV برای گروههای اول تا چهارم به ترتیب ۱/۶۳±۲۴ ، ۴/۳±۱۹/۷ ، ۴/۴۷±۳۲، ۵/۰۷±۲۹/۵ متر بر ثانیه است. اختلاف بین گروه دوم و سوم از لحاظ آماری معنی‌دار است (p<0.001). همچنین اختلاف بین گروههای آزمایشی و اتوگرافت با گروه شاهد (۱/۲۹±۴۴/۵) و کنترل معنی‌دار است (p<0.003). اگر چه میانگین سرعت هدایت حرکتی در گروه سوم بالاتر از گروههای اول و چهارم بود ولی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (p=0.07). در هفته دوازدهم میانگین سرعت هدایت حسی در گروه سوم و چهارم بالاتر از گروههای اول و دوم است، ولی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (p=0.08). میانگین دامنه (Amplitude) پتانسیل حرکتی عضله برای سمت کنترل ۱/۳۵±۹/۴۲ و برای گروههای اول تا پنجم به ترتیب ۱/۸۴±۳/۶ ، ۰/۲۳±۶/۰۸ ، ۱/۳۱±۹/۳۴ ، ۱/۳۱±۵/۳۴ ، ۰/۹۸±۴/۹۵ میلی‌ولت است. اختلاف بین گروه سوم باگروههای اول و دوم از لحاظ آماری معنی‌دار است. (p<0.02).

بحث

اگر چه پیوند اتوگرافت در حال حاضر به عنوان روش طلایی برای ترمیم شکاف عصبی به کار می‌رود ولی ترمیم عملکردی کامل نادر است [۲و ۳]. NGCs مزایای زیادی دارند و می‌توانند به عنوان جانشین اتوگرافت استفاده شوند. فقدان یک روش استاندارد و شناخت ناکافی اصول مکانیسمهای رژنراسیون عصب از جمله دلایل قصور در تحقیقات NGCs است. به‌عنوان مثال اندازه شکاف ایجاد شده در عصب محیطی، خواص فیزیکی و شیمیایی NGCs به کاربرده شده، خصوصیت ماتریکس داخل لوله، ترکیب فاکتورهای رشد عصب که به داخل لوله اضافه می‌شوند، یا تحت فشار قرار دادن عصب (بدون ایجاد شکاف در آن) بر میزان رژنراسیون تاثیر دارند و با

توجه به روشهای مختلف ارزیابی مقایسه بین تحقیقات انجام شده توسط محققین مختلف، سخت و دشوار است. تنه عصب سیاتیک در موش صحرایی تقریباً ۱/۵ سانتی‌متر طول دارد و در تحقیق با شکاف بیش از ۱ سانتی‌متر، امکان انجام میکرو آناستوموز مشکل است [۳]. در بسیاری از تحقیقات انجام شده اندازه شکاف عصبی کمتر از ۱ سانتی‌متر در نظر گرفته می‌شود، که این امر روی نتایج حاصل از تحقیق بسیار موثر است.

ابیشر (Aebischer) و همکاران (۱۹۸۷) پیشنهاد نمودند که منابع الکتریکی، فاز اولیه طویل شدن رشته‌های میلین را تسریع می‌کنند [۸]، ولی مکانیسم آن تاکنون مشخص نشده است [۱۰]. خاصیت نیمه تراوایی کانال PVDF [۷ و ۹] و فعالیت الکتریکی، نقش مهمی در رژنراسیون عصب موجود زنده دارد [۸]. کاربرد PVDF قطبی شده بر رژنراسیون اعصاب محیطی مفید است. از بین رفتن کشش خط سوچور و رگ سازی دو فاکتور مهم در رژنراسیون عصب به شمار می‌روند. به کارگیری NGCs، کشش سوچور جراحی را به حداقل می‌رساند و استفاده از IGF-I رگ سازی را تحریک می‌نماید [۲۷]. فاکتورهای رشد سبب کامل کردن دژنرسانس والدین دیستال به محل ضایعه نیز می‌شوند. NGF پروتئین بزرگی است که شامل سه زیر واحد است: زیر واحد B فرم فعالش است و نقش مهمی در تمایز، نگهداری و زنده ماندن نورونهای حسی و سمپاتیک در جریان تکامل و بلوغ دارد [۳]. چن (Chen) و همکاران (۱۹۹۵) پس از تحت فشار قرار دادن عصب سیاتیک موش صحرایی، از محلول NGF به مقدار ۱ میلی‌گرم به‌طور موضعی برای تسریع در روند رژنراسیون استفاده نمودند و میانگین تاخیر پاسخ حسی دردناک را در هفته پنجم بعد از ضایعه (۳±۵/۱ ثانیه) گزارش کردند [۲۸]. نتایج چاپ شده از تحقیقات نشان می‌دهد که ترکیب NGF و IGF-I پاسخ بهتری نسبت به استفاده مجزای آنها دارد [۲]. در تحقیق حاضر، پس از ایجاد شکاف ۱ سانتی‌متری در عصب سیاتیک و استفاده از لوله PVDF قطبی شده حاوی IGF-I, NGF، میانگین پاسخ حسی دردناک در هفته پنجم (۲/۷±۷/۲ ثانیه) است، که در مقایسه با سایر روشهای ترمیم و اتوگرافت عصب، نتایج بهتری را نشان می‌دهد. پی‌یو (PU) و همکاران (۱۹۹۸) از ورید فمورال موش صحرایی برای ترمیم شکاف ۱ سانتی‌متری عصب سیاتیک استفاده نمودند (پیوند اتوگرافت) و پس از تزریق NGF به داخل ورید میانگین پاسخ حسی دردناک را در هفته پنجم پس از جراحی در مقایسه با پیوند اتوگرافت عصب به ترتیب ۲±۵/۱، ۲/۴±۷ ثانیه گزارش کردند [۳]. اگرچه استفاده از ورید برای پیوند عصب نتایج بهتری نشان می‌دهد و عقیده دارند که سلولهای دیواره ورید، NGF ترشح می‌نمایند ولی برداشتن ورید هم قطر عصب سیاتیک از بدن بیمار برای پیوند اتوگرافت غیرممکن است و علاوه بر افزایش هزینه، با محدودیتهای جراحی نیز همراه است. در تحقیق حاضر نیز هنگامی که از ژل کلاژن به تنهایی در داخل لوله PVDF استفاده نمودیم سرعت هدایت عصبی حسی و حرکتی با گروه اتوگرافت برابر نبود که این امر نشان می‌دهد ضخامت قطر آکسون و غلاف میلین در گروه اتوگرافت بیشتر است. ولی هنگامی که فاکتورهای رشد IGF-I و NGF به ژل کلاژن اضافه شد (گروه سوم)، میانگین تاخیر پاسخ حسی دردناک در هفته پنجم به ۲/۱±۵/۸۶ ثانیه کاهش یافت. اگر چه ترمیم رژنراسیون اعصاب صدمه دیده توسط آزمونهای عملکردی حسی دردناک، الکتروفیزیولوژی و هیستولوژی میسر است ولی اهمیت بهبودی عملکردی مهمتر از سایر روشها است. این مهم در انسان به راحتی امکان‌پذیر است ولی در حیوانات بسیار مشکل است. ارزیابی حسی دقیق نیست و به دلیل هم پوشانی عصب‌دهی و غیرمستقیم بودن، از اعتبار کمتری نسبت به سایر روشهای ارزیابی برخوردار است [۲۹]. چن (Chen) و همکاران (۱۹۹۵) پیشنهاد نمودند که از عضله طبیعی بدون عصب و نیز در عضلات جنینی یک فاکتور رشد عصب حرکتی (MNGF) ترشح می‌شود، ولی مکانیسم عمل آن هنوز به طور کامل روشن نیست [۲۹]. تحقیقات نشان می‌دهد که NGF میزان MNCV را به‌صورت معنی‌داری افزایش می‌دهد [۵].

IGF-I نقش مهمی در نگهداری نورونهای اعصاب محیطی در موش صحرایی بالغ دارد. گیرنده IGF-I روی بافت عصبی وجود دارد. تجویز IGF-I سبب افزایش میزان رشد رژنراسیون عصب سیاتیک بعد از ضایعه می‌شود [۲۷]. مطالعات نشان می‌دهد که سلولهای غیر نورونی در اعصاب محیطی همانند شوان برای IGF دارای گیرنده هستند، که ممکن است تکثیر آنها

را در هنگام رژنراسیون عصب محیطی کنترل نمایند [۳۰]. IGF-I به طور موضعی در محل ترومای عصب محیطی تجمع می‌یابد و غلظت مناسب آن رژنراسیون را تقویت می‌کند [۲۸ و ۳۱]. کاپلان (Caplan) و همکاران (۱۹۹۱) پیشنهاد نمودند که IGF-I سبب افزایش رژنراسیون آکسون در آسیب عصب سیاتیک می‌شود [۳۲].

تحقیق حاضر نشان می‌دهد که استفاده توام IGF-I و NGF رژنراسیون آکسون را افزایش می‌دهد و هنگامی که ژل کلاژن به محیط اضافه می‌شود، SFI نسبت به گروه بدون ژل کلاژن به طور معنی‌داری زیاد می‌شود. کیلی (Keeley) و همکاران (۱۹۹۳) با انجام آزمونهای الکتروفیزیولوژی نشان دادند که گروه اتوگرافت نسبت به گروهی که کانال آن از کلاژن پرشده، سرعت هدایت حسی و حرکتی بالاتری دارد [۳۳]. به نظر می‌رسد اگر چه فاکتورهای رشد عصب سبب تسریع طویل شدن آکسونهای حسی و حرکتی می‌شوند ولی وجود رشته‌های کلاژن برای هدایت صحیح آکسونها از ناحیه پروگزیمال NGCs به دیستال آن اهمیت دارد. از دیگر مسائل مهم در رژنراسیون عصب، فاکتور سن است؛ پیری یک مرحله عمومی است که منجر به کاهش پیشرفت دستگاههای اعصاب محیطی، مرکزی، سیستم ایمنی و اندوکرین می‌شود.

پیری به طور یقین بر بیان پروتئین‌های اصلی غلاف میلین اعصاب محیطی تاثیر دارد [۸]. به نظر می‌رسد که در موشهای جوان‌تر رژنراسیون سریع‌تر اتفاق می‌افتد [۳۴]. بعد از هفته نهم، میزان SFI تغییر زیادی ندارد. از طرفی آزمونهای حسی و انجام الکتروفیزیولوژی در هفته دوازدهم، افزایش سرعت هدایت حسی و حرکتی (SNCV و MNCV) را نشان می‌دهند که نشانه افزایش ضخامت آکسون و قطر میلین و فاصله بین گره‌ای است و به نظر می‌رسد به دلیل کوتاهی عضلات و سفتی مفاصل در اندام جراحی شده، انجام حرکات طبیعی با مشکل روبرو می‌شود و دامنه حرکات کاهش می‌یابد. براین اساس به نظر می‌رسد که انجام حرکت درمانی و توانبخشی در دست‌یابی به نتایج بهتر، مفید باشد. بنابراین با توجه به نتایج به‌دست آمده، پیشنهاد می‌شود که استفاده توام فاکتورهای رشد عصب (LGF-I و NGF) و ژل کلاژن در لوله PVDF ممکن است جانشین مناسبی برای اتوگرافت عصب باشد. با توجه به تحقیقات فراوانی که در زمینه رژنراسیون اعصاب محیطی انجام شده است، هنوز سوالات بدون جواب زیادی وجود دارد از جمله: ۱- آیا ترکیب ایده‌آل برای فاکتورهای تحریک عصب که موجب رژنراسیون رشد آکسونها می‌شوند، وجود دارد؟، ۲- چگونه باید مقدار فاکتورهای تحریک کننده عصب را تنظیم کرد؟، ۳- فاکتورهای ترشح شده از بافتهای اطراف محل ضایعه چگونه موجب تقویت یا مهار رژنراسیون می‌شوند؟، ۴- آیا می‌توان فاکتورهای تحریک کننده یا مهارکننده رشد عصب را در مراحل خاص تکامل جنین یافت؟، ۵- کدام ماتریکس و با چه ترکیبی در رژنراسیون عصب موثر است؟

تلاش برای پاسخ گویی به سؤالات فوق، ضرورت انجام تحقیقات بیشتر درباره رژنراسیون اعصاب را نشان می‌دهد.

تقدیر و تشکر

این مقاله نتایج طرح تحقیقاتی شماره ۶۲ / پ حوزه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران است. نویسندگان مقاله بدینوسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از آن حوزه معاونت و نیز از مسئولین آزمایشگاه فشار قوی دانشکده برق دانشگاه صنعتی شریف (برای شارژ لوله PVDF) و از مسئول کلینیک سینا وابسته به دانشگاه بهزیستی و توانبخشی و جناب آقای دکتر مجتبی عظیمیان برای انجام الکتروفیزیولوژی نمونه‌ها و خانم فرزانه محمدزاده برای کمک در رسم نمودار اعلام می‌نمایند.

References

۱. گوشه جمال س. جراحی میکروسکوپی اعصاب دست، انتشارات طلاعات، تهران، چاپ اول، ۱۳۶۸، فصل اول.

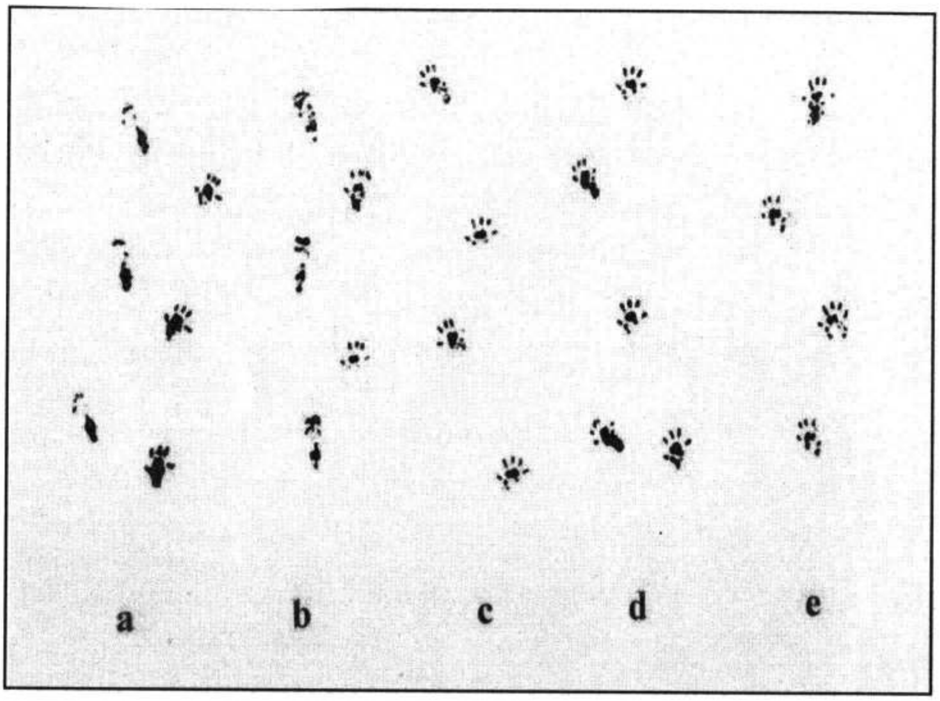
2. **Yu x, Bellamkonda RV.** Tissue -engineered scaffolds and effective alternatives to autografts for bridging peripheral nerve gaps. Tissue Eng 2003; 9(3): 421-30.

3. **Pu L, syed SA, Reid M, Patwa H, Goldstein JM, Formand DL, Thomson JG.** Effects of nerve growth factor on nerve regeneration through a vein graft across a gap. Plast Reconst Surg 1999; 104(5): 1379-85.

4. **Archibalo SJ, Krarup C, Shefner J, Li s, Madison RD.** A collagen - based nerve gide conduit for peripheral nerve repair: An electrophysiological study of nerve regeneration in rodents and non human primates. J Compar Neurol 1991; 306: 685-96.
5. **He C, Chen Z, Chen Z.** Enhdncement of motor nerve regeneration by nerve. Microsurgery 1992; 13: 151-4.
6. **Yannas IV, Itill BJ.** Selection of biomaterials for peripheral nerve regeneration using data from the nerve chamber model. Biomaterials 2004; 25(9): 1593-600.
7. **Valentini RF, Vargo TG, Gardella JA.Tr, Aebischer P.** Electrically charged polymetric substrates enhance Nerve fiber out growth in vitro. Biomaterials 1992; 13(3): 183-90.
8. **Aebischer P, Valentini RF, Dario P, Domenici C, Galletti RM.** Piezoelectric guidance channels enhance regeneration in the mouse sciatic Nerve after axotomy. Brain Res 1987; 436: 165-8.
9. **Hudson TW, Evons G, Schmidt CE.** Engineaning strategies for peripheral nerve repair. Clin Plast Surg 1999; 26(4): 617-28.
10. **Fine EG, Valentini RF, Bellamkonda R, Aebischer P.** Improved nerve regenpration through piezoelectric Vinylidene Fluride tri fluoroethlene copolymer guidance channels. Biomaterials 1991; 12: 775-80.
11. **Thanson PK.** Ultrastructure and cellular biology of nerve regeneration. J Reconstr Microsurg 1998; 14(6): 423-37.
12. **Labrador R, Buti M, Navaro X.** Influence of collgen and laminin gels concentration on rerve regeneration afrer resection and tube repair. Exp Neurol 1998; 149(1): 243-52.
13. **Eppley BL, Delfind JJ.** collagen tube repair of the mandibular; a prelimnary investigotion in the rat. J Oral Maxillo Fac Surg 1988; 46(1): 41-7.
14. **Yoshii S, Oka M, Shima M, Taniguchi A, Akagi M.** Bridgina a 30mm nerve defect using collagen filaments. J Biomed Mater Res 2003; 6A(2): 467-74.
15. **Thoenen H, Bandtlow c, Heumann R, lind holum D, meyer M, Rohrer H.** Nerve growth factor : cellular localization and regulation of synthesis. Cell Mol Neurobiol 1988; 8(1): 35-40.
16. **Frostick SP, Kemp GJ.** Schwann cells, Neurotrophic factors. Peripheral Nerie Reyeneration 1998; 18: 397-405.
17. **Lund bory G.** Nerve regeneration and repair, a review. Acta Orthop Scand 1987; 58: 145-69.
18. **PU SF, Zhuang HK, Marsh DJ, Ishii DN.** Time - dependent alternation of insulin-like growth factors gene expresion during nerve regeneration in regions of muscle enriched with neuromuscular junctions. Brain Res Mol Brain Res 1999; 63(2): 207-16.
19. **Gingras M, Bergeron J, Dery J, Durham HD, Berthood F.** In vitro development of a tissue engineered model of peripheral nerve regeneration to study neurite growth. Faseb J 2003; 17(14): 2124-6.
20. **Maniwa S, Iwata A, Hirata H, ochi M.** Effects of neurotrophic factors on chemokinesis of schwann cells in culture. Scand J Reconstr Surg Hand Surg 2003; 37(1): 14-7.
21. **Wang K.** Hyaluronic acid enhances peripheral nerve reyeneration in vitro. Microsurgery 1998; 18: 270-5.
22. **Kimpinski K, Mearow K.** Neurite growth promotion by nerve growth factor and Insulin like growth factor-I in cultured adult sensory neurons : Role of phosphoinositide 3-kinase and mitogen activated protein kinase. J Neurol Sci Res 2001; 63: 486-99.
23. **Danielsen N.** Nerve regeneration and repair. Diabet Med 1996; 13(7): 677-8.
24. **Navaro X, Rodriguez FG, ceballos D, Verdu E.** Engineering an artificial nerve graft for the repair of severe nerve injuries. Med Biol Eng Comput 2003; 41(2): 220-6.
25. **Bain J, Mackinnon S, Hunter DA.** Functional evaludtion of complete sciatic, peroneal and posterior tibial Nerve Lesions in the rat, Plast. Reconstr Surg 1989; 83: 129.36.
26. **Kanaya F, Firrell IC, Breidenbach WC.** Sciatic function index, nerve conduction tests, muscle contraction, and axon morphometry as in dicators of regenpration. Plast and Reconstr Surg 1996; 98(7): 1264-72.
27. **Rabinovsky ED.** The multifunctional role of IGF-I in peripheral nerve regeneration. Neurol Res 2004; 26(2): 204-10.
28. **Chen Z, wang MS.** Effects of nerve growth factor on crushed sciatic nerve regeneration in rats. Microsugery 1995; 16: 547-51.
29. **Medina celi LDE, Freed WJ, Wyatt RJ.** An index of the functinal condition of rat sciatic Nerve Based on measurements made from walking Tracks. Exp Neurol

1982; 77: 634-43.

30. **Nachemoson AK, Lundborg G, Hansson HA.** Insulin - like growth factor-I promotes nerve regeneration : an experimental study on rat sciatic nerve. Growth Factors 1990; 3(4): 309-14.
31. **Svenningsen AF, Kanje M.** Insulin and the Jnsulin - like growth factors I and II are mitogenic to cultred rat sciatic Nerve segments and stimulate (3H) thtmidine incorporation through their respective receptors. Glia 1996; 18(1): 68-72.
32. **Caplan J, Tiangco DA, Terzis JK.** Effects of IGF-II in a new end-to-side model. J Reconstr Microsur 1999; 15(5): 351-8.
33. **Keeley R, Atagi T, sabelman E, padilla J, kadlcik S, keeley A, Nguyen K, Rosen J.** peripheral regeneration across 14mm gaps: a comparison of autogroft and entbulation repair methods in the rat. J Reconstr Microsurg 1993; 9(5): 349-58.
34. **Melcangi RC, Magnaghi V, Martini L.** Aging in peripheral nerves : regulation of myelin protein genes by steroid hormons. Prog Neurol 2000; 60: 1-308.



▲ شکل ۱. تصویر اندام‌های عقب (toes print) موشهای گروههای مختلف هنگام راه رفتن برای اندازه‌گیری SFI در هفته ۱۲. گروه اول، فاکتور رشد NGF+IGF-I (a)، گروه دوم، ژل کلاژن (b)، گروه سوم، فاکتور رشد و ژل کلاژن (c)، گروه چهارم، اتوگرافت (d)، و گروه پنجم، شاهد (e). پای سالم (سمت راست)، پای جراحی شده (سمت چپ).