دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی – پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال شانزدهم – شماره 80
اردیبهشت 1388

بررسی تغییرات فاکتور نروتروفیکی BDNF و گیرنده‌های آن (P75, TrK-B) پس از قطع عصب سیاتیک در نوزاد موش صحرایی

نویسندگان: دکتر مرجان حشمتی[1*]، حسام امینی[2] و دکتر علیرضا دلشاد[1]

1. استادیار گروه علوم تشریح و پاتولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد
2. دانشجوی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد

*** نویسنده مسئول:** Email: marjanheshmaty@hotmail.com

وصول: 87/11/5
آخرین اصلاحات: 87/12/5
پذیرش: 88/1/29

چکیده

مقدمه و هدف: مرگ سلولی اپوپتیک در مراحل تکوین سیستم‌های مختلف بدن و نیز بسیاری از موارد پاتولوژیک از جمله سرطان و بیماری‌های نورودژنراتیو نقش مهمی دارد. لذا شناخت مکانیسم‌های مولکولی دخیل در آن می‌تواند برای طراحی استراتژی‌های درمانی نوین مفید باشد. در مطالعه حاضر به دنبال القای آپوپتوز در نرون‌های حرکتی نخاع، بیان فاکتور نروتروفیکی BDNF و گیرنده‌های Trk-B و p75 مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق از 20 سر نوزاد 3 روزه موش صحرایی نژاد اسپراگو داولی استفاده گردید. حیوان‌ها به طور تصادفی به دو گروه کنترل و مطالعه تقسیم شد، در گروه مطالعه عصب سیاتیک سمت چپ در وسط ران قطع گردید. در هر 2 گروه 21 روز پس از آکسوتومی، حیوان‌ها کشته شده و سگمان‌های نخاعی L4-L6 آن‌ها برای شمارش سلولی و مطالعه ایمنو هیستو شیمیایی مورد استفاده قرار گرفت و تعداد و نرون‌های حرکتی و چگونگی بیان BDNF ، P75 و TrK-B بررسی شد. در هر 2 گروه کنترل و مطالعه نیمه مقابل نخاع به عنوان گروه شاهد داخلی در نظر گرفته شد.

نتایج: به دنبال آکسوتومی عصب سیاتیک تعداد نرون‌های حرکتی باقیمانده، در مقایسه با گروه شاهد 58/89 درصد و در مقایسه با گروه کنترل 55/84 درصد کاهش یافت. درصد نرون‌های BDNF مثبت و P75 مثبت در مقایسه با گروه‌های شاهد و کنترل افزایش داشته اما درصد نرون‌هایی که TrK-B مثبت بودند کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که نرتروفین بررسی شده در این تحقیق دارای تأثیری دوگانه است. اتصال آن به گیرنده مکانیسم مرگ آپوپتیک را فعال می‌کند. P75 باعث حفظ و بقای سلول می‌شود اما اتصال آن به گیرنده TrK-B

واژه‌های کلیدی: آکسوتومی، آپوپتوز، نرون حرکتی، نروتروفین BDNF، گیرنده‌های P75,TrK-B

این پژوهش طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات علوم پزشکی دانشگاه شاهد بوده است.بودجه آن از محل اعتبارات این مرکز تأمین شده است.

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

برخی بیماری‌های نخاعی در انسان و حیوانات منجر به تخریب اولیه عصبی (Primary neuronal degeneration) می‌گردند. متداول‌ترین آن‌ها بیماری آمیوتروفیک لترال اسکلروزیس (Amyotrophic lateral sclerosis) است که منجر به مرگ نرون‌ها در دو بخش نرون محرکه تحتانی (lower motor neuron) و نرون محرکه فوقانی (upper motor neuron) می‌گردد. بیماری‌های دیگر در این گروه شامل آتروفی عضلانی (X-Linked spinal muscular atrophy) و وردینگ هافمن (Werdnig – Hoffmann) می‌باشند که منجر به مرگ نرون‌ها در نرون محرکه تحتانی می‌گردند، تمامی این بیماری‌ها القاءکننده آپوپتوز در نرون‌های حرکتی می‌باشند[1].

تاکنون درمان مؤثری برای این بیماری‌ها ارائه نشده است. به منظور تحقیق در این زمینه یکی از مدل‌هایی که می‌توان به کمک آن در حیوانات آزمایشگاهی آپوپتوز را القاء کرد قطع عصب محیطی سیستم اعصاب مرکزی (axotomy) است[2] مطالعات نشان داده که آکسوتومی عصب سیاتیک سبب ایجاد آپوپتوز در نرون‌های حرکتی نخاع می‌گردد[3] و سلول‌های مرده پاکسازی شده توسط اجزاء گلیال جایگزین می‌شود[4]. یکی از مشکلات اصلی در راه ترمیم اینگونه ضایعات در محل ضایعه است که امکان هر گونه اقدام جهت ترمیم نرون‌های از دست رفته را ناموفق می‌گرداند.

مطالعات انجام شده نقش فاکتورهایی که سیگنال‌های مرگ برنامه‌ریزی شده را به طور طبیعی در دستگاه عصبی کنترل می‌کنند را نشان می‌دهد. حال این سؤال مطرح است که در هنگام آکسوتومی یا قطع عصب محیطی چه فاکتورهایی مجدداً در این پروسه فعال شده و مکانیسم اثر این فاکتورها چگونه است؟

تئوری انتقال پس‌نورد (رتروگرید) محرک‌های مولکولی از بافت هدف به نرون‌های پیش‌سیناپسی مطرح گردید.

این تئوری مورد تأیید اکثر محققین قرار گرفت که از بین این فاکتورها می‌توان: فاکتور رشد عصبی NGF (nerve growth factor)، BDNF (brain derived neurotrophic factor)، نروتروفین 3 (Neurotrophin 3/NT-3) و نروتروفین 4/5 (NT – 4/5) را نام برد[5].

با توجه به نروتروفین‌ها نقش گیرنده‌ها نیز مورد توجه محققین قرار گرفت. شواهد و مطالعات حاکی از تغییر فعالیت این گیرنده‌ها و نقش دوگانه آن‌ها در حفظ یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌ها با توجه به زمان فعال شدن گیرنده‌ها و سن موجود است. به‌طوری که بیش‌ترین فعال شدن گیرنده P75 در دوران جنینی و کمی بعد از تولد روی می‌دهد[6]. تحقیقات نشان داده که به دنبال صدمه به عصب محیطی سلول‌های صدمه دیده بافت هدف شروع به ساخت و انتقال فاکتورهایی می‌کنند این فاکتورها به صورت پس‌نورد از بافت هدف به طرف جسم سلولی نرون پیش‌سیناپسی حمل شده و سبب حفظ یا مرگ سلول می‌شود. در یک گزارش منتشر شده علاوه بر انتقال BDNF از بافت هدف و سلول شوان به صورت پس‌نورد BDNF از گانگلیون ریشه خلفی نخاع نیز به صورت پیش نورد به طرف بافت هدف منتقل می‌شود[7]. علی‌رغم تصور قبلی مبنی بر این که مرگ نرون‌ها در غیاب فاکتورهای نروتروفیکی به دلیل محرومیت از این مواد ضروری است، امروزه مشخص شده که نروتروفین‌ها نقش تنظیمی در برنامه خودکشی سلول را در نرون‌های مهره‌داران به عهده دارند[8]. نقش نروتروفین‌ها با توجه به نوع گیرنده‌ای که به آن متصل می‌شوند متنوع است به‌طوری که به‌دنبال آکسوتومی و صدمه به عصب محیطی NGF افزایش می‌یابد که در صورت اتصال با گیرنده P75 سبب مرگ نرون و در صورت اتصال با تیروزین کیناز A (TrK-A) سبب حفظ نرون می‌شود و بدین‌ترتیب دو سر طیف مرگ و حیات سلول را مشخص می‌کند[9].

از آن‌جا که تاکنون مطالعه ایمنوهیستوشیمیایی برروی نروتروفین BDNF و گیرنده‌های اختصاصی آن یعنی P75 و تیروزین کیناز B (TrK-B) به‌عنوان

Archive of SID

www.SID.ir

گیرنده‌هایی القایی مرگ و حیات سلول عصبی پس از گذشت 21 روز از قطع عصب محیطی سیاتیک در نوزادان 3 روزه موش صحرایی نژاد اسپراگوداولی انجام نشده است، تحقیقی طراحی گردید که بتوان با انجام این تحقیق به سؤالات موردنظر زیر پاسخ منطقی داد:

1- آیا قطع عصب محیطی سبب تغییر برخی از فاکتورهای نوتروفیکی می‌شود؟

2- آیا ضایعه و قطع عصب محیطی سبب تغییرات مرگ سلولی و کاهش سلول‌های عصبی می‌شود؟

مواد و روش‌ها

با توجه به عملکرد متفاوت نوروتروفین‌ها در حفظ و حیات سلول از یک طرف و مرگ سلول از طرف دیگر بر آن شدیم که فاکتور BDNF را در نرون‌های شاخ قدامی نخاع و گیرنده P75 و TrK-B را به‌عنوان گیرنده اختصاصی این فاکتور پس از قطع عصب سیاتیک سمت چپ موش صحرایی 3 روزه بررسی کنیم. بدین‌منظور تعداد 20 سر نوزاد موش صحرایی نژاد اسپراگو داولی (انستیتو رازی کرج) به همراه مادرانشان در شرایط استاندارد حیوانخانه دانشکده پزشکی شاهد تحت دمای 3±21 درجه سانتی‌گراد و رطوبت 50-60 درصد و 12 ساعت روشنایی و 12 ساعت تاریکی در قفس‌های استاندارد نگهداری کردیم. در روز سوم پس از تولد نوزادان را به طور تصادفی به 2 گروه کنترل و مطالعه تقسیم کردیم. در گروه مطالعه با قرار دادن نوزادان بر روی یخ و پایین آوردن دمای بدن حیوان را بیهوش کرده، پس از برش پوست پشت ران چپ عصب سیاتیک را در وسط ران قطع کردیم. به منظور جلوگیری از پیوند مجدد دو سر قطع شده عصب قطعه‌ای از آن را به طول 2-3 میلی‌متر برداشته شد. پس از دوختن پوست نوزادان را به مدت 15 دقیقه در دمای 37 درجه قرار دادیم تا کاملا به هوش آیند و سپس آنان را به قفس مادرانشان منتقل کردیم. 21 روز پس از آکسوتومی موش صحرایی 24 روزه را پس از بیهوش کردن با کلروفرم با پرفیوژن داخل قلبی پارافرمآلدئید 4 درصد کشته سگمان‌های نخاعی L4-L6 را خارج کردیم. نمونه‌های نخاع ابتدا به مدت 12 ساعت در فیکساتیو پارافرم آلدئید 4 درصد و سپس به مدت 24 ساعت در فرمالین 10 درصد بافر خنثی قرار داده شد. پس از پردازش بافتی از نمونه‌های نخاع قالب‌های پارافینی تهیه شد. نمونه‌های نخاع به شکلی در پارافین قرار داده شد که در حین برش‌گیری، مقاطع عرضی حتی‌الامکان قرینه از هر دو نیمه نخاع به دست آید. در همه نمونه‌ها نیمه راست نخاع به عنوان گروه شاهد داخلی در نظر گرفته شد. با استفاده از میکروتوم روتاری برش‌های عرضی سریال به ضخامت 8 میکرومتر تهیه شد. پس از انتقال برش‌ها بر روی لام‌های میکروسکپی، از هر 5 برش متوالی یک برش برای مطالعات شمارش سلولی با کرزیل فست ویولت 0/1 درصد رنگ‌آمیزی گردید و برش‌های دیگر برای تکنیک‌های ایمنوهیستوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفتند. در مرحله مورفومتری و شمارش سلولی، نرون‌های حرکتی واقع در شاخ قدامی نخاع هر دو نیمه نخاع که دارای هسته بزرگ‌تر از 10 میکرون و هستک مشخص بودند با بزرگنمایی 400 برابر میکروسکوپ نوری شمرده شدند. با توجه به این‌که از هر 5 برش یکی برای شمارش سلولی مورد استفاده قرار گرفت و با توجه به ضخامت 8 میکرومتری برش‌ها، کم‌تر از یک درصد نرون‌ها در دو برش متوالی قرار گرفت و تعداد نرون‌هایی که دو بار شمرده می‌شدند از نظر آماری بی‌معنا و قابل چشم‌پوشی است[10]. سپس میانگین نرون‌های حرکتی هر دو نیمه نخاع در گروه‌های کنترل و مطالعه با روش آماری تی تست با یکدیگر مقایسه گردید. برش‌های سریال باقیمانده برای مطالعات ایمنوهیستو شیمیایی مورد استفاده قرار گرفت. برای مطالعه هر یک از فاکتورهای نوتروفین BDNF و گیرنده‌های غشا سلولی P75 و Trk-B، از هر یک از نمونه‌های نخاع به طور راندوم و با فواصل یکسان 10 برش انتخاب گردید. تکنیک ایمنوهیستو شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق روش غیرمستقیم دو مرحله‌ای است.

Archive of SID

www.SID.ir

شناسایی BDNF

پس از حذف پارافین و رساندن نمونه به بافر فسفات سالین (PBS)، نمونه‌های بافتی ابتدا به مدت یک شب در دمای 4 درجه در معرض آنتی‌بادی (Rabbit Anti-Brain derived neurotrophic factor polyclonal) شرکت کمیکون امریکا با غلظت 1/500 قرار گرفتند.

پس از شستشوی آنتی‌بادی اولیه با PBS، نمونه‌ها مجدداً به مدت یک ساعت و در دمای 37 درجه در معرض آنتی‌بادی ثانویه (Goat Peroxidase conjugated anti rabbit) شرکت داکو آلمان با غلظت 1/100 قرار گرفتند.

شناسایی Trk-B

نمونه‌های بافتی به مدت یک شب، دمای اتاق، در معرض آنتی‌بادی (Rabbit Anti- Trk-B polyclonal) شرکت کمیکون آمریکا با غلظت 1/1000 قرار گرفتند. نوع و شرایط آنتی‌بادی ثانویه مورد استفاده مشابه تکنیک BDNF است.

شناسایی P75

نمونه‌های بافتی به مدت 24 ساعت در دمای اتاق در معرض آنتی‌بادی (Mouse Anti- p75 monoclonal) شرکت کمیکون آمریکا با غلظت 1/300 قرار گرفتند. پس از شستشوی آنتی‌بادی اولیه با PBS نمونه‌ها به مدت 5 ساعت در دمای 37 درجه در معرض آنتی‌بادی ثانویه (Goat Peroxidase conjugated anti mouse) شرکت داکو آلمان با غلظت 1/100 قرار گرفتند.

در مورد هر سه فاکتور پس از شستشو آنتی‌بادی ثانویه، نمونه‌ها به مدت 10 دقیقه در معرض محلول آب اکسیژنه (H_2O_2) 0/003 درصد و دی‌آمینوبنزیدین (DAB) 0/005 درصد قرار داده شد. به دنبال آبگیری و شفاف‌سازی با لامل پوشانده شد. سپس با بزرگنمایی 400 برابر میکروسکوپ نوری، نرون‌های حرکتی رنگ‌آمیزی شده شمرده شد و درصد آن‌ها نسبت به کل نرون‌های حرکتی موجود در شاخ قدامی در گروه‌های مطالعه، کنترل و شاهد محاسبه گردید. در همه مراحل ایمنوهیستو شیمیایی به منظور تأیید صحت و دقت تکنیک‌های آزمایشگاهی و موارد مورد استفاده، یک نمونه به عنوان کنترل منفی در کنار بقیه نمونه‌ها در نظر گرفته شد. برای این منظور با حذف مرحله آنتی‌بادی اولیه بقیه مراحل مطابق آنچه توضیح داده شد انجام گردید.

نتایج

نتایج تحقیق در دو گروه مجزا مورد بررسی قرار می‌گیرند. نتایج مطالعات میکروسکوپ نوری به منظور شمارش سلول‌های عصبی حرکتی و بررسی تغییرات مورفومتری سلول‌ها و گروه دیگر بررسی شمارش سلول‌های عصبی حرکتی که به واکنش ایمنوهیستوشیمیایی نوروتروفین BDNF و گیرنده‌های غشا سلولی P75 و Trk-B پاسخ مثبت داده‌اند.

شمارش سلولی و مورفومتری: در مقطع عرضی از نخاع که با روش کرزیل فست ویولت رنگ‌آمیزی شده است نرون حرکتی سالم نخاع با هسته مدور و روشن، هستک واضح و سیتوپلاسم آکنده از اجسام نیسل دیده می‌شود (شکل 1). همچنین با بزرگنمایی 400 برابر میکروسکوپ نوری، در شاخ پیشین نیمه چپ گروه مطالعه تعداد نرون‌های حرکتی نخاع با ویژگی‌های کروماتولیز (شکل 2) و آپوپتوز (شکل 3) مشاهده گردید. شمارش سلولی نرون‌های حرکتی شاخ قدامی نخاع در گروه‌های مختلف نشان داد که در گروه مطالعه میانگین نرون‌های حرکتی با قیمانده پس از آکسوتومی در مقایسه با نیمه چپ گروه کنترل 55/84 درصد و در مقایسه با نیمه راست یا سالم همان نمونه (گروه شاهد) 58/89 درصد کاهش یافت. این کاهش از نظر آماری معنادار بوده ($p<0/05$)، در حالی که بین میانگین نرون‌های حرکتی دو نیمه مخاع در گروه کنترل و نیز بین نیمه راست گروه کنترل و گروه مطالعه تفاوت معناداری مشاهده نگردید (جدول 1 و 2).

ایمنو هیستو شیمیایی: در زیر میکروسکوپ نوری نرون‌های حرکتی رنگ‌آمیزی شده یا واکنش مثبت داده جهت نوروتروفین BDNF (شکل 4) و Trk-B (شکل 5) و

Archive of SID

www.SID.ir

P75 (شکل 6) دارای هسته‌ای روشن و سیتوپلاسمی به رنگ قهوه‌ای تیره می‌باشند. مطالعات ایمنوهیستوشیمی

جدول 1. میانگین و انحراف معیار تعداد کل سلول‌های عصبی حرکتی در دو گروه مطالعه و کنترل

گروه‌های مورد بررسی	میانگین و انحراف معیار سلول‌های عصبی حرکتی در سمت آکسوتومی شده (سمت چپ نخاع)	میانگین و انحراف معیار سلول‌های عصبی حرکتی در سمت آکسوتومی نشده (سمت راست نخاع یا شاهد)	درصد کاهش
گروه مطالعه	827/3 ± 33/70	2013/3 ± 118/5	-58/89 *
گروه کنترل	1873/3 ± 64/48	1824/6 ± 76/10	-2/59

* ($p \leq 0/05$)

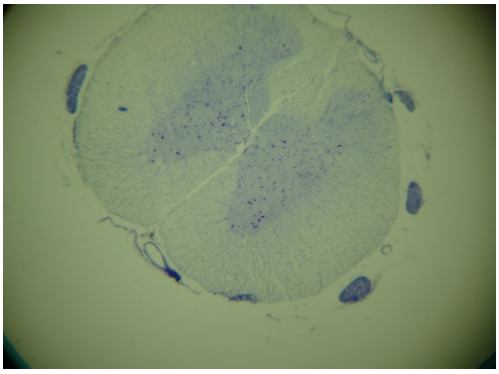
جدول 2. میانگین و انحراف معیار تعداد کل سلول‌های عصبی حرکتی در سمت راست یا شاهد و چپ گروه‌های مطالعه و کنترل

معیار	گروه مطالعه	گروه کنترل	درصد کاهش
میانگین و انحراف معیار سلول‌های عصبی حرکتی در سمت راست یا آکسوتومی نشده	2013/3 ± 118/5	1824/6 ± 76/10	-9/37
میانگین و انحراف معیار سلول‌های عصبی حرکتی در سمت چپ یا آکسوتومی شده	827/3 ± 33/7	1873/3 ± 64/48	-55/84 *

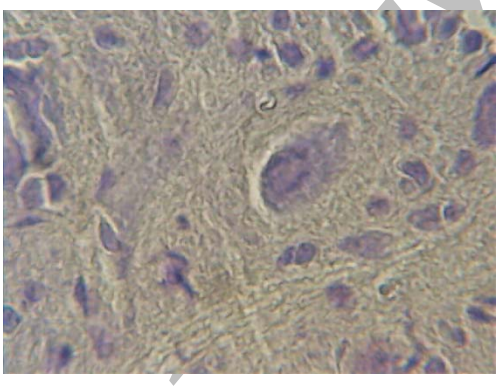
* ($p \leq 0/05$)

جدول 3. میانگین وانحراف معیار سلول‌های عصبی حرکتی که در واکنش ایمنوهیستوشیمیایی پاسخ مثبت داده‌اند

نوع واکنش ایمنوهیستوشیمیایی	در سمت راست گروه مطالعه	در سمت چپ گروه مطالعه	در سمت راست گروه کنترل	در سمت چپ گروه کنترل
Trk-B	8/66±66/06	1/08±5/800	4/12±67/53	3/21±66/93
P75	3/68±15/00	4/06±19/86	1/99±19/53	2/144±19/20
BDNF	2/55±19/66	2/09±11/33	1/55±18/00	2/00±17/80



شکل 1. برش عرضی از نخاع با بزرگنمایی 250. نرون حرکتی سالم با هسته مدور و روشن، هستک واضح و سیتوپلاسم آکنده از اجسام نیسل. سلول‌های گلیا به شکل سلول‌های کوچک و پراکنده در اطراف نرون دیده می‌شوند (رنگ‌آمیزی کرزیل فست ویولت).



شکل 2. نرون حرکتی کروماتولیک، اجسام نیسل به ویژه در اطراف هسته از بین رفته‌اند و سیتوپلاسم روشن‌تر دیده می‌شود (رنگ‌آمیزی کرسیل فست ویولت با بزرگنمایی 400)

نشان داد که به دنبال اکسوتومی میانگین نرون‌های حرکتیBDNF مثبت در شاخ قدامی گروه مطالعه در مقایسه با گروه‌های کنترل و شاهد آن‌ها کاهش یافت. در صورتی که درصد این نرون‌ها نسبت به تعداد کل

Archive of SID

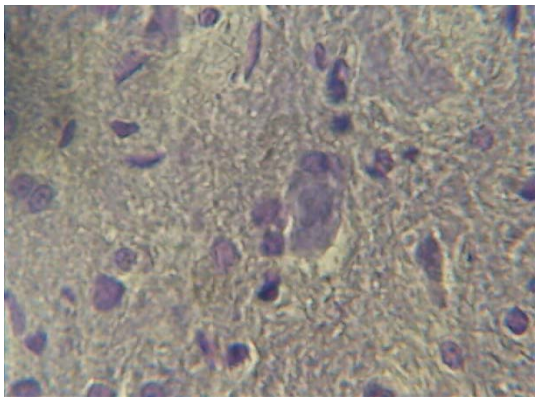
www.SID.ir

نرون‌های حرکتی باقیمانده در مقایسه با هر دو گروه کنترل و شاهد آن‌ها افزایش یافت. به دنبال اکسوتومی هم میانگین و هم درصد نرون‌های TrK-B مثبت در گروه مطالعه در مقایسه با هر دو گروه کنترل و شاهد آن‌ها کاهش یافت. بالاخره در مورد نرون‌های P75 مثبت میانگین این نرون‌ها در گروه مطالعه در مقایسه با گروه شاهد آن افزایش کمی یافت که از نظر آماری معنادار نبود. در مقایسه با گروه کنترل تغییری مشاهده نگردید. این در حالی است که درصد نرون‌هایی که P75 مثبت بودند در مقایسه با هر دو گروه کنترل و شاهد آن‌ها افزایش قابل ملاحظه‌ای را نشان داد (جدول3و4).

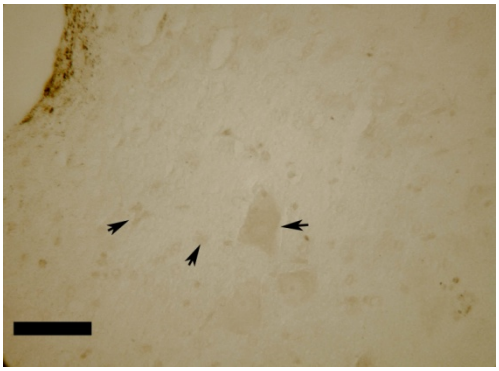
مقایسه این نتایج با نمونه‌های کنترل منفی که در آن‌ها آنتی‌بادی اولیه حذف شد حساسیت و دقت آنتی‌بادی را تأیید می‌کند (شکل 7).

جدول 4. میانگین و انحراف معیار کل سلول‌های عصبی حرکتی در نمونه‌های تهیه شده برای بررسی واکنش ایمنوهیستوشیمیایی

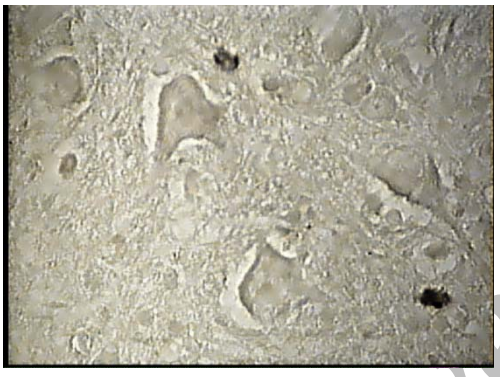
در سمت راست (شاهد) گروه مطالعه	80/26±5/29
در سمت چپ گروه مطالعه	21/80±4/19
در سمت راست (شاهد)گروه کنترل	77/13±4/25
در سمت چپ گروه کنترل	75/00±5/29



شکل 3. نرون حرکتی اپوپتیک، اجسام آپوپیتیک در اطراف نرون دیده می‌شود. (رنگ‌آمیزی کرسیل فست ویولت با بزرگنمایی **400**)



شکل 4. الگوی تظاهر BDNF. نرون‌های حرکتی سالم را نشان می‌دهد که سطح سلول به رنگ قهوه‌ای درآمده(بزرگنمایی **1000**)



شکل 5. الگوی تظاهر گیرنده Trk-B روی سطح سلول‌های عصبی سالم به‌صورت رسوب‌قهوه‌ای‌رنگ‌است.(بزرگنمایی **1000**)

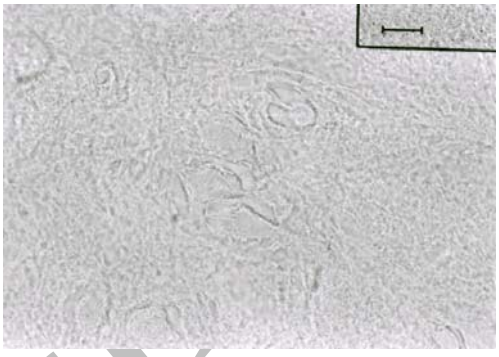
بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه مورفومتری: روش شمارش سلولی یکی از متداول‌ترین روش‌ها جهت بررسی درصد بقای موتونرون‌ها است که توسط بسیاری از محققین به‌کار گرفته شده است [**11**]. در تحقیق حاضر به دنبال قطع عصب سیاتیک چپ در نوزاد موش صحرایی و شمارش نرون‌های حرکتی در شاخ قدامی نخاع پس از گذشت **21** روز از عمل آکسوتومی عصب سیاتیک، میانگین نرون‌های باقیمانده در گروه مطالعه در مقایسه با نیمه چپ گروه کنترل **55/84** درصد و در مقایسه با گروه شاهد (نیمه سالم نخاع در همان نمونه) **58/89** درصد کاهش یافت. این کاهش در هر دو مورد از نظر آماری معنادار بود ($p<0/05$). در مورد نتایج حاصل از

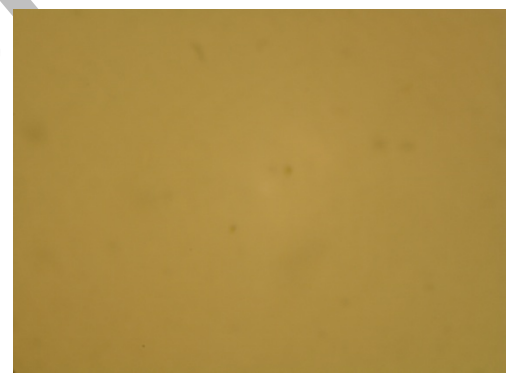
Archive of SID

www.SID.ir

آکسوتومی در حیوان بالغ گزارش‌های کاملا متفاوت و گاه حتی متضادی وجود دارد. به طوری که بعضی محققین به دنبال آکسوتومی مرگ آپوپتیک بیش‌تر نرون‌های مربو طه را گزارش کردند و



شکل 6. الگوی تظاهر گیرنده P75 بر سطح سلول‌های عصبی سالم به‌صورت رسوب قهوه‌ای رنگ است. (بزرگنمایی **1000**)



شکل 7. نمونه کنترل منفی که حساسیت و دقت آنتی‌بادی را تأیید می‌کند. (بزرگنمایی **1000**)

برخی دیگر کاهش قابل توجهی در تعداد نرون‌ها مشاهده نکردند[**11،12و13**]. اما در مرحله نوزادی عموم مطالعات مرگ آپوپتیک را در درصد قابل توجهی از نرون‌ها گزارش کردند [**14،15و16**]. یافته‌های ما نیز کاهش بیش از **50** درصدی نرون‌های آکسوتومی شده را نشان داد که کم و بیش مطابق با گزارشات موجود است، در تفاوت‌های آماری در درصدهای به‌دست آمده ناشی از تفاوت‌های تکنیکی در روش اجرای آزمایش است. در واکنش نرون به آکسوتومی و ضایعه عصبی عوامل متعددی نقش دارند از جمله سن و گونه حیوان، محل و نوع ضایعه عصبی و نوع نرون مورد بررسی [**17و18**]. در مجموع می‌توان گفت که در نوزاد موش صحرایی آکسوتومی موجب تغییرات کروماتولایتیک درنرون‌های مربوطه می‌شود. این تغییرات گاهی برگشت‌پذیر بوده سلول می‌تواند استرس ناشی از ضایعه را با موفقیت پشت سر گذاشته زنده بماند. اما در مواردی واکنش کروماتولیز ادامه یافته در نهایت به مرگ آپوپتیک سلول منتهی می‌شود.

مطالعه ایمنو هیستو شیمیایی: در تحقیق حاضر به دنبال قطع عصب سیاتیک چپ در نوزاد موش صحرایی، میانگین نرون‌های حرکتی BDNF مثبت در شاخ قدامی نخاع در گروه مطالعه (**11/33**)، در مقایسه با گروه‌های شاهد و کنترل کاهش یافت، درحالی که درصد این نرون‌ها نسبت به تعداد کل نرون‌های حرکتی باقیمانده **48/62** درصد در مقایسه با هر دو گروه افزایش یافت. در مورد نرون‌های TrK-B مثبت هم میانگین (**5/80**) و هم درصد (**26/60** درصد) این نرون‌ها در مقایسه با گروه‌های شاهد و کنترل شدیداً کاهش یافت. بالاخره هر چند میانگین نرون‌های P75 مثبت (**19/86**) در مقایسه با گروه‌های شاهد و کنترل تغییر معناداری را نشان نداد، اما درصد این نرون‌ها (**90/82** درصد) کاملاً افزایش یافت. در مجموع در هر سه تکنیک مورد استفاده در این تحقیق میانگین نرون‌های با واکنش مثبت کم شد یا حداقل ثابت بود. در حالی که اگر درصد این نرون‌ها را نسبت به کل نرون‌های باقیمانده در نظر بگیریم، سلول‌های BDNF مثبت و P75 مثبت افزایش و سلول‌های Trk-B مثبت کاهش یافت. با توجه به یافته‌های مرحله شمارش سلولی مبنی بر کاهش **50** درصدی نرون‌های حرکتی به دنبال آکسوتومی، کم شدن میانگین نرون‌ها یی با واکنش مثبت در همه‌ی موارد دور از انتظار نیست. افزایش بیان BDNF و P75 و کاهش بیان Trk-B در روز **21** پس از اکسوتومی می‌تواند نشان دهند یک ارتباط متقابل و دو گانه بین فاکتورهای فوق باشد. BDNF یکی از مهم‌ترین اعضای خانواده نروتروفین هاست که در تکوین نرمال سیستم عصبی، نروژنز، بقای نرون، آپوپتوز، پلاستیسیتی سیناپس‌ها، رشد دندریت‌ها و

Archive of SID

www.SID.ir

حافظه بلند مدت نقش مهمی دارد]19[. نروتروفین‌ها نقش خود را با واسطه گیرنده‌های تیروزین کینازی اعمال می‌کنند به طوری که BDNF با گیرنده Trk-B پیوند شده، با فعال شدن تیروزین کیناز و فسفوریلاسیون پروتئین‌های داخل سیتوپلاسمی مجموعه‌ای از پیام‌های داخل سلولی فعال می‌شود. همه‌ی نوروتروفین‌ها علاوه بر گیرنده‌های تیروزین کینازی اختصاصی می‌توانند با P75 هم پیوند شوند [20]. گیرنده P75 یک فاکتور نکروز تومور (TNF) است که اعتقاد عمومی بر آن است که می‌تواند مسیر اپوپتوز را فعال کند. مطالعات اخیر نشان داده است که پیش‌نیاز نروتروفین‌ها (proneurotrophins) فقط شکل غیرفعال نروتروفین‌ها نیست بلکه می‌توانند به عنوان مولکول‌های محرک مسیرهای سیگنالینگ داخل سلولی عمل کنند. پیوند پرونروتروفین‌ها با گیرنده P75 که با واسطه سورتیلین (Sortilin) انجام می‌شود آپوپتوز را تحریک و رشد را مهار می‌کند، در حالی که کمپلکس نروتروفین و TrK-B موجب رشد و بقای نرون می‌شود [21]. مطالعات متعددی نشان داده است که نرون‌های سیستم عصبی مرکزی BDNF را عمدتا به شکل pro BDNF ترشح می‌کنند[22]. اگر BDNF با گیرنده TrK-B پیوند شود عمدتاً موجب بقای نرون، تمایز و فعالیت سیناپسی آن می‌شود. در حالی که اتصال آن به گیرنده P75 موجب مرگ سلول می‌گردد [20]. از طرف دیگر گزارشاتی مبنی بر نقش مثبت P75 در بقای نرون‌ها وجود دارد، از جمله این‌که کمپلکس pro BDNF-P75، با فعال کردن مسیر پیام‌های داخل سلولی بر پلاستیسیتی سیناپس‌ها تأثیر مثبت دارد که این گزارش‌ها با این باور رایج که پیوند پرونروتروفین‌ها و P75 موجب آپوپتوز نرون‌ها می‌شود در تضاد است [22]. به این ترتیب اثر دوگانه BDNF از طریق دو سیستم Trk و P75 در کنترل بقای سلول در بیماری‌های نرودژنراتیو مورد توجه زیادی قرار گرفته مطالعات زیادی به منظور بررسی نقش BDNF و گیرنده‌های Trk و P75 در سیستم عصبی انجام پذیرفته است. آرنت (Arnett) و همکارانش به دنبال قطع عصب سیاتیک در موش و بررسی نرون‌های حسی گانگلیون ریشه پشتی گزارش کرد که pro NGF به طور انتخابی با P75 پیوند شده مسیرهای آپوپتوز را فعال می‌کند[23]. در مطالعات تجربی بر روی مدل‌های ایسکمی، تروما و تشنج نشان داده شد که جلوگیری از بیان و فعالیت گیرنده P75 می‌تواند مرگ سلولی را مهار کرده موجب بهبود عملکرد سیستم عصبی شود[21]. سدل (Sadel) گزارش کرد که در دوران جنینی فعالیت NGF با واسطه P75 و در غیاب A Trk موجب مرگ سلول‌های عصبی می‌شود[24]. در مطالعه دیگری به دنبال قطع عصب سیاتیک در نوزاد یک روزه موش صحرایی 80 درصد نرون‌های حرکتی مربوطه به علت فعال شدن گیرنده P75 دچار آپوپتوز شدند[25]. در مجموع با مقایسه یافته‌های این تحقیق، با مطالعات مشابه می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که به دنبال آکسوتومی اعصاب محیطی در جسم سلولی نرون‌های مربوطه واکنش کروماتولیز روی می‌دهد. در حیوان بالغ معمولاً این واکنش بر گشت‌پذیر بوده نرون زنده می‌ماند. اما در مرحله نوزادی در اکثر سلول‌های عصبی آسیب دیده واکنش کروماتولیز به مرگ نرون منتهی می‌شود. در نرون‌هایی که در مسیر آپوپتوز قرار می‌گیرند مقادیر زیادی BDNF بیان می‌شود. به موازات افزایش بیان BDNF، گیرنده TrK-B کاهش و گیرنده P75 افزایش می‌یابد و به این ترتیب مقادیر بیش‌تری از BDNF به گیرنده P75 پیوند می‌شود. در نتیجه BDNF بیش‌تر از آنچه موجب بقای نرون شود مسیر آپوپتوز را فعال می‌کند.

منابع

1- Yuan J., Yanker B.A. Apoptosis in the nervious system. Nature, 407: 802 – 809, 2000.

2- Oliveira AL., Risling M., Negro A. Apoptosis of spinal interneurons induced by sciatic nerve axotomy in the neuronal rat is counteracted by nerve growth factor and ciliary neurotrophic factor. J. Comp. Neurol, 10: 381-393, 2002.

3- Rossiter J.P., Riopeller R.J., Bisby M.A. Axotomy – induced apoptotic cell death of neonatal rat facial motoneurons. Time course analysis and relation to NADPH – diaphoranse activity. Experimental Neurology, 138: 33 – 44, 1996.

Archive of SID

www.SID.ir

4- Dusart L., Marty S., peschanski M. Glial changes following an excitotoxic lesion in the CNS –Astrocytes. Neuroscience, 45: 541-549, 1991.

5- Tonra J.R., Curtis R., Wong V., Cliffer K.D., park J.S., Axotomy upregulates the anterograde transport and expression of brain – derived neurotrophic factor by sensory neurons. J. Neurosci., 18: 4374 – 4383, 1998.

6- Rosa E.J., Pablo F. cell death in early neural development: Beyond the neurotrophic theory. Neurosci., 23: 454 – 458, 2000.

7- TonraJ., CurtisR., WongV., Cliffer K.D., ParkJ.S., Timmes A. Axotomy upregulates the anterograde transport & expression of brain derived neurotrophic factor by sensory neurons. J. Neurosci., 18: 4374-4383, 1998.

8- Carmed J.B., Galante A., Soteropoulos p., Hart R.P. Gene expression profiling of acute spinal cord injury reveals spreading inflammatory signals and neuron loss. In press. Physiological Genomics, 4; 1-13, 2001.

9- Xie Y., Yao Z., Wu W. Expression and role of low – affinity nerve growth factor receptor (p75) in spinal motor neurons of aged rats following axonal injury. Dev. Neurosci., 25: 65 – 71, 2003.

10- Li L., Oppenheim R.W., Lei M., Houenou L.J. Neurotrophic agents prevent motoneuron death following sciatic nerve section in the neonatal mouse.J. Neurobilogy, 25:759-766, 1994.

11- Palecek J. Properties of NMDA receptor in rat spinal cord motoneurons. Eur. j.Neurosci., 11: 827-836, 1999.

12- Tandrup T., Woolf C. T., Coggeshall R. E., Delayed loss of small dorsal root ganglion cells after transaction of the rat sciatic nerve. J. Com. Neurol., 422: 172-180,2000.

13- Mc Geachie A.B., Koishi K., Imamura T., Mclennan I.S. Fibroblast growth factor -5 is expressed in Schwann cells and is not essential for motoneuron survival.Neurosci., 104:891-899, 2001.

14- Greensmith L., Ng P., Mohaghegh P., Vrbova G. Reducing transmitter release from nerve terminals influences motoneuron survival in developing rats. Neurosci., 97:357-362, 2000.

15- Bahadori M.H, Taghi Tiraihi T.M. sciatic nerve transaction in neonatal rats induces apoptotic neuronal death in L5 dorsal root ganglion. Journal of Neurocytology, 30: 125 – 130, 2001.

16- Tiraihi T., Masoudian N. Astrogliosis in different zones of the spinal cord gray matter after sciatic nerve axotomy in the new born rat: Amorphometric and immunohistochemical study. Histol. Histopathol., 18: 449 – 457, 2003.

17- Novikov L.N.,Holemberg P., Kellerth J.O. Exogenous brain –derived neurotrophic factor regulates the synaptic composition of axonally lesioned and normal adult rat motoneurons. Neurosc., 100:171-181, 2000.

18- GoettL V.M., Neff N.H. Hadji constantin M. Sciatic nerve axotomy maged rats: response of motoneurons and the effect of GM1 ganglioside treatment, Brain Research, 968: 44 – 53, 2003.

19- Post R.M. role of BDNF in bipolar and disorder: clinical and theoretical implications. J. Psychiatric Research, 41:979-990, 2007.

20- Tang S., Machaalani R., Waters K.A. BDNF and Trk-B in the piglet brainsteam after post-natal nicotine and intermittent hypercapnic hypoxia. Brain Research., 1232: 195-205,2008.

21- Underwood C.K., Coulson L.J. The P75 neurotrophin receptor. The international J Biochemistry and cell biology, 40:1664-1668, 2008.

22- Woo N.H., Teng H.K., Siao C.J.Activation of p75NTR by pro BDNF facilitates hippocampal long – term depression. Nature neurosc., 8: 1069-1077, 2005.

23- Arnett M.G., Ryals J.M., Wright D.F. Pro-NGF,sortilin and P75 NTR,potential mediators of injury – induced apoptosis in the mouse dorsal root ganglion. Brain Research., 1183:32-42, 2007.

24- Sadel F., Bechade C. Nerve growth factor induce motoneuron apoptosis in rat embryonic spinal cord in vitro. Eur. J. Neurosci., 11: 3904 – 3912, 2005.

25- Xie Y., Yao Z., Chai H., Wong W.M., Wu W. Expression and role of low – affinity nerve growth factor receptor (P75) in spinal motor neurons of aged rats following axonal injury. Deu. Neurosci., 25: 65 – 71, 2003.

Archive of SID

www.SID.ir