Archive of SID

دانشور
پزشکی

بررسی اثر داروی دپرنیل در ایجاد گلیوز پس از ضایعه فشارمکانیکی طنـاب نخـاعی موش صحرایی بالغ

نویسندگان: حسام امینی[*1]، دکتر مرجان حشمتی [2] و دکتر محمد رضا جلالی[3]

۱. دانش آموخته پزشکی دانشکده پزشکی شاهد
۲. استادیار گروه علوم تشریح و پاتولوژی دانشکده پزشکی شاهد
۳. دانشیار گروه علوم تشریح و پاتولوژی دانشکده پزشکی شاهد

نویسنده مسئول: ***E-mail: un120000@yahoo.com**

چکیده

مقدمه و هدف: هدف از این تحقیق، ارزیابی تأثیرات داروی دپرنیل در حفظ یـا نگهـداری سـلول‌هـای عصبی حرکتی و تأثیر دارو در واکنش گلیوز است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق از موش صحرایی نژاد اسپراگ رالی به وزن ۳۰۰-۲۵۰ گرم از انستیتو رازی حصـارک کـرج اسـتفاده شـد. در ایـن بررسـی بـه تـأثیر داروی دپرنیـل mg/kg ۲/۵ در حفـظ سلول‌های عصبی با بررسی مورفومتری و میزان تشکیل بافت عصبی پشتیبان پس از ضایعه مکانیکی نخاع به روش ایمنوهیستوشیمیایی پرداخته شد.

یافته‌ها: نتایج این تحقیق در دو بخش مجزا مورد بررسی قرار می‌گیرد:۱. نتایج مطالعـات مورفـومتری سلول‌های عصبی ۲. بررسی شمارش سلول‌های آستروسیت و الیگو دندروسیت و محاسبهٔ درصد این پاسخ‌گویی. شمارش سلول‌های عصبی حرکتی نخاع حاکی از کاهش سلول‌های عصبی حرکتی درشاخ قدامی نخاع به همراه ایجاد حفره است. این کـاهش در گـروه دریافـت کننـده داروی دپرنیـل کـم‌تـر از گروهی که سرم فیزیولوژی دریافت کرده و تأثیر داروی دپرنیل در زیر، گروهی که چهار هفته از دارو استفاده کرده بیش‌تر بوده و این تفاوت معنادار است (P< ۰/۰۵). همچنین تـأثیر داروی دپرنیـل سـبب کاهش ایجاد واکنش گلیوز شده و در زیرگروهی که این دارو را به مدت چهار هفته دریافت کرده‌اند این تأثیر بیش‌تر است (P<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: برای اولین بار تأثیر داروی دپرنیل در کاهش تکمیل بافت اسکار گلیوز مشخص شد. دارو بیش‌ترین تأثیر را روی سلول آستروسیت دارد، به‌طوری که سبب کاهش این سلول می‌شود. این تأثیر در گروه‌هایی که چهار هفته دارو را دریافت کرده‌اند، بیش‌تر است. برای مشخص شدن نقـش بـیش‌تـر دارو و مکانیسم عمل آن، پیشنهاد می‌شود دارو در درازمدت و دوزهای مختلف بررسی شود.

واژگان کلیدی: ضایعات مکانیکی نخاع، آپوپتوز، گلیوز

دوماهنامه علمی - پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال شانزدهم - شماره ۸۲
شهریور ۱۳۸۸

وصول: ۸۸/۱/۳۰
آخرین اصلاحات: ۸۸/۴/۸
پذیرش: ۸۸/۴/۲۰

این پژوهش پایان‌نامه دانشجویی مصوب دانشکده پزشکی شاهد بوده اسـت و بودجه آن از محل اعتبارات دانشگاه شاهد تأمین شده است.

مقدمه

در بررسی انجام شده هر ساله تعداد زیادی از افراد در پـی صدمات وارده بر ستون فقـرات بـه‌صـورت شکسـتگی یـا جابه‌جایی مهره، فشار ضایعات فضاگیر، فتق دیسـک و ... دچار معلولیت‌هایی با درجـه‌هـای مختلـف از خفیـف تـا شدید می‌شوند [۱].

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده از داروی نروپروتکتیومی مانند دپرنیل توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است. این دارو یک مهارکنندهٔ انتخابی غیرقابل برگشت از منوآمینواکسیداز نوع B است. این آنزیم وظیفهٔ متابولیسم دوپامین در مغز را بر عهده دارد که در درمان بیماری پارکینسون مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲]. مطالعات انجام شده در سیستم عصبی پستانداران نشان می‌دهد در مراحل تکوین و اوایل تولد، سلول‌های عصبی مربوطه با درجه‌های مختلفی دچار مرگ سلولی یا آپوپتوز می‌شوند که این درجه‌ها به شدت فشار، محل آسیب، نوع سلول عصبی و محل قرار گرفتن آن در سیستم عصبی و سن حیوان وابسته است [۳].

استفاده از ضایعهٔ مکانیکی طناب نخاعی برای القای آپوپتوز در نرون‌ها کاربرد گسترده‌ای پیدا کرده و امروزه مشخص شده که در پی آن تغییرات دژنراتیو نرون‌ها، همراه با هماتوم و خونریزی و حفره‌حفره شدن بافت نخاعی پدیدار می‌شود.

بررسی این تغییرات و پیدا کردن ارتباط منطقی میان آن‌ها می‌تواند به فهم بهتر و دقیق‌تر مکانیسم‌های دخیل در دژنراسیون یا آپوپتوز نرون کمک کند.

داروی دپرنیل اولین بار توسط پروفسور Knoll (۱۹۶۰) در مجارستان ساخته شد. این دارو یک مهارکنندهٔ انتخابی غیرقابل برگشت از منوآمینواکسیداز نوع B است. این آنزیم وظیفهٔ متابولیسم دوپامین در مغز را برعهده دارد که در درمان بیماری پارکینسون مورد استفاده قرار می‌گیرد [۴]. ابتدا به عنوان داروی ضدافسردگی معرفی شد [۵]، اما با مشخص شدن اثرات دیگر دارو در درمان بیماری نورودژنراتیو پارکینسون، امروزه به عنوان یک داروی ضدپیری نیز مطرح است. تحقیقات اخیر نشان می‌دهد دپرنیل دارای خاصیت حفاظتی برای سلول عصبی (neuroprotctive)، نجات‌دهندگی نرون (neurorescue) و کاهش‌دهندهٔ آپوپتوز است [۶]. بنابراین تصمیم گرفتیم، اثر این دارو را در آپوپتوز ناشی از فشار بر ضایعات طناب نخاعی موش صحرایی بررسی کنیم. اولین بار Katoh و همکاران با استفاده از روش جراحی لامینکتومی طناب نخاعی را رؤیت کردند [۷]. سپس روش‌های متفاوتی برای ایجاد ضایعهٔ تجربی بر نخاع مطرح شد. استفاده از ضایعه مکانیکی و فشار به طناب نخاعی یکی از روش‌های القای آپوپتوز در نرون‌های محل بررسی است. Dolan & Tator در سال ۱۹۷۹ و Fehling & Nashina در سال ۱۹۹۵ یکی از روش‌های استفاده از کلیپس آنوریسم را ارائه دادند. در سال ۲۰۰۷ به عنوان روشی مطمئن در ایجاد ضایعهٔ مکانیکی نخاع معرفی شد [۸]. به این منظور پس از عمل جراحی لامینکتومی و اعمال فشار با کمک کلیپس آنوریسم که روش تأیید شده مقالات است [۹]، به بررسی تعداد و عملکرد سلول‌های عصبی و سلول‌های گلیال آستروسیت و الیگودندروسیت در سگمان نخاعی مربوطه با کمک روش ایمنوهیستوشیمیایی پرداختیم. هدف از این تحقیق، ارزیابی تأثیرات داروی دپرنیل در میزان تشکیل واکنش گلیوز است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از حیوان آزمایشگاهی موش صحرایی نژاد اسپراگ به وزن ۳۰۰-۲۵۰ گرم از انستیتو رازی حصارک کرج استفاده شد. ابتدا تعداد ۴۲ عدد موش در دو گروه ۱. مطالعه (اعمال فشار مکانیکی + تزریق روزانه دپرنیل ۲/۵ mg/kg) ۲. کنترل (اعمال فشار مکانیکی + تزریق روزانه سرم فیزیولوژی) در قفس‌های جداگانه به طور تصادفی قرار گرفته و شرایط استاندارد دوازده ساعت روشنایی و دوازده ساعت تاریکی و دمای ۲۳-۲۲ درجه سانتی‌گراد، غذای مخصوص پلیت از شرکت خوراک دام پارس و آب کافی در حیوان‌خانه دانشکده پزشکی شاهد در نظر گرفته شد. روی هر قفس برچسبی برای مشخص کردن تاریخ خرید، زیرگروه، تاریخ عمل جراحی لامنیکتومی و تاریخ کشتن با توجه به این‌که زمان نمونه‌برداری مربوط به کدام زیر گروه ۱-۲ و چهار هفته پس از اعمال فشار مکانیکی است، نصب شد. روش تجربی ایجاد ضایعه نخاعی اعمال فشار با استفاده از کلیپس انوریسم انجام گرفت [۹].

پس از روئیت نخاع گیرهٔ کلیپس آنوریسم (تنظیم شده برای اعمال فشاری معادل ۵۵ گرم) [۱۰] را به آرامی میان دو انگشت گرفته و دو لبهٔ آن را در طرفین طناب نخاعی قرار می‌دهیم و به مدت یک دقیقه منتظر می‌مانیم. سپس با باز کردن دو لبهٔ گیره آن را برداشته و محل‌های برش زده شده، یعنی عضلات، فاسیا و پوست را بخیه می‌زنیم.

برای کاهش خونریزی تزریق سرم لاکتات دامپزشکی به میزان پنج تا هشت میلی‌لیتر/ سی‌سی انجام شد. موش‌های جراحی شده به داخل قفس‌هایی مجزا منتقل و کمی گرم شدند و به آرامی به هوش آمدند. پس از گذشت

www.SID.ir

Archive of SID

پنج تا شش ساعت تخلیه مثانه با کمک فشار آرام انگشت از جهت بالا به پایین در ناحیه تناسلی بین دو اندام تحتانی را شروع کردیم و این کار روزی سه مرتبه تکرار شد. تزریق روزانه داخل صفاقی دپرنیل mg/kg ۲/۵ با سرم فیزیولوژی پس از عمل لامنیکتومی در حیوانات بر حسب این‌که مربوط به کدام گروه هستند، انجام شد.

بعد از گذشت مدت زمان موردنظر یعنی یک هفته، دو و چهار هفته پس از انجام لامینکتومی و اعمال فشار مکانیکی به نخاع موش‌ها با کتامین و گزیلایزین به‌طور عمیق بی‌هوش شدند. سپس پرفیوژن قلبی انجام و نمونه نخاعی خارج و فیکس شد. پس از پردازش بافتی نخاع ابتدا قالب پارافینی و سپس از این نمونه‌های نخاعی، بلوک تهیه شد. سپس برش‌هایی هشت میکرومتری به کمک دستگاه میکروتوم مدل۸۲۰ لایکا تهیه شد. برای بررسی مورفومتری از روش رنگ‌آمیزی کرسیل فست ویولت شرکت مرک آلمان استفاده کردیم.

دراین مرحله برای شمارش سلولی، نرون‌های حرکتی که در قسمت قدامی خارجی در هر دو نیمهٔ نخاع قرار دارد با بزرگنمایی X400 میکروسکوپ نوری زایس مورد شمارش قرار گرفتند. برای این منظور از هر پنج برش سریال یکی از آن‌ها انتخاب شد (به عنوان مثال ۱، ۶، ۱۱، ۱۶، ۲۱ و...). حاصل جمع نرون‌های شمرده شده ابتدا در عدد پنج ضرب شد و مجموع نرون‌های حرکتی سگمان‌های آسیب‌دیده در هر دو نیمه نخاع به‌دست آمد [۱۱]. با استفاده از روش‌های آماری میانگین تعداد نرون‌های حرکتی در هر یک از زیرگروه‌های مدل مطالعه و کنترل محاسبه شد. این توضیح لازم است که شمارش نرون‌های حرکتی برای تأثیر داروی دپرنیل mg/kg ۲/۵ در حفظ نرون‌های شاخ قدامی نخاع انجام شد.

برای بررسی اثر داروی دپرنیل در حفظ عملکرد و میزان تشکیل بافت عصبی پشتیبان پس از ضایعه مکانیکی نخاع مطالعات ایمنوهیستوشیمیایی انجام شد. به‌طوری که در هر زیرگروه چهار حیوان برای بررسی ایمنوهیستوشیمیایی در نظر گرفته شد. از هر حیوان برای بررسی ایمنوهیستوشیمیایی هر کدام از سلول‌های آستروسیت و الیگودندروسیت ده برش و همچنین برای رنگ‌آمیزی با تکنیک هماتوکسیلین ائوزین برای تعیین درصد سلول‌های موجود در این منطقه، ده برش انتخاب شد که شناسایی سلول‌ها با استفاده از ویژگی‌های بافت‌شناسی آن‌ها صورت گرفت. بررسی سلول‌های آستروسیت با استفاده از آنتی‌بادی بر علیه پروتئین GFAP (شرکت کمیکون امریکا) [۱۲] و بررسی سلول‌های الیگودندروسیت که در ساخته شدن میلین دخیل هستند با استفاده از آنزیم CNPase (شرکت کمیکون امریکا) [۱۳] با استفاده از آنتی‌بادی بر علیه CNPase استفاده شد. برای تهیهٔ نمونه‌های بافتی موردنیاز به‌طور دقیق مانند مرحلهٔ شمارش سلولی عمل شد. سپس برش‌هایی به ضخامت هشت میکرومتر تهیه کردیم. در هر گروه تکنیک ایمنوهیستوشیمیایی مورد استفاده برای واکنش گلیوز روش غیرمستقیم دو مرحله‌ای بود. در نهایت با به کار بردن DAB (دی آمینو بنزیدین) روی نمونه‌ها که مادهٔ اخیر با پراکسیداز موجود در آنتی بادی ثانویه واکنش داده و رسوب قهوه‌ای رنگی در زیر میکروسکوپ نوری قابل مشاهده بود. به‌طوری که در این تحقیق در هر یک از دو گروه مطالعه و کنترل، ۲۱ حیوان و در هر زیرگروه هفت حیوان قرار گرفت. این هفت حیوان به ترتیب سه حیوان برای شمارش سلولی و چهار حیوان برای بررسی ایمنوهیستوشیمیایی در نظر گرفته شد. در کل ۴۲ حیوان در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

نتایج این تحقیق در دو بخش مجزا مورد بررسی قرار می‌گیرد. ۱. نتایج مطالعات مورفومتری سلول‌ها ۲. مطالعات ایمنوهیستوشیمیایی سلول‌های آستروسیت و الیگودندروسیت و محاسبهٔ درصد این پاسخگویی.

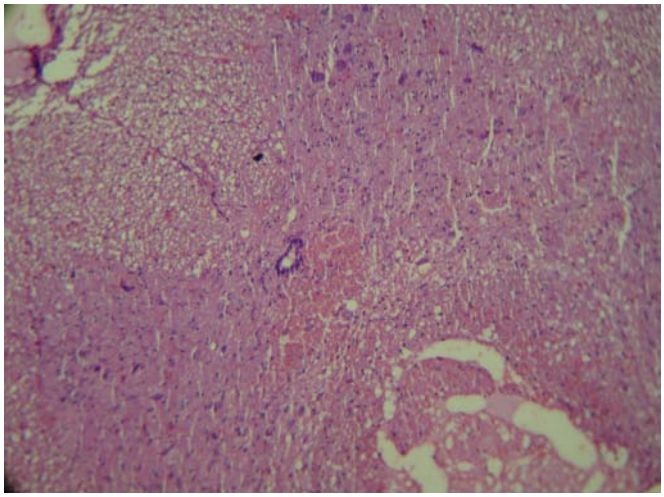
نتایج بررسی مورفومتری سلول‌های عصبی

بررسی سلول‌های عصبی حرکتی نخاع حاکی از کاهش سلول‌های عصبی حرکتی در شاخ قدامی نخاع به همراه ایجاد حفره بین سلول‌ها و خونریزی در لابه‌لای سلول‌ها و داخل این حفرات است (شکل ۱).

شمارش سلول‌های عصبی حرکتی نخاع در محل ضایعه در دو گروه حاکی از این است که تعدادی از سلول‌های عصبی حرکتی در محل اعمال فشار دستخوش کروماتولیز شده (اجسام نیسل در اطراف هسته به مقدار زیادی از بین رفته) و سیتوپلاسم اطراف هسته روشن دیده می‌شود (شکل ۲). مقایسهٔ بین دو گروه مورد مطالعه (اعمال فشار مکانیکی و تزریق روزانهٔ داروی دپرنیل در داخل صفاق تا

www.SID.ir

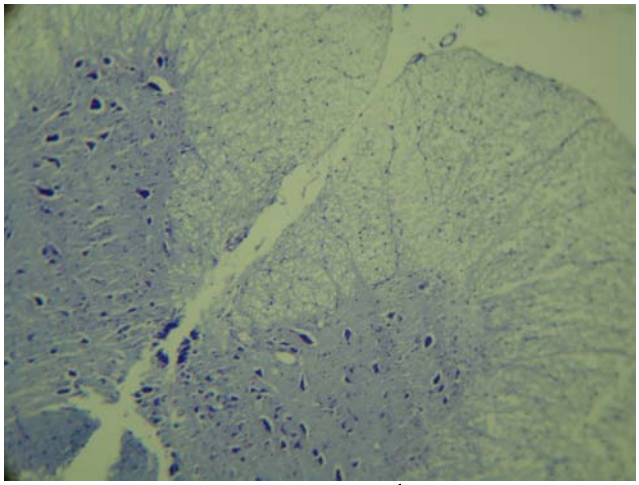
Archive of SID



شکل ۱. برش عرضی از نخاع موش صحرایی در گروه کنترل ۴ هفته پس از اعمال فشار مکانیکی، کاهش سلول‌های عصبی حرکتی در شاخ قدامی نخاع به همراه ایجاد حفره در بین سلول‌ها و خونریزی در بافت منطقه خاکستری و سفید نخاع با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین و بزرگنمایی ۱۰۰

زمان کشتن حیوان) و گروه کنترل (اعمال فشار مکانیکی و تزریق روزانهٔ سرم فیزیولوژی در داخل صفاق تا زمان کشتن حیوان) نشان می‌دهد، این تغییرات و کاهش سلول‌های عصبی در گروهی که دپرنیل دریافت کرده‌اند کم‌تر از گروهی است که سرم فیزیولوژی دریافت کرده‌اند (جدول ۱). نتایج حاصل از مقایسه بین شمارش سلولی کل سلول‌های عصبی حرکتی با استفاده از آزمون تی نشان می‌دهد، در گروه درمان‌نشده کاهش معناداری وجود دارد ($P< ۰/۰۵$). در زیرگروهی که چهار هفته دارو دریافت کرده‌اند تأثیر دارو در حفظ سلول‌های عصبی با اختلاف معناداری بیش‌تر است ($P< ۰/۰۵$).

در زیرگروه یک هفته کاهش سلول‌های عصبی با خونریزی در لابه‌لای سلول‌های بافت نخاع همراه است. در زیرگروه دو هفته کاهش سلول‌ها به همراه حفره‌حفره شدن بافت نخاع در محل اعمال فشار مکانیکی است و داخل حفرات خونریزی دیده می‌شود. در زیرگروه چهار هفته میزان خونریزی کاهش یافته و بیش‌تر بافت نخاع توسط سلول‌های عصبی پشتیبان جایگزین شده است. مقایسه این تغییرات در هر دو گروه کنترل و درمان شده نشان می‌دهد، در گروه درمان‌نشده این تغییرات بیش‌تر از گروه درمان شده با دپرنیل است.



شکل ۲. برش عرضی از بافت نخاع موش صحرایی در رنگ‌آمیزی کرسیل فست ویولت. در این تصویر منطقه خاکستری و منطقه سفید مشاهده می‌گردد. در منطقه خاکستری سلول‌های عصبی که دور تادور آنها را نوروگلی محاط کرده است را نشان می‌دهد.در گروه کنترل۴ هفته پس از اعمال فشار مکانیکی، کاهش سلول‌های عصبی حرکتی در شاخ قدامی نخاع مشهود است با بزرگ‌نمایی ۴۰۰

www.SID.ir

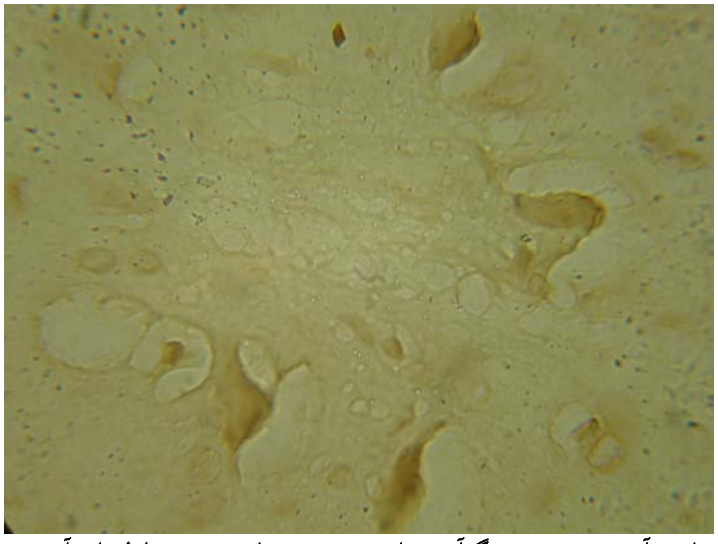
Archive of SID

مقایسه تعداد سلول‌های عصبی حرکتی بعد از گذشت چهار هفته در دو گروه کنترل و مطالعه حاکی از تأثیر داروی دپرنیل برای افزایش تعداد سلول‌ها یا کاهش مرگ سلول‌های عصبی حرکتی است.

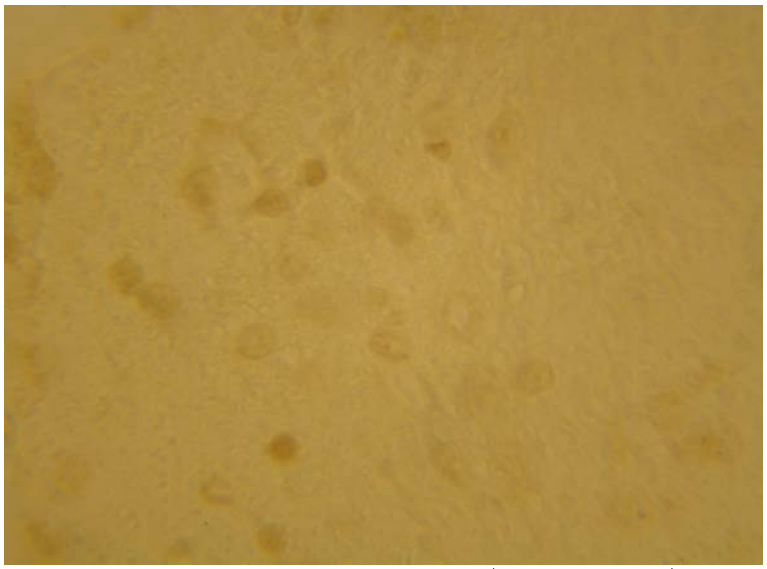
نتایج بررسی ایمنوهیستوشیمیایی سلول‌های گلیال

برای بررسی سلول‌های آستروسیت و الیگو دندروسیت در نمونه لام‌هایی که با این روش تهیه شده‌اند، محصول نهایی به صورت رسوب قهوه‌ای رنگی در سطح سیتوپلاسم است که محل حضور این سلول‌ها را نشان می‌دهد (شکل‌های ۳ و ۴).

مقایسه این نتایج با نمونه‌های کنترل منفی که در آن ها آنتی‌بادی اولیه حذف شده بود، حساسیت و دقت آنتی‌بادی را تأیید می‌کند (شکل ۵).



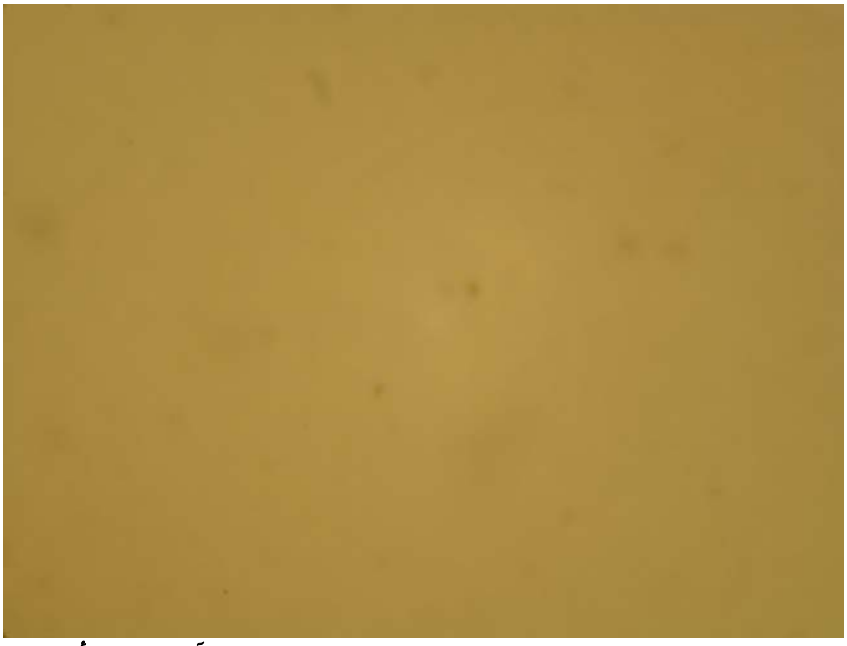
شکل ۳. مقطعی از بافت نخاع ناحیه آسیب دیده در رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمیایی جهت سلول‌های آستروسیت. در گروه مطالعه ۴ هفته پس از اعمال فشار مکانیکی.
محل جسم سلولی و زوائد سلولی به رنگ قهوه‌ای مشخص است . بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰



شکل ٤. مقطعی از بافت نخاع ناحیه آسیب دیده در رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمیایی سلول‌های الیگو دندروسیت در گروه مطالعه ۴ هفته پس از اعمال فشار مکانیکی. محل جسم سلولی به رنگ قهوه‌ای مشخص است .بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵. رنگ آمیزی ایمنوهیستو شیمیایی جهت نمونه کنترل منفی است که حساسیت و دقت آنتی‌بادی را تأیید می‌کند. بزرگنمایی ۱۰۰۰

با شمارش سلول‌های رنگ شده گلیال که با روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند، توانستیم سلول‌های محدوده موردنظر را محاسبه کنیم. میانگین و انحراف معیار کل سلول‌های گلیال (آستروسیت –آلیگو دندروسیت و میکرو گلیال) منطقه نیز مشخص شد. به این ترتیب، میانگین و انحراف معیار سلول‌های آستروسیت و الیگو دندروسیت نیز در تمام زیرگروه‌ها به دست آمد (جدول ۲). درصد تعداد سلول‌های آستروسیت و الیگو دندروسیت که با روش ایمنوهیستوشیمیایی رنگ شده‌اند در تمام زیرگروه‌ها در دو گروه مطالعه و کنترل محاسبه شد (جدول ۳). تحلیل آماری حاکی از اختلاف معنادار بین سلول‌های آستروسیت در گروه کنترل با گروه مطالعه در هفته چهار است. تحلیل آماری حاکی ازاختلاف معنادار بین سلول‌های الیگو دندروسیت در گروه کنترل با گروه مطالعه درهفته چهار است. تحلیل آماری حاکی ازاختلاف معنادار بین سلول‌های گلیال در گروه کنترل با گروه مطالعه در هفته چهار است.

جدول ۱. میانگین و انحراف معیار تعداد کل سلول‌های عصبی حرکتی در دو گروه مطالعه و کنترل و درصد کاهش سلول‌های عصبی

تحلیل آماری	درصد کاهش سلول‌های عصبی حرکتی درمقایسه دو گروه مطالعه و کنترل در هفته‌های ۱ -۲ و ٤	درصد کاهش سلول‌های عصبی حرکتی در مقایسه هفته ۱ با ۲ و هفته ۲ با ٤ در گروه کنترل	درصد کاهش سلول‌های عصبی حرکتی در مقایسه هفته ۱ با ۲ و هفته ۲ با ٤ در گروه مطالعه	میانگین و انحراف معیار سلول‌های عصبی حرکتی در بخش آسیب دیده، گروه مطالعه (دپرنیل)	میانگین و انحراف معیار سلول‌های عصبی حرکتی در بخش آسیب دیده، گروه کنترل(سرم فیزیولوژی)	زیر گروه‌ها
P<۰/۰۵	-۱۵	-	-	۲۹۵۶ ±۱۷۰	۲۵۰۸± ۲۶۰	۱ هفته
P<۰/۰۵	-۲۸	- ۴۸/۴	- ۳۸/۸	۱۸۰۸ ±۲۵۹	۱۲۹۴ ± ۱۹۷	۲ هفته
P<۰/۰۵	-۳۹	-۳۹/۲۵	- ۲۷/۹	۱۳۰۳± ۳۸۶	۷۸۶ ± ۲۳۷	۴ هفته

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲. میانگین و انحراف معیار کل سلول‌های گلیال در رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، سلول‌های آستروسیت و الیگو دندروسیت که به واکنش ایمنوهیستوشیمیایی پاسخ مثبت داده‌اند.

در صد کاهش کل سلول‌های گلیال درمقایسه دو گروه مطالعه و کنترل	سلول‌های الیگو دندروسیت در بخش آسیب دیده نخاع در گروه مطالعه(درمان شده)	سلول‌های آستروسیت در بخش آسیب دیده نخاع در گروه مطالعه(درمان شده)	کل سلول‌های گلیال موجود در بخش آسیب دیده نخاع در گروه مطالعه(درمان شده)	سلول‌های الیگو دندروسیت در بخش آسیب دیده نخاع در گروه کنترل (درمان نشده)	سلول‌های آستروسیت در بخش آسیب دیده نخاع در گروه کنترل(درمان نشده)	کل سلول‌های گلیال موجود در بخش آسیب دیده نخاع در گروه کنترل(درمان نشده)	زیر گروه ها
٪ ۲۶/۶۲ –	۲۷±۳/۴	۲۲۵±۱/۲	۲۵۹±۶/۳	۵۲±۲/۳	۲۹۸±۴/۲	۳۵۳±۹/۸	۱ هفته
٪۳۷/۲۹–	۳۰±۳/۲	۲۴۸±۴/۳	۳۱۱±۹/۲	۶۹±۷/۴	۴۲۷±۳/۱	۴۹۶±۱۷/۹	۲ هفته
٪۶۵/۱۵–	۴۱±۲/۵ **	۳۵۳±۲/۲ *	۴۹۱±۱۶/۲ ***	۱۴۴±۹/۸ **	۱۲۶۵±۳۲/۳ *	۱۴۰۹±۱۴/۸ ***	۴ هفته

(P<۰/۰۵) * (P<۰/۰۵) ** (P<۰/۰۵) ***

نتایج نشان می‌دهد سلول‌های گلیال با گذشت زمان افزایش می‌یابند و این افزایش در گروهی که داروی دپرنیل دریافت نکرده‌اند، بیش‌تر است. این افزایش بیش‌تر مربوط به سلول‌های آستروسیت است. با گذشت زمان سلول‌های الیگو دندروسیت نیز افزایش می‌یابد. گروهی که داروی دپرنیل دریافت کرده‌اند، این افزایش کم‌تر است. به این ترتیب، داروی دپرنیل سبب کاهش تعداد آستروسیت و الیگو دندروسیت می‌شود. نتایج نشان می‌دهد در زیرگروه چهار هفته جایگزین سلول‌های از بین رفته بیش‌تر از نوع سلول‌های پشتیبان آستروسیت است. سلول‌های آستروسیت با گذشت زمان در گروه کنترل افزایش داشته در صورتی که در گروهی که دپرنیل دریافت کرده‌اند با اثر مهاری دپرنیل روند افزایش سلول‌های آستروسیت کندتر می‌شود.

بحث

نتایج این تحقیق در ۲ بخش مجزا مورد بررسی قرار گرفت: ۱. نتایج مطالعات مورفومتری سلول‌های عصبی ۲. بررسی شمارش سلول‌های آستروسیت و الیگو دندروسیت و محاسبهٔ درصد این پاسخگویی. شمارش سلول‌های عصبی حرکتی نخاع حاکی از کاهش سلول‌های عصبی حرکتی نخاع ی در شاخ قدام به همراه ایجاد حفره است. این کاهش در گروه دریافت کننده داروی دپرنیل، کم‌تر از گروهی است که سرم فیزیولوژی دریافت کرده و در زیرگروهی که چهار هفته دارو دریافت کرده تأثیر داروی دپرنیل بیش‌تر بوده و این تفاوت معنادار است (P< ۰/۰۵). همچنین تأثیر داروی دپرنیل سبب کاهش ایجاد واکنش گلیوز شده و در زیرگروهی که این دارو را به مدت چهار هفته دریافت کرده‌اند، این تأثیر بیش‌تر است (P< ۰/۰۵).

جدول ۳. درصد پاسخ گویی سلول‌های آستروسیت و الیگو دندروسیت در بخش نخاع اسیب دیده در واکنش ایمنوهیستوشیمیایی

الیگودندروسیت در گروه مطالعه	استروسیت در گروه مطالعه	الیگودندروسیت در گروه کنترل	آستروسیت در گروه کنترل	زیر گروه‌ها
٪ ۱۰/۴۲	٪۸۶ /۸۷	٪ ۱۷/۷۳	٪ ۸۴/۴۱	۱ هفته
٪ ۹/۶۴	٪۷۹/۷۴	٪ ۱۳/۹۱	٪ ۸۶ / ۰۰	۲ هفته
٪ ۸/۳۵	٪۷۱/۸۹	٪۱۰ /۲۲	٪ ۸۹/۷۷	۴ هفته

www.SID.ir

Archive of SID

روش شمارش سلولی یک روش تأیید شده برای بررسی مورفومتری سلول‌های عصبی است که بسیاری از محققان مانند Oppenheim و Jacobson آن را ارائه کردند [۱۴]. Crow و همکاران وقوع آپوپتوز را در پی ضربات مکانیکی نخاع گزارش نمودند.بطوری که مشاهده سلول‌های آپوپتیک از شش ساعت تا سه هفته بعد از ضایعه در بافت سفید نخاع است . سلول‌های آپوپتیک بیش‌تراز نوع الیگو دندروسیت معرفی گردید [۱۵]. Liu در راستای همین نتایج بدنبال صدمات مکانیکی نخاع مرگ سلول‌های عصبی و سلول‌های گلیال را از نوع مرگ آپوپتیک ارائه کرد [۱۶]. در سال ۲۰۰۱ نیز Qiu و همکاران گزارشی مبنی بر نکروز سلول‌های عصبی و سلول‌های آستروسیت را پس از ضایعه ضربه مکانیکی ارائه کردند [۱۷]. در سال ۲۰۰۲ Smith و همکاران نکروز سلول‌ها را در پی افزایش آمینواسیدهای گلوتامیت و گلایسین و تورین موجوددر نخاع را متعاقب ضایعات نخاع ارائه کردند [۱۸]. Mills و همکاران نیز افزایش غلظت خارج سلولی آمینواسید گلوتامیت را سبب بروز یک سری وقایع توکسیک عنوان کردند [۱۹]. Hains و همکاران آزاد شدن رادیکال‌های سایتوتوکسیک را دلیل آپوپتوز در ضایعات نخاعی عنوان کردند [۲۰]. مشاهده آپوپتوز با کاهش فوری پروتئین ضدآپوپتوز BCL-XL در محل ضایعه را ارائه کرد [۱۷]. نتایج حاصل از این تحقیق نیز در راستای نتایج سایر تحقیقات مبنی بر کاهش سلول‌های عصبی در پی مرگ سلولی آپوپتیک است. به‌طوری که در گروه کنترل، بعد از گذشت چهار هفته تعداد سلول‌ها به یک سوم هفته اول کاهشی می‌یابد.بررسی‌های متعدد روی داروی دپرنیل خاصیت آنتی آپوپتیک و آنتی اکسیدانی آن راتأیید کرده است [۲]. دکتر Knoll اولین بار تأثیر این دارو را برای مهار آنزیم مونوامینو اکسیداز نوع B ساخت و آن را به عنوان داروی ضدپیری و بقای سلول معرفی کرد [۴].

در گزارش دیگری این خاصیت به صورت افزایش بیان مولکول‌های ضد آپوپتوز مانند BCL-2 است [۵]. در گزارش Tatton و همکاران، داروی دپرنیل سبب رشد طولی، زوائد سلول‌های عصبی و کاهش مرگ آپوپتیک سلول‌ها معرفی شد [۲۱]. با توجه به تحقیقات انجام شده روی داروی سلژیلین و اثر تحریکی آن در افزایش فاکتورهای نوروتروفیکی در محیط کشت سلول‌های آستروسیت [۲۲]. برای اولین بار نقش داروی دپرنیل به میزان ۲/۵mg/kg در ضایعات مکانیکی طناب نخاعی بررسی شد و نتایج این تحقیق حاکی از کاهش مرگ سلول‌های عصبی بود. به‌طوری که در هفته اول در گروهی که داروی دپرنیل دریافت کرده بودند، تعداد سلول‌های عصبی باقی مانده با تفاوت معناداری پانزده در صد بیش‌تر از گروهی است که در همین مدت سرم فیزیولوژی دریافت کرده‌اند. پس از گذشت دو هفته این تفاوت در افزایش سلول‌ها به ۲۸ درصد و بعد از گذشت چهار هفته به ۳۹ درصد رسیده است. در مقایسه بین هفته اول با دوم در گروه مطالعه درصد کاهش سلول‌های عصبی ۳۸/۸ و مقایسه هفته دو با چهار در همین گروه ۲۷/۹ است یعنی با گذشت یک هفته سیر کاهش سلول عصبی در این گروه مهار شده و بیش‌ترین تأثیر دارو پس از گذشت چهار هفته در مقایسه بین گروه‌ها در هفته چهارم نیز این نتایج بیش‌ترین تأثیر را نشان می‌داد. همچنین مقایسه بین هفته یک با دو در گروه کنترل، کاهشی معادل ۴۸/۴ درصد دارد که در همین گروه در هفته چهارم این کاهش در مقایسه به هفته دوم معادل ۳۹/۲۵ درصد است. روند این سیر کاهش نیز هم‌راستا با نتایج Oppenheim است. او این روند کاهش را در پی واکنش فیدبک سلولی در افزایش بیان نوروتروفین عنوان می‌کند [۲۳]. با توجه به نتایج تحقیق در هفته چهارم، پیشنهاد می‌شود تأثیر دارو در درازمدت بررسی شود. با مقایسه نتایج می‌توان گفت این نتایج هم‌راستا با نتایجی است که دپرنیل هنگام قطع عصب محیطی به‌صورت افزایش سلول‌ها از طریق حفظ آن‌ها به‌دست آورد [۶]. تحقیق حاضر، پس از اعمال ضایعه مکانیکی نخاع و در پی مرگ سلول‌های عصبی لابه‌لای سلول‌ها حفراتی ایجاد می‌شود و بافت عصبی با سلول‌های گلیال اشغال می‌شود که این نتایج مشابه با نتایج تحقیقات Gilmore وهمکاران (۱۹۹۰) وKao و همکاران (۲۰۰۸) است [۲۴]. همچنین در بررسی که Zai و همکاران انجام دادند، مرگ آپوپتوتیک سلول‌های عصبی و گلیال در پی ضایعات مکانیکی طناب نخاعی دیده می‌شود [۲۵]. مطالعات Morin و همکاران (۱۹۹۸) نشان می‌دهد به دنبال ضایعه قطع طناب نخاعی بیشترین تغییرات بیان زن در

www.SID.ir

Archive of SID

سلول‌های گلیال الیگو دندروسیت هااست به‌طوری کـه در چند روز اول، آنزیمCNPase افزایش یافتـه، امـا در انتهـای هفته اول به حالت عادی برمی‌گـردد ایـن تغییـرات همـراه کـاهش میلـین‌سـازی اسـت [۲۶]. Hinman و همکـاران (۲۰۰۸) این فرایند را کـه پـس از ضـایعه طنـاب نخـاعی سلولها دچار مرگ آپوپتیک می شوند مشـابه وقـایع دوران پیری عنوان می‌کنند [۲۷]. در صورتی کـه مطالعـات قبلـی حاکی از افزایش سـلول‌هـای آستروسـیت پـس از ضـایعه نخاعی است [۲۴]. در بررسی دیگـری کـه توسـط Lytle و همکاران انجام شد کاهش پنجاه درصدی سلول‌های گلیال متعاقب ضایعه فیزیکی نخاع عنـوان شـد [۲۸]. در همـین راستا مطالعه Xiao و همکاران مرگ آپوپتیـک سـلول‌هـای عصبی و گلیال را پس از فشار مکانیکی نخاع ارائه می‌کنـد [۲۹]. در این مطالعه نیزسلول‌های گلیال در هر دو گروه با گذشت زمان افزایش یافته کـه بـیش‌تـرین میـزان افـزایش مربوط به سلول‌های آستروسیت هادر هفته چهارم است که مغایر با نتایج Zai و Morin وLytle و Xiao و همسو بـاKao وGilmore است.

مصـرف داروی دپرنیـل سـبب کـاهش سـلول‌هـای آستروسیت و الیگو دندروسیت‌ها می‌شود کـه بـا گذشـت زمان این تأثیر بیش‌تر نیز می‌شود. بنابراین با توجه به ایـن که تا کنون روی تأثیر دارو در میزان واکنش گلیوز تحقیقی صورت نگرفتـه، بررسـی بـیش‌تـر چگـونگی اثـر دارو در زمان‌های طولانی‌تر و دوزهای مختلف، همچنین بـه نقـش این دارو در بیان ژن‌های آنتی آپوپتیک سـلول‌هـای گلیـال پیشنهاد می‌شود.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان‌نامه دانشجویی در دانشکده پزشـکی دانشگاه شاهد است.

از کارکنان و کارشناسـان آزمایشـگاه تحقیقـاتی علـوم تشریح و پـاتولوژی دانشـکده پزشـکی شـاهد و کارکنـان آزمایشگاه حیوانات که در انجام این پایان نامه ما را یـاری کردند، کمال تشکر را داریم.

منابع

1. Le Th,gean A d.Neuroimaging of traumatic brain injury. Spinal J Med 2009:20:145-62.

2. Kiray M, Ergur BU, Bagriyanik A. Suppression of apoptosis and oxidative stress by deprenyl and estradiol in aged rat liver. Acta Histochem 2007;109:480-485.

3. Akhtar AZ, Pippin JJ, Sandusky C B. Animal studies in spinal cord injury. Altern lLab Anim 2009;37:43-62.

4. Knoll J. History of deprenyl ; the first selective inhibitor of monoamine axidase type B. Vopor. Med Khim 1997;43:482-93.

5. Buys YM., Trope G, Tatton W.G. Deprenyl increase the survival of rat retinal ganglion cells after optic nerve crush. J Current –Eye- Res 1995;14:119-26.

6. Heshmati M ,Amini H. deprenyl can mediate neuronal protection rather than neuronal rescue. Iran J Pathol 2007;pp.2:45-48.

7. Katoh M ,Hida K.Abe H. A split cord malformation.Childs Nerv Syst 1998;14:398-400.

8. Dolan EJ ,Tator CH. A new method for testing the force of clips for aneurysms or experimental spinal cord compression. J Neurosurg 1979;51:229-33.

9. Dolan EJ, Tator. The value of decompression for acute experimental spinal cord compression injury. J Neurosurg 1995;53:749-55.

10. Liu X,Xu X.Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. J Neurosci 1997;17:5395-5406.

11. Sadel F, Bechade C. Nerve growth factor induce motoneuron apoptosis in rat embryonic spinal cord in vitro.Eur. j. Neurosci 1999;11:3904-3912.

12. Singh, D.K. Neurosci Letters :2003;340: 201-204.

13. Lee J C , Mayer M. Gliogenesis in the central nervious system. Glia 2000;30:105-121.

14. Jacobson M,Weil M.Programmed cell death in animal development 1997;88:347-354.

15. Crow M ,Bresnahan J,Shuman S.Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. Nat Med 1997;3:240-253.

16. Liu X, Xu X,Hu R. neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. J Neurosci 1997;17:5395-5406.

17. Qiu J, Nesie O, Ye Z. BCL -expression after contusion to the rat spinal cord. J Neurotrauma 2001;18:18-24.

18. Smith C, Somogy G, Bird E. Neurogenic bladder model for spinal cord injury :spinal cord microdialysis and chronic urodynamics. Brain Res 2002;9:57-64.

19. Mills C,Fullwood S, Hulsebosch C. changes in metabotrophic glutamate.

20. Hains B,Yucra J,Hulsebosch C. Reduction of pathological and behavioral deficits following spinal cord contusion injury with the selective cyclooxygenase -2 inhibitor NS-398.J Neurotrauma 2001;18:409-23.

21. Tatton W G, Wadia JS, Ju W Y. Deprenyl reduce neuronal apoptosis and facilitates neuronal out growth by altering protein synthesis with out inhibitory monoamine-oxidase. J N Transm 1996;48: 45-59.

22. Kontkanen Q, Castren E.Trophic effects of selegiline on cultured dopaminergic neuron. Brain Res 1999;829:190-200.

23. Oppenheim R W, Ler M, Houenou L Neurotrophic agents prevent motoneuron death following sciatic nerve section the neonatal mouse. J Neurobiol 1994;7: 759-66.

24. Simon Cm, Sharif s, Tan Rp .Spinal cord contusion causesacute plasma membrane damage. J Neurotrauma 2009;4:38-41.

25. Zai LJ, Wrathall Jr, Cell proiifration and replacement following contusive spinal cord injury. Glia 2005:50:247-57.

www.SID.ir

Archive of SID

26. Morin r, Feldblum S, Privat A, Astrocytes and oligodendrocytes reactions after a total section of the rat spinal cord. Brain Res 1998;783 :85-101.

27. Hinman JD ,Chen CD, Oh SY. Age dependent accumulation of ubi quitinated 2,3-cyclic nucleotide 3-Phosphodiesterase in mylin lipid rats. Glia 2008;56: 118-133.

28. Lytle JM, Wrathall JR. Glial cell loss,proliferation and replacement in the contused murine spinal cord. Eur J Neurosci 2007;25: 11-24.

29. Xiao Y, Shan KR,Guan ZZ. Effect of beta –amyloid on alpha -7 nicotinic receptor status in astrocytes and neurons J..Zhonghua Bing Li 2006;35:462-66

www.SID.ir