

## بررسی پدیده دژنراسیون آلفا موتونرون‌های نخاع پس از کمپرسیون عصب سیاتیک در رت‌های دیابتی

مریم طهرانی پور<sup>۱</sup>، افسانه اکرامی<sup>۲</sup>، ناصر مهدوی شهری<sup>۳</sup>، فرزانه اکرامی<sup>۲</sup>

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، دانشیار فیزیولوژی جانوری، گروه زیست‌شناسی، مشهد، ایران.

۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، کارشناسی ارشد علوم جانوری، مشهد، ایران. [biologist\\_1355@yahoo.com](mailto:biologist_1355@yahoo.com)

۳- استاد زیست‌تکوین، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۱/۶/۷ تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۱۵

### چکیده

زمینه و هدف: دیابت یکی از شایع‌ترین امراض عصر حاضر بوده که عوارض نورولوژیکی آن از جمله نوروپاتی دیابتی یکی از مشکلات عمده آن می‌باشد. در این پژوهش اثر نورودژنراتیو دیابت بعد از کمپرسیون عصب سیاتیک رت‌های دیابتی با بررسی نورو-های حرکتی آلفای نخاع تعیین شده است.

روش کار: در این تحقیق تجربی آزمایشگاهی ۱۸ رت نر نژاد ویستار به‌طور تصادفی در سه گروه کنترل، کمپرسیون و دیابت + کمپرسیون ( $n=6$ ) تقسیم شدند. در حیوانات، دیابت با تزریق (STZ) استرپتوزوتوسین با دوز  $50\text{mg/kg}$  تجربی القای گردید. پس از اطمینان از القای دیابت، کمپرسیون عصب سیاتیک پای چپ تحت کمپرسیون قرار گرفت. پس از یک ۲۸ روز مراقبت، رت‌ها با فرمالین ۱۰ درصد تحت پرفیوژن قلبی قرار گرفتند و از نخاع ناحیه کمری نمونه‌برداری و پس از آماده‌سازی بافتی، برش‌های سریال ۷ میکرونی از بلوک‌های پارافینی تهیه شدند. برش‌ها با آبی تولوئیدین رنگ آمیزی و شمارش نوروهای حرکتی شاخ قدامی نخاع به روش (دایسکتور) انجام گردیدند. آنالیز داده‌های کمی با آزمون‌های آماری انجام شد.

یافته‌ها: تعداد نوروهای آلفا گروه کمپرسیون ( $28 \pm 789$ ) در مقایسه با گروه کنترل ( $70 \pm 1766$ ) کاهش معنی‌داری داشت. همچنین با مقایسه گروه کمپرسیون و گروه کمپرسیون+دیابت ( $14 \pm 543$ ) اختلاف معنی‌داری بین دانسیته نوروهای در این دو گروه مشاهده شد ( $p < 0.001$ ).

نتیجه‌گیری: دیابت به عنوان یک بیماری نورودژنراتیو، ضایعات نوروهای در سیستم عصبی مرکزی را افزایش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: دیابت، نورودژنراتیو، کمپرسیون.

### مقدمه

تسریع‌کننده پیری مطرح شده است که از طریق مستعد کردن افراد برای وضعیت دژنراتیو شامل امراض کلیوی، امراض شبکیه چشم، فشارخون، امراض شریان کرونری، سکته و تصلب شرایین عمل می‌کند، هم‌چنین مدارک جدید نشان می‌دهد که دیابت در تسریع پیری مغز نیز نقش دارد (۱۳). پیوستگی بین دیابت، جنون و آلزایمر وابسته و مربوط به پدیده‌های نورودژنراسیون بوده و

دیابت از بیماری‌های پر هزینه‌ای است که ششمین علت شایع مرگ در آمریکا بوده و مسئول قریب به ۱۸٪ از موارد مرگ و میر در گروه‌های سنی بالای ۲۵ سال می‌باشد، هم‌چنین شایع‌ترین علت نارسایی مزمن کلیوی، نابینائی و قطع پاها شناخته شده است. در ایران تعداد مبتلایان به دیابت حدود یک میلیون و دویست هزار نفر گزارش شده است (۶، ۲). دیابت به عنوان یکی از انواع

راهکارهای به موقع از ایجاد آن ممانعت می کند (۱۱، ۳). حیوانات مدل که در آن‌ها دیابت القای شده یک اثر مستقیم نورودژنراتیو دیابت را نشان می دهند. در اکثریت مطالعات اثرات نورودژنراتیو بر روی هیپوکامپ بوده که مرتبط با حافظه و یادگیری می باشد (۵، ۴). در یک بررسی نشان داده شده که در بین فاکتورهای خطر برای ایجاد زوال عقل دیابت قوی ترین شاخص است (۱۱). در مطالعه ای ارتباط بین متابولیسم معیوب گلوکز در اثر دیابت و زوال عقل نشان داده شده که در میانسالی با وقوع زوال عقل در پیری همراه می باشد (۱۱). عوارض بیماری دیابت شامل اختلالات حاد و مزمن است. اختلالات مزمن شامل اختلالات میکرو و واسکولار (نفروپاتی، رتینوپاتی و نوروپاتی) و اختلالات ماکرو واسکولار یا قلبی عروقی (هیپرتانسیون، بیماری عروق کرونر، بیماری عروق محیطی و بیماری عروق مغز) می باشد (۱).

با توجه به این که برای این بیماری درمان قطعی مشخص نشده بیماران دیابتی تا پایان عمر باید دارو مصرف کنند. برای جلوگیری از عوارض جانبی داروها و کاهش شیوع عوارض این بیماری و پیامدهای ناشی از آن تلاش برای یافتن داروهای موثرتر با عوارض کم تر ضروری و شناخت عوارض دقیق این بیماری و محل های آسیب آن ضروری به نظر می رسد. اثرات نورودژنراتیو دیابت سال ها پیش شناخته شده است ولی این که این بیماری از چه مکانیسم هایی اثرات خود را اعمال می کند هنوز در هاله ای از ابهام قرار گرفته است. هدف از این تحقیق بررسی پدیده دژنراسیون آلفا موتونرون های نخاع پس از کمپرسیون عصب سیاتیک در رت های دیابتی است.

### مواد و روش ها

مطالعه از نوع تجربی آزمایشگاهی است. تعداد ۱۸ رت نر بالغ با وزن ۳۰۰ تا ۳۵۰ گرم از سرم سازی رازی

تهیه و در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی، ۱۲ ساعت روشنایی، درجه سانتی گراد حرارت و رطوبت مناسب در اتاق حیوانات گروه زیست شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد نگهداری شدند. رت ها به صورت تصادفی در سه گروه ۶ تایی تقسیم شدند. کنترل، کمپرسیون، دیابت+ کمپرسیون. برای القای دیابت به حیوانات استرپتوزوتوسین با دوز ۵۵ mg/kg (تهیه شده از مرکز هلال احمر مشهد) به طریق داخل صفاقی تزریق شدند و بعد از ۴۸ ساعت خون گیری انجام گردید (رت هایی که دارای قند خون زیر ۲۰۰ mg/dl بودند از آزمایش حذف شدند). برای اطمینان از القای دیابت رت ها به مدت ۴ هفته نگه داری و هر هفته قند خون آن ها اندازه گیری می شد. پس از این زمان در تمام رت ها به جز گروه کنترل عمل کمپرسیون انجام شد. برای کمپرسیون ابتدا ماده بیهوشی رامپون و کتامین (۶ و ۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم) به طریقه داخل صفاقی تزریق شده و رت ها بیهوش گردیدند. سپس عصب سیاتیک پای چپ در ناحیه سر استخوان ران توسط پنس قفل دار (قفل دوم-۶۰ ثانیه) تحت کمپرسیون قرار گرفت. پس از کمپرسیون محل ضایعه ضد عفونی شده و توسط گیره فلزی بخیه زده شد. در هنگام بیهوشی سعی شد بدن رت ها گرم نگه داشته شود. بعد از این که رت ها هوشیاری اولیه خود را به دست آوردند به قفس های جداگانه منتقل و در شرایط استاندارد حیوان خانه نگه داری شدند. پس از ۲۸ روز از قطعات نخاعی مربوط به عصب سیاتیک نمونه برداری انجام شد. از آن جایی که بافت عصبی بافتی حساس است و سریعاً دچار فرآیند های اتولیز می شود و علاوه بر این فیکساتور به علت وجود پرده های سخت دور نخاع نیز به خوبی در آن نفوذ نمی کند برای فیکساسیون از متد پرفیوژن استفاده گردید. برای یکسان بودن نمونه برداری در همه نمونه ها، نخاع به طور کامل تا انتهای دم اسب جدا گردیده و از انتهای دم اسب به اندازه

### نتایج

نتایج حاصل از بررسی پدیده دژنراسیون مرکزی در طول ۲۸ روز پس از کمپرسیون و بررسی اثر دیابت به صورت شمارش نورون‌های حرکتی آلفا در شاخ قدامی نخاع گروه‌های تیمار شده در جدول ۱ ارائه گردیده است. به طوری که میانگین دانسیته تعداد در گروه کنترل ( $1766 \pm 70$ )، در گروه کمپرسیون ( $789 \pm 28$ ) و در گروه کمپرسیون دیابتی ( $543 \pm 14$ ) می‌باشد. نتایج نشان می‌دهد که دانسیته نورونی گروه کمپرسیون نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری دارد ( $p < 0.001$ )، هم‌چنین آنالیزهای آماری داده‌ها اختلاف معنی‌داری را بین دانسیته نورونی گروه کمپرسیون و گروه کمپرسیون+القاء دیابت ( $p < 0.001$ )، را نشان می‌دهد.

### بحث و نتیجه گیری

دیابت ملیتوس یک اختلال متابولیک شایع است که به وسیله هایپرگلیسمی ناشی از نقص ترشح انسولین تیپ یک و یا مقاومت به انسولین تیپ دو مشخص می‌شود. در گذشته عوارض نورولوژیکی دیابت شامل عوارض محیطی و نوروپاتی سیستم عصبی مرکزی به عنوان آنسفالوپاتی دیابتی شناخته می‌شد (۶). آنسفالوپاتی دیابتی یکی از عواقب معمول طولانی مدت دیابت می‌باشد. به عبارت دیگر یکی از عوارض دیررس بیماری دیابت نوروپاتی یا گرفتاری اعصاب است و مطالعات نشان داده است که در ۵۰٪ بیماران با ۲۰ سال سابقه دیابت نوروپاتی ایجاد می‌شود (۱۲، ۶). نوروپاتی به چند شکل در بیماران دیده می‌شود که شایع‌ترین فرم آن به صورت مشکلات حسی در پا می‌باشد که ممکن است به صورت درد، سوزن سوزن شدن یا مور مور شدن در پاها بروز نماید و یا به صورت از بین رفتن حس درد، حرارت و حس درک موقعیت پا تظاهر کند (۱۴).

۱۸ میلی‌متر بالا رفته و نمونه‌هایی به طول ۸ میلی‌متر تهیه شد. بعد از نمونه‌برداری نمونه‌ها وارد مرحله پاساژ شدند. پس از طی مراحل پاساژ از آن‌ها به صورت سریال برش - های ۷ میکرونی تهیه شده که با آبی تولوئیدین رنگ - آمیزی شدند با استفاده از دستگاه فتومیکروسکوپ از منطقه شاخ قدامی در لام‌های تهیه شده عکس‌های لازم با حفظ ترتیب و شماره برای مطالعات بعدی گرفته شد. از هر لام دو قطعه عکس یکی از شاخ قدامی نیمه چپ برش اول و یکی از شاخ قدامی نیمه چپ برش بعدی گرفته شد. بزرگنمایی میکروسکوپ در این مرحله  $200 \times 4 \times 10 \times 5$  است. برای شمارش نورونی از روش نمونه - برداری رندم و برای شمارش ذرات یعنی نورون‌های حرکتی آلفا از روش دایسکتور استفاده گردید.

برای آنالیز داده‌های خام نیاز به پارامترهایی مانند  $\sum \text{frame}, \sum Q$ ، میانگین، و غیره است که این پارامترها چنین تعریف می‌شوند.

$\sum Q$ : مجموع نورون‌های شمارش شده در یک نیمه نمونه

$\sum \text{Frame}$ : مجموع دفعات نمونه‌برداری شده.

Vdissector: حجم چهار چوب نمونه‌برداری که برابر

است با:  $V\text{dissector} = A\text{frame} \times H$

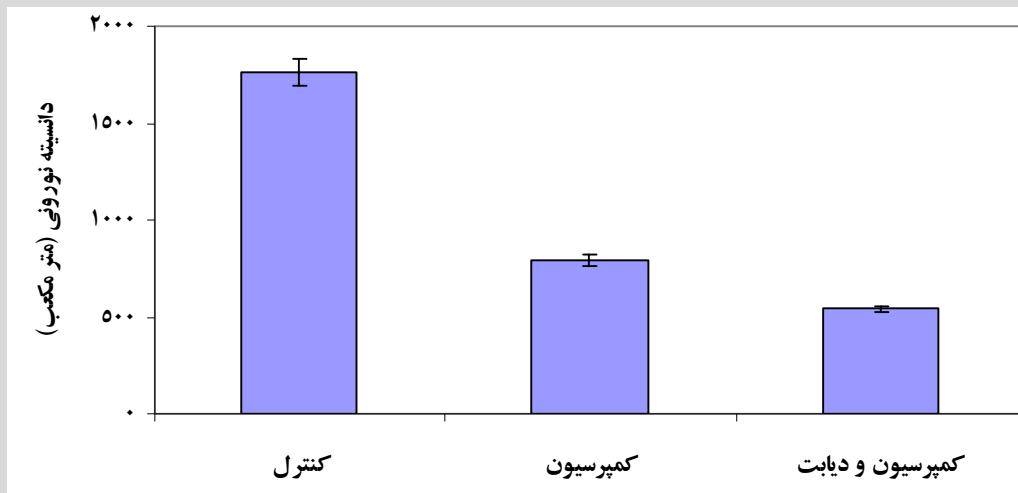
Aframe: مساحت چهار چوب نمونه‌برداری

H: فاصله بین دو برش یا ضخامت هر برش

برای بررسی داده‌ها با استفاده از برنامه‌های آماری مانند t-test نیاز به پارامتر دیگری به نام numerical NV (density یا دانسیته تعداد است).

$$NV = \frac{\sum Q}{V \text{ dissector} \times \sum \text{frame}}$$

در این تحقیق برای به دست آوردن اندازه واقعی مساحت دایسکتور بر روی نمونه و با مقیاس میکرون از لام میکرومتری استفاده شد.



نمودار ۱- مقایسه دانشیه تعداد نورون های حرکتی آلفا شاخ قدامی نخاع در گروه های مختلف (تعداد=6)

هایپرگلیسمی در حیوانات و مدل های دیابتی یک سری مسیرهای متابولیسم گلوکز که دلالت بر پیشرفت نوروپاتی دارد را فعال می کند. این مسیرها شامل انباشت سوربیتول و فروکتوز عدم توازن و ناهماهنگی NADP\_redox، فعال شدن پروتئین کیناز C، افزایش مسیر هگزوزامین، تولید اضافی سوپراکسید و کاهش سطح آنزیم های کلیدی آنتی اکسیدانت می باشد که نتیجه همه این ها افزایش استرس اکسیداتیو سلول می باشد (۱۴، ۶). مدارک کلینیکی هم چنین نشان می دهد که هایپرگلیسمی استرس اکسیداتیو پیش مستعد Predisposes بیماران دیابتی را تحریک می کند و مهار آن ممکن است شروع و پیشرفت نوروپاتی را بلوکه کند (۶). تنش اکسیداتیو در بافت عصبی وقتی ایجاد می شود که تولید رادیکال آزاد متجاوز از نصف ظرفیت آنتی اکسیدانت آن باشد. ظرفیت آنتی اکسیدانت ناقص نسبت به حمله رادیکال آزاد منجر به ایجاد صدمات در پروتئین ها، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک می شود. این آسیب های سلولی، آپتوزیس در سلول های گیال و اعصاب را راه اندازی می کند و منجر به نوروپاتی وابسته به دیابت می شود (۱۰، ۷، ۶). چندین مکانیسم متفاوت ممکن است در ایجاد عوارض مزمن دیابت (مثل

این پژوهش هم بر پایه همین اثر دیابت مطرح شده است و نتایج آن نیز با پژوهش های سایر دانشمندان سازگار است و نشان داده که دیابت موجب افزایش دژنراسیون مرکزی در صورت ایجاد ضایعات عصبی می شود. هایپرگلیسمی از طریق مکانیسم هایی شامل افزایش فشار و تنفس اکسیداتیو نقش مهمی را در توسعه و پیشرفت نوروپاتی دیابتی بازی می کند (۶). پلاک آلزایمر و فیبرهای عصبی در گیر، پروتئین های گلیکوزیته دارند که نشان می دهد افراد دیابتی سطح بالای گلوکز خون را داشته و مشکوک به پاتولوژی آلزایمر می باشند (۱۳). آلزایمر تغییراتی به شکل از دست رفتن نورون ها، گسترش تحلیل و آتروفی آنها به عبارتی نورودژنراسیون در مغز ظاهر می شود (۱۳). مدارک قانع کننده ای وجود دارد که اختلال شناختی و جنون عواقب و عوارض بالقوه دیابت هستند که احتمالاً ناشی از اثر مستقیم دیابت روی ریسک آلزایمر و افزایش فاکتورهای وابسته به آن هستند (۱۱). در مورد مکانیسم ارتباط بین آلزایمر و دیابت پیشنهاد شده است که دیابت باعث اختلالات و دگرگونی هایی در جریان خون رگ های مغزی می شود (۱۳، ۵). هایپرگلیسمی ناشی از عدم کنترل دیابت به عنوان منشاء نوروپاتی مشخص شده است.

سلول می گردد (۸). احتمال می رود هایپر گلیسمی از طریق افزایش این رادیکال‌ها در افزایش آپتوزیس نورون‌ها نقش داشته باشد. کمپرسیون یا ایجاد ضایعه فشاری در اعصاب دارای اثرات تخریبی در جسم سلولی نورون‌های حرکتی آن‌ها در نخاع است و این اثرات تخریبی به وسیله حمل آکسونی رتروگراد به جسم سلولی رسیده و باعث دژنراسیون مرکزی می شود. نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد که هایپر گلیسمی ناشی از دیابت باعث افزایش دژنراسیون سیستم عصبی مرکزی می شود به طوری که دانسیته نورونی در گروه دیابتی نسبت به گروه کمپرسیون کاهش معنی داری را نشان می دهد. در تحقیقات بعدی می توان با استفاده از عصاره گیاهان نوروپروتکتیو به بررسی اثر آن‌ها بر کاهش دژنراسیون ناشی از دیابت پرداخت.

### تشکر و قدردانی

این پژوهش در گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد انجام شده که بدین وسیله از تمامی همکاران گروه و مدیریت آن سرکار خانم دکتر محمود زاده و ریاست محترم دانشکده علوم آقای دکتر مومن هروی تشکر و قدردانی می گردد.

نوروپاتی) دخالت داشته باشد که از جمله: تشکیل پروتئین‌های گلیکوزیله و محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته، اختلال متابولیسم لیپید، افزایش صدمات اکسیداتیو، هیپر انسولینی، افزایش ویسکوزیته خون، اختلال عملکرد پلاکت‌ها و فعال شدن انواع مختلفی از عوامل رشد می توان اشاره کرد (۹، ۱۲، ۶). مطالعات قبلی نشان داده بودند که هایپر گلیسمی در سلول‌های عصبی کشت داده شده منجر به آپتوزیس می شود (۱۲) و کاهش دانسیته نورونی در گروه دیابت کمپرسیون نسبت به گروه کمپرسیون هم نشان دهنده همین اثر دیابت در نورون‌های آلفای شاخ قدامی نخاع می باشد. یک دلیل دیگر برای کاهش دانسیته نورونی گروه دیابت کمپرسیون می تواند این باشد که به علت گلوکز بالا انواع اکسیژن واکنش پذیر سلولی افزایش یافته و استرس اکسیداتیو را بالا می رود (۱۴). یکی از فاکتورهایی که باعث مرگ سلول‌ها می شود رادیکال‌های آزاد تشکیل شده در بدن است که پس از ایجاد ضایعه تولید می گردد. از جمله رادیکال‌های آزاد به Reactive oxygen ROS (species) می توان اشاره کرد که به طور طبیعی توسط متابولیسم بدن و از ترکیبات اکسیژن دار تولید می شود. تولید بیش از حد ROS سبب آسیب به عملکردهای

### منابع

- ۱- اندرلی، توماس. ۱۳۸۰. مبانی طب داخلی سیسیل، ترجمه مهدی شاهرودی علمداری، بهزاد آقا زاده، بهرام قاضی جهانی. چاپ دوم، تهران، انتشارات گلبان.
- ۲- حسین زاده، حسین، ایمن شهیدی، محسن. ۱۳۸۱. مدل‌های حیوانی ایجاد دیابت. مجله دیابت و لیپید تهران.
3. Beerli, M., Goldbourt, U., Silverman, J., Noy, S., Schmeidler, J., Sprenger R. (2004). Diabetes mellitus in midlife and the risk of dementia three decades later. Elsevier journal, 65;112-123.
4. Biedsels, G., Staeken borg, S., Brunner, E., Baryon, C., Schetens, P. (2006). Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. Neurology, 5; 64-74.
5. Col, A., Astell, A., Green, C., Sutherland, C. (2007). Molecular connexions between dementia and diabetes. Neuroscience journal, 31; 1046-10630.
6. Dago, Y., Avraham, Y., Link, G., Zolotarev, O., Mechoulam, R., Berry Ellio, M. (2007). The synthetic cannabinoid Hu 210 attenuates neural damage in diabetic mice and hyperglycemic pheochromocytoma pc12 cells. Neurobiology of Disease, 27; 174-181.
7. Hollander, P. (2007). Anti-diabetes and anti-obesity medications: effects on weight in people with diabetes. The american diabetes association, 20;159-165.
8. Hampson, A. J., Grimahdi, M., Axelrod, J., Wink, D., Rosenthal, R. (2000). Neuroprotective antioxidants from marijuana

Annals of the New York Academy of Sciences, 274-282; 0077-8923.

9. Kadoi, Y., Hinohara, H., Kunimoto, F., Saito, S. (2008). Effects of the cannabinoid antagonist AM281 on systemic hemodynamics and mortality rate in streptozotocin-induced diabetic rats with endotoxic shock: comparison between non-diabetic and diabetic rats. *Journal of Clinical Investigation*, 118; 664-672.

10. Pagano, C., Pilon, C., Calcagno, A., Urbanet, R., Rossato, M., Milan, G. (2007). Regulation function and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and  $\beta$ -pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92; 4810-4819.

11. Raoul, P., Esther, V., Jaap Kappelle, L., Geert, J. (2008). Diabetes and other vascular risk factors for dementia: Which factor matters most. A systematic review. *Pharmacology*, 585; 97-108.

12. Weiss, I., Zeira, M., Reich, Sh., Slavin, S., Raz, I., Mechoulam, R. (2008). Cannabidiol arrests onset of autoimmune diabetes in NOD Mice. *Neuropharmacology*, 54; 244-249.

13. Whitmer, R. (2008). Alzheimers, dementia and diabetes-where are the connections?. *Diabetes Voice*, 53; 19-28.

14. Zhang, F., Hong, Sh., Stone, V., Smith, P. (2007). Expression of cannabinoid CB<sub>1</sub> receptors in models of diabetic neuropathy. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics fast forward*, 323; 508-515.

---

Archive of SID