بررسی اثر تجویز یک نوبت عصارهٔ مغز جنین بر حفظ نورونهای حرکتی نخاع پس از قطع عصب سیاتیک در رت

*دکتر محمدرضا نیکروش، ** دکتر مرتضی بهنام رسولی، ** دکتر ناصر مهدوی شهری، *** مریم طهرانی پور

* گروه علوم تشریحی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

** گروه زیست شناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

*** گروه زیست شناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه آزاد اسلامی مشهد

خلاصه

در این پژوهش ابتدا عصب سیاتیک ۲۴ رت نر بالغ از نژاد wistar در ناحیه میانی ران (در بین عضلات گلوتئال) قطع گردیده و به دو گروه تجربی و کنترل تقسیم شدند. سپس سعی شد تا اثر درمانی تجویز یك نوبت از عصاره مغز جنین (FBE) بر حفظ و بقای نورونهای حرکتی اعصاب نخاعی (عصب سیاتیك) قطع شده گروه تجربی مورد مطالعه و ارزیابی قرار گیرد و با گروه کنترل مقایسه گردد. این مطالعه نشان داد با گذشت ۶ هفته از قطع عصب، قریب به ۸۰٪ نورونهای حرکتی عصب قطع شده سیاتیك که در زمان قطع، مورد تجویز عصاره مغز جنین واقع شده اند، حفظ گردیده است در حالی که در گروه کنترل (قطع عصب بدون دریافت عصاره) فقط حدود ۴۰٪ از نورونها حفظ گردیده است. این مشاهدات می تواند دلالت بر این موضوع باشد که تجویز یك نوبت عصاره مغز جنین به محل ضایعه در هنگام قطع عصب توانسته است نورونهای حرکتی شاخ قدامی نخاع را در گروه تجربی تا حدود زیادی نسبت به کنترل محافظت نماید.

کلمات کلیدی: عصاره مغز جنین، نورونهای حرکتی، عصب سیاتیك، رت

مقدمه

فاکتورهای تروفیك عصبی، گروه متنوعی از نوروتروفینها محسوب می شوند که حفظ و بقای نورونها و از جمله نورونهای حرکتی بوجود آنها وابسته است (۴، ۵، ۱۳، ۱۵). در این رابطه سایر تحقیقات نشان داده است که فاکتورهای مشتق از مغز نابالغ و از جمله Brain Drive Nerurotrophic Factor (BDNF) یکی از عوامل حیاتی است که برای بافت عصبی در حال تکامل (۱، ۷، ۱۲) و همچنین برای حفظ و بقا و ترمیم بافت عصبی بالغ ضروری به نظر می رسند (۹، ۱۶، ۲۰). تحقیقات نشان می دهد که اینگونه فاکتورها می توانند از طریق حمایت و تحریك سلولهای آسیب دیده منجر به رشد اکسونی در الیاف ضایعه یافته مربوط به آنان شوند (۱۱، ۱۹). از آنجائیکه چنین فرایندی ممکن است وابسته به عوامل تروفیك متعدد باشد که در بافت عصبی نابالغ نیز وجود دارد و از سوی دیگر حفظ و بقای نورونهای بالغ در شرایط معمولی متکی به اینگونه فاکتورها است (که از اندام هدف با استفاده از حمل اکسونی رو به عقب باید به جسم سلولی نورونها برسد)، در شرایط قطع عصب چنانچه بتوان از فاکتورهای تروفیك به صورت اگزوژن استفاده نمود، می توان انتظار داشت که نورونهای ضایعه دیده با برخورداری از این حمایت تروفیکی زنده بمانند و به پدیده ترمیم اکسونی خود ادامه دهند.

لذا در این پژوهش سعی گردیده است تا اثر یك نوبت تجویز عصاره مغز جنین که بعد از قطع عصب سیاتیك به محدوده قطع عصب وارد گردیده است، مورد بررسی قرار گرفته و اثرات محافظتی آن بر روی نورونهای حرکتی ضایعه دیده در شاخ قدامی سگمنتهای نخاعی مربوط به این عصب ارزیابی شود.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش کار

تهیهٔ عصارهٔ مغز جنین: برای تهیه عصاره از رتهای نژاد ویستار استفاده شد که به همین منظور آمیزش داده شده و به روز هفدهم حاملگی رسیده بودند. در این مرحله با بهره گیری از بیهوشی موقت و قطع نخاع، عمل سزارین در هریك از آنان انجام گرفته و پس از خارج نمودن جنینها از شاخه های رحم، سر آنان قطع گردیده و مغز هریك با سرعت از جمجمه خارج شد و در یك میلی لیتر سرم فیزیولوژی با استفاده از هموژنایزر در یك لوله آزمایش استریل سوسپانسیون شد. در مرحله بعد لوله های آزمایش مورد نظر با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید و پس از آن عصاره جدا شده از بافت مغزی له شده جنین به لوله های اپندرف منتقل و تا زمان مصرف در فریزر مورد نگهداری قرار گرفت.

روش قطع عصب: برای این مطالعه ۲۴ رت نر ویستار به سن تقریبی ۲ ماه و وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم با استفاده از تزریق داخل صفاقی ketamin (۱۰۰ mg/kg) و zylazine (۱۰ mg/kg) مورد بیهوشی عمیق قرار گرفتند. سپس با تراشیدن موهای خارج ران چپ حیوانات و استریل نمودن موضع، برش پوستی کوتاهی به موازات بخش زیرین سر فمور به طول تقریبی ۱۵ میلی متر ایجاد گردید و پس از شکافتن عضلات گلوتئال در این ناحیه، عصب سیاتیك در معرض دید قرار گرفت و با استفاده از تیغ جراحی بدون اینکه دچار کشیدگی شود، قطع گردید.

روش تجویز عصاره: برای این هدف در ۱۲ مورد از ۲۴ رت انتخابی (به عنوان گروه تجربی) قطعه ای از اسفنج نرم به ابعاد تقریبی ۳ میلی متر که از قبل آماده و استریل گردیده بود به عصاره مغز جنین آغشته گردید و به گونه ای در بستر بریده شده عصب قرار گرفت که عصب قطع شده در تماس با آن باشد. سپس عضلات برش خورده به حالت طبیعی خود باز گردانده شد و با استفاده از کلیپس های مخصوص، پوست بخیه گردید و موضع زخم مجددا مورد ضد عفونی قرار گرفت. در ۱۲ مورد باقی مانده (به عنوان گروه کنترل) این تکنیك بدون بهره گیری از عصاره مغز انجام گرفت و اسفنج مورد نظر صرفا به سرم فیزیولوژی استریل آغشته شد.

روش آماده سازی: در پایان هفته سوم از هریك از گروههای تجربی و کنترل ۶ مورد جدا گردیده و مورد استنشاق ماده بیهوشی (کلروفرم) قرار گرفتند. در این حالت برای نمونه برداری و فیکس اولیه با استفاده از پرفیوژن بطنی که با بهره گیری از فرمالین ۱۰٪ انجام گرفت بدون آنکه به نخاع آسیبی برسد با شکستن مهره های سینه و کمر و آزاد سازی نخاع، سگمنتهای نخاعی متعلق به عصب سیاتیك از بقیه قسمتها جدا شده و مجددا در فیکساتور (فرمالین ۱۰٪) قرار داده شد. مشابه این عمل در پایان هفته ششم نیز در نمونه های باقیمانده از گروههای تجربی و کنترل صورت گرفت.

مطالعهٔ میکروسکوپی: پس از فیکس و آماده سازی بافتی، از سگمنتهای نخاعی نمونه های مورد نظر در هر یك از گروهها با استفاده از میکروتوم روتاری برشهایی به ضخامت ۱۰ میکرون تهیه گردید. آنگاه از برشهای سریال به دست آمده به فاصله هر ۵ برش یك برش انتخاب و با استفاده از هماتوکسیلین- ائوزین مورد رنگ آمیزی قرار گرفت. در مرحله بعد نورونهای موجود در شاخ قدامی هر برش با استفاده از تکنیك دایسکتور (۳) در سمت ضایعه شمارش شده و با سمت دست نخورده مقایسه گردید و ارقام به دست آمده با استفاده از t-test مورد تجزیه و تحلیل و آنالیز آماری قرار گرفت.

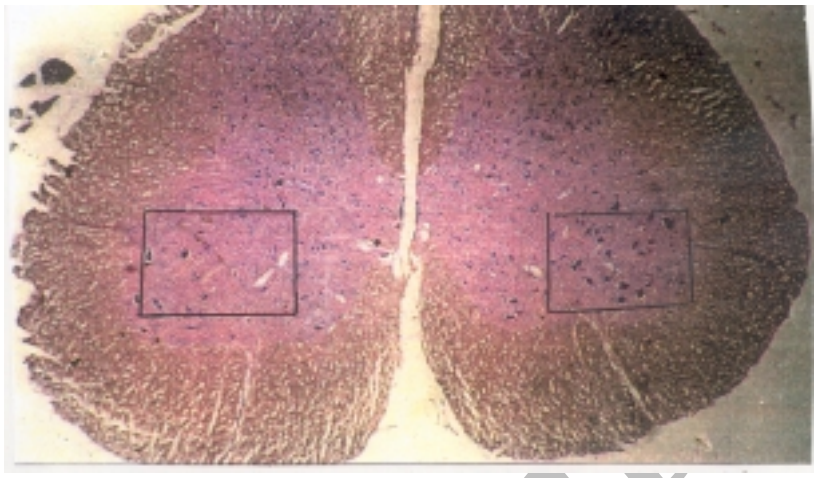
نتایج

نتایج حاصل از این شمارش نشان داد که در نمونه های تجربی مرحله اول (بعد از گذشت ۳ هفته از قطع عصب) حدود ۸۴٪ نورونها حفظ گردیده اند و این رقم در نمونه های تجربی مرحله دوم (بعد از ۶ هفته) به ۷۹٪ تغییر کرده است (نمودار ۱).

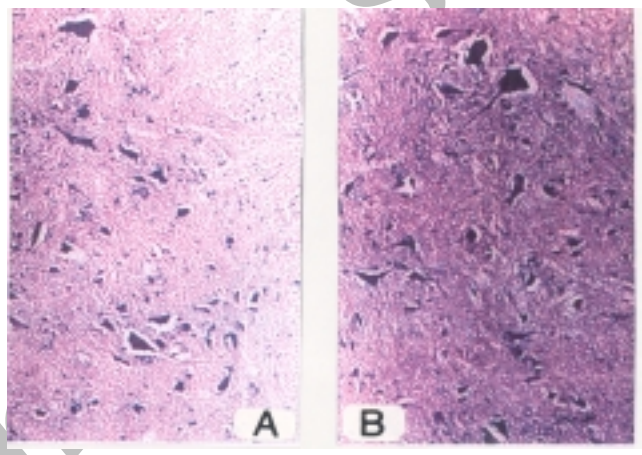
شمارش نورونی مربوط به گروه کنترل نیز مشخص کرد که تعداد نورونهای باقیمانده در شاخ قدامی سمت ضایعه بعد از گذشت ۳ هفته به ۶۲٪ و پس از ۶ هفته به ۴۱٪ کاهش یافته است (نمودار ۱).

Archive of SID

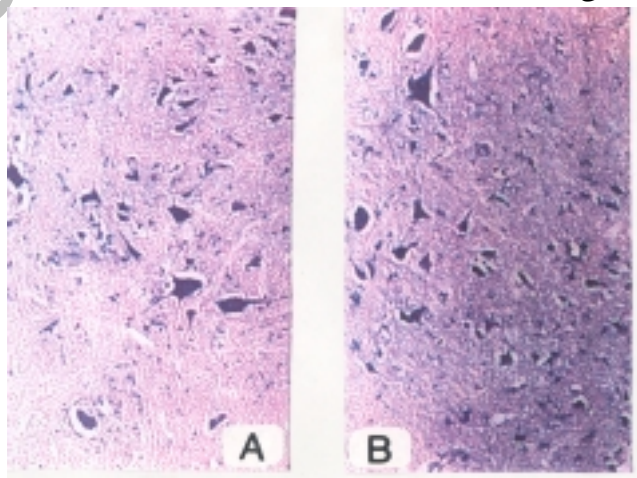
www.SID.ir



شکل ۱ : مقطع عرضی یکی از سگمنتهای نخاعی مربوط به عصب سیاتیک متعلق به گروه تجربی در پایان هفتهٔ ششم (رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین و درشتنمایی = ۲×۱۰× ۱۰). در این تصویر کادر سمت چپ، به عنوان جمعیت نورونی ضایعه دیده شاخ قدامی نخاع و سمت راست جمعیت نورونهای دست نخورده است.

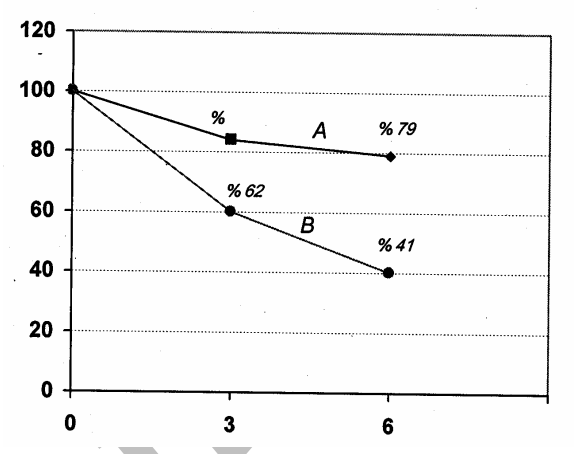


شکل ۲ : مقایسهٔ نورونهای شاخ قدامی نخاع در یک مقطع ضایعه دیدهٔ کنترل (A) و ضایعه دیدهٔ تجربی (B) در پایان هفتهٔ ششم. در این مقایسه به جمعیت نورونی موجود در دو مقطع و شکل نورونها توجه شود (درشتنمایی ٤٠٠).



شکل ۳ : مقایسهٔ نورونهای شاخ قدامی نخاع در نیمهٔ چپ ضایعه دیدهٔ تجربی (A) و نیمهٔ راست همان مقطع (B) در پایان هفتهٔ ششم. در این مقایسه نیز به شکل و تعداد نورونها توجه شود (درشتنمایی ٤٠٠).

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار ۱: درصد نورونهای باقیمانده در گروه تجربی (A) و کنترل (B). در این نما محور عمودی بیانگر درصد نورونهای باقیمانده در شاخ قدامی سمت ضایعه و محور افقی بیانگر هفته های آزمایش است ($p< ۰/۰۰۵$).

بحث

امروزه این باور وجود دارد که نورونهای حرکتی همواره از اندام هدف، فاکتورهای تروفیك دریافت می کنند که بدون این عوامل حفظ وبقای آنها ممکن نیست (۱۴) . کم شدن اثر حمایتی اینگونه فاکتورها که به اعتبار قطع عصب انجام می گیرد احتمالا به محرومیت اینگونه نورونها از عوامل تروفیك منجر می شود (۶، ۸) و در اکثر موارد به مرگ سلولی در آنان منتهی می گردد (۱۷، ۲۱). علاوه بر این مرگ سلولی اینگونه نورونها می تواند با فاصله محل قطع عصب از جسم سلولی مرتبط باشد چنانکه محل قطع عصب هرچه به جسم سلولی نزدیك تر باشد احتمال دژنراسیون سلولی سریعتر و بیشتر است (۱۰).

یکی از مهم ترین یافته های این مطالعه این است که بر اساس نتایج موجود، تجویز یك واحد از عصاره مغز جنین به محل ضایعه عصب می تواند به میزان قابل ملاحضه ای در حفظ وبقای نورونهای حرکتی ضایعه دیده مؤثر واقع شود و از پدیده دژنرسانس سلولی در آنها جلوگیری نماید. نتایج حاضر مشخص کننده این واقعیت است که درمان با عصاره مغز جنین با جذب احتمالی آن از طریق انتهای پروگزیمال عصب تا حد زیادی می تواند از این بحران بکاهد و جایگزین فاکتورهای تروفیك اندام هدف گردد. علاوه بر این ما در این مطالعه دریافتیم که تجویز یك دوز عصاره می تواند اثرات دراز مدتی بر حفظ نورونهای حرکتی ضایعه دیده از خود باقی بگذارد. بنا براین با توجه به اینکه فاکتورهای تروفیك مغز در شرایط مطلوب نگهداری (۳۷ درجه سانتیگراد) نیمه عمری در حدود یك ماه از خود نشان می دهد (۲۱)، به نظر می رسد که در طی دوران بحرانی بازگشت عصب به فعالیت طبیعی و ارتباط اکسونی آن با اندام هدف، تجویز یك دوز عصاره مغز جنینی کفایت نموده باشد زیرا مطالعات گذشته ما در این زمینه مشخص نمود که ضایعه عصب سیاتیك رت در ناحیه میانی ران می تواند به کمك مکانیسمهای حمایتی پس از گذشت پنج هفته به عصب دار شدن مجدد اندام هدف (عضلات ساق و کف پا) منجر شود (۲). بنابراین باتوجه به اینکه سرعت رشد اعصاب محیطی یك تا سه میلی متر در شبانه روز گزارش شده است (۱۸)، انتهای پروگزیمال عصب ضایعه دیده خواهد توانست روند بازسازی را کامل نموده و با رشد رو به جلو خود را به اندام هدف برساند. در این وضعیت بازیابی فاکتورهای تروفیك اندام هدف از سوی اینگونه اعصاب مجددا خواهد توانست زمینه بقا وفعالیتهای بعدی نورونهای آسیب دیده را فراهم آورد. در این شرایط اگر چه مکانیسم عمل ونحوه تاثیر گذاری فاکتورهای تروفیك دقیقا مشخص نیست اما یك مسئله را نمی توان انکار کرد وآن اینکه با توجه به گزارشات رسیده در خصوص قابلیت هریك از نوروتروفینها به خاطر اطمینان بیشتر چنانچه عصاره مغز جنین به عنوان مجموعه ای از فاکتورهای تروفیك بجای نروتروفینی خاص مورد استفاده قرار گیرد نورونهای آسیب دیده برای حفظ وبقای خود از ضریب حمایتی بالاتری برخوردار خواهند بود.

References

1. AM Horton A., Burton L. E., Schmelzer C., Vandlen R., Rosenthal A., 1993, Neurotrophin-4/5 is a mammalian-specific

Archive of SID
www.SID.ir

survival factor for distinct populations of sensory neurons, J. Neurosci., 13:4961-4967.
2. Behnam–Rasouli M., Nikravesh M. R., Mahdavi–Shahri N., Fazel A., 2001, The effects of local fetal brain extract administration on the electromyogram of crushed sciatic nerve in rat, Iranian Biomed. J., 5: 73-77.
3. Behnam–Rasouli M., Nikravesh M. R., Mahdavi–Shahri N., Tehranipour M, 2000, Post operative time effects after sciatic nerve crush on the number of alpha motoneurons, using a stereological counting metod (Disector), Iranian Biomed. J., 4: 41-49.
4. Buchman V. L., Davies A. M., 1993, Different neurotrophins are expressed and act in a developmental sequence to promote the survival of embryonic sensory neurons, Development, 118: 989-1001.
5. Buj-Belle A., Pinon L. G., Davies A. M., 1994, The survival of NGF- dependent but not BDNF-dependent cranial sensory neurons is promoted by several different neurotrophins early in their development, Development, 120: 1573-l 580.
6. Close R., 1969, Dynamic properties of fast and slow skeletal muscles of the rat after nerve cross-union, J. Physiol., 204: 331-346.
7. Ernfors P., Lee K. F., Jaenisch R., 1994, Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits, Nature, 388: 147-l 50.
8. Finkelstein D. I., Dooley P. C., Luff A. R., 1993, Recovery of muscle after different periods of denervation and treatments, Muscle-Nerve, 16: 769-777.
9. Fu S. Y., Gordon T., 1995, Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: prolonged axotomy, J. Neurosci., 15: 3876-3885.
10. Gu Y. M., Spasic Z., Wu W., 1997, The effects of remaining axons on motoneuron survival and NOS expression following axotomy in the adult rat, Dev. Neurosci., 19: 255-259.
11. Helgren M. E., Squinto S. P., Davis H. L., Parry D. F., Boulton T. G., Heck C. S., Zhu Y., Yancopoulos G. D., Lindsay R. M., Distefano P. S., 1994, Trophic effect of ciliary neurotrophic factor on denervated skeletal muscle, Cell., 76: 493-504.
12. Jones K. R., Farinas I., Backus C., Reichardt L. F., 1994, Targeted disruption of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development, Cell, 78: 989-999.
13. Kucera J., Ernfors P., Walro J., Jaenisch R., 1995, Reduction in the number of spinal motor neurons in neurotrophin-3-defecient mice, Neuroscience, 69: 321-330.
14. Lewin G. R., Barde Y. A., 1996, The physiology of neurotrophins, Annu. Rev. Neurosci., 19: 269-317.
15. Lohof A. M., Ip N. Y., Poo M. M., 1993, Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF, Nature, 363: 350-353.
16. Memberg S. P., Hall A. K., 1996, Proliferation, differentiation, and survival of rat sensory neuron precursors in vitro require specific trophic factors, MO/ Cell Neurosci, 8: 323-335.
17. Pinon L. G. P., Minichiello L., Klein R., Davies A. M., 1996, Timing of neuronal death in t & A, tdrt3 and t&C mutant embryos reveals developmental changes in sensory neuron dependence on Trk signaling, Development, 122: 3255-3261.
18. Snell R. S., Clinical neuroanatomy for medical students, 3rd Ed., Little, Brown and Company, Boston, America, 1987, pp: 103-113.
19. Vogel K. S., Davies A. M., 1991, The duration of neurotrophic factor independence in early sensory neurons is matched to the time course of target field inervation, Neuron, 7: 819-830.
20. Wilkinson G. A., FariAas I., Backus C., Yoshida C. K., Reichardt L. F., 1996, Neurotrophin-3 is a survival factor in viva for early mouse trigeminal neurons, J. Neurosci., I8: 7681-7669.
21. Yan Q., Elliot J., Snider W. D., 1996, Brain-drived neurotrophic factor rescues spinal motor neurons from axotomy-induced cell death, Nature, 360: 753-755.

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir