

# فعالیت NADPH دیافورز و ایمنوراکتیویته کلیندین ۲۸kD در نرون های حرکتی نخاع موش های صحرایی نوزاد بعد از ضایعه عصب محیطی

\*دکتر زهرا فلاح<sup>۱</sup>

## خلاصه

**سابقه و هدف:** مطالعات قبلی خاطر نشان ساخت که ضایعه اعصاب مدین و اولنار، راکتیویته کلیندین (Calbindin=CB) را در بعضی نرونهای عصبی آسیب دیده در موش های صحرایی در حال رشد القاء می نماید. مرگ نرونهای حرکتی به وسیله قطع عصب سیاتیک در موش های صحرایی نوزاد سبب القاء ایزوفرم نرونی نیتریک اکسید سینتاز شده است. مطالعه حاضر ارتباط بروز کلیندین با مرگ نرونهای حرکتی را بررسی می نماید.

**مواد و روشها:** در این مطالعه تجربی که بر روی ۳۰ نوزاد موش صحرایی صورت گرفت، بعد از قطع عصب مدین و اولنار در روزهای دوم و هفتم بعد از تولد (P2, P7) واکنش NADPH-d به طریقه هیستوشیمیایی روی مقاطع نخاع گردنی انجام شد تا القاء بروز نیتریک اکسید سینتاز را در نرونهای حرکتی که به روش رتروگراد با فاست بلو (Fast Blue =FB) نشاندار شده بودند همراه با روش ایمنو هیستوشیمی برای CB مورد بررسی قرار دهد.

**یافته ها:** واکنش دیافورز NADPH در نرونهای حرکتی نشاندار شده با FB در طی هفته های اول و دوم بعد از ضایعه عصبی در P2 مشاهده نگردید. اما به دنبال ضایعه عصبی در P7 بعضی نرونهای حرکتی نشاندار شده با FB فعالیت آنزیمی را دو هفته بعد از قطع عصب نشان دادند در حالی که برای CB نبودند.

**بحث و نتیجه گیری:** این نتایج نقش احتمالی نیتریک اکسید را در ترمیم عصب و نقش CB را در مکانیسمهای محافظتی و یا مرگ نرونی مطرح می نماید.

**کلمات کلیدی:** اسکوتومی، دیافورز NADPH، کلیندین، نرون حرکتی.

## مقدمه:

اولنار در روزهای P2, P7 نشان داده شد که بعضی نرون های حرکتی آسیب دیده کلیندین (CB) را که یک پروتئین متصل شونده به کلسیم است را بروز می دهند. ایمنوراکتیویته CB در نرون های حرکتی آسیب دیده در P2 به طور معناداری بیشتر از نرون های حرکتی آسیب دیده در P7 بود (۱۳). نقش CB در نرون ها موضوع مورد اختلاف بوده است. CB یک پروتئین متصل شونده به  $Ca^{+2}$  و وابسته به کالمدولین است و بسیاری از مولفین به نقش ابتدایی آن به عنوان بافبری کردن غلظت کلسیم داخل سلولی در نرون های از نظر الکتریکی بسیار فعال اذعان دارند (۱۴ و ۱۵). مطالعه حاضر به بررسی نقش احتمالی CB در نرون های حرکتی اسکوتومی شده نوزاد رت می پردازد و بروز همزمان nNOS و CB را در نرون های حرکتی آسیب دیده بررسی نمی نماید. NOS یک دیافورز وابسته به NADPH است و از نظر هیستوشیمیایی قابلیت آشکار سازی فعالیت NADPH دیافورز

قطع عصب محیطی جوندگان در طی اولین هفته بعد از تولد سبب مرگ نرون های حرکتی بیشماری می گردد (۱-۳). به نقش احتمالی رادیکال آزاد نیتریک اکسید (NO) در واکنش های گروه های نرون های حرکتی به ضایعه عصبی اشاره شده است. اخیراً نیتریک اکسید به عنوان یک پیامبر داخل سلولی و بین سلولی شناخته شده است که در انتقال پیام عصبی، اتساع عروقی و کشنده سلولی و تکامل سیستم عصبی نقش دارد (۹-۴). NO در سیتوپلاسم نرون از L-آرژنین توسط ایزوفرم نرونی نیتریک اکسید سینتاز (nNOS) و در حضور اکسیژن مولکولی و نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید فسفات<sup>۱</sup> تولید می شود. القاء فعالیت nNOS در نرون های حرکتی بعد از اسکوتومی (۱۰) یا بعد از قطع ریشه قدامی نخاع در موش های صحرایی<sup>۲</sup> نوزاد (۱۱) گزارش شده است. در آزمایشات قبلی به دنبال قطع عصب مدین و

1- Nicotin Amid Dinucleotid Phosphate  
2- Rat

۱- استادیار دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران، دانشکده پزشکی، گروه بافت شناسی (\*نویسنده مسئول)

جدول ۱: تعداد رت های اکسوتومی شده در سنین P2 و P7

قطع عصب اعصاب مدین و اولنار					
سن حیوان پس از اکسوتومی					
P21	P14	P12	P7	P4	اکسوتومی در P2
(۳)	(۲)	(۲)	(۶)	(۴)	(تعداد حیوان)
P21	P18	P14	P12	P10	اکسوتومی در P7
(۳)	(۴)	(۴)	(۳)	(۴)	(تعداد حیوان)

حیوانات بعد از طی دوره معین بعد از جراحی با دوز کشنده سدیم (پنتوباریتال ۶۰ mg/kg، داخل صفاقی) بیهوش شدند و از طریق قلبی با سرم فیزیولوژی و بدنبال آن با محلول فیکساتیو تازه (۴٪ پارافرمالدئید و ۰/۲٪ اسید پیکریک در بافر فسفات (M ۰/۱، pH=۷/۴) پرفیوز (perfused) گردیدند. قطعات نخاع ناحیه تحتانی گردن (C5-T1) برداشته شدند و به مدت ۲ ساعت در همان فیکساتیو و سپس در سوکروز ۱۰٪ و ۳۰٪ در بافر فسفات به ترتیب به مدت ۱ ساعت و در طول شب در دمای ۴°C نگهداری شدند. بعد از آن برش های عرضی ۳-۴ میکرومتری از نخاع توسط کرایوستات زده شد. برش های بافتی در بافر فسفات سالین (PBS، M ۰/۱) بر طبق سطح مقطع خود در نخاع به طور جداگانه جمع آوری گردیدند. هر گروه از مقاطع به طور ابتدا با روش هیستوشیمیایی و سپس ایمنو هیستوشیمی مورد آزمایش قرار گرفتند. زمان چسباندن مقاطع بر روی لام نیز مشخص گردید. در مورد حیوانات با قطع عصب سیاتیک نمونه نخاع کمتری در ناحیه L۴-L۳ تشریح گردید و به قطعات مربوطه تقسیم گردید و مراحل پردازش بافتی برای این مقاطع نیز به روش فوق انجام شد. روش هیستوشیمی و اکنش NADPH-d و ایمنو هیستوشیمی CB برای انجام اکنش NADPH-d از روش Vincent and Kimura (۱۹) استفاده گردید. پس از برش نخاع، ابتدا مقاطع به طور شناور در بافر فسفات ۲۰ mM حاوی ۰/۳٪ تریتون ۱۰۰، ۰/۲۵ mg/ml نیتر و بلوتترازولوم (Sigma) ۱ mg/ml NADPH۱ (Sigma) قرار داده شده و در دمای ۳۷°C به مدت ۳۰-۶۰ دقیقه انکوبه گردیدند. سپس مقاطع در PBS شستشو داده شدند و برای ایمنو هیستوشیمی CB مورد پردازش واقع شدند. ابتدا مقاطع در محلول بافر فسفات حاوی آنتی بادی منوکلونال ضد CB به غلظت ۱:۲۰۰۰، ۰/۳٪ تریتون و ۳٪ سرم نرمال در طول شب در دمای ۴°C انکوبه شدند. مقاطع سپس با PBS شستشو داده شدند.

(NADPH-d) را در بافت عصبی نشان داده است و توزیع آن در انطباق با نرون های حاوی nNOS در روش ایمنو هیستوشیمی است (۱۹-۱۰، ۱۶). در این مطالعه، واکنش NADPH-d بطریقه هیستوشیمیایی برای شناسایی nNOS و روش ایمنو هیستوشیمی نیز برای ایمنوراکتیویته CB بکار رفته است.

### مواد و روش ها:

در این مطالعه تجربی (Experimental) بر روی رت های نژاد ویستار نر و ماده بالغ (سه ماهه) از انستیتو پاستور خریداری گردیدند و در آزمایشگاه حیوانات دانشگاه تولید مثل نمودند مطالعه انجام گردید. روز تولد نوزادان به عنوان روز صفر (P۰) در نظر گرفته شد. قطع اعصاب مدین و اولنار در P2 و P7 بر روی ۳۰ نوزاد رت صورت گرفت. جراحی تحت شرایط استریل انجام گردید. ابتدا نوزادان به طریقه هیپوترمی بیهوش گردیدند. با ایجاد یک شکاف پوستی در حفره آرنج اندام فوقانی چپ، اعصاب مدین و اولنار نمایان و قطع گردیدند. سپس پودر فاست بلو (Sigma, FB) در انتهای پروکسیمال اعصاب قطع شده نهاده شد و مازاد آن پاک گردید و پوست آن ناحیه بخیه زده شد. بعد از جراحی نوزادان رت نزد مادرشان برگردانده شدند و تا چند ساعت تحت نظارت بعد از عمل قرار گرفتند. ۱۸ حیوان در P2 قطع عصب گردیدند و اجازه داده شد به مدت ۲، ۵، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۶، ۱۹ روز (یعنی تا سنین P4، P۷، P۱۰، P۱۲، P۱۴، P۱۸، P۲۱) بعد از جراحی زنده بمانند (جدول ۱). در آن دسته از رت ها که قطع عصب موفقیت آمیز بود، هیپراکستسیون دست مشاهده گردید. هر چند سمت مقابل به اعصاب محیطی قطع شده در نخاع به عنوان شاهد در نظر گرفته شد، تعدادی رت در سنین متفاوت نیز به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند. تعداد ۱۸ نوزاد رت نیز به همان روش فوق الذکر در P۷ مورد جراحی قرار گرفتند و اجازه داده شد به مدت ۳، ۵، ۷، ۱۱ و ۱۴ روز (یعنی تا سنین P۱۰، P۱۲، P۱۴، P۱۸، P۲۱) بعد از جراحی زنده بمانند (جدول ۱).

پس از انجام تعدادی از آزمایشات مربوط به قطع اعصاب مدین و اولنار و مشاهده نتایج، تعدادی نوزاد رت نیز در روزهای P۲ و P۷ مورد قطع عصب سیاتیک قرار گرفتند تا با نتایج حاصل از مطالعه Clowry, (۱۱) مقایسه گردد.

نرون های حرکتی یافت شدند. این ها سلول های میکرو گلی بوده که احتمالاً متعاقب فاگوسیتوز نرون های حرکتی آسیب دیده که دچار مرگ سلولی شده بودند، به طور ثانویه با FB نشاندار شده بودند. (شکل ۱a)



شکل ۱: فتومیکروگراف های A و B مربوط به مقطع نخاع گردن رت ۵ روز پس از قطع اعصاب مدین و اولنار در روز P۲ می باشد. نرون های حرکتی به روش رتروگراد با پودر FB نشاندار شده اند. بعضی از نرون های حرکتی ایمنوراکتیویته CB را نشان می دهند (ستاره)، سلول های میکرو گلی نیز بطور واضح FB را آشکار ساخته اند (پیکان).

در بررسی ایمنوراکتیویته CB در نرون های نخاع، الگوی ایمنوراکتیویته نرون ها در مقاطع نخاع نمونه های شاهد و تجربی شبیه الگوی بالغین بود با این تفاوت که زوائد سیتوپلاسمی این سلول ها با افزایش سن پس از تولد گسترده تر می شد. در مقاطع نخاع مربوط به نمونه های قطع عصب شده بعضی از نرون های حرکتی که FB مثبت بودند، ایمنوراکتیویته CB را با شدت متوسط یا ضعیف نشان دادند (شکل B-1A). ایمنوراکتیویته بیشتر در جسم سلولی نرون های حرکتی دیده می شد. بروز CB در نرون های حرکتی اسکوتومی شده

و در محلول حاوی آنتی بادی ثانویه (Fab) کنژوگه با CY۳ به غلظت ۱:۱۰۰ به مدت ۲ ساعت در دمای ۴°C انکوبه شدند. سپس در محلول PBS شستشو داده شدند و روی لام های با پوشش ژلاتینی چسبانده شدند. لام ها در طول شب خشک شده و با انتلان برچسب گذاری گردیدند. با ترکیب این دو روش مقاطع بافتی به طور همزمان برای واکنش NADPH-d و CB رنگ آمیزی شدند. مقاطع ابتدا با میکروسکوپ نوری برای بروز واکنش NADPH-d مورد مطالعه قرار گرفتند و سپس با میکروسکوپ فلوروسانت الیمپوس برای نرون های نشاندار شده با CB و FB، با استفاده از فیلتر های مناسب آنالیز و در صورت لزوم عکسبرداری شدند.

روش شمارش و بررسی آماری: اکثر نرون های حرکتی نشاندار شده با FB در سطوح C۶-C۸ یافت شدند و همراه با نرون های حرکتی NADPH-d مثبت در همین مقاطع شمارش گردیدند. برای تهیه برش های سریال از نخاع جهت آنالیز کمی، کرایوستات توانایی لازم را نداشت و نیاز به یک دستگاه میکروتوم انجمادی رومیزی بود که متأسفانه به علت فقدان این دستگاه کلیه مقاطع نخاع جمع آوری نمی گردید به ویژه در مورد رت های جوانتر که برش مقاطع نخاع دشوارتر بود. بنابراین تعداد مقاطعی که از نظر آماری مورد بررسی واقع شدند در گروه های سنی مورد نظر نیز شمارش گردیدند. بر حسب نتایج به دست آمده از روشهای هیستوشیمی و ایمنوهیستوشیمی، شمارش سلولی تنها در مورد بعضی از نمونه های قطع عصب شده در PV که نرونهای با واکنش مثبت NADPH-d را در بین نرونهای نشاندار شده با FB آشکار ساختند انجام شد. جهت شمارش ابتدا نرون های حرکتی +FB در هر مقطع شمارش گردید سپس با تغییر فیلتر از فلوروسانت به عادی، نرونهای حرکتی نشاندار با واکنش مثبت NADPH-d شمارش گردیدند. میانگین ارقام به دست آمده از نمونه های هر گروه گرفته شد و انحراف معیار آن نیز محاسبه گردید.

#### یافته ها

در بررسی مقاطع بافتی با میکروسکوپ فلوروسانت، نرون های حرکتی نشاندار شده با FB در ستون خلفی جانبی شاخ قدامی نخاع در سمت آسیب دیده آشکار شدند. نرون های حرکتی نشاندار شده، FB را در جسم سلولی و دندریت های پروکسیمال خود نشان دادند. علاوه بر نرون های حرکتی، تعدادی سلول گلیال نشاندار در محدوده

در ستون سلولی حد واسط جانبی (IML) نخاع واکنش شدیدی را نشان دادند. این نرون ها توسط دستجاتی از زوائد سلولی خود با نرون های NADPH-d مثبت مستقر در اطراف کانال مرکزی مرتبط بودند. (شکل ۳). نرون هایی که واکنش شدید برای NADPH-d را نشان دادند.



شکل ۳: مقطعی از نخاع در سطح T1 که نرون های واکنش دهنده با NADPH-d را در شاخ جانبی (IML) نشان می دهد که توسط دستجاتی از زوائد سلولی خود با نرون های مستقر در اطراف کانال مرکزی (CC) نخاع در ارتباط هستند.

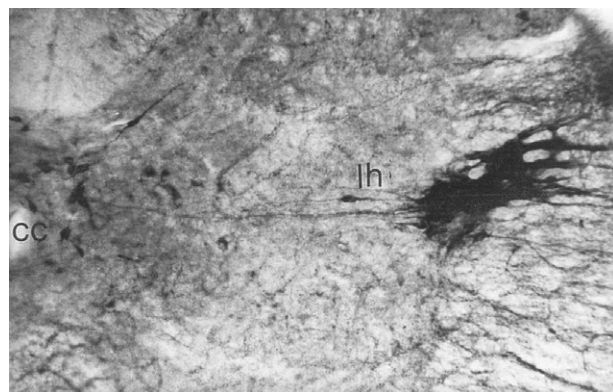
شامل نرون های لایه های سطحی شاخ خلفی و اطراف کانال مرکزی نخاع بودند. نرون های لایه های VII, VI رنگ پذیری با شدت متوسط را آشکار ساختند در حالی که تعداد کمی از نرون ها نیز واکنش ضعیفی را نشان دادند. مقاطعی از نخاع که با ضخامت کمتری بریده شده بودند تنها از نظر کاهش رنگ آمیزی زمینه تفاوت داشتند. در بعضی از مقاطع در شاخ قدامی نخاع در مجاورت نرونهای حرکتی نشاندار شده نرون هایی با واکنش شدید NADPH-d در سمت همسو با قطع عصب محیطی یافت شدند که FB منفی بودند (شکل ۴). در مقاطع نخاع مربوط به نمونه های اکسوتومی شده در P2، نرونهای حرکتی در سمت آسیب دیده نخاع در روز های مختلف بعد از قطع عصب برای NADPH-d واکنش مشهودی نداشتند. هر چند تعداد اندکی از نرون های حرکتی آسیب دیده در هفته دوم بعد از قطع عصب واکنش بسیار ضعیفی را نشان دادند که در عین حال برای CB ایمنوراکتیویته نشان ندادند. قطع عصب در P7 سبب شد که تقریباً از روز هفتم پس از اکسوتومی تعدادی از نرون های حرکتی نشاندار شده با FB واکنش NADPH-d را با شدت متفاوت آشکار سازند، (شکل های ۴-۵) در حالی که از نظر ایمنوراکتیویته CB منفی بودند (شکل ۴). اگر چه بعضی از نرون های حرکتی اکسوتومی شده در P2

بطور موقتی بود بطوری که با افزایش سن حیوان پس از قطع عصب بتدریج ناپدید گردید و تا دو هفته بعد از قطع عصب کم یا هیچ نرون حرکتی CB را بروز دادند. جدول ۲ مدت زمان بروز CB در نرون های حرکتی اکسوتومی شده را نشان می دهد. در رت های با قطع عصب در P2 تعداد نرون های حرکتی CB مثبت نسبت به P7 بیشتر بنظر می رسید. هیچ یک از نرون های حرکتی سمت مقابل نخاع در رت های آسیب دیده و یا نرون های حرکتی در گروه شاهد ایمنوراکتیویته CB را آشکار نکردند.

جدول ۲: ایمنوراکتیویته CB در نرون های حرکتی در سنین مختلف پس از اکسوتومی

ایمنوراکتیویته CB							سن حیوان در زمان قطع عصب
P21	P18	P14	P12	P10	P7	P4	P2
+	-+	+	+	+	+	-+	P2
+	-+	+	+	-+			P7

در مشاهدات مقاطع با میکروسکوپ نوری، کلیه مقاطع بافتی در سنین مختلف برای NADPH-d واکنش نشان دادند. اکثر نرون هایی که واکنش مثبت داشتند در یک روش مشابه به رنگ آمیزی گلژی، رنگ گرفته بودند. و رنگ پذیری را در جسم سلولی و زوائدشان و نه در هسته نشان دادند. این واکنش مثبت در نمونه های شاهد و تجربی شامل همان نرون های نخاعی بود که در مطالعات سایر محققین نیز به آن ها اشاره شده بود. الگوی رنگ پذیری منحصر به نرون هایی در شاخ خلفی نخاع، اطراف کانال مرکزی و تعدادی نیز در شاخ قدامی نخاع می شد (شکل ۲). در مقاطعی که از سطح T1 بریده شده بودند، علاوه بر نرون های فوق الذکر نرون های مستقر

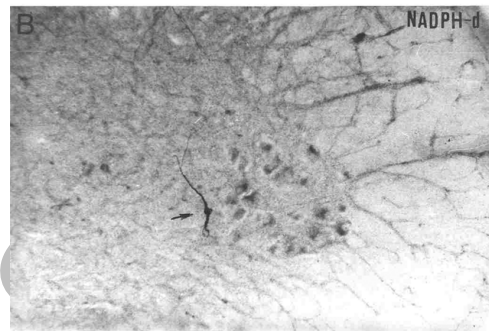
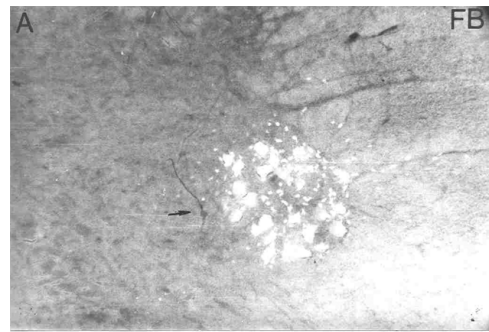


شکل ۴: این فتومیکروگراف مقطعی از نخاع ناحیه تحتانی گردن را در رت نشان می دهد که نرون های NADPH-d مثبت را در شاخ خلفی نخاع (dh) و اطراف کانال مرکزی (CC) نشان می دهد.

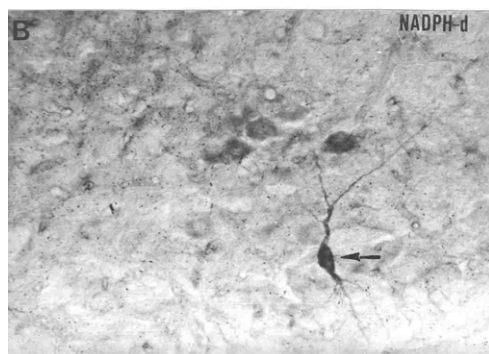
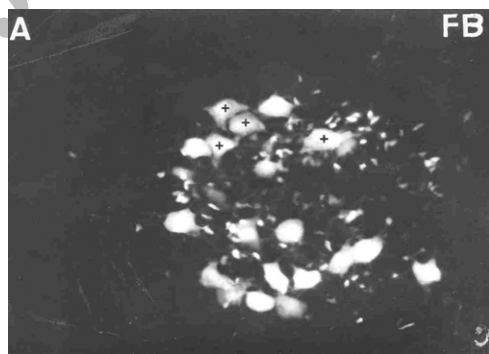
جدول ۳: شمارش نرون های حرکتی NADPH-d مثبت و نشاندار شده با FB در روزهای معین پس از قطع اعصاب مدین و اولنار در رت های نوزاد در PV

روزهای پس از قطع عصب در P7	نرون های حرکتی نشاندار شده با FB	نرون های حرکتی FB <sup>+</sup> +NADPH-d <sup>+</sup>	درصد نرون های حرکتی FB <sup>+</sup> +NADPH-d/FB <sup>+</sup>
P10	۲۷۰	-	-
	۱۵۳	-	-
	۲۴۴	-	-
میانگین (SD)	۲۱۹	-	-
	(۲۵)۲۲۷۵	-	-
P12	۲۴۵	۱	۰/۴
	۲۹۰	۲	۰/۶
میانگین (SD)	۱۸۲	-	-
	(۳۱۳)۲۳۹	(۰/۵)۱	(۰/۲)۰/۳
P14	۲۸۰	۴۱	۱۴/۶
	۲۶۴	۵۵	۲۰/۸
	۲۹۵	۳۱	۱۰/۵
میانگین (SD)	۲۵۱	۲۸	۱۷/۵
	(۹۵)۲۷۲/۵	(۳/۹)۳۸۷	(۲/۳)۱۴/۲
P18	۲۳۶	۴۵	۱۹
	۲۵۵	۳۳	۱۲/۹
	۲۳۸	۴۲	۱۷/۶
میانگین (SD)	۲۷۸	۵۲	۱۸/۷
	(۹۷)۲۵۱۷	(۳/۹)۴۳	(۷/۴)۱۷
P21	۳۲۴	۶۸	۲۰/۹
	۳۵۵	۵۴	۱۵/۲
میانگین (SD)	۳۷۴	۵۸	۱۲/۲
	(۱۴/۵)۳۵۱	(۴/۱)۶۶	(۷/۷)۱۶/۱

PV و تا یک هفته پس از قطع عصب کلیندین را با شدت متفاوت بروز میدادند، ایمنوراکتیویته CB در نرون های حرکتی دو هفته بعد از قطع عصب به سختی قابل رویت بود. با توجه به واکنش منفی نرون های حرکتی CB مثبت از نظر NADPH-d و نیز اطلاعات منتشر شده حاصل از مطالعه قبلی، سعی در شمارش این نرون های حرکتی CB مثبت نشاندار شده با FB به عمل نیامد. به هر حال نرون هایی حرکتی اکسوتومی شده در PV که NOS را با افزایش تدریجی شدت واکنش طی روزهای پس از جراحی آشکار ساختند شمارش گردیدند. نتایج این شمارش در جدول (۳) اشاره شده است. هر چند به علت مشکل در تهیه مقاطع سریال توسط کرایوستات تعداد مقاطع بریده شده نخاع رتهای جوانتر کمتر از رت های بالغ تر بود، بهر حال شمارش نرون های حرکتی نشاندار شده با FB آشکار ساخت که تعداد



شکل ۴: تصاویر سیاه و سفید A-B مقطع نخاع را نشان می دهد. پیکان یک نرون بینابینی d-NADPH مثبت در مجاورت نرونهای حرکتی را که از نظر FB منفی است اشاره می کند.



شکل ۵: فتومیکروگراف های دیگری از یک مقطع نخاع گردن رت دو هفته پس از قطع عصب محیطی در PV.. نرون های حرکتی FB مثبت که برای nNOS نیز واکنش داده اند با ستاره مشخص شده اند. یک نرون بینابینی که واکنش شدید d-NADPH را آشکار ساخته است در مجاورت نرون های حرکتی دیده می شود (پیکان). به تعداد فراوان سلول های میکروگلی نشاندار شده با FB در تصویر a توجه کنید.

بدست آمده تغییری حاصل نشد. البته در مطالعه Clowry اشاره شده که این نرون های حرکتی با واکنش مثبت d-NADPH در بین گروه نرون های حرکتی نشاندار شده با FB مشاهده شده اند که خود از نظر FB منفی بوده اند. دلیل مولف در بشمار آوردن این نرون ها به عنوان نرون های آسیب دیده این بوده که واکنش هیستوشیمیایی این سلولها فلئورسانس FB را می پوشاند. به هر حال احتمال داده می شود که نرون های با فعالیت d-NADPH در مطالعه Clowry که پس از قطع عصب در P2 آشکار شده اند در واقع همان نرون هایی هستند که در سایر تحقیقات و نیز تحقیق حاضر مشاهده شده اند و به آنها عنوان پیش نرون حرکتی اطلاق گردیده است. بعلاوه در تایید مطالعه حاضر، تحقیقات دیگری نیز نشان داده اند که قطع عصب سیاتیک دررت های نوزاد نتوانسته است سبب بروز nNOS در نرون های حرکتی ناحیه کمر در سمت آسیب دیده یا مقابل به آن در نخاع گردد (۲۱ و ۲۰، ۹). همچنین در یک مطالعه دیگر Mariotti و همکاران (۲۲) نشان دادند که نرون های حرکتی اکسوتومی شده هسته فاسیال در زمان تولد از آشکار کردن d-NADPH در روزهای اول و دوم بعد از قطع عصب ناتوان هستند، یعنی زمانی که تغییرات آپوپتوزی در نرون های حرکتی بوضوح آشکار بوده و به عبارتی بروز nNOS پس از شروع مرگ نرون های حرکتی بوده است.

از طرف دیگر در این بررسی، قطع اعصاب مدین و اولنار در P7 منجر به فعالیت دیافورن d-NADPH در بعضی از نرون های حرکتی آسیب دیده دو هفته پس از نرسیدن گردید. بروز nNOS توسط بعضی از این نرون های حرکتی، تنها در بخش نوروتروفیکی این آنزیم را مطرح سازد. در بررسی نقش NO در دژنراسیون و آلفا۱ من عصب سیاتیک پس از لیگاتور مشاهده شده که پس از بروز nNOS در نرون های گانگلیون خلفی ریشه نخاع ظاهر می شود که به الیاف در حال رشد گسترش یافته و در طی هفته دوم به پیک می رسد. همچنین، ایزوفرم اندوتلیالی NOS در محل لیگاتور عصب و iNOS در ماکروفاژهای ناحیه آسیب عصب افزایش می یابند (۲۳). همچنین بر اساس گزارش Keilhoff و همکارانش، موشهای ناک-اوت nNOS بعد از قطع عصب سیاتیک، تاخیر در ترمیم عصب و نیز مرگ سلولی آپوپتوزی بیش از حد نرونهای گانگلیون خلفی نخاع را آشکار ساختند (۲۴، ۲۵، ۲۶). بعلاوه، در نرون های گانگلیونی اکسوتومی شده و در حال ترمیم در رت، استفاده از مهار کننده NOS سبب کاهش اثرات القایی فاکتور

نرون های آسیب دیده کاهش چشمگیری تا دو هفته پس از اکسوتومی نداشته اند.

قطع عصب سیاتیک در P2 و P7 نیز نتایج مشابه با قطع اعصاب مدین و اولنار را نشان داد.

همان گونه که در جدول ۳ ملاحظه می کنید، نرون های حرکتی FB<sup>+</sup> بیشتری با افزایش سن حیوان پس از اکسوتومی مشاهده می شود. این به دلیل سهولت بیشتر در جمع آوری مقاطع سریال پس از برش توسط دستگاه کرایوستات می باشد. بنا بر این تعداد نرون های حرکتی نشاندار شده پس از قطع عصب سیاتیک و اولنار در این جدول ارقام واقعی بشمار نمی رود نسبت نرون های حرکتی نشاندار که با انجام واکنش d-NADPH واقع در FB<sup>+</sup> بوده اند نیز تقریباً یک هفته بعد از قطع عصب آشکار شده و نسبت آنها نسبت به کل نرون های FB<sup>+</sup> در سنین P14, P18, P21 ثابت می داری نداشته است. اگر چه شدت واکنش با افزایش سن بیشتر شده است

### بحث و نتیجه گیری

بروز nNOS در نرون های حرکتی اکسوتومی شده در ارتباط با مرگ نرونی گزارش شده است (۱۱). این مطالعه از طریق واکنش d-NADPH در نرون های حرکتی در زمان های متفاوت بعد از قطع عصب ارتباط احتمالی مرگ نرون های حرکتی آسیب دیده را با بروز nNOS و CB بررسی نمود. در این مطالعه آشکار شد که نرون های حرکتی اکسوتومی شده در P2 هیچ واکنشی را در رابطه با بروز nNOS از خود نشان ندادند و هیچ انطباقی بین نرون های حرکتی نشاندار شده با FB و نرون های d-NADPH مثبت در کلیه حیوانات این گروه آزمایشی در سنین مختلف پس از اکسوتومی وجود ندارد. این یافته ها مغایرت دارد با نتایج Clowry (۱۱) که نشان داده بود قطع عصب سیاتیک در رتهای ویستار نوزاد (P1) سبب افزایش نسبت نرون های حرکتی d-NADPH مثبت در ناحیه خلفی جانبی شاخ قدامی نخاع کمری می شود. این می تواند به علت نوع عصب محیطی قطع شده، و یا شرایط و کیفیت تکنیک مورد استفاده باشد. در این رابطه آزمایشاتی نیز با قطع عصب سیاتیک تجربه شد که یافته های آن با نتایج بدست آمده از قطع اعصاب مدین و اولنار مشابهت داشت. احتمال تفاوت ضخامت مقاطع بافتی نیز می توانست عاملی برای کاهش واکنش آنزیمی برای واکنش مربوطه باشد که در این رابطه نیز مقاطعی با ضخامت کمتر (۳۰ μm) تهیه گردید که مجدداً در نتایج

در PV، نرون های حرکتی تکامل یافته ترند و مرگ نرون ها نیز تدریجی است.

با توجه به شمارش نرون های حرکتی نشاندار شده با FB که به منظور تعیین درصد نرون های حرکتی آسیب دیده دارای فعالیت d-NADPH انجام شد بنظر می رسد که قطع عصب در PV تاثیر زیادی در تعداد نرون های آسیب دیده ندارد. در عین حال با توجه به عدم حصول مقاطع سریال نخاع بویژه در رتهای جوانتر توسط کرایوستات، این یک روش شمارش دقیق برای تعیین درصد مرگ سلولی به شمار نمی رود. یافته های حاصل از مطالعه قبلی (۱۳) نیز نشان داد که شمارش تعداد نرون های حرکتی آسیب دیده نشاندار شده با FB در گروه هایی از رتها با قطع عصب مدین و اولنار در سنین P۲, PV, P۲۱ و بالغ تفاوت معنی داری نداشته، هر چند در رت های جوان تر اکسوتومی شده کمتر بود. مطالعات زیادی نشان داده اند که توانایی نرون های حرکتی به ادامه حیات بعد از اکسوتومی با سن حیوان در زمان قطع عصب تغییر می کند. Pollin و همکارانش (۲) در مطالعات خویش بر روی موش های نوزاد نشان دادند که قطع اعصاب مدین و اولنار در چهار روز اول بعد از تولد سبب مرگ ۹۰-۸۰٪ نرون های حرکتی می گردد و ۵۰٪ نرون های حرکتی نیز متعاقب اکسوتومی در هفته اول بعد از تولد از بین می روند. کاهش نسبی مرگ نرونی بدنبال اکسوتومی در PV مویید این نکته است که نرون های حرکتی در این سن بالغتر از زمان P۲ هستند. علاوه بر اینکه اختلافات زیادی در میزان مرگ نرون های حرکتی در رابطه با متفاوت بودن سن اکسوتومی در گونه های مختلف دیده شده، نظرات متفاوتی نیز در مورد میزان مرگ نرونی در بین یک گونه خاص مطرح شده است. بطوری که در مطالعات بر روی رت ها بعضی محققین گزارش داده اند که آسیب عصب سیاتیک ۷ روز پس از تولد منجر به کاهش ۸۰٪ نرون های حرکتی می شود (۲۹)، در حالی که بعضی دیگر نه تنها کاهش نرونی قابل ملاحظه ای را بعد از آسیب عصب محیطی ۶-۵ روز بعد از تولد ذکر نکرده اند، بلکه عصب رسانی مجدد تقریباً کامل عضله را گزارش نموده اند (۳۰). بعلاوه Clowry و همکارانش (۳۱) در بررسی آسیب پذیری نرون های حرکتی هسته های فاسیال، زیر زبانی، ابدوسن و سه قلو تنه مغزی در موش جهش یافته لرزان (Wobbler) نتیجه گرفته اند که نرون های حرکتی در هسته های مختلف پاسخ متفاوتی در فاز دژنراسیون است.

نوروتروفیکی مشتق از مغز (BDNF) در بروز mRNA ژنهای مرتبط با رشد مثل TAG-1, L1, GAP (۲۷) می شود. بنابراین بنظر می رسد که NO و به عبارتی ایزوفریم نرونی NOS جهت بقا و ترمیم نرون ضروری باشد در مطالعه قبلی (۱۳) وجود سلولهای میکروگلی نشاندار شده با FB یک هفته پس از قطع عصب در P۲ و PV گزارش شد که تعداد آنها در رتهای تجربی جوانتر بیشتر بود. در این مطالعه حضور سلول های میکروگلی نشاندار دو هفته بعد از آسیب عصب محیطی در PV می تواند نشانه ادامه روند مرگ سلولی باشد. در عین حال، نرون های حرکتی مقاوم در برابر آسیب که تعدادشان با افزایش سن حیوان در هنگام اکسوتومی افزایش می یابد، احتمالاً با بروز NO به روند ترمیم کمک می نمایند.

در بررسی ایمنوراکتیویته CB نیز نتایج نشان دادند که CB بطور موقت در نرون های حرکتی اکسوتومی شده آشکار می شود که با افزایش سن حیوان پس از قطع عصب محیطی بتدریج ناپدید می شود. بطوری که دو هفته بعد از قطع عصب نرون های حرکتی CB مثبت بندرت یافت می شدند. بعلاوه نرونهای حرکتی اکسوتومی شده در PV نیز که از هفته دوم با شدت ضعیفی nNOS را بروز دادند با نرون های حرکتی CB مثبت منطبق نبودند. ظهور CB در نرون های حرکتی اکسوتومی شده می تواند حاکی از نقش آن در نورپروتکشن باشد. Lim و همکارانش (۲۸)، بروز موقت CB را در نرون های حرکتی نخاع کمری رت پس از ریزوتومی اعصاب نخاعی در P۳ گزارش داده اند. آن ها با توجه به مرگ ۸۰٪ نرون های حرکتی آسیب دیده، نظر داده اند که بروز زودگذر CB در نرون های حرکتی اکسوتومی شده که اکثراً محکوم به مرگ هستند می تواند یک کوشش ناموفق این نرون ها در بافری نمودن مقادیر بالا و نوروتوکسیک کلسیم داخل سلولی باشد. از طرف دیگر، بنظر می رسد بروز موقت CB در نرون های حرکتی بعد از اکسوتومی در ارتباط با مرگ نرونی باشد زیرا در مطالعه قبلی نشان داده شد که با افزایش سن حیوان در زمان قطع عصب محیطی، ایمنوراکتیویته CB در نرون های حرکتی کاهش می یابد که با کاهش مرگ نرون مطابقت دارد. بنابراین احتمال دارد این پروتئین در مسیر های پیام رسانی  $Ca^{+2}$  که منتهی به مرگ سلول می شود دخالت داشته باشد. بنابراین آسیب عصب محیطی در روز های نخست بعد از تولد منجر به مرگ سریع تعداد بیشماری از نرون های حرکتی می گردد، در حالی که هنگام قطع عصب محیطی

### تشکر و قدردانی

کار تحقیقاتی حاضر نتیجه طرح پژوهشی مصوب دانشگاه شاهد است که مولف بدین وسیله مراتب قدردانی خویش را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه و مسئولین دانشکده پزشکی در حمایت مالی و فراهم نمودن امکانات و تسهیلات لازم ابراز می دارد. از جناب آقای دکتر احمدبانی و نیز مدیریت محترم شرکت دارویی زهراوی که در تامین داروی بیهوشی مورد نیاز همکاری نمودند کمال تشکر را دارم. همچنین مراتب قدر دانی خود را از سرکارخانم شرایلی و پرسنل محترم آزمایشگاه بیمارستان مصطفی خمینی که در امر تهیه برش های انجمادی به این پروژه یاری رساندند و نیز آقای بشارتی کارمند دلسوز آزمایشگاه حیوانات و نیز کلیه پرسنل دانشکده پزشکی شاهد که در خرید مواد، استریلیزاسیون و مکاتبات اداری انجام مراحل مختلف پروژه همکاری داشتند، اعلام می دارم.

### References:

1. Aszmann O C, Winkler T, Korak, Lassmann H, Frey M. The influence of GDNF on the timecourse and extent of motoneuron loss in the cervical spinal cord after brachial plexus injury in the neonate. *Neurol Res.* 2004; 26:211-7.
2. Pollin M M, McHanwell S, and Slatter C R. The effect of age on motoneuron death following axotomy in the mouse. *Devel.* 1991; 112: 83-89.
3. Lowrie M B, and Vrbova G. Dependence of postnatal motoneurons on their targets: Review and hypothesis. *Trends Neurosci.* 1992; 15: 80-84.
4. Tiraihi, T and Rezaie M J. Apoptosis onset and Bax protein distribution in spinal motoneurons of newborn rats following sciatic nerve axotomy. *Intern. J. Neurosci.* 2003; 113: 1163-1175.
5. Garthwai J. Glutamat, nitric oxide and cell- cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosc.* 1991; 14: 60-67.
6. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Fedn Proc fedn Am Socs Exp Biol.* 1992; 3051-3064.
7. Snyder S H. Nitric oxide and neurons. *Curr Opin*

از مطالعه حاضر می توان نتیجه گیری نمود که NO علاوه بر سیتو توکسیسیته می تواند در مکانیسم های ترمیمی نیز موثر باشد به همان گونه که در طی تکامل اولیه نرون حرکتی نیز بروز می یابد. افزایش شدت واکنش d-NADPH در طی هفته دوم پس از قطع عصب محیطی در P۷ و نه در P۲ به دلیل آسیب پذیری کمتر نرون های حرکتی و تمایل بیشتر آن ها به بقا و ترمیم می باشد. از طرفی بروز موقت CB در نرون های حرکتی اکسوتومی شده در طی دو هفته بعد از آسیب در رابطه با واکنش محافظتی اولیه نرون ها به اثرات مرگبار افزایش کلسیم داخل سلولی و در واقع مقابله با مرگ سریع نرون ها و یا نتیجه مداخله این پروتئین در مکانیسم های مرگ سلولی با واسطه Ca است.

*Neurobiol.* 1992; 2: 323-327.

8. Brosnan C F, Battistini L, Ranie C S, Dixon D W, Casadevall A, and Lee S C. Reactive nitrigen intermediates in human neuropathology: an overview. *Dev Neurosci.* 1994; 16:152-161.
9. Keilhoff G, Seidel B, Noack H, Tischmeyer W, Stanek D, and Wolf G. Patterns of nitric oxide synthase at the messenger RNA and protein levels during early rat brain development. *Neurosci.* 1996; 75: 1193-1201.
10. Kalb R G and Agostini J: Molecular evidence for nitric oxide-mediated motoneuron development. *Neurosci,* 1993; 57: 1-8.
11. Clowry G J. Axotomy induces NADPH diaphorase activity in neonatal but not adult motoneurons. *Neuroreport.* 1993; 5: 361-364.
12. Wu Y, Li Y, Liu H, and Wu W. Induction of nitric oxide synthase and motoneuron death in newborn and early postnatal rats following spinal root avulsion. *Neurosci Lett.* 1995; 194: 109-112.
13. Fallah Z, and Clowry G J. The effect of a peripheral nerve lesion on calbindin D28k immunoreactivity in



- the cervical ventral horn of developing spinal cord. *Exp Neurosci.* 1999; 156: 111-120.
14. Kohr G, Lambert C E, and Mody I. Calbindin-D28k (CaBP) levels and calcium currents in actually dissociated epileptic neurons. *Exp. Brain Res.* 1991; 85: 543-551.
15. Liedo P M, Morton A J, Emson P C, and Masson W T. Stable transfection of calbindin-D28k into the Gh3 cell line alters calcium currents and intracellular homeostasis. *Neuron.* 1992; 9: 943-
16. Anderson C R. NADPH diaphorase positive neurons in the rat spinal cord include a subpopulation of autonomic preganglionic neurons. *Neurosci Lett.* 1992; 130: 280-284.
17. Dawson T D, Bredt D S, Fotuhi M, Hwang P M and Sinder S H: Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci.* 1991; 88: 7797-7801.
18. Yu W H A. Regulation of nitric oxide synthase expression in motoneurons following nerve injury. *Dev Neurosc.* 1997; 19: 247-254.
19. Vincent S R, and Kimura H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neurosci.* 1992; 46: 755-784.
20. Rogerio F, Teixeira S A, Queiroz L S, Nucci G and Langone F: Expression of neuronal isoform of nitric oxide synthase in spinal neurons of neonatal rats after sciatic nerve transection. *Neurosci Lett.* 2001; 307: 61-64.
21. Piehl F, Hammarberg H, Tabar G, Hokfelt T, and Culheim S. Changes in the mRNA expression pattern, with special reference to calcitonin gene related peptide after axonal injuries in rat motoneurons depends on age and type of injury. *Exp Brain Res.* 1998; 119: 191-204.
22. Mariotti R, Peng Z-C, Kristensson K, and Bentivoglio M. Age-dependent induction of nitric oxide synthase activity in facial motoneurons after axotomy. *Exp. Neurol.* 1997; 145: 361-370.
23. Gonzalez- Hernandez T, Rustioni A. Expression of three forms of nitric oxide synthase in peripheral nerve regeneration. *J Neurosci. Res.* 1999; 55:198-207.
24. Keilhoff G, Fansa H, Wolf G. NOS Neuronal deficiency promotes apoptotic cell death of spinal cord neurons after peripheral nerve transection. *Nitric Oxide.* 2004; 10:101-11.
25. Keilhoff G, Fansa H, Wolf G. Nitric oxide synthase, an essential factor in peripheral nerve regeneration. *Cell Mol Biol.* 2003; 49:885-97.
26. Keilhoff G, Fansa H, Wolf G. Neuronal nitric oxide synthase is the dominant nitric oxide supplier for the survival of dorsal root ganglia after peripheral nerve axotomy. *J Chem Neuroanat.* 2002; 24:181-7.
27. Klocker N, Jung M, Stuermer CA, Bahr M. BDNF increases the number of axotomized rat retinal ganglion cells expressing Gap-43, L1 and TAG-1 mRNA –a supportive role for nitric oxide? *Neurobiol. Dis.* 2001; 8: 103-113.
28. Lim SM, Guiloff RJ, Navarrette R. Interneuronal survival and calbindin D-28k expression following motoneuron degeneration. *J Neurol. sci.* 2000; 180: 45-51.
29. Luthman J, Aldskogius H, Severson M, and Jondsson G. Exogenous GM-1 ganglioside and thyrotropin-releasing hormone do not affect survival rate of spinal motor neurons and number of ventral root myelinated fibers following early postnatal sciatic nerve transection. *Exp. Neurol.* 1988; 99: 166-177.
30. Lowrie MB, Krishnan S, Vrbova G. Recovery of slow and fast muscles following nerve injury during early post-natal development in rat. *J. Physiol.* 1982; 331: 51-66.
31. Clowry JG and McHanwell S. Brainstem motor nuclei respond differentially to degenerative disease in the mutant mouse wobbler. *Neuropathol and Appl. Neurobiol.* 2004; 30: 148-160.

## NADPH-diaphorase activity and CB-28kD immunoreactivity in spinal motoneurons of neonatal rats after a peripheral nerve lesion

\*Zahra Fallah<sup>1</sup>

### Abstract :

**Background:** Our previous studies have shown that median and ulnar nerve lesion induced calbindin (CB) immunoreactivity in some injured motoneurons in developing rats. Motoneuron death induced by sciatic nerve transection in neonatal rats has been related to induction of neuronal isoform of nitric oxide synthase. The present study investigated whether CB expression is related to the death or survival of motoneurons in response to axotomy.

**Materials and methods:** After median and ulnar nerve transection at P2 and P7, NADPH-diaphorase histochemistry was performed on cervical sections to analyze the induction of nitric oxide synthase in motoneurons retrogradely labeled with fast blue and immunostained for CB. NADPH-diaphorase reactivity was not detectable in fast blue (FB) labeled motoneurons after 1 and 2 weeks after nerve lesion at P2.

**Results:** following nerve lesion at P7, some FB labeled motoneurons showed enzyme activity 2 weeks after nerve lesion which were not CB immunoreactive.

**conclusion:** The results indicate the possible role of nitric oxide in nerve regeneration and the role of CB in neuroprotection from cell death or in mechanisms of neurodegeneration.

**Key words:** axotomy, calbindin, motoneuron, NADPH-diaphorase

1- (\*Correspondence author) Assistant professor, department of histology, Army University of medical sciences.