

# تأثیر استیل ال کارنیتین بر واکنش گلیوز پس از ضایعه فشاری طناب نخاعی موش صحرایی بالغ

نویسندگان: صدرا جمشیدی گوهری<sup>۱</sup>، مرجان حشمتی<sup>۲\*</sup>، محمدرضا جلالی ندوشن<sup>۲</sup>

۱. دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۲. گروه علوم تشریح و پاتولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران، ایران

E-mail: heshmatimarjan@hotmail.com

\* نویسنده مسئول: مرجان حشمتی

## چکیده

مقدمه و هدف: ضایعه فشاری بروی طناب نخاعی سبب بروز طیف وسیعی از اختلالات حسی و حرکتی می‌گردد. در این تحقیق سعی شد پس از ایجاد مدل فشاری بر نخاع موش صحرایی بالغ تغییرات بافتی بررسی شود. بدین منظور واکنش گلیوز با استفاده از روش ایمنوهیستوشیمی بابیان آنزیم CNPase و GFAP و تأثیر استیل ال کارنیتین در این روند ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها: ۲۴ موش صحرایی نر نژاد اسپراگوداولی در ۴ گروه بصورت تصادفی تقسیم شدند. پس از انجام لامینکتومی مهره‌های ۹ تا ۱۱ پشتی با توجه به گروه مطالعه یا کنترل اعمال فشار (۳۰ گرم بر واحد سطح) و تزریق روزانه داخل صفاقی استیل ال کارنیتین (۳۰۰ میلی‌گرم) انجام شد. پس از ۴ هفته تمامی نخاع‌ها خارج و بررسی مورفومتری و ایمنوهیستوشیمی به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد بیان گردید. پس از مشخص نمودن توزیع داده‌ها برای مقایسه نتایج از آزمون تی و آنوای یکطرفه با نرم‌افزار SPSS Ver19 استفاده شد.

نتایج: نتایج مورفومتری حاکی از کاهش تعداد سلول‌های عصبی حرکتی به دنبال فشار مکانیکی است. استیل ال کارنیتین سبب کاهش این روند گردید ( $p \leq 0/05$ ). همچنین استیل ال کارنیتین سبب کاهش سلول‌های آستروسیت شد ( $p \leq 0/05$ ).

نتیجه‌گیری: برای اولین بار استیل ال کارنیتین در واکنش گلیوز مطالعه و نتایج حاکی از کاهش آستروسیت‌ها و افزایش حدوداً سه برابر اولیگودندروسیت‌ها شد. با پیش‌فرض تولید میلین جهت مشخص شدن نقش بیشتر استیل ال کارنیتین پیشنهاد بررسی درازمدت و چگونگی انتقال پیام عصبی می‌گردد.

واژگان کلیدی: استیل ال کارنیتین، گلیوز، موش صحرایی بالغ

دانشور  
پزشکی

دوماهنامه علمی-پژوهشی  
دانشگاه شاهد  
سال بیست و پنجم-شماره ۱۳۶  
شهریور ۱۳۹۷

دریافت: ۱۳۹۷/۰۳/۰۹  
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۷/۰۵/۲۴  
پذیرش: ۱۳۹۷/۰۶/۰۳

## مقدمه

ضربات مکانیکی طناب نخاعی یکی از مشکلات اساسی کشورها و جوامع پیش رفته جوان امروز محسوب می‌شود. (۱). در بررسی به عمل آمده در ایران تصادفات و ترومای حاد سبب معلولیت می‌گردند. جوانان بیشتر از سایر افراد در معرض خطرات ناشی از تصادفات قرار دارند (۲). عمده‌ترین مکانیسم‌های تروما در ضایعات نخاعی شکستگی یا جابه‌جایی ستون مهره‌هاست (۳) تحقیقات حدوداً دهه‌ی اخیر به‌گونه‌ای نشان داده است که با استفاده از سلول‌های بنیادی این امکان وجود دارد که بتوان روند ترمیم و رشد مجدد رشته‌های عصبی در ضایعات نخاعی را فراهم نمود (۴) تا حدود سی سال پیش تصور می‌شد که نمی‌توان اقدام مؤثری در جهت بهبود وضعیت افرادی که دچار ضایعات نخاعی می‌شوند انجام داد (۵) این نگرش تا حدود زیادی ناشی از مشکلات متعدد از جمله اختلالات سیستم ادراری - عفونت‌ها (۶) اختلالات ثانویه در عمل کرد اعضا و بخش‌هایی نظیر ریه و پوست از قبیل عفونت‌های ریوی و ضایعات پوستی مانند زخم بستر و ... (۷) و ترومبوزهای وریدی ناشی از بی‌حرکتی بود (۸) در طی جنگ دوم جهانی عمر متوسط این قبیل بیماران حدوداً سه ماه پس از ابتلای به ضایعه بود. در حال حاضر این دوره‌ی زمانی به بیست و پنج تا سی سال افزایش یافته است (۹) مطالعات زیادی در دو دهه‌ی اخیر در بیولوژی سلولی و مولکولی و درمان‌های مبتنی بر به کار بردن سلول‌های بنیادین بخصوص بر روی مدل‌های بیولوژیک ضایعات نخاعی و یا داروهای با خاصیت نوروتروفیکی انجام گرفته است. بطور مشخص در این ارتباط امروزه نظر دانشمندان به مواد دیگر قابل استفاده در جریان کلی درمان ضایعات نخاعی فراگیر که بعضاً بطور طبیعی در سلول هم وجود دارند از قبیل اریتروپوئیتین و اسید آمینه ال-کارنیتین جلب شده است.

استیل ال-کارنیتین (ALCAR) Acetyl LCarnitine (ALCAR) شکلی از اسید آمینه ال-کارنیتین است که در قریب به

تمام یاخته‌های بدن یافت می‌شود. استیل ال-کارنیتین در تولید انرژی از اسیدهای چرب زنجیره دراز نقش اساسی دارد و نیز سبب افزایش فعالیت بعضی یاخته‌های عصبی در دستگاه اعصاب مرکزی (CNS) می‌شود (۱۰). غلظت ال کارنیتین در عضلات سالم به میزان صد برابر از میزان این ماده در سرم و مایع بین سلولی بیشتر است (۱۱) در همه گونه‌های عالی جانوری گردش خون مسئول مستقیم رساندن ال کارنیتین به عضله قلب و همچنین سایر عضلات اسکلتی بدن است. بدین ترتیب سلول‌های بدن برای سنتز ال کارنیتین به ویتامین‌های ث، ب-۶ و ب-۳ (نیاسین) نیاز دارند؛ اما می‌توان آن را از منابع غذایی مانند گوشت قرمز، لبنیات و میوه آووکادو نیز دریافت کرد. وظیفه اصلی ال کارنیتین در بدن کمک به سوخت‌وساز و تبدیل غذا به انرژی از طریق انتقال اسیدهای چرب زنجیره دراز به داخل میتوکندری‌ها جهت بتاکسیداسیون آن‌هاست. از طرف دیگر مصرف چربی‌ها به عنوان منبع انرژی موجب صرفه‌جویی در مصرف گلیکوژن عضلات گردیده و با حفظ ذخایر گلیکوژن به تأخیر در بروز خستگی ورزشکاران می‌انجامد (۱۲). در یک جمله چنانچه بخواهیم نقش ال کارنیتین را بیان کنیم باید گفت این ماده چربی‌های فعال را از توده‌های ذخیره چربی به درون میتوکندری انتقال می‌دهد، به عنوان یک کوفاکتور در تولید انرژی عمل نموده و روند تولید چربی‌های با زنجیره متوسط و پیرواتها و همچنین اجسام کتون را تحت کنترل دارد. تحقیقات اخیر نشان داده است که علاوه بر اثرات سودمند مهمی که برای ال کارنیتین برشمرده شد (۱۳) و (۱۴) این ماده می‌تواند در فرآیند دفاعی بدن و ساخت سلول‌های دفاعی اختصاصی مانند تی لنفوسیت‌ها و بی لنفوسیت‌ها و همچنین سلول‌های فاگوسیتوز کننده غیراختصاصی مانند ماکروفاواها و نوتروفیل‌ها مؤثر باشد. در واقع استیل ال-کارنیتین می‌تواند تأثیرات آلزایمر را در بدن گند سازد (۱۵).

تاکنون روش‌های مختلفی جهت درمان ضایعات

استرس اکسیداتیو در بافت هیپوکامپ موش‌های صحرایی صرعی شده توسط اسید کاینیک "کاهش معنی‌دار آثار صرع و تخفیف شدت حملات تشنجی را نشان داد (۲۷). استیل‌ال‌کرنیتین در جلوگیری از تحلیل نوروهای هیپوکامپ و جوانه زدن فیبرهای خزه‌ای در مدل تجربی صرع گیجگاهی با نتیجه کاهش معنی‌دار آثار صرع و شدت حملات تشنجی همراه است (۲۸). "تأثیر استیل‌ال-کارتینین در بهبود عملکرد میتوکندری‌ها و در نتیجه ترمیم رشته‌های عصب محیطی در ضایعه‌ی طناب نخاعی" است (۲۹). "تأثیر استیل‌ال‌کارتینین در بهبود عملکرد سلول عصبی از طریق تأثیر روی فعالیت میتوکندری‌ها در ضایعه‌ی مدل کانتیوژن طناب نخاعی است (۳۰).

#### مواد و روش

بدین منظور ۲۴ موش صحرایی بالغ ماده از نژاد اسپراگوداولی به وزن ۲۵۰-۳۰۰ گرم تهیه شد. سپس در ۴ گروه به صورت تصادفی به شرح زیر قرار گرفتند:

الف- لامینکتومی مهره‌های ۹ تا ۱۱ پشتی و تزریق روزانه داخل صفاقی استیل‌ال‌کارتینین

ب- لامینکتومی مهره‌های ۹ تا ۱۱ پشتی به همراه تزریق داخل صفاقی سرم فیزیولوژی

ج- مانند گروه الف همراه اعمال فشار مکانیکی

د- مانند گروه ب همراه اعمال فشار مکانیکی

بدین ترتیب که در هر گروه ۶ حیوان قرار گرفت. در گروه مطالعه تزریق روزانه به صورت داخل صفاقی استیل‌ال‌کارتینین به میزان ۳۰۰ میلی‌گرم محلول در سرم فیزیولوژی انجام شد. فشار با کلیپس آنوریسم به میزان ۳۰ گرم بر واحد سطح نیز اعمال گردید. پس از گذشت ۴ هفته تمامی حیوانات به روش بیهوشی عمیق از طریق پرفیوژن قلبی کشته شدند. نخاع خارج و در محلول ۱۰ درصد فرمالین فیکس و پردازش بافتی انجام شد. سپس بلوک پاراتینی تهیه و از بلوک‌های پاراتینی برش‌هایی به ضخامت ۶ میکرون توسط دستگاه میکروتوم تهیه و لام‌های حاوی نمونه جهت بررسی مورفومتری و ایمنوهیستوشیمیایی آماده گردید.

نانویه نخاع توسط محققان مطرح گردیده است که هولسبوخ<sup>۱</sup> و همکاران وی به آن اشاره کرده‌اند (۱۶) علاوه بر مطالعه بالینی مطالعه پایه‌ای نیز در زمینه ضایعات نخاعی با در نظر گرفتن ابعاد مختلف آن انجام شده و هدف نهایی ارائه الگویی کاربردی و درعین حال ساده و کم‌هزینه جهت اجرایی شدن این هدف در جامعه بشری است (۱۷، ۱۸). یکی از مدل‌هایی که به شکل گسترده استفاده می‌شود مدل له‌شدگی است که در آن یک وزنه فشار ناگهانی معینی را ایجاد می‌کند. با توجه به اینکه له‌شدگی علت زمینه‌ای ۴۹٪ از بیماران پاراپلژیک است، یک مدل کاربردی جهت اعمال فشار جهت آزمایش‌ها بالینی محسوب می‌گردد (۰ و ۱۹). در روش کلیپس آنوریسم که این وسیله اولین بار توسط فهلینگ<sup>۲</sup> و همکاران وی در سال ۱۹۹۸ استفاده شد (۲۱) میزان فشار در واحد سطح قابل تنظیم است (۲۲). روش‌های درمانی در حال حاضر استفاده از انواع داروهای شیمیایی و داروهای گیاهی، سلول درمانی، توان‌بخشی، روان‌پزشکی و مشاوره است (۲۳). در بین داروها می‌توان از پردنیزولون- دکسترو متارفان نام برد. هدف استفاده از داروهای شیمیایی و گیاهی جلوگیری از روند مرگ و آپوپتوز سلول‌های عصبی پس از ضایعه فیزیکی نخاع و درعین حال جلوگیری از روند تشکیل بافت عصبی گلیال در این گونه حوادث فیزیکی وارد شده به مصدوم است (۲۴)

گلیوز یک پاسخ غیراختصاصی و عمومی سلول‌های نوروگلیا به بسیاری از اشکال آسیب سیستم اعصاب مرکزی CNS<sup>۳</sup> است. این پدیده در روندهای التهابی CNS مهم است ولی به نظر می‌رسد که ایسکمی، تروما، عوامل توکسیک و عوامل دیگر قادر باشند که سلول‌های نوروگلیا به ویژه آستروسیت‌ها و میکروگلیا را فعال کنند (۲۵). به نظر می‌رسد که آستروگلیا و میکروگلیا می‌توانند برای یکدیگر فاکتور رشد تولید کنند (۲۶). مطالعات نشان می‌دهد اثر تجویز استیل‌ال‌کارتینین بر

<sup>1</sup> . Hulsebosch CE

<sup>2</sup> . Fehling E J

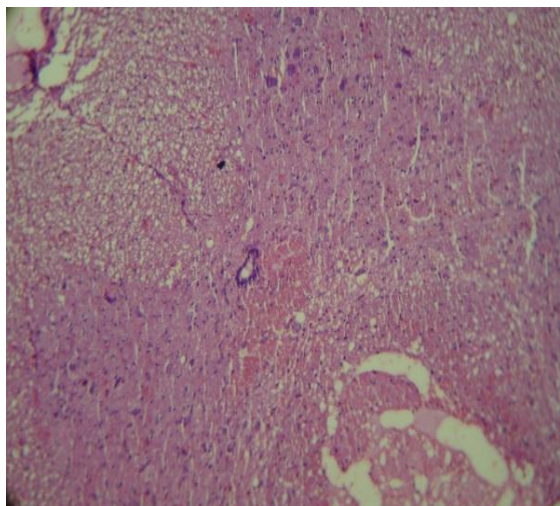
<sup>3</sup> . Central Nervous System

### روش‌های تجزیه و تحلیل نتایج

با توجه به چندین متغیر از آنالیز واریانس یک‌طرفه با نرم‌افزار SPSS Ver19 و همچنین برای بررسی دوبه‌دو از آزمون "تی" برای تجزیه و تحلیل نتایج استفاده شد. برای معنی‌دار بودن اختلاف میانگین گروه‌ها  $\leq 0/05$  در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

بررسی سلول‌های عصبی حرکتی نخاع نشان داد فشار مکانیکی سبب کاهش تعداد سلول‌های عصبی حرکتی گردید. این کاهش همراه با خونریزی و ایجاد حفره لابه‌لای سلول‌های شاخ قدامی نخاع و اطراف مجرای مرکزی است (تصویر ۱).



تصویر ۱. کاهش سلول‌های عصبی حرکتی در شاخ قدامی طرفی نخاع به همراه ایجاد حفره در بین سلول‌ها و خونریزی در بافت سفید و خاکستری نخاع و اطراف مجرای مرکزی نخاع با رنگ آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین (بزرگنمایی ۱۰۰)

نتایج رنگ‌آمیزی اختصاصی اجسام نیسل کاهش سلول‌های عصبی حرکتی در شاخ قدامی طرفی نخاع به همراه کروماتولیز شدن سلول‌های عصبی حرکتی در محل اعمال فشار در گروه‌های ج و د است (تصویر ۲).

با استفاده از روش رنگ‌آمیزی کرزیل فست ویولت که رنگ‌آمیزی اختصاصی اجسام نیسل در نورون‌های حرکتی است بررسی تعداد سلول‌ها و مورفولوژی نورون‌ها در طناب نخاعی سگمان مربوطه انجام گردید.

در روش ایمنوهیستوشیمیایی بررسی آنزیم CNPase (Cyclic-nucleotide-phosphodie) و پروتئین GFAP (Glial fibrillary acidic protein) با استفاده از آنتی‌بادی علیه این مارکرها انجام شد طوری که پس از انجام مراحل پرفیوژن و درآوردن سگمان نخاعی مورد نظر بلافاصله به محلول بافر فرمالین ۱۰ درصد منتقل و بعد از گذشت ۱۲ ساعت مراحل مختلف آب‌گیری، شفاف‌سازی، آغشتگی و قالب‌گیری به روش روتین همانند نمونه‌های میکروسکوپ نوری (شمارش سلولی) انجام گردید.

در این تکنیک با استفاده از آنتی‌بادی اولیه و آنتی‌بادی ثانویه به صورت واکنش دومرحله‌ای عملکرد سلول‌های آستروسیت با پروتئین GFAP و عملکرد سلول‌های اولیگودندروسیت با آنزیم دخیل در ساخته شدن میلین یعنی CNPase بررسی شد. کمیّت (درصد) و کیفیت (شدت) حضور CNPase و GFAP میزان واکنش گلیوز - که هدف اصلی همین بررسی بود - را نشان داد. در خاتمه‌ی تکنیک، با استفاده از دی آمینو بنزیدین (DAB / Di Amino Benzidine) محصول نهایی واکنش ایمنوهیستوشیمیایی به شکل رسوب ذرات قهوه‌ای تا سیاه‌رنگ دیده شد.

بررسی مورفومتری و ایمنوهیستوشیمیایی روی ۲۰ نمونه برش بافتی نخاع از بلوک‌ها روی لام انجام و شمارش و میانگین و درصد آن محاسبه گردید.

برای بررسی ایمنوهیستوشیمیایی نیز از هر نمونه بلوک بافتی مربوط به حیوان ۶ برش تهیه و با رنگ‌آمیزی اختصاصی به روش ایمنوهیستوشیمیایی و رنگ‌آمیزی روتین هماتوکسیلین و اتوزین درصد حضور سلول‌های مورد نظر محاسبه و بررسی گردید.

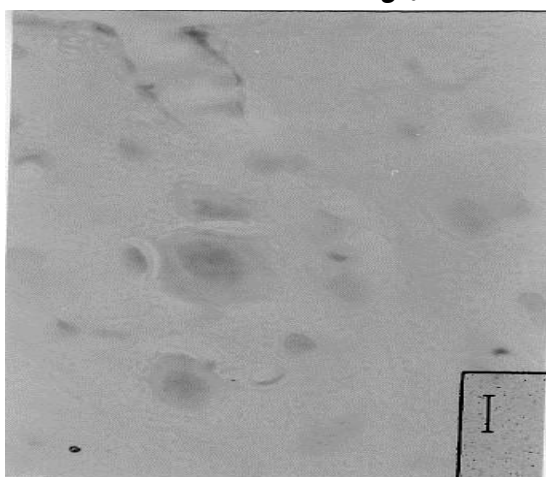
جدول ۲. درصد کاهش نورون‌های حرکتی شاخ قدامی-خارجی نخاع نسبت به گروه ب (مینا)

گروه‌های بررسی	در صد کاهش نسبت به گروه مینا (ب)
گروه الف	۱/۳٪ -
گروه ج	۳۴/۲۵٪ *
گروه د	۷۶/۳۵٪ *

\* $(p \leq 0.05)$  = Significant

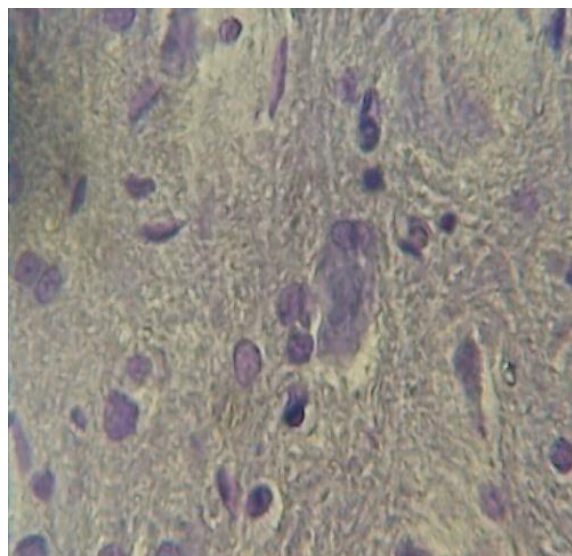
نتایج بررسی حضور و فعالیت آستروسیت با بررسی در صد و شدت حضور پروتئین GFAP انجام شد (شکل ۳)

محصول نهایی این تکنیک رسوب قهوه‌ای تا سیاه‌رنگ در سطح سلول آستروسیت است. سلول‌هایی که دارای واکنش مثبت نسبت به آنتی‌بادی استفاده شده را داشتند شمارش شدند.



تصویر ۳. دو سلول عصبی آستروسیت که با آنتی‌بادی برای پروتئین GFAP واکنش مثبت نشان داده‌اند. (بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰)

جهت بررسی حضور سلول عصبی اولیگودندروسیت در صد و شدت حضور با استفاده از آنتی‌بادی علیه آنزیم CNPase استفاده شد. محصول نهایی رسوب قهوه‌ای در سطح سلول اولیگودندروسیت است. سلول‌های موجود در شاخ قدامی نخاع شمارش شدند.



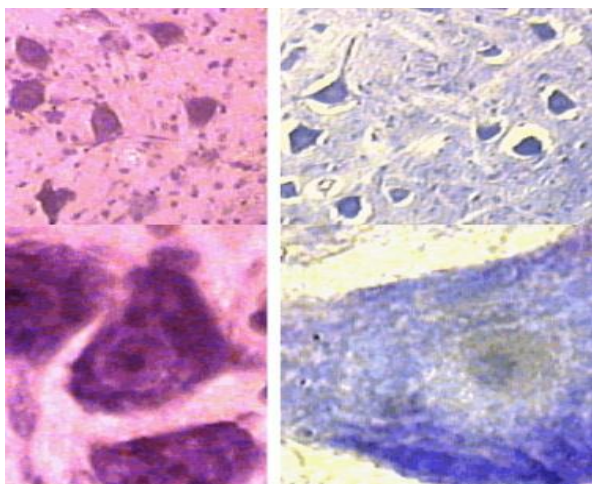
تصویر ۲-نورون‌ها و اجسام نیسل رنگ گرفته شده در گروه د (سرم فیزیولوژیک+اعمال فشار) بارنگ آمیزی کرزیل فست ویولت (بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰)

شمارش سلول‌های حرکتی نشان داد در بین دو گروه الف و ب که فشاری دریافت نکردند تفاوت آماری معنی‌داری نیست ( $P < 0.05$ ). در گروهی که علاوه بر فشار استیل ال کارنیتین دریافت کرده است کاهش تعداد سلول‌های عصبی حرکتی کمتر از گروهی است که فشار مکانیکی را به همراه سرم فیزیولوژی دریافت نموده است ( $P < 0.05$ ). بطوری که میانگین و انحراف معیار تعداد کل سلول‌های عصبی حرکتی در ۴ گروه موردتحقیق در جدول ۱ آمده است.

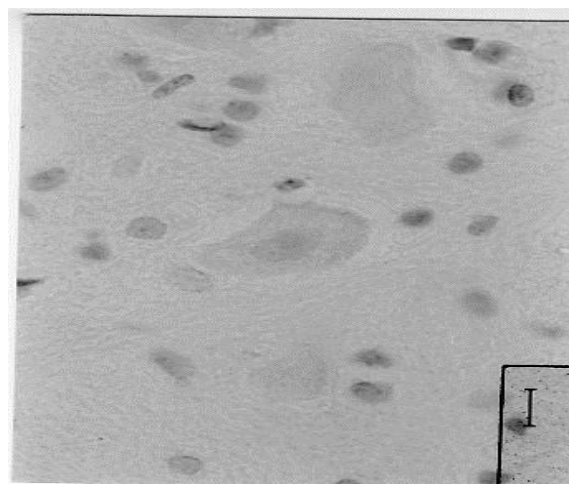
جدول ۱. میانگین و انحراف معیار تعداد کل سلول‌های عصبی حرکتی در گروه‌های مورد بررسی

تحلیل آماری	میانگین و انحراف معیار سلول‌های عصبی حرکتی در بخش آسیب‌دیده	زیرگروه‌ها
$P < 0.05$	$2645/325 \pm 101/11$	گروه الف: لامینکتومی + استیل ال کارنیتین
$P < 0.05$	$2682/202 \pm 162/01$	گروه ب: لامینکتومی + سرم
$P < 0.05$	$1763/301 \pm 142/56$	گروه ج: لامینکتومی + استیل ال کارنیتین + فشار
$P < 0.05$	$634/121 \pm 171/12$	گروه د: لامینکتومی + سرم فیزیولوژی + فشار

در صد کاهش سلول‌های عصبی حرکتی در بین ۴ گروه نسبت به گروه ب (مینا) نیز محاسبه گردید (جدول ۲).



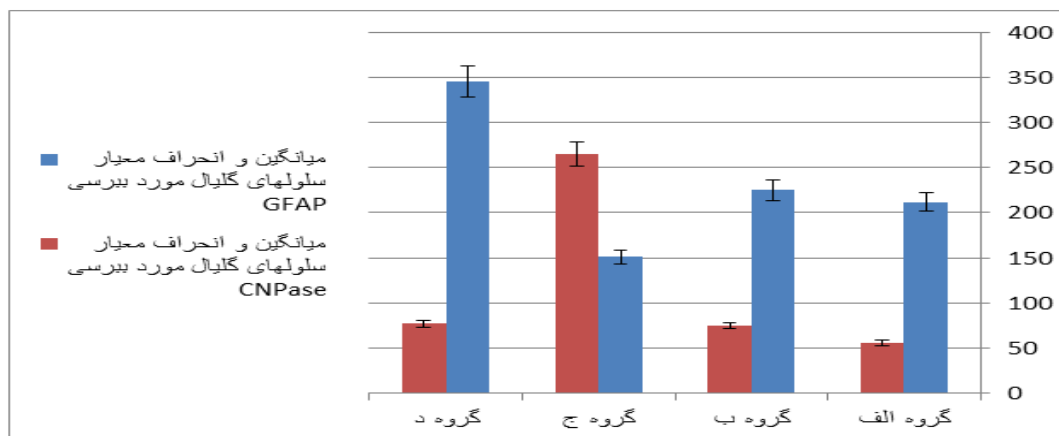
تصویر ۵. رنگ آمیزی کرزیل فسف و ویولت در سمت راست با دو بزرگ‌نمایی ۴۰۰ و ۱۰۰۰ رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین در سمت چپ با دو بزرگ‌نمایی ۴۰۰ و ۱۰۰۰ محل استقرار سلول‌های عصبی حرکتی و سلول‌های گلیال را مشخص می‌کند میانگین و انحراف معیار مشخص گردید و با محاسبه میانگین و انحراف معیار سلول‌های مثبت شده آستروسیت و اولیگودندروسیت توانستیم درصد سلول‌های مثبت شده را حساب کنیم (جدول ۳ و نمودار ستونی ۱).



تصویر ۶. سلول‌های عصبی اولیگودندروسیت که با آنتی‌بادی برای آنزیم CNPase واکنش مثبت نشان داده‌اند. (بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰) برای اطمینان از حضور و محاسبه درصد سلول‌های گلیال مورد نظر ابتدا شمارش کل سلول‌های گلیال با کمک ۲ تکنیک رنگ آمیزی هماتوکسیلین - اتوزین و کرزیل فسف و ویولت انجام شد (تصویر ۵) تعداد کل سلول‌های گلیال (آستروسیت-اولیگودندروسیت و میکروگلیال) منطقه شمارش شد.

جدول ۳. میانگین و انحراف معیار درصد پاسخگویی سلول‌های عصبی حرکتی در واکنش ایمنوهیستوشیمی نسبت به کل سلول‌های عصبی

گروه د	گروه ج	گروه ب	گروه الف	نوع واکنش
۶۴۵±۱۴/۵	۵۶۳±۱۳/۳	۴۳۱±۱۰/۲	۴۲۴±۱۲/۱	تعداد کل سلول‌های گلیال در رنگ آمیزی H&E (آستروسیت-اولیگو دندروسیت و میکرو گلیال)
۳۴۵±۱۱/۲	۱۵۱±۸/۳۲	۲۲۵±۹/۲۳	۲۱۲±۷/۱۲	تعداد سلول‌های آستروسیت در واکنش ایمنوهیستوشیمیایی GFAP
۷۷±۵/۶	۲۶۵±۷/۱	۷۵±۶/۸	۵۶±۵/۱	تعداد سلول‌های اولیگودندروسیت در واکنش ایمنوهیستوشیمیایی CNPase



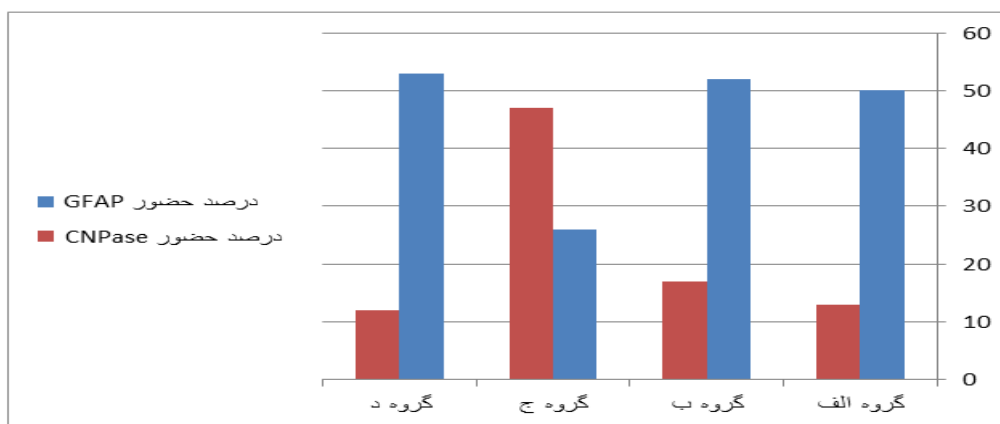
نمودار ستونی ۱. میانگین و انحراف معیار سلول‌های گلیال مورد بررسی در رنگ آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین سلول‌های آستروسیت و اولیگو دندروسیتی که به واکنش ایمنوهیستوشیمیایی پاسخ مثبت داده‌اند.

حضور سلول‌های آستروسیت بیشتر از سایر گروه‌ها بود. با دانستن تعداد کل سلول‌های گلیال منطقه می‌توان درصد حضور این سلول‌ها را نیز محاسبه کرد. به عبارتی درصد پاسخگویی سلول‌های آستروسیت و اولیگودندروسیت را در چهار گروه مورد مطالعه به دست آورد (جدول ۴ و نمودار ستونی ۲).

بر اساس نتایج حضور GFAP معرف تعداد سلول‌های آستروسیت و حضور CNPase معرف تعداد سلول‌های اولیگو دندروسیت به دنبال واکنش ایمنوهیستوشیمیایی است. گروه ج که استیل الکارنیتین را به دنبال فشار مکانیکی بر نخاع دریافت کردند بیشترین میزان حضور سلول‌های اولیگو دندروسیت را نشان دادند. در گروه د حیوانات دریافت‌کننده سرم فیزیولوژی همراه فشار

جدول ۴. نشانگر درصد پاسخگویی سلول‌های عصبی حرکتی در واکنش ایمنوهیستوشیمیایی نسبت به کل سلول‌های عصبی

گروه د	گروه ج	گروه ب	گروه الف	در صد حضور سلول‌های گلیال در شاخ قدامی نخاع
٪۵۳/۴۸	٪۲۶/۸۲	٪۵۲/۲۰	٪۵۰	درصد پاسخگویی سلول‌های آستروسیت در واکنش ایمنوهیستوشیمیایی GFAP
٪۱۱/۹۳	٪۴۷/۰۶	٪۱۷/۴۰	٪۱۳/۲۰	درصد پاسخگویی سلول‌های اولیگودندروسیت در واکنش ایمنوهیستوشیمیایی CNPase



نمودار ستونی ۲. درصد حضور سلول‌های آستروسیت و اولیگو دندروسیت با پاسخ مثبت به واکنش ایمنوهیستوشیمیایی

فشار مکانیکی دریافت کردند.

### نتیجه‌گیری و بحث

هرچند که مکانیسم‌های دخیل در مرگ سلول‌های عصبی حرکتی پس از صدمه مکانیکی بر نخاع به قدر کافی شناخته شده نیستند اما شواهدی مبنی بر مرگ آپوپتوزی وجود دارد. مطالعات مورفومتری با استفاده از رنگ‌آمیزی اختصاصی اجسام نیسل همانند سایر مطالعات مرگ سلول‌های عصبی پس از صدمات مکانیکی نخاع را نشان داد. استیل ال کارنیتین سبب کاهش مرگ سلول‌های عصبی حرکتی گردید. طوری که تعداد سلول‌های عصبی حرکتی در دو گروهی که تحت

طبق نمودار ۲ بیشترین در صد حضور سلول‌های آستروسیت مربوط به گروه (د) و کمترین درصد مربوط به گروه (ج) است. به عبارت دیگر نتایج نشان داد استیل ال کارنیتین سبب کاهش سلول‌های آستروسیت می‌شود. بیشترین درصد حضور سلول‌های اولیگو دندروسیت مربوط به گروه (ج) حکم‌ترین درصد مربوط به گروه (د) است. به عبارتی دیگر نتایج نشان داد در گروهی که فشار بر نخاع داشتند استیل ال کارنیتین سبب افزایش سلول‌های اولیگو دندروسیت گردید. میزان حضور این نوع از سلول‌های گلیال با افزایش حدود سه برابری بیشتر از نمونه‌هایی است که استیل ال کارنیتین را بدون

نتایج منتشره از تأثیر ماده استیل ال کارنیتین بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو و کاهش معنی‌دار شدت تشنج در بیماران صرعی و کاهش سطح مالون دی‌الدئید بر اساس تحقیق (روغنی و پسران ۱۳۹۰) انگیزه تحقیق اثر احتمالی استیل ال کارنیتین در نقل و انتقالات پیام عصبی در سطح غشای سلول از طریق گیرنده آپوپتوزی و لیگاند مربوطه را بیشتر کرد (۳۶)

رادیکال‌های آزاد در نتیجه واکنش‌های شیمیایی نرمال سلول تولید می‌شوند. افزایش تولید این مواد و تجمع آن‌ها تخریب سلولی و ایجاد حالت استرس اکسیداتیو می‌کند که منجر به تخریب بافتی، عفونت‌های باکتریال، ویروسی و اختلالات اتوایمیون می‌گردد. بدین ترتیب استرس اکسیداتیو نتیجه عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی است. در واقع تعادل بین این دو سیستم در حفظ و نگهداری هموستاز بدن و پیشگیری از تخریب و مرگ سلولی مهم شناخته می‌شود.

بر اساس شواهد موجود، استرس اکسیداتیو که بخش اعظم آن در میتوکندریها به عنوان ارگان اصلی متابولیسم مواد غذایی رخ می‌دهد نقش مهمی در پاتوژنز آپوپتوز سلول‌های عصبی دارد. در همین ارتباط مطالعات قبلی نشان داده‌اند که آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند از طریق افزایش پایداری غشاهای سلولی موجب افزایش مقاومت نوروها در برابر آسیب اکسیداتیو گردند و از طرفی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مغز را در برابر آسیب افزایش دهند (۳۷) همین مکانیسم احتمالاً می‌تواند در مورد اثرات حفاظتی استیل ال کارنیتین در مدل القاء ضایعه نخاعی مطرح باشد. در این رابطه اثرات نوروپروتکتیو این ماده قبلاً توسط هتا و همکاران در سال ۲۰۱۱ در محافظت عصبی در مدل تجربی هیپوکسی القا شده مورد تأیید قرار گرفته است (۳۸)

رغم ناشناخته بودن مکانیسم بروز این پدیده، طبق بررسی پاتل و همکاران در سال ۲۰۱۰ استیل ال کارنیتین در ضایعه مدل کانتیوژن طناب نخاعی در بهبود عملکرد سلول عصبی از طریق تأثیر روی فعالیت

اعمال فشار مکانیکی بر نخاع بودند کاهش یافت و این کاهش در گروه (ج) که استیل ال کارنیتین دریافت کردند با تفاوت معنی‌داری کمتر بود ( $p \leq 0.05$ ). تعداد سلول‌های عصبی در گروه ضایعه دیده (ج) با دریافت این ماده پس از گذشت ۴ هفته تقریباً ۳ برابر گروه (د) است که بجای این ماده از سرم فیزیولوژی استفاده گردید ( $P \leq 0.05$ ). همچنین این ماده سبب افزایش حدوداً ۴ برابری تعداد سلول‌های گلیال از نوع اولیگودندروسیت در گروه (ج) نسبت به گروه (د) گردید. در حالی که در این گروه (ج) تعداد سلول‌های آستروسیت حدوداً به نصف کاهش یافت.

در گروه‌های ضایعه دیده تأثیر این ماده سبب حفظ و نگهداری سلول‌های عصبی حرکتی حدود سه برابر نسبت به گروهی که ماده را دریافت نکردند شد. نتایج این تحقیق همچنین هم راستا با بررسی بیلفیلد و همکاران در سال ۲۰۰۸ استیل ال کارنیتین از سیستم عصبی محافظت می‌کند و نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن در حفظ سلول‌های عصبی در برابر صدمات رادیکال سوپر اکسید تأثیر دارد (۳۱)

همچنین با نتایج تحقیقات Liu در سال ۱۹۹۷ که مرگ سلول‌های عصبی حرکتی و سلول‌های گلیال را در صدمات مکانیکی طناب نخاعی ارائه کرده (Liu و همکاران ۱۹۹۷) هم سو و هم‌راستا است (۳۲) در تحقیق (Crowe و همکاران ۱۹۹۷) آپوپتوز ناشی از ضربات مکانیکی نخاع نشان داده و سلول‌های آپوپتوتیک از ۶ ساعت تا ۳ هفته بعد از ضایعه بخصوص در بافت سفید نخاع دیده شدند (۳۳) در همین راستا در تحقیق (Hains و همکاران ۲۰۰۱) مرگ سلول‌های عصبی و سلول‌های گلیال در صدمات مکانیکی طناب نخاعی از نوع مرگ آپوپتوتیک ارائه شده است (۳۴) در تحقیق (Schwab و همکاران ۲۰۰۲) فرضیه‌هایی مطرح شده است که هر عاملی که بتواند در روند چگونگی اتصال لیگاند به گیرنده سطح غشای سلول جهت انتقال سیگنال به منظور ایجاد سری فعالیت‌های آبخاری تغییر ایجاد کند می‌تواند بر حیات سلول‌های عصبی نیز اثر بگذارد (۳۵) توجه به



تأثیر استیل ال کارنیتین این کاهش تا حدی جبران گردید. همچنین تأثیر استیل ال کارنیتین بر واکنش گلیوز به گونه‌ای است که سبب افزایش در صد حضور سه برابری سلول‌های الیگودندروسیت و کاهش یافتن سلول‌های آستروسیت به میزان نیمی از حالت معمول پس از تزریق استیل ال کارنیتین در نخاع ضایعه دیده می‌گردد.

با پیش‌فرض احتمالی تولید میلین به دنبال افزایش سلول اولیگودندروسیت و همچنین کاهش سلول‌های آستروسیت - تا میزان نیمی از حالت معمول - به منظور پیش بردن پژوهش، پیشنهاد می‌گردد بررسی درازمدت " چگونگی انتقال پیام عصبی و تشکیل میلین " برای مشخص شدن نقش بیشتر استیل ال کارنیتین صورت پذیرد.

#### منابع

1. Lu J, Ashwell K. Olfactory ensheathing cells: their potential use for repairing the injured spinal cord. *Spine* 2002; 27:887-892.
2. McDonald W, Liu XZ, Qu Y, Liu S, Mickey SK, Turetsky D, et al. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nature Medicine Journal* 1999; 5:1410-1412.
3. Cao Q, Benton RL. Stem cell repair of central nervous system injury. *Journal of Neuroscience Research* 2002; 68: 501-510.
4. Martin D, Robe P, Franzen R, Pelree P, Schenen J, Srevenaert A, et al. Effects of Schwann cell transplantation in a contusion model of rat spinal cord injury. *Journal of Neuroscience Research* 1996; 45: 588-597.
5. Lazarov-Spiegler O, Solomon AS, Zeev-Rrann AB, Hirschberg DL, Lavie V, Schwarts M. Transplantation of activated macrophages overcomes central nervous system regrowth failure. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 1996; 10: 1296-1302.
6. Duncan ID, Hammang JP, Jackson KF, Wood PM, Bunge RR, Langford L. Transplantation of oligodendrocytes and Schwann cells into the spinal cord of the myelin-deficient rat. *Journal Neurocytology* 1988; 17: 351-360.
7. Tuszinski MH, Peerson Da, Ray J, Baird A, Nakahava Y, Goge FH. Fibroblasts genetically modified to produce nerve growth factor induce neuritic ingrowth after grafting to the spinal cord. *Experimental Neurology* 1994; 126: 1-14.
8. Ide C, Kitada M, Chakraborty S, Taketomi M, Matsumoto N, Kikukarna S, et al. Grafting of choroid plexus ependymal cells promotes the growth of regenerating axons in the dorsal funiculus of rat spinal cord: a preliminary report. *Experimental Neurology* 2001; 167: 242-251.
9. Zhao ZM, Li HJ, Liu HY, Lu SH, Yang RC, Zhang QJ, et al. Intra spinal transplantation of CD34+ human umbilical cord blood cells after spinal cord hemisection injury improves functional recovery in adult rats. *Cell Transplantation* 2002; 13: 113-122.
10. Ribouche CJ, Engel AG. Tissue distribution of carnitine biosynthesis enzymes in man. *Biochemistry Biophys Acta* 1980; 630: 22-29.
11. Cassano P, Flück M, Giovanna Sciancalepore A, Pesce V, Calvani M, Hoppeler H, Cantatore P, Gadaleta MN. Muscle unloading potentiates the effects of acetyl-L-carnitine on the slow oxidative muscle phenotype. *Biofactors* 2010; 36: 70-7.
12. Virmani A, Koverech A, Ali SF, Binienda, ZK. Acetyl L-Carnitine Modulate TP53 and IL10 Gene Expression Induced by 3-NPA Evoked Toxicity in PC12 Cells. *Current Neuropharmacology* 2011; 9: 195-199.
13. Zhang R, Zhang H, Zhang Z, Wang T, Niu J, Cui D, Xu S. Neuroprotective Effects of Pre-Treatment with L-Carnitine and Acetyl-L-Carnitine on Ischemic Injury In Vivo and In Vitro. *International of Molecular Sciences* 2012; 13: 2078-90.
14. Bjorkland A, Linnvall O. Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Natural Neuroscience* 2000; 3: 573-577.

میتوکندری‌ها نقش داشته است (۳۹) در مطالعه بریکارتز و همکاران در سال ۱۹۹۴ اثر درمان مزمن با استیل‌ال کارنیتین روی حافظه فضایی یادگیری موش‌های صحرایی بررسی شده و اطلاعات به دست آمده اثرات نوروپروتکتیو استیل‌ال کارنیتین را تأیید کرده است (۴۰) این یافته با مطالعات گو و همکاران در سال ۲۰۱۲ درباره اثرات حفاظتی استیل ال کارنیتین بر کاهش معنی‌دار تغییرات نورودژنراتیو در مدل‌های ایسکمی مزمن مغزی و اختلال یادگیری و حافظه در موش‌های صحرایی مبتلا به انسداد دو طرفه شریان کاروتید نیز مطابقت دارد (۴۱) همین مکانیسم احتمالاً می‌تواند در مورد مطالعه حاضر نیز مطرح باشد. بطوری که نتایج تحقیق حاضر نشان داد به دنبال ایجاد ضایعه فشاری در نخاع میزان سلول‌های عصبی محل ضایعه در نخاع کاهش یافته و با

15. Lu P, Jones LL, Tuszynsky MH. BDNF-expressing marrow stromal cells support extensive axonal growth at sites of spinal cord injury. *Experimental Neurology* 2005; 191: 344-360.
16. Hulsebosch CE, Recent advances in athophysiology and treatment of spinal cord injury. *Advances in Physiology Education* 2002; 26: 238-255.
17. Juguera Rodriguez L, Pardo Rios M, Leal Costa C, Castillo Hermoso M, Perez Alonso N, Diaz Agea JL. Relatives of people with spinal cord injury: a qualitative study of caregivers' metamorphosis. *Spinal Cord* 2018 [Epub ahead of print]
18. Xie Y, Song W, Zhao W, Gao Y, Shang J, Hao P, Yang Z, Duan H, Li X. Application of the sodium hyaluronate-CNTF scaffolds in repairing adult rat spinal cord injury and facilitating neural network formation. *Science China Life Sciences* 2018;61:559-568.
19. Gardner AR, Diz DI, Tooze JA, Miller CD, Petty J. Injury patterns associated with hypotension in pediatric trauma patients: A national trauma database review. *Trauma Acute Care Surgery* 2015;78:1143-8.
20. Tarlov IM, Klinger H. Spinal cord compression studies. II. Time limits for recovery after acute compression in dogs. *A.M.A Archives of Neurology and Psychiatry* 1954; 71:271-90.
21. Tator CH, Hashimoto R, Raich A, Norvell D, Fehlings MG, Harrop JS, Guest J, Aarabi B, Grossman RG. Translational potential of preclinical trials of neuroprotection through pharmacotherapy for spinal cord injury. *Journal of Neurosurgery Spine* 2012;17(1 Suppl):157-229.
22. Dolan EJ, Tator CH. A new method for testing the force of clips for aneurysm or experimental spinal cord compression. *Journal of Neurosurgery* 1979;51: 229-33.
23. Sastry PS, Kalluri SR. Short review apoptosis and the nervous system. *Journal of Neurochemistry* 2000; 74: 1-20.
24. Lee JC, Mayer M. Gliogenesis in the central nervous system. *Glia* 2000; 30: 105-121.
25. Zhang D, Hu X, Qian M, O'Callaghan JP, Hong JS. Astroglia in CNS Pathologies: Is There A Role for Microglia? *Molecular Neurobiology* 2010;41: 232-241.
26. Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astroglia and glial scar formation (Review). *Trends in Neuroscience* 2009;32: 638-47.
27. Beghi E. Treating epilepsy across its different stages. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders* 2010; 3: 85-92.
28. Abdul HM, Calabrese V, Calvani M, Butterfield DA. Acetyl-L-carnitine-induced up-regulation of heat shock proteins protects cortical neurons against amyloid-beta peptide 1-42-mediated oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience Research* 2006; 84:398-408.
29. Patel SP, Sullivan PG, Patel SP, Sullivan PG, Lyttle TS, Magnuson DS, Rabchevsky AG. Acetyl-L-carnitine treatment following spinal cord injury improves mitochondrial function correlated with remarkable tissue sparing and functional recovery. *Journal of Neuroscience* 2012;210:296-307.
30. Patel SP, Sullivan PG, Lyttle TS, Rabchevsky AG. Acetyl-L-carnitine ameliorates Mitochondrial dysfunction following contusion spinal cord injury. *Journal of Neurochemistry* 2010;114:291-301.
31. Bielefeld EC, Coling D, Chen GD, Henderson D. Multiple dosing strategies with acetyl L Carnitine (ALCAR) fail to alter age-related hearing loss in the Fischer 344/NHsd rat. *Journal of Negative Results in Biomedicine* 2008;4:51-57.
32. Liu QY, Schaffner AE, Chang YH, Vaszil K, Barker JL. Astrocytes regulate amino acid receptor current densities in embryonic rat hippocampal neurons. *Journal of Neurobiology* 1997; 33:848-64.
33. Crowe DL, Boardman ML, Fong KS. Anti-Fas antibody differentially regulates apoptosis in Fas ligand resistant carcinoma lines via the caspase 3 family of cell death proteases but independently of bcl2 expression. *Anticancer Research* 1998; 18:3163-70.
34. Hains BC, Fullwood SD, Eaton MJ, Hulsebosch CE. Subdural engraftment of serotonergic neurons following spinal hemisection restores spinal serotonin, downregulates serotonin transporter, and increases BDNF tissue content in rat. *Brain Research* 2001; 913:35-46.
35. Schwab ME. Increasing plasticity and functional recovery of the lesioned spinal cord. *Progress in Brain Research* 2002; 137:351-9.
36. Pesaran F, Roghani M. The effect of Acetyl L carnitine in preservation of stress oxidative in experimental epilepsy model induced by kainic acid in rats. Thesis for general physician, Medical school, Shahed University 1390.
37. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Review* 2010; 4: 118-126.
38. Hota KB, Hota SK, Chaurasia OP, Singh SB. Acetyl-L-carnitine-mediated neuroprotection during hypoxia is attributed to ERK1/2-Nrf2-regulated mitochondrial biosynthesis. *Hippocampus* 2012;22:723-36.
39. Patel SP, Sullivan PG, Lyttle TS, Magnuson DS, Rabchevsky AG. Acetyl-L-carnitine treatment following spinal cord injury improves mitochondrial function correlated with remarkable tissue sparing and functional recovery. *Neuroscience* 2012;210:296-307.
40. Breikreutz R, Babylon A, Hack V, Schuster K, Tokus M, Böhles H, Hagmüller E, Edler L, Holm E, Dröge W. Effect of carnitine on muscular glutamate uptake and intramuscular glutathione in malignant diseases. *British Journal of Cancer* 2000 ;82:399-403.
41. Goo MJ, Choi SM, Kim SH, Ahn BO. Protective effects of acetyl-L-carnitine on neurodegenerative changes in chronic cerebral ischemia models and learning-memory impairment in aged rats. *Archives of Pharmacol Research.* 2012; 35: 145-54.

Daneshvar  
Medicine

*Scientific-Research  
Journal of Shahed  
University  
25th Year, No.136  
August-September 2018*

Received: 30/05/2018

Last revised: 15/08/2018

Accepted: 25/08/2018

## The effect of acetyl L-carnitine on gliosis reaction after spinal cord injury using a compression model in adult rats

Sadra Jamshidi<sup>1</sup>, Marjan Heshmati<sup>2\*</sup>, Mohammadreza Jalali Nadoushan<sup>2</sup>

1. School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.
2. Department of Anatomy and Pathology, Shahed University, Tehran, Iran.

\* Corresponding author e-mail: heshmati@shahed.ac.ir

### Abstract

**Background and Objective:** Contusion injury causes a major variety of functional and sensory disorders. In this research, we tried to study histological changes after performing contusion model in spinal cord. For this reason, we investigated the effect of acetyl L-carnitine on gliosis reaction by using immunohistochemistry method for GFAP and CNPase after spinal cord injury (SCI).

**Materials and Methods:** In this study, 24 male adult Sprague-Dawley rats were randomly divided into 4 groups. Laminectomy at T9-T11 was done in all of the rats and based on control groups or study groups, normal saline or acetyl L-carnitine (300 mg/kg) was injected. In study groups, SCI was done by 30 gr compression. After 4 weeks, spinal cords were extracted for morphometry and immunohistochemistry study and data were analyzed using t test and ANOVA at  $p < 0.05$ .

**Results:** Motoneurons reduced after SCI and acetyl L-carnitine reduced this reduction in addition to reduction of astrocytes ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** For the first time it was shown that in gliosis reaction, acetyl L-carnitine could reduce astrocytes and increase oligodendrocytes (about 3 times) and this improvement may be due to myelin production and also due to better conduction. Further study is needed to distinguish synapse conduction.

**Keywords:** Acetyl L-carnitine, Gliosis, Adult Rat