

بررسی اثر داروی دپرنیل در ایجاد گلیوز پس از ضایعه فشارمکانیکی طناب نخاعی موش صحرایی بالغ

نویسندگان: حسام امینی^{۱*}، دکتر مرجان حشمتی^۲ و دکتر محمد رضا جلالی^۳

۱. دانش آموخته پزشکی دانشکده پزشکی شاهد

۲. استادیار گروه علوم تشریح و پاتولوژی دانشکده پزشکی شاهد

۳. دانشیار گروه علوم تشریح و پاتولوژی دانشکده پزشکی شاهد

*E-mail:

نویسنده مسئول:

un120000@yahoo.com

چکیده

مقدمه و هدف: هدف از این تحقیق، ارزیابی تأثیرات داروی دپرنیل در حفظ یا نگهداری سلول‌های عصبی حرکتی و تأثیر دارو در واکنش گلیوز است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق از موش صحرایی نژاد اسپراک رالی به وزن ۲۵۰-۳۰۰ گرم از انستیتو رازی حصارک کرج استفاده شد. در این بررسی به تأثیر داروی دپرنیل ۲/۵ mg/kg در حفظ سلول‌های عصبی با بررسی مورفومتری و میزان تشکیل بافت عصبی پشتیبان پس از ضایعه مکانیکی نخاع به روش ایمنوهیستوشیمیایی پرداخته شد.

یافته‌ها: نتایج این تحقیق در دو بخش مجزا مورد بررسی قرار می‌گیرد: ۱. نتایج مطالعات مورفومتری سلول‌های عصبی ۲. بررسی شمارش سلول‌های آستروسیت و الیگو دندروسیت و محاسبه درصد این پاسخ‌گویی. شمارش سلول‌های عصبی حرکتی نخاع حاکی از کاهش سلول‌های عصبی حرکتی در شاخ قدامی نخاع به همراه ایجاد حفره است. این کاهش در گروه دریافت‌کننده داروی دپرنیل کمتر از گروهی که سرم فیزیولوژی دریافت کرده و تأثیر داروی دپرنیل در زیر، گروهی که چهار هفته از دارو استفاده کرده بیش‌تر بوده و این تفاوت معنادار است ($P < 0/05$). همچنین تأثیر داروی دپرنیل سبب کاهش ایجاد واکنش گلیوز شده و در زیرگروهی که این دارو را به مدت چهار هفته دریافت کرده‌اند این تأثیر بیش‌تر است ($P < 0/05$).

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

واژگان کلیدی: ضایعات مکانیکی نخاع، آپوپتوز، گلیوز

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

دوماهنامه علمی - پژوهشی

دانشگاه شاهد

سال شانزدهم - شماره ۸۲

شهریور ۱۳۸۸

وصول: ۸۸/۱/۳۰

آخرین اصلاحات: ۸۸/۴/۸

پذیرش: ۸۸/۴/۲۰

مقدمه

در بررسی انجام شده هر ساله تعداد زیادی از افراد در پی صدمات وارده بر ستون فقرات به صورت شکستگی یا جابه‌جایی مهره، فشار ضایعات فضاگیر، فتق دیسک و ... دچار معلولیت‌هایی با درجه‌های مختلف از خفیف تا شدید می‌شوند [۱].

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

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

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

داروی دپرنیل اولین بار توسط پروفیسور Knoll (۱۹۶۰) در مجارستان ساخته شد. این دارو یک مهارکننده انتخابی غیرقابل برگشت از منوآمینواکسیداز نوع B است. این آنزیم وظیفه متابولیسم دوپامین در مغز را بر عهده دارد که در درمان بیماری پارکینسون مورد استفاده قرار می‌گیرد [۴]. ابتدا به عنوان داروی ضدافسردگی معرفی شد [۵]، اما با مشخص شدن اثرات دیگر دارو در درمان بیماری نورودژنراتیو پارکینسون، امروزه به عنوان یک داروی ضدپیری نیز مطرح است.

تحقیقات اخیر نشان می‌دهد دپرنیل دارای خاصیت حفاظتی برای سلول عصبی (neuroprotective)، نجات‌دهندگی نرون (neurorescue) و کاهش‌دهنده آپوپتوز است [۶]. بنابراین تصمیم گرفتیم، اثر این دارو را در آپوپتوز ناشی از فشار بر ضایعات طناب نخاعی موش صحرائی بررسی کنیم. اولین بار Katoh و همکاران با استفاده از روش جراحی لامینکتومی طناب نخاعی را رؤیت کردند [۷]. سپس روش‌های متفاوتی برای ایجاد ضایعه تجربی بر نخاع مطرح شد. استفاده از ضایعه مکانیکی و فشار به طناب نخاعی یکی از روش‌های القای آپوپتوز در نرون‌های محل بررسی است. Dolan & Tator در سال ۱۹۷۹ و Fehling & Nashina در سال ۱۹۹۵ یکی از روش‌های استفاده از کلیپس آنوریسم را ارائه دادند. در سال ۲۰۰۷ به عنوان روشی مطمئن در ایجاد ضایعه مکانیکی نخاع معرفی شد [۸]. به این منظور پس از عمل جراحی لامینکتومی و اعمال فشار با کمک کلیپس آنوریسم که روش تأیید شده مقالات است [۹]، به بررسی تعداد و عملکرد سلول‌های عصبی و سلول‌های گلیال آستروسیت و الیگودندروسیت در سگمان نخاعی مربوطه با کمک روش ایمنوهیستوشیمیایی پرداختیم. هدف از این تحقیق، ارزیابی تأثیرات داروی دپرنیل در میزان تشکیل واکنش گلیوز است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از حیوان آزمایشگاهی موش صحرائی نژاد اسپراگ به وزن ۲۵۰-۳۰۰ گرم از انستیتو رازی حصارک کرج استفاده شد. ابتدا تعداد ۴۲ عدد موش در دو گروه ۱. مطالعه اعمال فشار مکانیکی + تزریق روزانه دپرنیل (۲/۵ mg/kg) ۲. کنترل (اعمال فشار مکانیکی + تزریق روزانه سرم فیزیولوژی) در قفس‌های جداگانه به طور تصادفی قرار گرفته و شرایط استاندارد دوازده ساعت روشنایی و دوازده ساعت تاریکی و دمای ۲۲-۲۳ درجه سانتی‌گراد، غذای مخصوص پلیت از شرکت خوراک دام پارس و آب کافی در حیوان‌خانه

در این مرحله برای شمارش سلولی، نرون‌های حرکتی که در قسمت قدامی خارجی در هر دو نیمه نخاع قرار دارد با بزرگنمایی X400 میکروسکوپ نوری زایس مورد شمارش قرار گرفتند. برای این منظور از هر پنج برش سریال یکی از آن‌ها انتخاب شد (به عنوان مثال ۱، ۶، ۱۱، ۱۶، ۲۱ و...). حاصل جمع نرون‌های شمرده شده ابتدا در عدد پنج ضرب شد و مجموع نرون‌های حرکتی سگمان‌های آسیب‌دیده در هر دو نیمه نخاع به دست آمد [۱۱]. با استفاده از روش‌های آماری میانگین تعداد نرون‌های حرکتی در هر یک از زیرگروه‌های مدل مطالعه و کنترل محاسبه شد. این توضیح لازم است که شمارش نرون‌های حرکتی برای تأثیر داروی دپرنیل $2/5 \text{ mg/kg}$ در حفظ نرون‌های شاخ قدامی نخاع انجام شد.

برای بررسی اثر داروی دپرنیل در حفظ عملکرد و میزان تشکیل بافت عصبی پشتیبان پس از ضایعه مکانیکی نخاع مطالعات ایمنو‌هیستوشیمیایی انجام شد. به طوری که در هر زیرگروه چهار حیوان برای بررسی ایمنو‌هیستوشیمیایی در نظر گرفته شد. از هر حیوان برای بررسی ایمنو‌هیستوشیمیایی هر کدام از سلول‌های آستروسیت و الیگودندروسیت ده برش و همچنین برای رنگ‌آمیزی با تکنیک هماتوکسیلین ائوزین برای تعیین درصد سلول‌های موجود در این منطقه، ده برش انتخاب شد که شناسایی سلول‌ها با استفاده از ویژگی‌های بافت‌شناسی آن‌ها صورت گرفت. بررسی سلول‌های آستروسیت با استفاده از آنتی‌بادی بر علیه پروتئین GFAP (شرکت کمیکون امریکا) [۱۲] و بررسی سلول‌های الیگودندروسیت که در ساخته شدن میلین دخیل هستند با استفاده از آنزیم CNPase (شرکت کمیکون امریکا) [۱۳] با استفاده از آنتی‌بادی بر علیه CNPase استفاده شد. برای تهیه نمونه‌های بافتی مورد نیاز به طور دقیق مانند مرحله شمارش سلولی عمل شد. سپس برش‌هایی به ضخامت هشت میکرومتر تهیه کردیم. در هر گروه تکنیک ایمنو‌هیستوشیمیایی مورد استفاده برای واکنش گلیوز روش غیرمستقیم دو مرحله‌ای بود. در نهایت با به کار بردن DAB (دی آمینو بنزیدین) روی نمونه‌ها که

دانشکده پزشکی شاهد در نظر گرفته شد. روی هر قفس برجسی برای مشخص کردن تاریخ خرید، زیرگروه، تاریخ عمل جراحی لامینکتومی و تاریخ کشتن با توجه به این که زمان نمونه‌برداری مربوط به کدام زیر گروه ۱- ۲ و چهار هفته پس از اعمال فشار مکانیکی است، نصب شد. روش تجربی ایجاد ضایعه نخاعی اعمال فشار با استفاده از کلیپس انورسِم انجام گرفت [۹].

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

برای کاهش خونریزی تزریق سرم لاکتات دامپزشکی به میزان پنج تا هشت میلی‌لیتر / سی‌سی انجام شد. موش‌های جراحی شده به داخل قفس‌هایی مجزا منتقل و کمی گرم شدند و به آرامی به هوش آمدند. پس از گذشت پنج تا شش ساعت تخلیه مثانه با کمک فشار آرام انگشت از جهت بالا به پایین در ناحیه تناسلی بین دو اندام تحتانی را شروع کردیم و این کار روزی سه مرتبه تکرار شد. تزریق روزانه داخل صفاقی دپرنیل $2/5 \text{ mg/kg}$ با سرم فیزیولوژی پس از عمل لامینکتومی در حیوانات بر حسب این که مربوط به کدام گروه هستند، انجام شد.

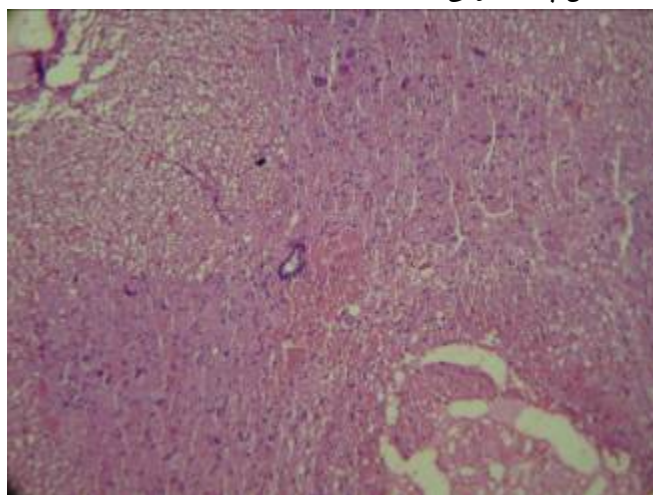
بعد از گذشت مدت زمان موردنظر یعنی یک هفته، دو و چهار هفته پس از انجام لامینکتومی و اعمال فشار مکانیکی به نخاع موش‌ها با کتامین و گزیلازین به طور عمیق بی‌هوش شدند. سپس پرفیوژن قلبی انجام و نمونه نخاعی خارج و فیکس شد. پس از پردازش بافتی نخاع ابتدا قالب پارافینی و سپس از این نمونه‌های نخاعی، بلوک تهیه شد. سپس برش‌هایی هشت میکرومتری به کمک دستگاه میکروتوم مدل ۸۲۰ لایکا تهیه شد. برای بررسی مورفومتری از روش رنگ‌آمیزی کرسیل فست و بولت شرکت مرک آلمان استفاده کردیم.

ماده اخیر با پراکسیداز موجود در آنتی بادی ثانویه واکنش داده و رسوب قهوه‌ای رنگی در زیر میکروسکوپ نوری قابل مشاهده بود. به طوری که در این تحقیق در هر یک از دو گروه مطالعه و کنترل، ۲۱ حیوان و در هر زیرگروه هفت حیوان قرار گرفت. این هفت حیوان به ترتیب سه حیوان برای شمارش سلولی و چهار حیوان برای بررسی ایمنوهیستوشیمیایی در نظر گرفته شد. در کل ۴۲ حیوان در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

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

نتایج بررسی مورفومتری سلول‌های عصبی
بررسی سلول‌های عصبی حرکتی نخاع حاکی از کاهش سلول‌های عصبی حرکتی در شاخ قدامی نخاع به همراه ایجاد حفره بین سلول‌ها و خونریزی در لابه‌لای سلول‌ها و داخل این حفرات است (شکل ۱).
شمارش سلول‌های عصبی حرکتی نخاع در محل ضایعه در دو گروه حاکی از این است که تعدادی از سلول‌های عصبی حرکتی در محل اعمال فشار دستخوش کروماتولیز شده (اجسام نیسل در اطراف هسته به مقدار زیادی از بین رفته) و سیتوپلاسم اطراف هسته روشن دیده می‌شود (شکل ۲). مقایسه بین دو گروه مورد مطالعه (اعمال فشار مکانیکی و تزریق روزانه داروی دپرنیل در داخل صفاق تا

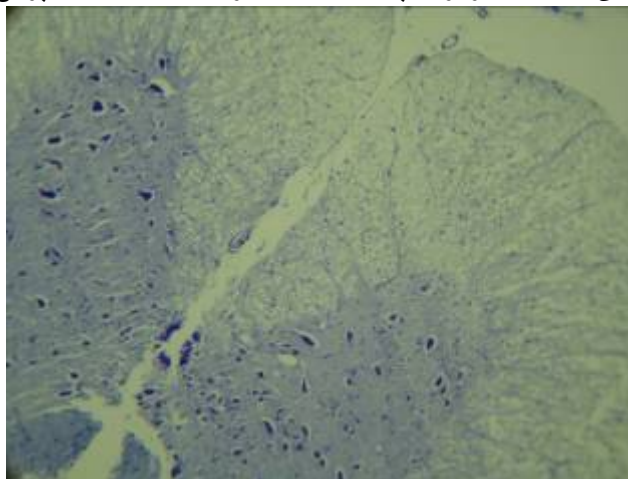


شکل ۱. برش عرضی از نخاع موش صحرایی در گروه کنترل ۴ هفته پس از اعمال فشار مکانیکی، کاهش سلول‌های عصبی حرکتی در شاخ قدامی نخاع به همراه ایجاد حفره در بین سلول‌ها و خونریزی در بافت منطقه خاکستری و سفید نخاع با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین و بزرگنمایی ۱۰۰

مقایسه بین شمارش سلولی کل سلول‌های عصبی حرکتی با استفاده از آزمون تی نشان می‌دهد، در گروه درمان‌نشده کاهش معناداری وجود دارد ($P < 0/05$). در زیرگروهی که چهار هفته دارو دریافت کرده‌اند تأثیر دارو در حفظ سلول‌های عصبی با اختلاف معناداری بیش‌تر است ($P < 0/05$).

زمان کشتن حیوان) و گروه کنترل (اعمال فشار مکانیکی و تزریق روزانه سرم فیزیولوژی در داخل صفاق تا زمان کشتن حیوان) نشان می‌دهد، این تغییرات و کاهش سلول‌های عصبی در گروهی که دپرنیل دریافت کرده‌اند کم‌تر از گروهی است که سرم فیزیولوژی دریافت کرده‌اند (جدول ۱). نتایج حاصل از

هفته میزان خونریزی کاهش یافته و بیش تر بافت نخاع توسط سلول‌های عصبی پشتیبان جایگزین شده است. مقایسه این تغییرات در هر دو گروه کنترل و درمان شده نشان می‌دهد، در گروه درمان نشده این تغییرات بیش تر از گروه درمان شده با دپرنیل است.



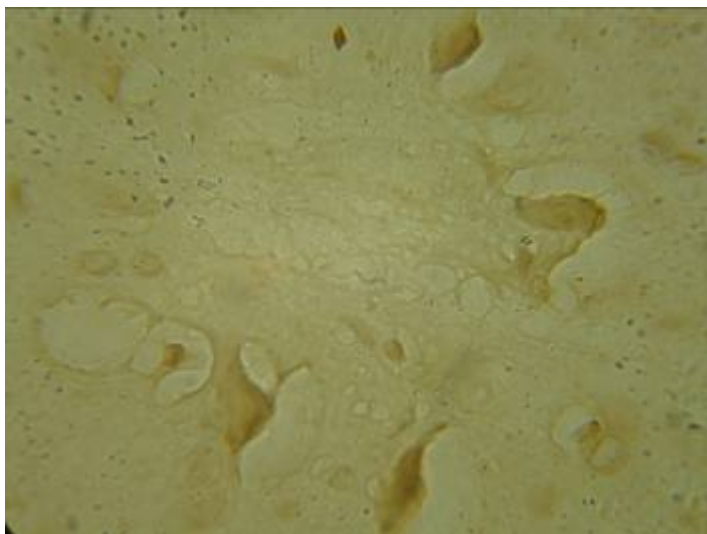
شکل ۲. برش عرضی از بافت نخاع موش صحرایی در رنگ‌آمیزی کرسیل فست ویولت. در این تصویر منطقه خاکستری و منطقه سفید مشاهده می‌گردد. در منطقه خاکستری سلول‌های عصبی که دور تادور آنها را نوروگلی محاط کرده است را نشان می‌دهد. در گروه کنترل ۴ هفته پس از اعمال فشار مکانیکی، کاهش سلول‌های عصبی حرکتی در شاخ قدامی نخاع مشهود است با بزرگ‌نمایی ۴۰۰

شده‌اند، محصول نهایی به صورت رسوب قهوه‌ای رنگی در سطح سیتوپلاسم است که محل حضور این سلول‌ها را نشان می‌دهد (شکل‌های ۳ و ۴). مقایسه این نتایج با نمونه‌های کنترل منفی که در آن‌ها آنتی‌بادی اولیه حذف شده بود، حساسیت و دقت آنتی‌بادی را تأیید می‌کند (شکل ۵).

در زیرگروه یک هفته کاهش سلول‌های عصبی با خونریزی در لابه‌لای سلول‌های بافت نخاع همراه است. در زیرگروه دو هفته کاهش سلول‌ها به همراه حفره حفره شدن بافت نخاع در محل اعمال فشار مکانیکی است و داخل حفرات خونریزی دیده می‌شود. در زیرگروه چهار

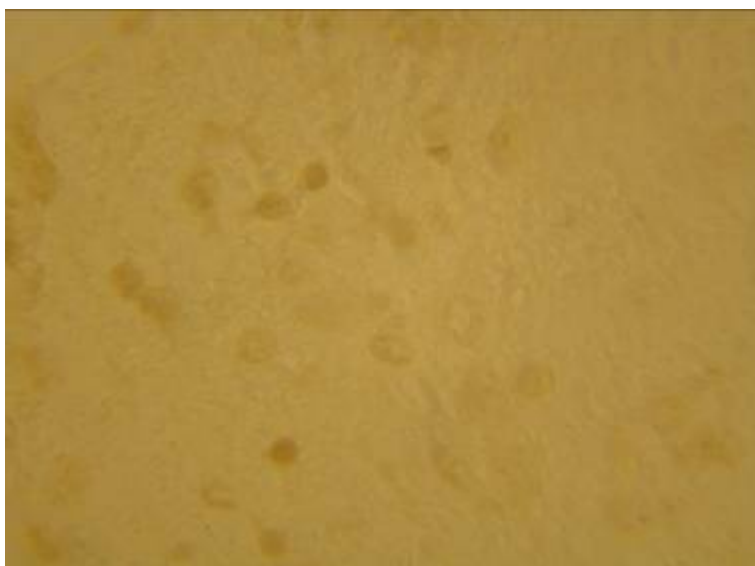
مقایسه تعداد سلول‌های عصبی حرکتی بعد از گذشت چهار هفته در دو گروه کنترل و مطالعه حاکی از تأثیر داروی دپرنیل برای افزایش تعداد سلول‌ها یا کاهش مرگ سلول‌های عصبی حرکتی است.

نتایج بررسی ایمنوهیستوشیمیایی سلول‌های گلیال
برای بررسی سلول‌های آستروسیت و الیگو دندروسیت در نمونه لام‌هایی که با این روش تهیه



شکل ۳. مقطعی از بافت نخاع ناحیه آسیب دیده در رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمیایی جهت سلول های آستروسیت. در گروه مطالعه ۴ هفته پس از اعمال فشار مکانیکی.

محل جسم سلولی و زوائد سلولی به رنگ قهوه ای مشخص است. بزرگ نمایی ۱۰۰۰



شکل ۴. مقطعی از بافت نخاع ناحیه آسیب دیده در رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمیایی سلول های الیگو دندروسیت در گروه مطالعه ۴ هفته پس از اعمال فشار مکانیکی. محل جسم سلولی به رنگ قهوه ای مشخص است. بزرگ نمایی ۱۰۰۰



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

دو گروه مطالعه و کنترل محاسبه شد (جدول ۳). تحلیل آماری حاکی از اختلاف معنادار بین سلول‌های آستروسیت در گروه کنترل با گروه مطالعه در هفته چهارم است. تحلیل آماری حاکی از اختلاف معنادار بین سلول‌های الیگو دندروسیت در گروه کنترل با گروه مطالعه در هفته چهارم است. تحلیل آماری حاکی از اختلاف معنادار بین سلول‌های الیگو دندروسیت در گروه کنترل با گروه مطالعه در هفته چهارم است.

با شمارش سلول‌های رنگ شده گلیال که با روش هماتوکسیلین و انوزین رنگ آمیزی شدند، توانستیم سلول‌های محدوده مورد نظر را محاسبه کنیم. میانگین و انحراف معیار کل سلول‌های گلیال (آستروسیت - آلیگو دندروسیت و میکرو گلیال) منطقه نیز مشخص شد. به این ترتیب، میانگین و انحراف معیار سلول‌های آستروسیت و الیگو دندروسیت نیز در تمام زیرگروه‌ها به دست آمد (جدول ۲). درصد تعداد سلول‌های آستروسیت و الیگو دندروسیت که با روش ایمنوهیستوشیمیایی رنگ شده‌اند در تمام زیرگروه‌ها در

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

زیر گروه‌ها	میانگین و انحراف معیار سلول‌های عصبی حرکتی در بخش آسیب دیده، گروه کنترل (سرم فیزیولوژی)	میانگین و انحراف معیار سلول‌های عصبی حرکتی در بخش آسیب دیده، گروه مطالعه (دپرینیل)	درصد کاهش سلول‌های عصبی حرکتی در هفته ۱ با ۲ و هفته ۲ با ۴ در گروه مطالعه	درصد کاهش سلول‌های عصبی حرکتی در هفته ۱ با ۲ و هفته ۲ با ۴ در گروه کنترل	درصد کاهش سلول‌های عصبی حرکتی درمقایسه دو گروه مطالعه و کنترل در هفته‌های ۱-۲ و ۴	تحلیل آماری

۱ هفته	۲۵۰۸±۲۶۰	۲۹۵۶±۱۷۰	-	-	-۱۵	P<۰/۰۵
۲ هفته	۱۲۹۴±۱۹۷	۱۸۰۸±۲۵۹	- ۳۸/۸	- ۴۸/۴	-۲۸	P<۰/۰۵
۴ هفته	۷۸۶±۲۳۷	۱۳۰۳±۳۸۶	- ۲۷/۹	-۳۹/۲۵	-۳۹	P<۰/۰۵

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

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

(P<۰/۰۵) ***

(P<۰/۰۵) **

(P<۰/۰۵) *

بحث

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

همچنین تأثیر داروی دپرنیل سبب کاهش ایجاد واکنش گلیوز شده و در زیرگروهی که این دارو را به مدت

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

چهار هفته دریافت کرده‌اند، این تأثیر بیش‌تر است ($P < 0/05$).

جدول ۳. درصد پاسخ‌گویی سلول‌های آستروسیت و الیگودندروسیت در بخش نخاع آسیب دیده در واکنش ایمنو هیستوشیمیایی

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

کنترل، بعد از گذشت چهار هفته تعداد سلول‌ها به یک سوم هفته اول کاهش می‌یابد. بررسی‌های متعدد روی داروی دپرنیل خاصیت آنتی آپوپتیک و آنتی اکسیدانی آن را تأیید کرده است [۲]. دکتر Knoll اولین بار تأثیر این دارو را برای مهار آنزیم مونوآمینو اکسیداز نوع B ساخت و آن را به عنوان داروی ضد پیری و بقای سلول معرفی کرد [۴].

در گزارش دیگری این خاصیت به صورت افزایش بیان مولکول‌های ضد آپوپتوز مانند BCL-2 است [۵]. در گزارش Tatton و همکاران، داروی دپرنیل سبب رشد طولی، زوائد سلول‌های عصبی و کاهش مرگ آپوپتیک سلول‌ها معرفی شد [۲۱]. با توجه به تحقیقات انجام شده روی داروی سلزلیلین و اثر تحرکی آن در افزایش فاکتورهای نروتروفیکی در محیط کشت سلول‌های آستروسیت [۲۲]. برای اولین بار نقش داروی دپرنیل به میزان ۲/۵mg/kg در ضایعات مکانیکی طناب نخاعی بررسی شد و نتایج این تحقیق حاکی از کاهش مرگ سلول‌های عصبی بود. به طوری که در هفته اول در گروهی که داروی دپرنیل دریافت کرده بودند، تعداد سلول‌های عصبی باقی مانده با تفاوت معناداری پانزده در صد بیش‌تر از گروهی است که در همین مدت سرم فیزیولوژی دریافت کرده‌اند. پس از گذشت دو هفته این تفاوت در افزایش سلول‌ها به ۲۸ درصد و بعد از گذشت چهار هفته به ۳۹ درصد رسیده است. در مقایسه بین هفته اول با دوم در گروه مطالعه درصد کاهش سلول‌های عصبی ۳۸/۸ و مقایسه هفته دو با چهار در

روش شمارش سلولی یک روش تأیید شده برای بررسی مورفومتری سلول‌های عصبی است که بسیاری از محققان مانند Oppenheim و Jacobson آن را ارائه کردند [۱۴]. Crow و همکاران وقوع آپوپتوز را در پی ضربات مکانیکی نخاع گزارش نمودند. بطوری که مشاهده سلول‌های آپوپتیک از شش ساعت تا سه هفته بعد از ضایعه در بافت سفید نخاع است. سلول‌های آپوپتیک بیش‌تر از نوع الیگو دندروسیت معرفی گردید [۱۵]. Liu در راستای همین نتایج بدنبال صدمات مکانیکی نخاع مرگ سلول‌های عصبی و سلول‌های گلیال را از نوع مرگ آپوپتیک ارائه کرد [۱۶]. در سال ۲۰۰۱ نیز Qiu و همکاران گزارشی مبنی بر نکروز سلول‌های عصبی و سلول‌های آستروسیت را پس از ضایعه ضربه مکانیکی ارائه کردند [۱۷]. در سال ۲۰۰۲ Smith و همکاران نکروز سلول‌ها را در پی افزایش آمینواسیدهای گلوتامیت و گلیاسین و تورین موجود در نخاع را متعاقب ضایعات نخاع ارائه کردند [۱۸]. Mills و همکاران نیز افزایش غلظت خارج سلولی آمینواسید گلوتامیت را سبب بروز یک سری وقایع توکسیک عنوان کردند [۱۹]. Hains و همکاران آزاد شدن رادیکال‌های سایتوتوکسیک را دلیل آپوپتوز در ضایعات نخاعی عنوان کردند [۲۰]. مشاهده آپوپتوز با کاهش فوری پروتئین ضد آپوپتوز BCL-XL در محل ضایعه را ارائه کرد [۱۷]. نتایج حاصل از این تحقیق نیز در راستای نتایج سایر تحقیقات مبنی بر کاهش سلول‌های عصبی در پی مرگ سلولی آپوپتیک است. به طوری که در گروه

پنجاه درصدی سلول‌های گلیال متعاقب ضایعه فیزیکی نخاع عنوان شد [۲۸]. در همین راستا مطالعه Xiao و همکاران مرگ آپوپتیک سلول‌های عصبی و گلیال را پس از فشار مکانیکی نخاع ارائه می‌کند [۲۹]. در این مطالعه نیز سلول‌های گلیال در هر دو گروه با گذشت زمان افزایش یافته که بیش‌ترین میزان افزایش مربوط به سلول‌های آستروسیت هادر هفته چهارم است که مغایر با نتایج Zai و Morin و Lytle و Xiao و همسو با Kao و Gilmore است.

مصرف داروی دپرنیل سبب کاهش سلول‌های آستروسیت و الیگو دندروسیت‌ها می‌شود که با گذشت زمان این تأثیر بیش‌تر نیز می‌شود. بنابراین با توجه به این که تا کنون روی تأثیر دارو در میزان واکنش گلیوز تحقیقی صورت نگرفته، بررسی بیش‌تر چگونگی اثر دارو در زمان‌های طولانی‌تر و دوزهای مختلف، همچنین به نقش این دارو در بیان ژن‌های آنتی آپوپتیک سلول‌های گلیال پیشنهاد می‌شود.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان‌نامه دانشجویی در دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد است. از کارکنان و کارشناسان آزمایشگاه تحقیقاتی علوم تشریح و پاتولوژی دانشکده پزشکی شاهد و کارکنان آزمایشگاه حیوانات که در انجام این پایان‌نامه ما را یاری کردند، کمال تشکر را داریم.

منابع

1. Le Th,gean A d. Neuroimaging of traumatic brain injury. Spinal J Med 2009;20:145-62.
2. Kiray M, Ergur BU, Bagriyanik A. Suppression of apoptosis and oxidative stress by deprenyl and estradiol in aged rat liver. Acta Histochem 2007;109:480-485.
3. Akhtar AZ, Pippin JJ, Sandusky C B. Animal studies in spinal cord injury. Altern Lab Anim 2009;37:43-62.
4. Knoll J. History of deprenyl ; the first selective inhibitor of monoamine oxidase type B. Vopor. Med Khim 1997;43:482-93.
5. Buys YM., Trope G, Tatton W.G. Deprenyl increase the survival of rat retinal ganglion cells after optic nerve crush. J Current -Eye- Res 1995;14:119-26.
6. Heshmati M ,Amini H. deprenyl can mediate neuronal protection rather than neuronal rescue. Iran J Pathol 2007;pp.2:45-48.

همین گروه ۲۷/۹ است یعنی با گذشت یک هفته سیر کاهش سلول عصبی در این گروه مهار شده و بیش‌ترین تأثیر دارو پس از گذشت چهار هفته در مقایسه بین گروه‌ها در هفته چهارم نیز این نتایج بیش‌ترین تأثیر را نشان می‌داد. همچنین مقایسه بین هفته یک با دو در گروه کنترل، کاهشی معادل ۴۸/۴ درصد دارد که در همین گروه در هفته چهارم این کاهش در مقایسه به هفته دوم معادل ۳۹/۲۵ درصد است. روند این سیر کاهش نیز هم‌راستا با نتایج Oppenheim است. او این روند کاهش را در پی واکنش فیدبک سلولی در افزایش بیان نروتروفین عنوان می‌کند [۲۳]. با توجه به نتایج تحقیق در هفته چهارم، پیشنهاد می‌شود تأثیر دارو در درازمدت بررسی شود. با مقایسه نتایج می‌توان گفت این نتایج هم‌راستا با نتایجی است که دپرنیل هنگام قطع عصب محیطی به صورت افزایش سلول‌ها از طریق حفظ آن‌ها به دست آورد [۶]. تحقیق حاضر، پس از اعمال ضایعه مکانیکی نخاع و در پی مرگ سلول‌های عصبی لابه‌لای سلول‌ها حفراتی ایجاد می‌شود و بافت عصبی با سلول‌های گلیال اشغال می‌شود که این نتایج مشابه با نتایج تحقیقات Gilmore و همکاران (۱۹۹۰) و Kao و همکاران (۲۰۰۸) است [۲۴]. همچنین در بررسی که Zai و همکاران انجام دادند، مرگ آپوپتوتیک سلول‌های عصبی و گلیال در پی ضایعات مکانیکی طناب نخاعی دیده می‌شود [۲۵]. مطالعات Morin و همکاران (۱۹۹۸) نشان می‌دهد به دنبال ضایعه قطع طناب نخاعی بیش‌ترین تغییرات بیان زن در سلول‌های گلیال الیگو دندروسیت هاست به طوری که در چند روز اول، آنزیم CNPase افزایش یافته، اما در انتهای هفته اول به حالت عادی برمی‌گردد این تغییرات همراه کاهش میلین‌سازی است [۲۶]. Hinman و همکاران (۲۰۰۸) این فرایند را که پس از ضایعه طناب نخاعی سلول‌ها دچار مرگ آپوپتیک می‌شوند مشابه وقایع دوران پیری عنوان می‌کنند [۲۷]. در صورتی که مطالعات قبلی حاکی از افزایش سلول‌های آستروسیت پس از ضایعه نخاعی است [۲۴]. در بررسی دیگری که توسط Lytle و همکاران انجام شد کاهش

18. Smith C, Somogy G, Bird E. Neurogenic bladder model for spinal cord injury :spinal cord microdialysis and chronic urodynamics. *Brain Res* 2002;9:57-64.
19. Mills C,Fullwood S, Hulsebosch C. changes in metabotropic glutamate.
20. Hains B,Yucra J,Hulsebosch C. Reduction of pathological and behavioral deficits following spinal cord contusion injury with the selective cyclooxygenase -2 inhibitor NS-398.*J Neurotrauma* 2001;18:409-23.
21. Tatton W G, Wadia JS, Ju W Y. Deprenyl reduce neuronal apoptosis and facilitates neuronal out growth by altering protein synthesis with out inhibitory monoamine-oxidase. *J N Transm* 1996;48: 45-59.
22. Kontkanen Q, Castren E.Trophic effects of selegiline on cultured dopaminergic neuron. *Brain Res* 1999;829:190-200.
23. Oppenheim R W, Ler M, Houenou L Neurotrophic agents prevent motoneuron death following sciatic nerve section the neonatal mouse. *J Neurobiol* 1994;7: 759-66.
24. Simon Cm, Sharif s, Tan Rp .Spinal cord contusion causesacute plasma membrane damage. *J Neurotrauma* 2009;4:38-41.
25. Zai LJ, Wrathall Jr, Cell proiifration and replacement following contusive spinal cord injury. *Glia* 2005;50:247-57.
26. Morin r, Feldblum S, Privat A, Astrocytes and oligodendrocytes reactions after a total section of the rat spinal cord. *Brain Res* 1998;783 :85-101.
27. Hinman JD ,Chen CD, Oh SY. Age dependent accumulation of ubi quitinated 2,3-cyclic nucleotide 3-Phosphodiesterase in mylin lipid rats. *Glia* 2008;56: 118-133.
7. Katoh M ,Hida K,Abe H. A split cord malformation.*Childs Nerv Syst* 1998;14:398-400.
8. Dolan EJ ,Tator CH. A new method for testing the force of clips for aneurysms or experimental spinal cord compression. *J Neurosurg* 1979;51:229-33.
9. Dolan EJ, Tator. The value of decompression for acute experimental spinal cord compression injury. *J Neurosurg* 1995;53:749-55.
10. Liu X,Xu X.Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci* 1997;17:5395-5406.
11. Sadel F, Bechade C. Nerve growth factor induce motoneuron apoptosis in rat embryonic spinal cord in vitro.*Eur. j. Neurosci* 1999;11:3904-3912.
12. Singh, D.K. *Neurosci Letters* :2003;340: 201-204.
13. Lee J C , Mayer M. Gliogenesis in the central nervous system. *Glia* 2000;30:105-121.
14. Jacobson M,Weil M.Programmed cell death in animal development 1997;88:347-354.
15. Crow M ,Bresnahan J,Shuman S.Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat Med* 1997;3:240-253.
16. Liu X, Xu X,Hu R. neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci* 1997;17:5395-5406.
17. Qiu J, Nesie O, Ye Z. BCL -expression after contusion to the rat spinal cord. *J Neurotrauma* 2001;18:18-24.
28. Lytle JM, Wrathall JR. Glial cell loss,proliferation and replacement in the contused murine spinal cord. *Eur J Neurosci* 2007;25: 11-24.
29. Xiao Y, Shan KR,Guan ZZ. Effect of beta -amyloid on alpha -7 nicotinic receptor status in astrocytes and neurons J..*Zhonghua Bing Li* 2006;35:462-66