دانشور
پزشکی

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

نویسندگان: حسام امینی*[1]، دکتر مرجان حشمتی [2] و دکتر محمد رضا جلالی[3]

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

نویسنده مسئول: *E-mail:
un120000@yahoo.com

دوماهنامه علمی - پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال شانزدهم - شماره ۸۲
شهریور ۱۳۸۸

وصول: ۸۸/۱/۳۰
آخرین اصلاحات: ۸۸/۴/۸
پذیرش: ۸۸/۴/۲۰

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 اسپراگ رالی به وزن ۳۰۰-۲۵۰ 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 محاسبهٔ درصد این پاسخ‌گویی. شمارش سلول‌های عصبی حرکتی نخاع حاکی از کاهش سلول‌های عصبی حرکتی درشاخ قدامی نخاع به همراه ایجاد حفره است. این کاهش در گروه دریافت کننده 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 ($P< ۰/۰۵$). 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 ($P<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: برای اولین بار تأثیر داروی دپرنیل در کاهش تکمیل بافت اسکار گلیوز مشخص شد. دارو بیش‌ترین تأثیر را روی سلول آستروسیت دارد، به‌طوری 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.

مقدمه

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

استفاده از داروی نروپروتکتیومی مانند دپرنیل توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است. این دارو یـک مهارکننـدهٔ انتخـابی غیرقابـل برگشـت از منوآمینواکسیداز نوع B است. این آنزیم وظیفهٔ متابولیسم دوپامین در مغز را بر عهده دارد که در درمـان بیمـاری پارکینسون مورد استفاده قـرار مـی‌گیـرد [۲]. مطالعـات انجام شده در سیستم عصبی پستانداران نشان می‌دهد در مراحل تکوین و اوایل تولد، سلول‌های عصـبی مربوطـه با درجه‌های مختلفی دچـار مـرگ سـلولی یـا آپوپتـوز می‌شوند که این درجه‌ها به شدت فشار، محـل آسـیب، نوع سلول عصبی و محـل قـرار گـرفتن آن در سیسـتم عصبی و سن حیوان وابسته است [۳].

استفاده از ضایعهٔ مکانیکی طناب نخاعی برای القـای آپوپتوز در نرون‌ها کاربرد گسترده‌ای پیدا کرده و امروزه مشخص شده که در پی آن تغییرات دژنراتیو نـرون‌هـا، همراه با هماتوم و خونریزی و حفره‌حفـره شـدن بافـت نخاعی پدیدار می‌شود.

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

داروی دپرنیـل اولـین بـار توسـط پروفسـور Knoll (۱۹۶۰) در مجارسـتان سـاخته شـد. ایـن دارو یـک مهارکنندهٔ انتخابی غیرقابل برگشـت از منوآمینواکسـیداز نوع B است. این آنزیم وظیفهٔ متابولیسم دوپامین در مغز را برعهده دارد که در درمان بیماری پارکینسـون مـورد اسـتفاده قـرار مـی‌گیـرد [٤]. ابتـدا بـه عنـوان داروی ضدافسردگی معرفی شد [٥]، اما با مشخص شدن اثرات دیگر دارو در درمان بیماری نورودژنراتیـو پارکنیسـون، امروزه به عنوان یک داروی ضدپیری نیز مطـرح اسـت. تحقیقات اخیر نشان مـی‌دهـد دپرنیـل دارای خاصـیت حفـاظتی بـرای سـلول عصـبی (neuroprotctive)، نجـات‌دهنـدگی نـرون (neurorescue) و کـاهش‌دهنـدهٔ آپوپتوز است [٦]. بنابراین تصمیم گرفتیم، اثر ایـن دارو را در آپوپتوز ناشی از فشار بـر ضایعات طناب نخـاعی موش صحرایی بررسی کنیم. اولین بار Katoh و همکاران با استفاده از روش جراحی لامینکتومی طناب نخـاعی را رؤیت کردند [۷]. سپس روش‌های متفاوتی برای ایجـاد ضایعهٔ تجربی بر نخاع مطـرح شـد. اسـتفاده از ضـایعه مکانیکی و فشار به طنـاب نخـاعی یکـی از روش‌هـای القای آپوپتوز در نرون‌های محل بررسی است. Dolan & Tator در سال ۱۹۷۹ و Fehling & Nashina در سال ۱۹۹۵ یکی از روش‌های استفاده از کلیپس آنوریسـم را ارائـه دادند. در سال ۲۰۰۷ به عنوان روشی مطمـئن در ایجـاد ضایعهٔ مکانیکی نخاع معرفی شد [۸]. به این منظور پـس از عمل جراحی لامینکتومی و اعمـال فشـار بـا کمـک کلیپس آنوریسم که روش تأیید شده مقالات اسـت [۹]، بـه بررسـی تعـداد و عملکـرد سـلول‌هـای عصـبی و سـلول‌هـای گلیـال آستروسـیت و الیگودندروسـیت در سـگمان نخـاعی مربوطـه بـا کمـک روش ایمنوهیستوشیمیایی پـرداختیم. هـدف از ایـن تحقیـق، ارزیابی تأثیرات داروی دپرنیل در میزان تشکیل واکـنش گلیوز است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از حیوان آزمایشـگاهی مـوش صـحرایی نژاد اسپراگ بـه وزن ۳۰۰-۲۵۰ گـرم از انسـتیتو رازی حصارک کرج استفاده شد. ابتدا تعداد ٤۲ عدد موش در دو گروه ۱. مطالعه (اعمـال فشـار مکـانیکی + تزریـق روزانـه دپرنیـل mg/kg ۲/۵) ۲. کنتـرل (اعمـال فشـار مکانیکی + تزریق روزانه سرم فیزیولوژی) در قفس‌های جداگانه به طور تصادفی قرار گرفته و شرایط اسـتاندارد دوازده ساعت روشنایی و دوازده ساعت تاریکی و دمای ۲۳-۲۲ درجه سانتی‌گـراد، غـذای مخصـوص پلیـت از شرکت خوراک دام پارس و آب کافی در حیـوان‌خانـه

دانشکده پزشکی شاهد در نظر گرفته شد. روی هر قفس برچسبی برای مشخص کردن تاریخ خرید، زیرگروه، تاریخ عمل جراحی لامنیکتومی و تاریخ کشتن با توجه به این‌که 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 انوریسم انجام گرفت [۹].

پس از روئیت نخاع گیرهٔ کلیپس آنوریسم (تنظیم شده برای اعمال فشاری معادل ۵۵ گرم) [۱۰] را به آرامی میان دو انگشت گرفته و دو لبهٔ آن را در طرفین طناب نخاعی قرار می‌دهیم و به مدت یک دقیقه منتظر می‌مانیم. سپس با باز کردن دو لبهٔ 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 ۲/۵ mg/kg با سرم فیزیولوژی پس از عمل لامنیکتومی در حیوانات بر حسب این‌که 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 گزیلایزین به‌طور 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 مدل۸۲۰ لایکا تهیه شد. برای بررسی مورفومتری از روش رنگ‌آمیزی کرسیل فست ویولت شرکت مرک آلمان استفاده کردیم.

دراین مرحله برای شمارش سلولی، نرون‌های حرکتی که در قسمت قدامی خارجی در هر دو نیمهٔ 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، ٦، ۱۱، ۱٦، ۲۱ و...). حاصل جمع نرون‌های شمرده شده ابتدا در عدد پنج ضرب شد و مجموع نرون‌های حرکتی سگمان‌های آسیب‌دیده در هر دو نیمه نخاع به‌دست 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 ۲/۵ 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. به‌طوری 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 تهیهٔ نمونه‌های بافتی موردنیاز به‌طور دقیق مانند مرحلهٔ 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

مادهٔ اخیر با پراکسیداز موجود در آنتی بادی ثانویه واکنش داده و رسوب قهوه‌ای رنگی در زیر میکروسکوپ نوری قابل مشاهده بود. به‌طوری 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 ٤٢ حیوان در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت.

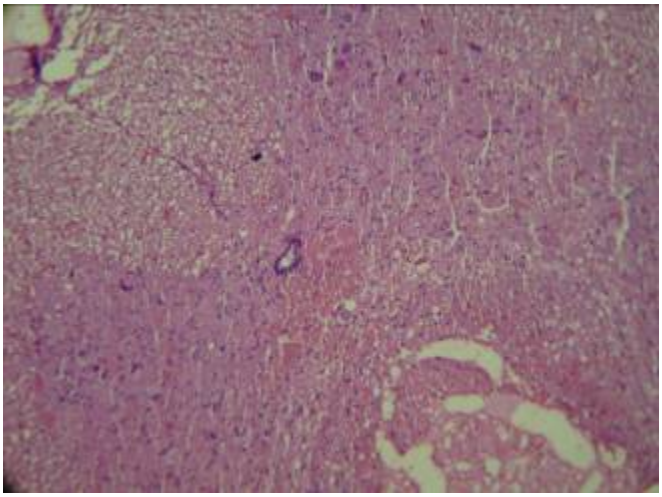
یافته‌ها

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

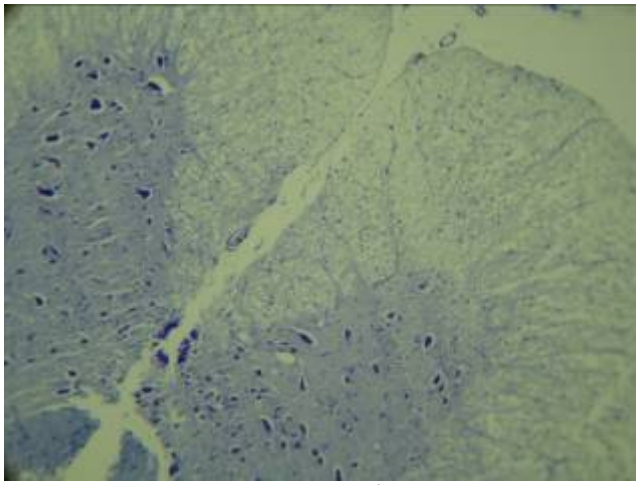
شمارش سلول‌های عصبی حرکتی نخاع در محل ضایعه در دو گروه حاکی از این است که تعدادی از سلول‌های عصبی حرکتی در محل اعمال فشار دستخوش کروماتولیز شده (اجسام نیسل در اطراف هسته به مقدار زیادی از بین رفته) و سیتوپلاسم اطراف هسته روشن دیده می‌شود (شکل ۲). مقایسهٔ بین دو گروه مورد مطالعه (اعمال فشار مکانیکی و تزریق روزانهٔ داروی دپرنیل در داخل صفاق تا



شکل ۱. برش عرضی از نخاع موش صحرایی در گروه کنترل ٤ 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 ائوزین و بزرگنمایی ۱۰۰

زمان کشتن حیوان) و گروه کنترل (اعمال فشار مکانیکی و تزریق روزانهٔ 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 مقایسه بین شمارش سلولی کل سلول‌های عصبی حرکتی با استفاده از آزمون تی نشان می‌دهد، در گروه درمان‌نشده کاهش معناداری وجود دارد ($P< ۰/۰۵$). در زیرگروهی که چهار هفته دارو دریافت کرده‌اند تأثیر دارو در حفظ سلول‌های عصبی با اختلاف معناداری بیش‌تر است ($P< ۰/۰۵$).

در زیرگروه یک هفته کاهش سلول‌های عصبی با خونریزی در لابه‌لای سلول‌های بافت نخاع همراه است. در زیرگروه دو هفته کاهش سلول‌ها به همراه حفره‌حفره شدن بافت نخاع در محل اعمال فشار مکانیکی است و داخل حفرات خونریزی دیده می‌شود. در زیرگروه چهار هفته میزان خونریزی کاهش یافته و بیش‌تر بافت نخاع توسط سلول‌های عصبی پشتیبان جایگزین شده است. مقایسه این تغییرات در هر دو گروه کنترل و درمان شده نشان می‌دهد، در گروه درمان‌نشده این تغییرات بیش‌تر از گروه درمان شده با دپرنیل است.



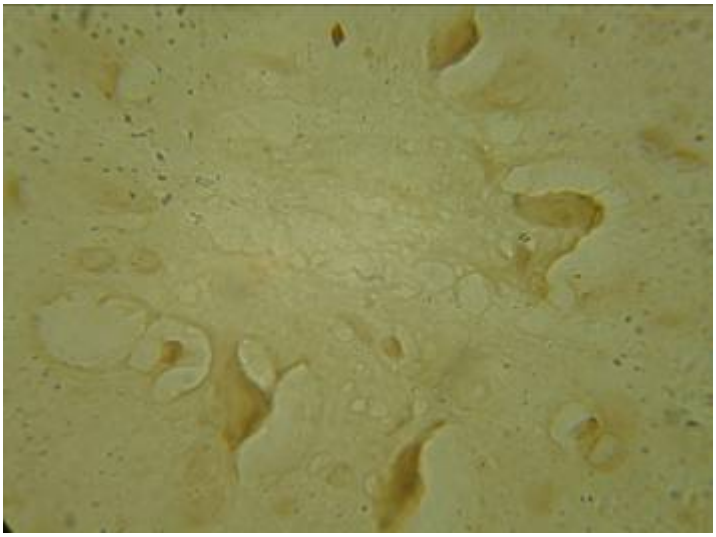
شکل ۲. برش عرضی از بافت نخاع موش صحرایی در رنگ‌آمیزی کرسیل فست ویولت. در این تصویر منطقه خاکستری و منطقه سفید مشاهده می‌گردد. در منطقه خاکستری سلول‌های عصبی که دور تادور آنها را نوروگلی محاط کرده است را نشان می‌دهد.در گروه کنترل٤ هفته پس از اعمال فشار مکانیکی، کاهش سلول‌های عصبی حرکتی در شاخ قدامی نخاع مشهود است با بزرگ‌نمایی ٤٠٠

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.

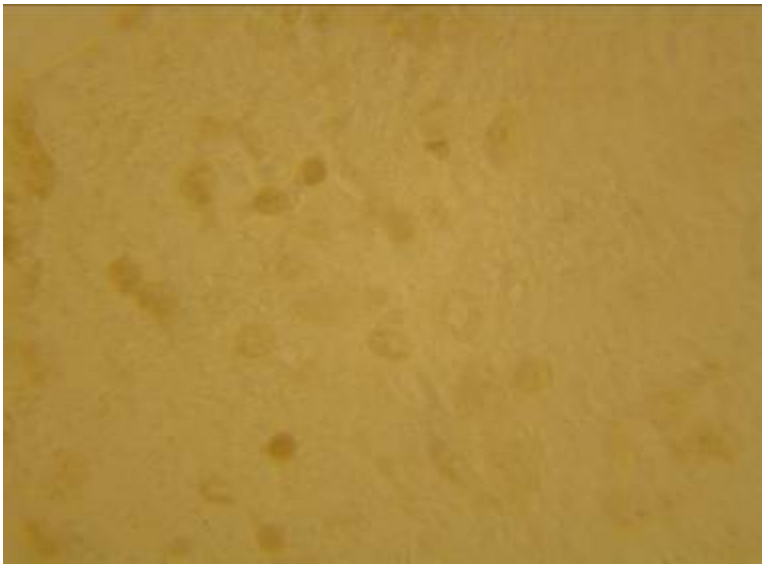
نتایج بررسی ایمنوهیستوشیمیایی سلول‌های گلیال

برای بررسی سلول‌های آستروسیت و الیگو دندروسیت در نمونه لام‌هایی که با این روش تهیه شده‌اند، محصول نهایی به صورت رسوب قهوه‌ای رنگی در سطح سیتوپلاسم است که محل حضور این سلول‌ها را نشان می‌دهد (شکل‌های ۳ و ٤).

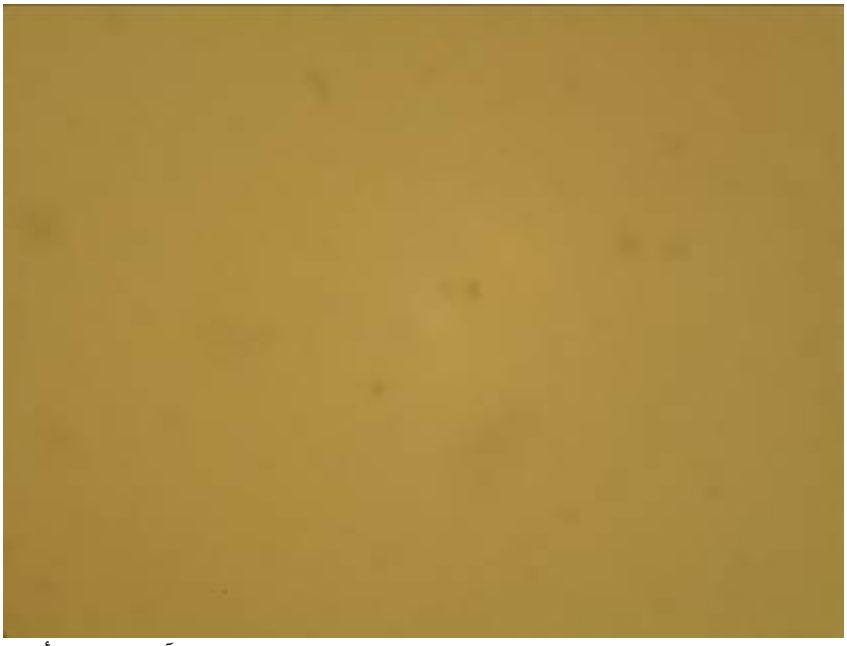
مقایسه این نتایج با نمونه‌های کنترل منفی که در آن ها آنتی‌بادی اولیه حذف شده بود، حساسیت و دقت آنتی‌بادی را تأیید می‌کند (شکل ٥).



شکل ۳. مقطعی از بافت نخاع ناحیه آسیب دیده در رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمیایی جهت سلول‌های آستروسیت. در گروه مطالعه ٤ هفته پس از اعمال فشار مکانیکی.
محل جسم سلولی و زوائد سلولی به رنگ قهوه‌ای مشخص است . بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰



شکل ٤. مقطعی از بافت نخاع ناحیه آسیب دیده در رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمیایی سلول‌های الیگو دندروسیت در گروه مطالعه ٤ هفته پس از اعمال فشار مکانیکی. محل جسم سلولی به رنگ قهوه‌ای مشخص است .بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰



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

با شمارش سلول‌های رنگ شده گلیال که با روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند، توانستیم سلول‌های محدوده موردنظر 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 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 چهار است. تحلیل آماری حاکی ازاختلاف معنادار بین سلول‌های الیگو دندروسیت در گروه کنترل با گروه مطالعه درهفته چهار است. تحلیل آماری حاکی ازاختلاف معنادار بین سلول‌های گلیال در گروه کنترل با گروه مطالعه در هفته چهار است.

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

تحلیل آماری	درصد کاهش سلول‌های عصبی حرکتی درمقایسه دو گروه مطالعه و کنترل در هفته‌های ۱-۲ و ٤	درصد کاهش سلول‌های عصبی حرکتی در مقایسه هفته ۱ با ۲ و هفته ۲ با ٤ در گروه کنترل	درصد کاهش سلول‌های عصبی حرکتی در مقایسه هفته ۱ با ۲ و هفته ۲ با ٤ در گروه مطالعه	میانگین و انحراف معیار سلول‌های عصبی حرکتی در بخش آسیب دیده، گروه مطالعه (دپرنیل)	میانگین و انحراف معیار سلول‌های عصبی حرکتی در بخش آسیب دیده، گروه کنترل(سرم فیزیولوژی)	زیر گروه‌ها

۱ هفته	۲۵۰۸± ۲۶۰	۲۹۵٦ ±۱۷۰	–	–	–۱۵	P<۰/۰۵
۲ هفته	۱۲۹٤ ± ۱۹۷	۱۸۰۸ ±۲۵۹	– ۳۸/۸	– ٤۸/٤	–۲۸	P<۰/۰۵
٤ هفته	۷۸٦ ± ۲۳۷	۱۳۰۳± ۳۸٦	– ۲۷/۹	–۳۹/۲۵	–۳۹	P<۰/۰۵

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

زیر گروه ها	کل سلول‌های گلیال موجود در بخش 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 بخش 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(درما ن شده)	در صد کاهش کل سلول‌های گلیال درمقایسه دو گروه مطالعه و کنترل
۱ هفته	۳۵۳±۹/۸	۲۹۸±٤/۲	۵۲±۲/۳	۲۵۹±٦/۳	۲۲۵±۱/۲	۲۷±۳/٤	٪– ۲٦/٦۲
۲ هفته	٤۹٦±۱۷/۹	٤۲۷±۳/۱	٦۹±۷/٤	۳۱۱±۹/۲	۲٤۸±٤/۳	۳۰±۳/۲	٪–۳۷/۲۹
٤ هفته	۱٤۰۹±۱٤/۸ ***	۱۲٦۵±۳۲/۳ *	۱٤٤±۹/۸ **	٤۹۱±۱٦/۲ ***	۳۵۳±۲/۲ *	٤۱±۲/۵ **	٪–٦۵/۱۵

(P<۰/۰۵) * (P<۰/۰۵) ** (P<۰/۰۵) ***

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 مهاری دپرنیل روند افزایش سلول‌های آستروسیت کندتر می‌شود.

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 محاسبهٔ درصد این پاسخگویی. شمارش سلول‌های عصبی حرکتی نخاع حاکی از کاهش سلول‌های عصبی حرکتی نخاع ی‌در 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

چهار هفته دریافت کرده‌اند، این تـأثیر بـیش‌تـر اسـت (P< ۰/۰۵).

جدول ۳. درصد پاسخ گویی سلول‌های آستروسیت و الیگو دندروسیت در بخش نخاع اسیب دیده در واکنش ایمنوهیستوشیمیایی

زیر گروه‌ها	آستروسیت در گروه کنترل	الیگودندروسیت در گروه کنترل	استروسیت در گروه مطالعه	الیگودندروسیت در گروه مطالعه
۱ هفته	٪ ۸٤/٤۱	٪ ۱۷/۷۳	٪۸٦ /۸۷	٪ ۱۰/٤۲
۲ هفته	٪ ۸٦ / ۰۰	٪ ۱۳/۹۱	٪۷۹/۷٤	٪ ۹/٦٤
٤ هفته	٪ ۸۹/۷۷	٪۱۰ /۲۲	٪۷۱/۸۹	٪ ۸/۳۵

روش شمارش سلولی یک روش تأییـد شـده بـرای بررسی مورفومتری سلول‌های عصبی است که بسیاری از محققان مانند Oppenheim وJacobson آن را ارائـه کردنـد [١٤]. Crow و همکاران وقوع آپوپتوز را در پی ضـربات مکانیکی نخاع گـزارش نمودنـد.بطـوری کـه مشـاهده سلول‌های آپوپتیک از شش ساعت تا سـه هفتـه بعـد از ضایعه در بافت سفید نخاع است . سلول‌های آپوپتیـک بیش‌تراز نوع الیگو دندروسیت معرفی گردیـد [١٥]. Liu در راستای همین نتایج بدنبال صدمات مکـانیکی نخـاع مرگ سلول‌های عصبی و سلول‌هـای گلیـال را از نـوع مرگ آپوپتیک ارائه کرد [١٦]. در سال ۲۰۰۱ نیز Qiu و همکاران گزارشی مبنی بر نکروز سـلول‌هـای عصـبی و سلول‌های آستروسیت را پس از ضایعه ضربه مکـانیکی ارائـه کردنـد [١٧]. در سـال ۲۰۰۲ Smith و همکـاران نکـروز سـلول‌هـا را در پـی افـزایش آمینواسـیدهای گلوتامیـت و گلایسـین و تـورین موجـوددر نخـاع را متعاقـب ضـایعات نخـاع ارائـه کردنـد [١٨]. Mills و همکاران نیز افزایش غلظت خـارج سـلولی آمینواسـید گلوتامیت را سبب بروز یک سری وقایع توکسیک عنوان کردند [١٩]. Hains و همکاران آزاد شدن رادیکـال‌هـای سایتوتوکسیک را دلیـل آپوپتـوز در ضـایعات نخـاعی عنوان کردند [٢٠]. مشاهده آپوپتـوز بـا کـاهش فـوری پروتئین ضدآپوپتوز BCL-XL در محـل ضـایعه را ارائـه کرد [١٧]. نتایج حاصل از این تحقیـق نیـز در راسـتای نتایج سایر تحقیقات مبنی بر کاهش سلول‌های عصبی در پی مرگ سلولی آپوپتیک است. به‌طوری کـه در گـروه کنترل، بعد از گذشت چهار هفته تعداد سلول‌ها به یـک سوم هفته اول کاهشی می‌یابد.بررسی‌هـای متعـدد روی داروی دپرنیل خاصیت آنتی آپوپتیک و آنتی اکسـیدانی آن راتأیید کرده است [٢]. دکتر Knoll اولین بار تأثیر این دارو را برای مهـار آنـزیم مونوامینـو اکسـیداز نـوع B ساخت و آن را به عنوان داروی ضدپیری و بقای سـلول معرفی کرد [٤].

در گزارش دیگری این خاصیت به صورت افـزایش بیان مولکول‌های ضد آپوپتوز مانند BCL-2 است [٥]. در گزارش Tatton و همکاران، داروی دپرنیل سـبب رشـد طولی، زوائد سلول‌های عصبی و کاهش مرگ آپوپتیـک سلول‌ها معرفی شد [٢١]. با توجه به تحقیقات انجام شده روی داروی سـلژیلین و اثـر تحریکـی آن در افـزایش فاکتورهای نوتروفیکی در محـیط کشـت سـلول‌هـای آستروسیت [٢٢]. برای اولین بار نقش داروی دپرنیل بـه میزان ۲/۵mg/kg در ضایعات مکـانیکی طنـاب نخـاعی بررسی شد و نتایج این تحقیق حـاکی از کـاهش مـرگ سلول‌های عصبی بود. بـه‌طـوری کـه در هفتـه اول در گروهی که داروی دپرنیل دریافت کـرده بودنـد، تعـداد سلول‌های عصبی باقی مانده با تفاوت معنـاداری پـانزده در صد بیش‌تر از گروهی است که در همین مدت سـرم فیزیولوژی دریافت کرده‌اند. پس از گذشت دو هفته این تفاوت در افزایش سـلول‌هـا بـه ۲۸ درصـد و بعـد از گذشت چهار هفته به ۳۹ درصد رسیده است. در مقایسه بین هفته اول با دوم در گـروه مطالعـه درصـد کـاهش سلول‌های عصبی ۳۸/۸ و مقایسه هفته دو بـا چهـار در

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 ٤٨/٤ 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 به‌صورت افزایش سلول‌ها از طریق حفظ آن‌ها به‌دست آورد [٦]. 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 وهمکاران (۱۹۹۰) وKao و همکاران (۲۰۰۸) است [٢٤]. 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 هااست به‌طوری که در چند روز اول، آنزیمCNPase افزایش یافته، اما در انتهای هفته اول به حالت عادی برمی‌گردد این تغییرات همراه کاهش میلین‌سازی است [٢٦]. Hinman و همکاران (۲۰۰۸) این فرایند را که پس از ضایعه طناب نخاعی سلولها دچار مرگ آپوپتیک می شوند مشابه وقایع دوران پیری عنوان می‌کنند [۲۷]. در صورتی که مطالعات قبلی حاکی از افزایش سلول‌های آستروسیت پس از ضایعه نخاعی است [٢٤]. در بررسی دیگری که توسط Lytle و همکاران انجام شد کاهش 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 نیزسلول‌های 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 وLytle و Xiao و همسو باKao 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 پایان نامه 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 lLab Anim 2009;37:43-62.
4. Knoll J. History of deprenyl ; the first selective inhibitor of monoamine axidase 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.

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 nervious 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

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 metabotrophic 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.