

اثر استیل ال کارنیتین بر فراساختمان سیناپس نورون حرکتی ضایعه دیده موش صحرایی بالغ

نویسندگان: مهران جمالی^۱، مرجان حشمتی*^۲، محمد رضا جلالی ندوشن^۲

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 مرجان حشمتی

چکیده

مقدمه و هدف: ضایعه فشاری طناب نخاعی عارضه نسبتاً شایع جوامع در حال رشد است. مواد و روش ها: ۱۶ سر موش صحرایی بالغ ضایعه نخاعی دیده با وزن ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم از نژاد اسپراگوداولی در ۴ گروه بصورت تصادفی قرار گرفتند، گروه ها شامل: الف) لامینکتومی با تزریق روزانه داخل صفاقی استیل ال کارنیتین ب) لامینکتومی با تزریق روزانه داخل صفاقی سرم فیزیولوژی ج) گروه الف + اعمال فشار مکانیکی بر نخاع و د) گروه ب + اعمال فشار مکانیکی بر نخاع. پس از ۴ هفته موشها کشته و نمونه بافت نخاعی شان جهت مورفومتری با میکروسکوپ نوری و فراساختاری بوسیله میکروسکوپ الکترونی مطالعه شدند. داده های بدست آمده به وسیله آزمون آماری آنوا و در ادامه آزمون توکی با نرم افزار SPSS Ver 19 مورد بررسی قرار گرفت. سطح معنی داری $p \leq 0/05$ در نظر گرفته شد.

نتایج: بررسی مورفولوژی کاهش تعداد سلول های عصبی حرکتی را بدنبال فشار مکانیکی نشان داد. استیل ال کارنیتین مرگ سلول های عصبی را کمتر کرد و به حفظ فراساختمان سلول های عصبی حرکتی در محل سیناپسها با حفظ تعداد و شکل میتوکندری ها کمک کرد.

بحث و نتیجه گیری: در این تحقیق استیل ال کارنیتین بر بهبود فراساختمان سیناپس نورون حرکتی پس از ضایعه فشاری موثر واقع شد. همچنین این ماده برحفظ و افزایش سلول های عصبی حرکتی و کاهش مرگ آنها اثر کرد. البته میزان تأثیر این تغییر در بهبود ضایعه نخاعی ناشی از فشار مکانیکی نیازمند بررسی های بیشتر است.

واژه های کلیدی: استیل ال کارنیتین، ضایعه طناب نخاعی، فراساختمان سیناپس، موش صحرایی بالغ

ده ماهنامه علمی - پژوهشی

دریافت: ۱۳۹۸/۰۸/۲۵

آخرین اصلاح ها: ۱۳۹۸/۱۱/۰۷

پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۱۶

مقدمه

به ایجاد شرایط مشابه با ضایعه‌ی نخاعی حاد و مزمن در انسان باشد، بسیار اهمیت دارد (۷). مدل‌های تجربی متفاوتی نشان داده شده‌اند که در نوع ایجاد ضایعه تفاوت دارند. یکی از مدل‌هایی که به شکل گسترده امروزه استفاده می‌شود مدل ایجاد فشار با استفاده از روش استاندارد Clips Aneurysm است که فشار مشخصی در زمان مشخص اعمال می‌گردد (۸). همانطور که اشاره شد از مواد درون سلولی نقش ال کارنیتین از اهمیت و توجه ویژه‌ای برخوردار است و مطالعات زیادی بر ساخته شدن و پخش آن در بین سلولها شده و اثر حفاظتی آن مورد توجه محققین است (۹). این تحقیق به بررسی روند تغییرات مورفولوژی و فرا ساختمانی سلولهای عصبی و سیناپسها پس از اعمال فشار مکانیکی با کمک کلیپس انوریسم در موش صحرایی می‌پردازد. ذکر این نکته ضروری است که جهت تکمیل یافته‌ها و در ادامه تحقیق قبلی مبنی بر "بررسی اثر استیل ال کارنیتین در واکنش گلیوز" تحقیق حاضر طراحی و اجرا گردید (۱۰).

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی از موش صحرایی ماده بالغ با وزن ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم از نژاد اسپراگوداولی استفاده گردید. بدین منظور ۱۶ حیوان از انستیتو حصارک کرج خریداری شد. حیوانات در ۴ گروه به صورت تصادفی قرار گرفتند که گروهها بر اساس روش تحقیق شامل:

الف- لامینکتومی مهره‌های ۹ تا ۱۱ پشتی و تزریق روزانه داخل صفاقی استیل ال کارنیتین

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

ج- گروه الف + اعمال فشار مکانیکی

د- گروه ب + اعمال فشار مکانیکی

بدین ترتیب در هر گروه ۴ حیوان قرار گرفت. در گروه‌های "الف و ج" تزریق روزانه استیل ال کارنیتین بصورت داخل صفاقی به میزان ۳۰۰ میلی گرم/کیلوگرم

صدمات نخاعی یکی از مصدومیت‌های ماندگار در انسان است که مشکلات زیادی در زندگی فرد ایجاد می‌کند، اگر چه شیوع ضایعه نخاعی خیلی بالا نیست، بطوریکه در یکی از بررسی‌هایی که در شهر تهران انجام شد، شیوع ضربه نخاعی ۴۴ مورد در جمعیت ۱۰ هزار نفری گزارش گردید، متأسفانه به دنبال این عارضه بهبودی کامل دیده نمی‌شود و حتی در اکثر موارد به خصوص در ضایعات کامل نخاع، گاهاً بیماران تا آخر عمر فلج باقی می‌مانند از طرفی داروی قطعی برای درمان وجود ندارد. در تأثیر تنها داروی موجود یعنی متیل پردنیزولون نیز اتفاق نظر همگانی نیست (۱). در بررسی‌های آزمایشگاهی نیز نشان داده شده، بعد از گذشت ۳۰ دقیقه از ضربه بر نخاع گردنی موش صحرایی، خونریزی وسیع در منطقه و بدنبال آن هجوم سلولهای التهابی دیده می‌شود، ترشحات حاصل از این سلولهای التهابی باعث ایجاد یک سری تغییرات شیمیایی می‌شود که بنوبه‌ی خود می‌تواند باعث آسیب بیشتر بافت‌های عصبی گردد. این فرآیند بمدت چند روز تا چند هفته ادامه می‌یابد که موجب تشدید عوارض ناشی از ضربه می‌گردد (۲). از این رو توجه محققین به بررسی روند ایجاد تغییرات بافتی بدنبال ضربه جلب می‌شود و مطالعات زیادی در دو دهه‌ی اخیر در بیولوژی سلولی و مولکولی و درمان‌های مبتنی بر به کار بردن سلول‌های بنیادین بر روی مدل‌های بیولوژیک ضایعات نخاعی انجام گرفته است (۳). در این ارتباط امروزه نظر دانشمندان به مواد طبیعی درون سلولی جلب شده است. یکی از این مواد استیل ال کارنیتین است (۴). استیل ال کارنیتین در ضایعات نخاعی خفیف موش صحرایی سبب بهبود عملکرد نورونهای حرکتی می‌شود (۵). البته ذکر این نکته ضروری است که طیف گسترده ضایعات نخاعی از فشار مختصر تا قطع کامل و یا له شدگی و تغییرات استحاله‌ای هر کدام سیر پیشرفت و یا مسیر بهبودی جداگانه‌ای دارند (۶). جهت ارتقای دانش و رمز گشایی درمان‌های ممکن یک مدل تجربی که قادر

گرفته و تعداد نورونهایی که دو بار شمرده شدند از نظر آماری معنی دار نبودند (۱۲) سپس میانگین و انحراف معیار نورونهای حرکتی محاسبه گردید. در بررسی فراساختاری پس از گذشت ۱۵ دقیقه که نمونه‌ها قوام یافتند نمونه‌ها مجدداً به قطعات کوچکتر ۱ میلیمتری تقسیم شدند. سپس بعد از مراحل شستشو با بافر فسفات با فیکساتیو تتراکسید اسمیوم ۱ درصد نمونه‌ها فیکس مجدد گردیدند. در انتهای واکنش نمونه‌ها سیاه رنگ شدند. سپس شستشو و مراحل آب گیری و آغشتگی و قالب گیری با رزین انجام گردید (۱۱). پس از تهیه برشهای نیمه نازک (۵۰۰ نانومتری) و نازک (۳۰-۵۰ نانومتری) با رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو و استات اورانیل و سیترات سرب واکنش رنگ‌آمیزی انجام شد. پس از تهیه ۴ برش از هر حیوان مطالعه با میکروسکوپ الکترونی مدل زایس EM 900 فرا ساختمان سیناپس سلولهای عصبی حرکتی مطالعه گردید. در محل سیناپس سلولهای عصبی حرکتی تغییرات و شکل وزیکولهای سیناپسی و میتوکندری‌ها و همچنین شکل و ساختمان غشای سیناپسی و درصد این تغییرات درون سلولی در سلولهای مورد نظر محاسبه گردید (۱۲).

روش‌های تجزیه و تحلیل نتایج

با استفاده از نرم افزار SPSS Ver 19 داده‌های بدست آمده به صورت میانگین \pm خطای استاندارد (SEM) بیان شد. بررسی داده‌ها بوسیله آزمون آماری آنوا ابتدا انجام شد و در ادامه از روش توکی استفاده شد که معادل تی تست است و سطح معنی‌داری (۰/۰۵) $p \leq$ در نظر گرفته شد.

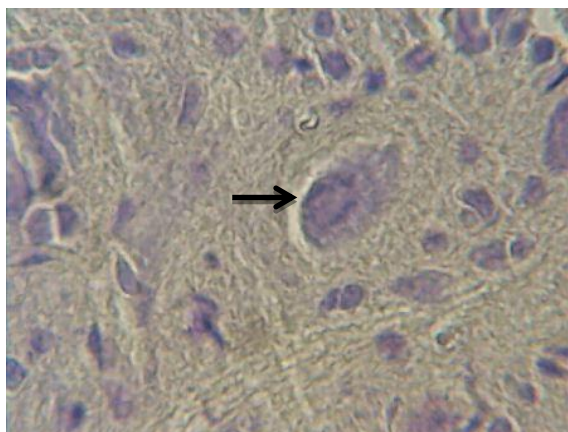
نتایج

برش‌های تهیه شده با رنگ‌آمیزی روتین H&E محل استقرار سلولهای حرکتی و هسته بصورت در هر بلوک انجام شد. پس از رنگ‌آمیزی اختصاصی جهت اجسام نیسل، باکرزیل فست ویولت نتایج حاصل مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مرحله، نورونهای حرکتی که در

محلول در سرم فیزیولوژی انجام شد. در گروه "ج" فشار با کلیپس آنوریسم به میزان ۳۰ گرم بر واحد سطح به مدت ۱ دقیقه نیز اعمال گردید. در دو گروه "ب" و "د" تزریق روزانه سرم فیزیولوژی بصورت داخل صفاقی انجام شد و در گروه "د" با استفاده از کلیپس آنوریسم فشاری معادل ۳۰ گرم بر واحد سطح به مدت ۱ دقیقه نیز اعمال شد. تزریقات همه روزه تا زمان نمونه برداری بصورت داخل صفاقی انجام گردید (۱۰).

پس از گذشت ۴ هفته از شروع تحقیق نخاع تمامی حیوانات به روش پرفیوژن قلبی فیکس و خارج گردید. سپس با توجه به روش بررسی در محلولهای فیکساتیو مورد نظر قرار گرفتند. برای بررسی مورفولوژی دو حیوان در هر گروه و بررسی فراساختاری نیز دو حیوان در هر گروه در نظر گرفته شد بطوریکه نخاعهای خارج شده در محلول ۱۰ درصد فرمالین برای بررسی با میکروسکوپ نوری و یا در فیکساتیو حاوی گلو تار آلدئید ۲/۵ درصد در بافر فسفات ۰/۱ مولار برای بررسی با میکروسکوپ الکترونی قرار گرفتند. سپس پردازش بافتی انجام و بلوک تهیه شد. بطوریکه از بلوک‌های پارافینی برش‌هایی به ضخامت ۷ میکرون توسط دستگاه میکروتوم لایکا مدل 820 تهیه شد. سپس از هر بلوک پارافینی مقاطع سریال تهیه گردید. ۴۰ مقطع برای رنگ‌آمیزی روتین H&E و ۴۰ مقطع برای رنگ‌آمیزی اختصاصی اجسام نیسل. رنگ‌آمیزی نیسل با استفاده از کرسیل فست ویولت یک‌دهم درصد با فرمول C17H17CiN3N محصول شرکت مرک که رنگ‌آمیزی اختصاصی اجسام نیسل در نورونهای حرکتی است تهیه شد. بررسی تعداد سلولها و مورفولوژی نورونهای حرکتی نمونه‌های روی لام انجام شد. ۴۰ مقطع تهیه شده هر نمونه شمارش گردید. شمارش‌ها به ترتیب (۱ و ۶ و ۱۱ و...) با میکروسکوپ نوری زایس انجام شد، معیار شمارش نورونهای حرکتی نخاع که دارای یک هسته بزرگتر از ۱۰ میکرومتر و حداقل یک هستک مشخص بودند در نظر گرفته شد. به این ترتیب کمتر از یک درصد نورونها در دو برش متوالی قرار

معنی داری مشاهده نگردید ($p > 0.05$). در حالی که این مقایسه در دو گروه "الف" و "ج" دارای تفاوت معنی داری است. همچنین این مقایسه در دو گروه "ب" و "د" نیز دارای تفاوت معنی دار است. در حالی که مقایسه دو گروه "ج" و "د" یعنی دو گروهی که فشار مکانیکی دریافت کردند با یکدیگر حاکی از کاهش معنی دار در تعداد نورونها در گروهی که سرم فیزیولوژی دریافت کردند است. بعبارتی نتایج حاصل از مقایسه بین شمارش سلولی کل سلولهای عصبی حرکتی نشان می دهد در گروهی که سرم فیزیولوژی بجای استیل ال کارنیتین دریافت کردند کاهش معنی داری دارد ($P < 0.05$). این تفاوت احتمالاً ناشی از تأثیر ماده استیل ال کارنیتین است (جدول ۱).



شکل ۱- تصویر نورونها و اجسام نیسل رنگ گرفته شده در گروه "د" (لامینکتومی+فشار نخاعی + سرم فیزیولوژی) با رنگ آمیزی کرسیل فست و یولت میزان بازوفیلی سیتوپلاسم یکنواخت نبوده و نوک پیکان هسته سلول را نشان می دهد ضمن تغییر شکل در خارج از مرکز قرار دارد. (بزرگ نمایی ۱۰۰۰)

قسمت قدامی خارجی در هر دو نیمه ی نخاع قرار دارند با میکروسکوپ نوری زایس مورد شمارش قرار گرفتند با استفاده از روشهای آماری میانگین تعداد نورونهای حرکتی در هر یک از گروههای مورد تحقیق محاسبه گردید. نتایج حاکی از کاهش تعداد قابل توجه سلولهای عصبی حرکتی در دو گروه "ج" و "د" است. مقاطع پارافینی تهیه شده از نخاع حیوانات، نورونهای حرکتی سالم به صورت سلولهای چند وجهی با هسته مرکزی روشن، هستک مشخص و اجسام نیسل بازوفیلی که به طور یکنواخت در سیتوپلاسم پراکنده بودند مشاهده شد.

در بررسی میکروسکوپی مقاطع پارافینی تهیه شده از بخش ضایعه دیده نخاع حیوانات، در این نورونها میزان بازوفیلی سیتوپلاسم یکنواخت نبوده و هسته سلولها ضمن تغییر شکل در خارج از مرکز قرار داشتند (شکل ۱). علاوه بر مشاهده خونریزی شدید در بخش آسیب دیده وقایع مربوط به شروع پدیده کروماتولیز در برخی از نورونهای حرکتی شاخ قدامی نخاع نیز مشاهده شد پس از گذشت ۴ هفته از زمان ایجاد ضایعه، پدیده Cavitation که از مشخصات بارز ضایعه نخاعی Contusion می باشد به همراه خونریزی به وضوح مشاهده گردید (شکل ۲). بدین ترتیب در نمونههایی که تحت اعمال فشار مکانیکی قرار گرفتند. کاهش سلولهای عصبی حرکتی در شاخ قدامی نخاع به همراه ایجاد حفره در بین سلولها و خونریزی در لابه لای سلولها و داخل این حفرات مشاهده شد (شکل ۲). در صورتی که در دو گروه دیگر "الف" و "ب" که بنوعی بعنوان گروه کنترل محسوب می شوند تغییراتی بصورت کاهش یا افزایش سلول عصبی یا وقوع مراحل آپوپتوتیکی مشاهده نگردید؛ یعنی گروه "الف" که لامینکتومی به همراه تزریق استیل ال کارنیتین و گروه "ب" که لامینکتومی و تزریق سرم فیزیولوژی داشتند تعداد سلولها تفاوت آماری معنی داری نداشته و تغییرات مرگ سلول نورونی مشاهده نشد. بعبارتی تعداد موتونورها و مورفومتری در بین دو گروه "الف" و "ب" اختلاف

همانطور که از جدول ۱ مشخص است با شمارش سلول‌های عصبی حرکتی بیشترین میزان حضور سلول‌های عصبی حرکتی مربوط به گروه "الف" تحقیق بود. این گروه مبنای بررسی میزان کاهش سلولی در ۳ گروه دیگر قرار گرفت. درصد کاهش سلول‌های عصبی حرکتی نسبت به گروه الف (مبنا) در گروه‌های "ب"، "ج"، "د" بدست آمد. درصد کاهش در گروه‌های آزمایشی "د" و "ج" به ترتیب ۶۸ و ۵۱ است که بیشترین درصد کاهش معنی‌دار را داشتند $P \leq 0.05$.

بررسی فراساختاری با استفاده از میکروسکوپ الکترونی

در این قسمت از تحقیق به بررسی کیفی تغییرات فراساختاری سلول‌های عصبی شامل میتوکندریها، وزیکولهای پیش سیناپسی و فضای سیناپسی پرداختیم.

آسیب ستون نخاعی سبب جا به جایی وزیکولهای سیناپسی در سیناپسهای مربوط به گروه‌های دچار آسیب نخاعی ("ج" و "د") می‌گردد، در حالیکه تغییرات سیناپسی با دانسیته الکترونی پایین در منطقه فعال سیناپسی و تورم میتوکندری، با میزان تورم متوسط تا شدید و افزایش دانسیته ماتریکس میتوکندری همراه با بی‌نظمی در غشای داخلی و خارجی و کریستاهای با حاشیه نامشخص دیده می‌شود (شکل ۳). مقایسه منطقه سیناپسی کلیه گروهها مشخص می‌کند که آسیب نخاعی که سبب تغییرات سیناپسی می‌شود در گروه "د" از همه واضح تر و در گروه "ج" کمتر مشاهده می‌شود. ناحیه سیناپسی و میتوکندری در گروه "الف" و "ب" سالم بودند (شکل ۴). مطالعات فراساختاری نشان داد آسیب نخاعی سبب القای وزیکولهای سیناپسی جا به جا و پخش شده در ناحیه پره سیناپسی در سیناپس‌های با میتوکندری وزیکوله می‌شود. بی‌نظمی‌های غشای سیناپسی و میتوکندری متورم با شدت متوسط تا زیاد طی هفته‌ها و افزایش دانسیته ماتریکس میتوکندری با شکاف سیناپسی روی هم خوابیده (شکل ۵)، تعداد افزایش یافته ساختارهای گرد هم‌اندازه بصورت میتوکندری ناسالم و پفکی شکل با کریستاهای با حاشیه نامشخص که ممکن است با جداشدگی غشاهای پیش و پس سیناپسی همراه باشد (شکل ۵).



شکل - ۲ برش عرضی از نخاع موش صحرایی بالغ جهت نمایش بافت سفید و خاکستری در گروه "ج" (لامینکتومی + فشارنخاعی + استیل ال کارنیتین) کاهش سلول‌های عصبی حرکتی در شاخ قدامی طرفی نخاع به همراه ایجاد حفره و نوک پیکان کوتاه حفره‌ها را در بین سلول‌ها نشان می‌دهد. همچنین خون ریزی در بافت سفید و خاکستری نخاع که توسط نوک پیکان بلند خونریزی را در پشت مجرای مرکزی نخاع نشان می‌دهد. با رنگ‌آمیزی همتوکسیلین وانوزین (بزرگ نمایی ۱۰۰).

جدول ۱- میانگین و انحراف معیار تعداد کل سلولهای عصبی حرکتی به همراه درصد کاهش در گروههای مورد بررسی

گروه‌های تحقیق:	در صد کاهش نسبت به گروه الف	میانگین و انحراف معیار سلول‌های عصبی حرکتی در بخش آسیب دیده نخاع	تحلیل آماری:
الف	-	2508 ± 26	$P \leq 0.05$
ب	۲/۹ - %	2434 ± 24	$P \leq 0.05$
ج	۵۱ - %	1218 ± 12	$P \leq 0.05$
د	۶۸ - %	786 ± 23	$P \leq 0.05$

مقایسه میانگین تعداد سلولهای عصبی حرکتی بعد از گذشت ۴ هفته در هر چهارگروه نشان می‌دهد که:

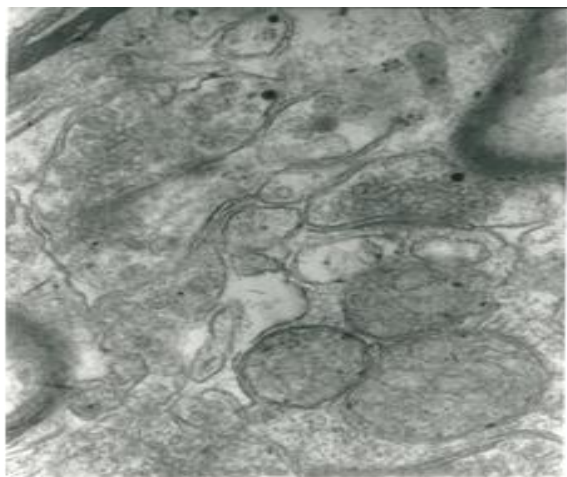
تأثیر استیل ال کارنیتین جهت افزایش تعداد سلولها یا کاهش مرگ سلولهای عصبی حرکتی در گروههای "الف" و "ج" که تفاوت آماری معنی‌دار است $(P \leq 0.05) = \text{Significant}$
تأثیر فشار مکانیکی بر نخاع که سبب کاهش سلولهای حرکتی در گروههای "ب" و "د" که تفاوت آماری معنی‌دار است $(P \leq 0.05) = \text{Significant}$

در صد کاهش در گروههای "ج" و "د" نسبت به گروه الف معنی‌دار است $(P \leq 0.05) = \text{Significant}$

بحث و نتیجه گیری

بیشترین میزان حضور سلول‌های عصبی حرکتی مربوط به گروه "الف" تحقیق است که این گروه به عنوان مبنا برای بررسی میزان کاهش سلولی در ۳ گروه دیگر در نظر گرفته شد. تغییرات فراساختمانی در فضای سیناپسی نشان داد، در گروه‌های مورد تحقیق که فشار مکانیکی دریافت نکردند کمترین میزان به هم ریختگی در فضای سیناپسی، میتوکندری‌ها و وزیکولهای پیش سیناپسی است. در گروه‌هایی که فشار مکانیکی دریافت کردند، غشای سیناپسی در قسمتهای دچار روی خوابیدگی شده، میتوکندریها متورم شده و دانسیته ماتریکس میتوکندری هم کمی افزایش یافته است. در گروه "د" که حیوانات سرم فیزیولوژی همراه فشار دریافت کردند علاوه بر تغییرات ناهنجار در گروه "ج"، حضور زواید سلول‌های آستروسیت ما بین غشای سیناپسی، روی خوابیدن غشای سیناپسی و متورم شدن میتوکندریها و از بین رفتن و سوراخ شدن غشای داخلی میتوکندریها مشاهده گردید. اگر چه مکانیسم‌های دخیل در مرگ سلولهای عصبی حرکتی پس از صدمه مکانیکی بر نخاع به خوبی شناخته شده نیستند. نتایج این تحقیق همراستا با نتایج تحقیق پاتل و همکاران که تأثیر استیل ال کارنیتین در جلوگیری از مرگ سلولهای عصبی حرکتی ارایه نموده است، می‌باشد و این تأثیر را توسط جلوگیری از اختلالات عملکرد میتوکندری ارائه کرده که هم سو و هم راستا با نتایج این تحقیق است (۱۳). در تحقیق مشابه دیگری توسط عدل و همکاران تأثیر استیل ال کارنیتین را از طریق مهار اکسیداتیو استرس و فعالیت میتوکندری ارایه گردید که دلیلی بر تأثیر این ماده در تحقیق حاضر است (۱۴). مطالعه ساستری و همکاران نشان می‌دهد هر عاملی که بتواند تغییر در روند چگونگی اتصال لیگاند به گیرنده سطح غشای سلول جهت انتقال سیگنال به منظور ایجاد سری فعالیت‌های آبخاری ایجاد کند می‌تواند بر حیات سلول‌های عصبی نیز اثر گذارد (۱۵). با توجه به 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 (۱۶) احتمال اثر احتمالی استیل ال-کارنیتین در نقل و انتقالات پیام عصبی در سطح غشای سلول از طریق گیرنده آپوپتوزی و لیگاند مربوطه است (۱۷)

رادیکال‌های آزاد در نتیجه واکنشهای شیمیایی نرمال سلول تولید می‌شوند که افزایش تولید این مواد و تجمع آنها منجر به تخریب سلولی شده و حالت استرس اکسیداتیو ایجاد می‌کند (۱۸) که منجر به تخریب بافتی، عفونتهای باکتریال، ویروسی و اختلالات اتوایمیون می‌شود (۱۹). بدین ترتیب استرس اکسیداتیو نتیجه عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و سیستم دفاع آنتی اکسیدانی 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 بعنوان ارگان اصلی متابولیسم مواد غذایی رخ می‌دهد نقش مهمی در پاتوژنز آپوپتوز سلولهای عصبی دارد (۲۰). در همین ارتباط مطالعات قبلی نشان می‌دهند که آنتی اکسیدان‌ها می‌توانند از طریق افزایش پایداری غشای سلولی موجب افزایش مقاومت نورون‌ها در برابر آسیب اکسیداتیو گردند و از طرفی ظرفیت آنتی اکسیدانی مغز را در برابر آسیب افزایش دهند (۲۱). همین مکانیزم احتمالاً می‌تواند در مورد اثرات حفاظتی استیل ال-کارنیتین در مدل القای ضایعه نخاعی مطرح باشد در این رابطه قبلاً اثرات نوروپروتکتیو این ماده در محافظت عصبی در مدل تجربی هیپوکسی القا شده مورد تأیید قرار گرفته است (۲۲). هر چند که مکانیسم بروز این پدیده به خوبی شناخته شده نیست اما طبق بررسی پاتل و همکاران سال ۲۰۱۰ استیل ال-کارنیتین در ضایعه مدل کانتیوژن طناب نخاعی در بهبود عملکرد سلول عصبی از طریق تأثیر روی فعالیت میتوکندری‌ها نقش داشته است (۱۳). همچنین هم راستا با بررسی بیلفیلد و همکاران در سال ۲۰۰۸ استیل ال-کارنیتین از سیستم عصبی حفاظت می‌کند و نیز فعالیت آنتی اکسیدانی آن در حفظ سلولهای عصبی در برابر صدمات رادیکال سوپر اکسید تأثیر دارد (۲۳). در مطالعه توماسونی و همکاران در سال ۲۰۱۸ از اثر درمان مزمن با استیل‌ال‌کارنیتین روی حافظه فضایی یادگیری موش‌های صحرایی استفاده شد و اطلاعات به دست آمده اثرات نوروپروتکتیو استیل‌ال-کارنیتین را تأیید کرد (۲۴). این یافته با مطالعات گو و همکاران در سال ۲۰۱۲ هم همخوانی دارد که استیل ال-کارنیتین بر کاهش معنی‌دار تغییرات نورودژنراتیو در مدل‌های ایسکمی مزمن مغزی و اختلال یادگیری و



شکل ۵ - عکس میکروسکوپ الکترونی از یک ناحیه سیناپسی در گروه "د" بابتی نظم‌های غشای سیناپسی و میتوکندری متورم با شدت متوسط تا زیاد طی هفته‌ها و افزایش دانسیته ماتریکس میتوکندری با شکاف سیناپسی روی هم خوابیده. میتوکندری وزیکوله است و برخی ساختارهای گرد هم‌اندازه بصورت میتوکندری دست نخورده همراه با کریستاهای با حاشیه نامشخص دیده می‌شود (۲۰۰۰×).

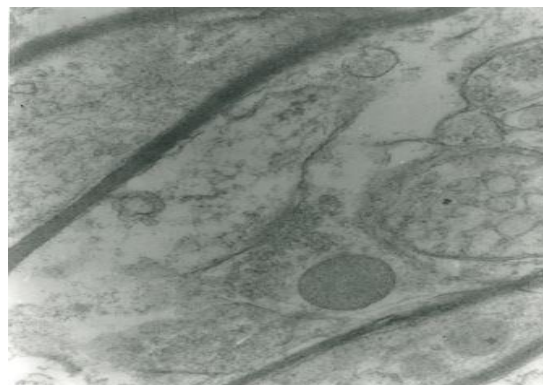
پیشنهادهات

نتیجه نهایی بیانگر اثر چشم‌گیر استیل‌ال‌کارنیتین بر حفظ و افزودن سلول‌های عصبی، کاهش مرگ سلول‌های عصبی حرکتی و حفظ فراساختار سلول‌های عصبی حرکتی در محل سیناپس‌ها بویژه نقش بارز آن بر میتوکندری‌ها است. گرچه مطالعات تکمیلی برای اثبات عملکرد سلول‌های عصبی در محل سیناپس و مکانیسم فعالیت میتوکندری‌ها پیشنهاد می‌گردد.

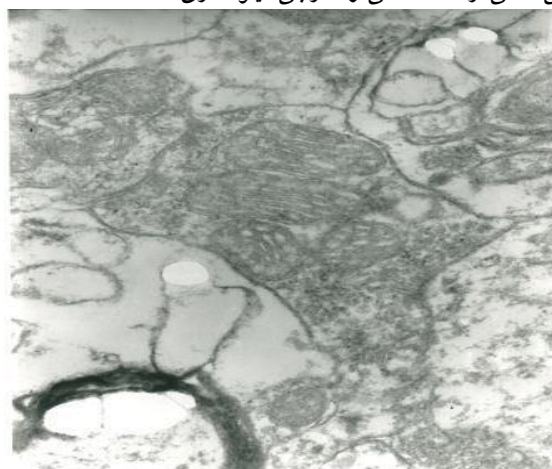
سپاسگزاری

مصوبه کد اخلاق IR.SHAHED.REC.1394.138 می‌باشد. بودجه طرح از معاونت پژوهشی دانشگاه شاهد تامین شده است. بدین وسیله گروه محققین تشکر خود را از معاونت محترم پژوهشی ابراز می‌نمایند.

حافظه در موشهای صحرایی مبتلا به انسداد دو طرفه شریان کاروتید تأثیر حفاظتی دارد (۲۵). همین مکانیسم احتمالاً می‌تواند در مورد مطالعه حاضر نیز مطرح باشد. برای تایید این مهم نیاز به مطالعات تجربی تکمیلی است.



شکل ۳. عکس میکروسکوپ الکترونی از یک ناحیه سیناپسی مربوط به نخاع پس از آسیب در گروه "ج". بی‌نظمی‌های مربوط به غشاهای سیناپسی در یک ناحیه با شکاف سیناپسی روی هم خوابیده. دانسیته پایین الکترونی در ناحیه فعال سیناپسی. میتوکندری وزیکوله همراه با افزایش دانسیته ماتریکس میتوکندری. بی‌نظمی در غشا داخلی و خارجی میتوکندری. (۵۰۰۰×)



شکل ۴. عکس میکروسکوپ الکترونی از یک ناحیه سیناپسی سالم از گروه "الف". میتوکندری و کریستاهای آن بصورت طبیعی دیده می‌شوند. غشای پره سیناپسی دست نخورده است. همچنین و زیکولهای پیش سیناپسی قابل مشاهده هستند (۳۰۰۰×).

منابع

1. Hassanzadeh S, Jameie SB, Mehdizadeh M, Soleimani M, Namjoo Z, Soleimani M. FNDC5 expression in Purkinje neurons of adult male rats with acute spinal cord injury following treatment with methylprednisolone. *Neuropeptides* 2018; 70:16-25.
2. Song W, Amer A, Ryan D, Martin JH. Combined motor cortex and spinal cord neuromodulation promotes corticospinal system functional and structural plasticity and motor function after injury. Their potential use for repairing the injured spinal cord. *Spine* 2015; 17:887-892.
3. Pourheydar B, Joghataei MT, Bakhtiari M, Mehdizadeh M, Yekta Z, Najafzadeh N. Co-transplantation of Bone Marrow Stromal Cells with Schwann Cells Evokes Mechanical Allodynia in the Contusion Model of Spinal Cord Injury in Rats. *Cell Journal* 2012; 13:213-22.
4. 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.
5. Ewan EE, Hagg T. Intrathecal Acetyl-L-Carnitine Protects Tissue and Improves Function after a Mild Contusive Spinal Cord Injury in Rats. *Journal Neurotrauma* 2016; 33:269-77.
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 of Neurocytology* 2003; 17:351-360.
7. Xu X, Li N, Zhu L, Zhou Y, Cheng H. Beneficial effects of local profound hypothermia and the possible mechanism after experimental spinal cord injury in rats. *Journal of Spinal Cord Medicine* 2016; 39:220-8.
8. Poon PC, Gupta D, Shoichet MS, Tator CH. Clip compression model is useful for thoracic spinal cord injuries: histologic and functional correlates. *Spine (Phila Pa 1976)* 2007; 32:2853-9.
9. Rebouche CJ, Engel AG. Tissue distribution of carnitine biosynthetic enzymes in man. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002; 630: 22-29.
10. Jamshidi S, Heshmati M, Jalali Nadoushan M. The effect of acetyl L-carnitine on gliosis reaction after spinal cord injury using a compression model in adult rats. *Daneshvar Medicine* 2018; 25:15-24.
11. Savage JC, Picard K, González-Ibáñez F, Tremblay ME. A Brief History of Microglial Ultrastructure: Distinctive Features, Phenotypes, and Functions Discovered Over the Past 60 Years by Electron Microscopy. *Frontiers in Immunology* 2018; 25:803-809.
12. Coggeshall RE, Lekan HA. Methods for determining numbers of cells and synapses: a case for more uniform standards of review. *Journal of Comparative Neurology* 1996;364:6-15.
13. Patel SP, Sullivan PG, Lyttle TS, Rabchevsky AG. Acetyl-L-carnitine ameliorates mitochondrial dysfunction following contusion spinal cord injury. *Epub* 2010;114:291-301.
14. 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.
15. Sastry P.S, Kalluri S.R. Short review apoptosis and the nervous system. *Journal of Neurochemistry* 2000;74:1-20.
16. Vivoli E, Di Cesare Mannelli L, Salvicchi A, Bartolini A, Koverech A, Nicolai R, et al. Acetyl-L-carnitine increases artemin level and prevents neurotrophic factor alterations during neuropathy. *Neuroscience* 2010; 167:1168-1174.
17. Barhwal K, Hota SK, Jain V, Prasad D, Singh SB, Ilavazhagan G. Acetyl-L-carnitine (ALCAR) prevents hypobaric hypoxia-induced spatial memory impairment through extracellular related kinase-mediated nuclear factor erythroid 2-related factor 2 phosphorylation. *Neuroscience* 2009; 161:501-514.
18. Kobayashi S, Iwamoto M, Kon K, Waki H, Ando S, Tanaka Y. Acetyl-L-carnitine improves aged brain function. *Geriatrics and Gerontology International* 2010;10: 99-106.
19. Baluchnejadmojarad T, Roghani M. Coenzyme q10 ameliorates neurodegeneration, mossy fiber sprouting, and oxidative stress in intrahippocampal kainate model of temporal lobe epilepsy in rat. *Journal of Molecular Neuroscience* 2013; 49:194-201.
20. Bhattacharya R, Singh P, John JJ, Gujar NL. Oxidative damage mediated iNOS and UCP-2 upregulation in rat brain after sub-acute cyanide exposure: dose and time-dependent effects. *Drug and Chemical Toxicology* 2018; 3:1-8.
21. 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; 22:723-736.
22. Navarro A, Bandez MJ, Lopez-Cepero JM, Gómez C, Boveris A. High doses of vitamin E improves mitochondrial dysfunction in rat hippocampus and frontal cortex upon aging. *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2011; 300:827-834.
23. 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.
24. Tomassoni D, Di Cesare Mannelli L, Bramanti V, Ghelardini C, Amenta F, Pacini A. Treatment with acetyl-L-carnitine exerts a neuroprotective effect in the sciatic nerve following loose ligation: a functional and microanatomical study. *Neural Regeneration Research* 2018;13:692-698.
25. 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 Pharmacological Research* 2012;35:145-54.

Daneshvar

Medicine

Scientific-Research

Received: 28/09/2019

Last revised: 11/12/2019

Accepted: 22/12/2019

The effect of acetyl l-carnitine on ultrastructure of injured motoneuron synapses in adult rat

Mehran Jamali¹, Marjan Heshmati^{2*}, Mohammadreza Jalali Nadoushan²

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

* Corresponding author e-mail: heshmatimarjan@hotmail.com

Abstract

Background and Objective: Spinal cord compression is a relatively common neurological complication in developing country. This study was designed to assess neuroprotective effect of acetyl L-carnitine.

Materials and Methods: 16 adult Sprague Dawley rats weighing 250 to 300 g were divided into 4 randomized groups, namely, A-laminectomy with daily intraperitoneal injection of acetyl L-carnitine. B- laminectomy with daily intraperitoneal injection of saline. C- group A+ mechanical compression and D- group B+ mechanical compression. After 4 weeks, they were sacrificed for morphological study by light microscope and ultrastructure of synaptic zone of motoneurons was evaluated by electron microscope. The results were analyzed by Tukey' s and ANOVA by SPSS Ver 19. Furthermore, the significance level was $P<0.05$.

Results: The morphological results indicated that compression causes reduction of spinal cord motoneurons. Acetyl L-carnitine decreased this reduction of motoneurons after spinal cord compression and preserved motoneurons ultrastructure in synaptic zone and mitochondria.

Conclusion: In this study, acetyl L-carnitine was effective on preservation of ultrastructure of motoneuron synapses after mechanical compression in spinal cord. Of course, the measure of these changes in means of decreasing the effect of mechanical compression after spinal cord compression needs further researches.

Keywords: Acetyl L-carnitine, Spinal cord injury, synapse ultrastructure, Adult rat