

بررسی اثر تجویز یک نوبت عصاره مغز جنین بر حفظ نورونهای حرکتی نخاع پس از قطع عصب سیاتیک در رت

*دکتر محمد رضا نیکروش، **دکتر مرتضی بهنام رسولی، ***دکتر ناصر مهدوی شهری، ***مریم طهرانی پور
* گروه علوم تاریخی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
* گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد
** گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی مشهد

خلاصه

در این پژوهش ابتدا عصب سیاتیک ۲۴ رت نر بالغ از نژاد wistar در ناحیه میانی ران (در بین عضلات گلوثال) قطع گردیده و به دو گروه تجربی و کنترل تقسیم شدند. سپس سعی شد تا اثر درمانی تجویز یک نوبت از عصاره مغز جنین (FBE) بر حفظ و بقای نورونهای حرکتی اعصاب نخاعی (عصب سیاتیک) قطع شده گروه تجربی مورد مطالعه و ارزیابی قرار گیرد و با گروه کنترل مقایسه گردد. این مطالعه نشان داد با گذشت ۶ هفته از قطع عصب، قریب به ۸۰٪ نورونهای حرکتی عصب قطع شده سیاتیک که در زمان قطع، مورد تجویز عصاره مغز جنین واقع شده اند، حفظ گردیده است در حالی که در گروه کنترل (قطع عصب بدون دریافت عصاره) فقط حدود ۴۰٪ از نورونها حفظ گردیده است. این مشاهدات می تواند دلالت بر این موضوع باشد که تجویز یک نوبت عصاره مغز جنین به محل ضایعه در هنگام قطع عصب توانسته است نورونهای حرکتی شاخ قدامی نخاع را در گروه تجربی تا حدود زیادی نسبت به کنترل محافظت نماید.

کلمات کلیدی: عصاره مغز جنین، نورونهای حرکتی، عصب سیاتیک، رت

مقدمه

دیگر حفظ و بقای نورونهای بالغ در شرایط معمولی متکی به اینگونه فاکتورها است (که از اندام هدف با استفاده از جمل اکسونی رو به عقب باید به جسم سلولی نورونها برسد)، در شرایط قطع عصب چنانچه بتوان از فاکتورهای تروفیک به صورت اگزوژن استفاده نمود، می توان انتظار داشت که نورونهای ضایعه دیده با برخورداری از این حمایت تروفیکی زنده بمانند و به پدیده ترمیم اکسونی خود ادامه دهند.

لذا در این پژوهش سعی گردیده است تا اثر یک نوبت تجویز عصاره مغز جنین که بعد از قطع عصب سیاتیک به محدوده قطع عصب وارد گردیده است، مورد بررسی قرار گرفته و اثرات محافظتی آن بر روی نورونهای حرکتی ضایعه دیده در شاخ قدامی سگمنت‌های نخاعی مربوط به این عصب ارزیابی شود.

فاکتورهای تروفیک عصبی، گروه متنوعی از نوروتروفینها محسوب می شوند که حفظ و بقای نورونها و از جمله نورونهای حرکتی بوجود آنها وابسته است (۴، ۵، ۱۳، ۱۵). در این رابطه سایر تحقیقات نشان داده است که فاکتورهای مشتق از مغز نابالغ و از جمله Brain Drive Neurotrophic Factor (BDNF) یکی از عوامل حیاتی است که برای بافت عصبی در حال تکامل (۱۱، ۱۲، ۷) و همچنین برای حفظ و بقا و ترمیم بافت عصبی بالغ ضروری به نظر می رسد (۹، ۱۶، ۲۰). تحقیقات نشان می دهد که اینگونه فاکتورها می توانند از طریق حمایت و تحریک سلولهای آسیب دیده منجر به رشد اکسونی در الیاف ضایعه یافته مربوط به آنان شوند (۱۱، ۱۹). از آنجاییکه چنین فرایندی ممکن است وابسته به عوامل تروفیک متعدد باشد که در بافت عصبی نابالغ نیز وجود دارد و از سوی

تئوژن و روش کار

بهره گیری از عصاره مغز اخبارم گرفت و اسفنج مورد نظر صرفا به سرم فیزیولوژی استریل آغاز شد. روش آماده سازی: در پایان هفته سوم از هریک از گروههای تجربی و کنترل ۶ مورد جدا گردیده و مورد استنشاق ماده بیهودی (کلروفرم) قرار گرفتند. در این حالت برای نونه برداری و فیکس اولیه با استفاده از پرفیوژن بطنی که با بهره گیری از فرمالین ۱۰٪ اخبارم گرفت بدون آنکه به خاغ آسیبی برسد با شکستن مهره های سینه و کمر و آزاد سازی خاغ، سگمنت‌های خاغی متعلق به عصب سیاتیک از بقیه قسمتها جدا شده و مجددا در فیکساتور (فرمالین ۱۰٪) قرار داده شد. مشابه این عمل در پایان هفته ششم نیز در نونه های باقیمانده از گروههای تجربی و کنترل صورت گرفت.

مطالعه میکروسکوپی: پس از فیکس و آماده سازی بافتی، از سگمنت‌های خاغی نونه های مورد نظر در هر یک از گروهها با استفاده از میکروتوم روتاری برشهایی به ضخامت ۱۰ میکرون تهیه گردید. آنگاه از برشهای سریال به دست آمده به فاصله هر ۵ برش بک برش انتخاب و با استفاده از هماتوکسیلین - اتوزین مورد رنگ آمیزی قرار گرفت. در مرحله بعد نورونهای موجود در شاخ قدامی هر برش با استفاده از تکنیک دایسکتور (۳) در سمت ضایعه شمارش شده و با سمت دست نخورده مقایسه گردید و ارقام به دست آمده با استفاده از t-test مورد تجزیه و تحلیل و آنالیز آماری قرار گرفت.

نتایج

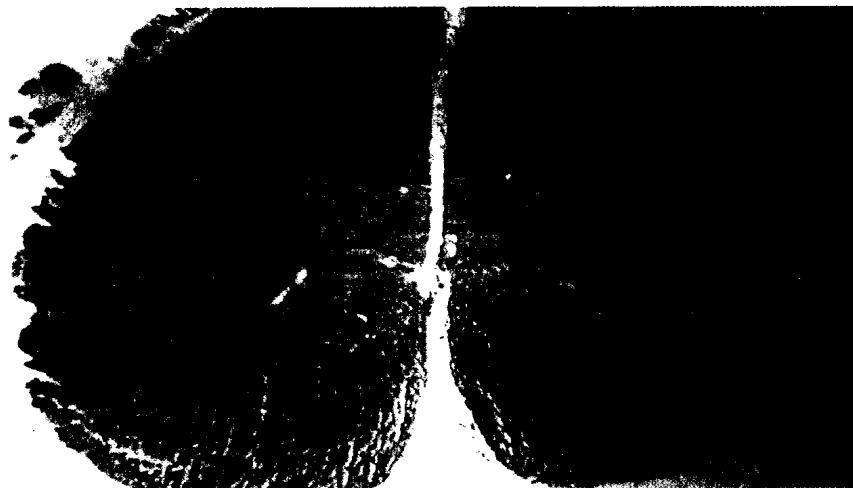
نتایج حاصل از این شمارش نشان داد که در نونه های تجربی مرحله اول (بعد از گذشت ۳ هفته از قطع عصب) حدود ۸۴٪ نورونهای حفظ گردیده اند و این رقم در نونه های تجربی مرحله دوم (بعد از ۶ هفته) به ۷۹٪ تغییر کرده است (نمودار ۱).

شمارش نوروئی مربوط به گروه کنترل نیز مشخص کرد که تعداد نورونهای باقیمانده در شاخ قدامی سمت ضایعه بعد از گذشت ۳ هفته به ۶۲٪ و پس از ۶ هفته به ۴۱٪ کاهش یافته است (نمودار ۱).

بسته عصره معرف جنین: برای تهیه عصاره از رتهای نژاد رسته های که به همین منظور آمیزش داده شده و به سرتاسر حسکی رسیده بودند. در این مرحله با بهره گیری سرتاسر سرت و قطع خاغ، عمل سزارین در هریک از روح خود آغاز شد و پس از خارج نودن جنینها از شاخه های روح سرت قطع گردیده و مغز هریک با سرعت از جسمه خارج شد و بد میلی لیتر سرم فیزیولوژی با استفاده از صورت آزمایش آزمایش استریل سوسپانسیون شد. در سرمه معرفه های آزمایش مورد نظر با سرعت ۵۰۰۰ دور نسبت به سرت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید و پس از آن بافت مغزی له شده جنین به لوله های سرمه ستر و در زمان مصرف در فریزر مورد نگهداری قرار گرفت.

روش فحص عصب: برای این مطالعه ۲۴ رت نر ویستار به سن تقریبی ۰-۲ ماه و وزن ۲۰۰-۲۵۰ گرم با استفاده از تزریق داخل صفتی (zylazine ۱۰۰ mg/kg) و صفتی (ketamine ۱۰۰ mg/kg) خارج چیز حیوانات و استریل نودن موضع، برش پوستی کوتاهی به سوزت بخش زیرین سرفور به طول تقریبی ۱۵ میلی متر بین گردید و پس از شکافتن عضلات گلوთال در این زایع عصب سیاتیک در معرض دید قرار گرفت و با استفاده از تبعیج جر حسی به عنوان یکه دچار کشیدگی شود، قطع گردید.

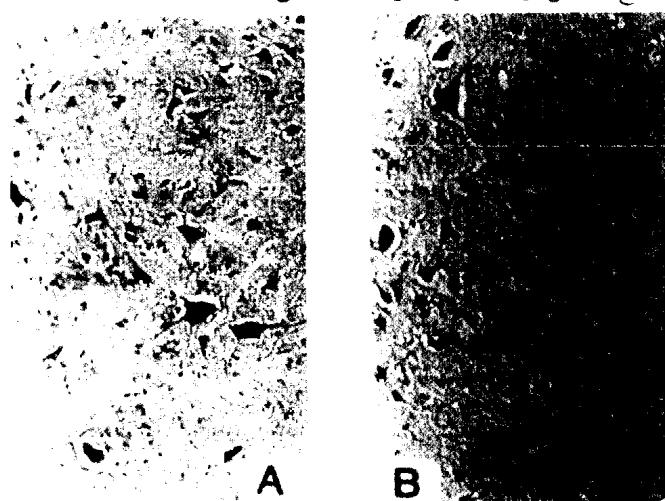
روشن تحویز عصاره: برای این هدف در ۱۲ مورد از ۲۴ رت تخریب به عنوان گروه تجربی، قطعه ای از اسفنج نرم به ابعاد تقریبی ۳ میلی متر که از قبل آماده و استریل گردیده بود به عصره مغز جنین آغاز شد و به گونه ای در بستر بریده شد؛ عصب قرقر گرفت که عصب قطع شده در تماس با آن بسته سپس عضلات برش خورده به حالت طبیعی خود باز گردیده شد و با استفاده از کلیپس های مخصوص، پوست بخیمه گزیده و عوضی زخم مجددا مورد ضد عفونی قرار گرفت. در ۱۲ مورد بقیه عذر (به عنوان گروه کنترل) این تکنیک بدون



شکل ۱: مقطع عرضی یکی از سگمنت‌های نخاعی مربوط به عصب سیاتیک متعلق به گروه تجربی در پایان هفته ششم (رنگ آمیزی همانوکسیلین - انوزین و درشتمنای = 10×2). در این تصویر کادر سمت چپ، به عنوان جمعیت نورونی ضایعه دیده شاخ قدامی نخاع و سمت راست جمعیت نورونهای دست نخورده است.



شکل ۲: مقایسه نورونهای شاخ قدامی نخاع در بک مقطع ضایعه دیده تجربی (A) و ضایعه دیده کترل (B) در پایان هفته ششم. در این مقایسه به جمعیت نورونی موجود در دو مقطع و شکل نورونها توجه شود (درشتمنای ۴۰۰).

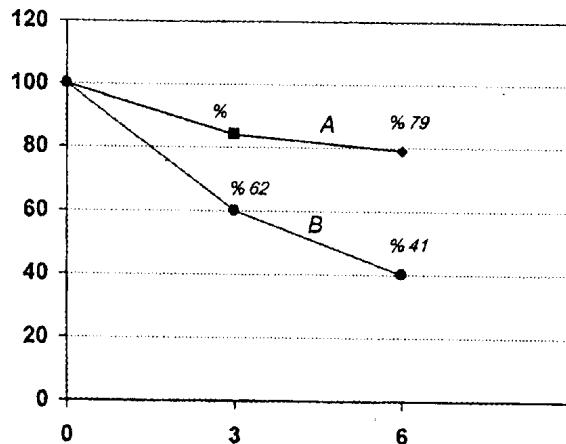


شکل ۳: مقایسه نورونهای شاخ قدامی نخاع در نیمه چپ ضایعه دیده تجربی (A) و نیمه راست همان مقطع (B) در پایان هفته ششم. در این مقایسه نیز به شکل و تعداد نورونها توجه شود (درشتمنای ۴۰۰).

تا حد زیادی می تواند از این بحران بکاهد و جایگزین فاکتورهای تروفیک اندام هدف گردد. علاوه بر این ما در این مطالعه دریافتیم که تجویز یک دوز عصاره می تواند اثرات دراز مدت بر حفظ نورونهای حرکتی ضایعه دیده از خود باقی بگذارد. بنا بر این با توجه به اینکه فاکتورهای تروفیک مفز در شرایط مطلوب نگهداری (۳۷ درجه سانتیگراد) نیمه عمری در حدود یک ماه از خود نشان می دهد (۲۱)، به نظر می رسد که در طی دوران بحرانی بازگشت عصب به فعالیت طبیعی و ارتباط اکسونی آن با اندام هدف، تجویز یک دوز عصاره مفز جنین کفايت نموده باشد زیرا مطالعات گذشته ما در این زمینه مشخص نموده که ضایعه عصب سیاتیک رت در ناحیه میانی ران می تواند به کمک مکانیسمهای جمایتی پس از گذشت پنج هفته به عصب دار شدن مجدد اندام هدف (عضلات ساق و کف پا) منجر شود (۲). بنابراین با توجه به اینکه سرعت رشد اعصاب محیطی یک تا سه میلی متر در شباهه روز گزارش شده است (۱۸)، انتهای پروگزیمال عصب ضایعه دیده خواهد توانست روند بازسازی را کامل نموده و با رشد رو به جلو خود را به اندام هدف برساند. در این وضعیت بازیابی فاکتورهای تروفیک اندام هدف از سوی اینگونه اعصاب مجدد خواهد توانست زمینه بقا و فعالیتهای بعدی نورونهای آسیب دیده را فراهم آورد. در این شرایط اگر چه مکانیسم عمل و نحوه تاثیر گذاری فاکتورهای تروفیک دقیقاً مشخص نیست اما یک مسئله را نمی توان انکار کرد و آن اینکه با توجه به گزارشات رسیده در خصوص قابلیت هریک از نوروتروفینها به خاطر اطمینان بیشتر چنانچه عصاره مفز جنین به عنوان مجموعه ای از فاکتورهای تروفیک بجای نروتروفینی خاص مورد استفاده قرار گردد نورونهای آسیب دیده برای حفظ وبقاء خود از ضربه جمایتی بالاتری برخوردار خواهند بود.

References

- AM Horton A., Burton L. E., Schmelzer C., Vandlen R., Rosenthal A., 1993, Neurotrophin-4/5 is a mammalian-specific



نمودار ۱: درصد نورونهای باقیمانده در گروه تجربی (A) و کنترل (B). در این نما محور عمودی بیانگر درصد نورونهای باقیمانده در شاخ قدامی سمت ضایعه و محور افقی بیانگر هفته های آزمایش است ($p < 0.005$).

بحث

امروزه این باور وجود دارد که نورونهای حرکتی همواره از اندام هدف، فاکتورهای تروفیک دریافت می کنند که بدون این عوامل حفظ وبقاء آنها ممکن نیست (۱۴). کم شدن اثر جمایتی اینگونه فاکتورها که به اعتبار قطع عصب انجام می گیرد احتمالاً به محرومیت اینگونه نوروها از عوامل تروفیک منجر می شود (۸, ۱۶, ۲۱). علاوه بر این مرگ سلولی در آنان متنه می گردد (۱۷, ۲۱). در اکثر موارد به مرگ سلولی اینگونه نوروها می تواند با فاصله محل قطع عصب از جسم سلولی مرتبط باشد چنانکه محل قطع عصب هرچه به جسم سلولی نزدیک تر باشد احتمال دژنراسیون سلولی سریعتر و بیشتر است (۱۰).

یکی از مهم ترین یافته های این مطالعه این است که بر اساس نتایج موجود، تجویز یک واحد از عصاره مفز جنین به محل ضایعه عصب می تواند به میزان قابل ملاحظه ای در حفظ وبقاء نورونهای حرکتی ضایعه دیده مؤثر واقع شود و از پدیده دژنراسیون سلولی در آنها جلوگیری نماید. نتایج حاضر مشخص کننده این واقعیت است که درمان با عصاره مفز جنین با جذب احتمالی آن از طریق انتهای پروگزیمال عصب

- neurotrophic factor on denervated skeletal muscle, *Cell*, 76: 493-504.
12. Jones K. R., Farinas I., Backus C., Reichardt L. F., 1994, Targeted disruption of the BDNF gene perturbs brain and sensory neuron development but not motor neuron development, *Cell*, 78: 989-999.
 13. Kucera J., Ernfors P., Walro J., Jaenisch R., 1995, Reduction in the number of spinal motor neurons in neurotrophin-3-deficient mice, *Neuroscience*, 69: 321-330.
 14. Lewin G. R., Barde Y. A., 1996, The physiology of neurotrophins, *Annu. Rev. Neurosci.*, 19: 269-317.
 15. Lohof A. M., Ip N. Y., Poo M. M., 1993, Potentiation of developing neuromuscular synapses by the neurotrophins NT-3 and BDNF, *Nature*, 363: 350-353.
 16. Memberg S. P., Hall A. K., 1996, Proliferation, differentiation, and survival of rat sensory neuron precursors in vitro require specific trophic factors, *Mol Cell Neurosci*, 8: 323-335.
 17. Pinon L. G. P., Minichiello L., Klein R., Davies A. M., 1996, Timing of neuronal death in t & A, tdrT3 and t&C mutant embryos reveals developmental changes in sensory neuron dependence on Trk signaling, *Development*, 122: 3255-3261.
 18. Snell R. S., Clinical neuroanatomy for medical students, 3rd Ed., Little, Brown and Company, Boston, America, 1987, pp: 103-113.
 19. Vogel K. S., Davies A. M., 1991, The duration of neurotrophic factor independence in early sensory neurons is matched to the time course of target field innervation, *Neuron*, 7: 819-830.
 20. Wilkinson G. A., FariAas I., Backus C., Yoshida C. K., Reichardt L. F., 1996, Neurotrophin-3 is a survival factor in vivo for early mouse trigeminal neurons, *J. Neurosci.*, 18: 7681-7669.
 21. Yan Q., Elliot J., Snider W. D., 1996, Brain-driven neurotrophic factor rescues spinal motor neurons from axotomy-induced cell death, *Nature*, 360: 753-755.
 - survival factor for distinct populations of sensory neurons. *J. Neurosci.*, 13: 4961-4967.
 2. Behnam-Rasouli M., Nikravesh M. R., Mahdavi-Shahri N., Fazel A., 2001, The effects of local fetal brain extract administration on the electromyogram of crushed sciatic nerve in rat, *Iranian Biomed. J.*, 5: 73-77.
 3. Behnam-Rasouli M., Nikravesh M. R., Mahdavi-Shahri N., Tehranipour M., 2000, Post operative time effects after sciatic nerve crush on the number of alpha motoneurons, using a stereological counting method (Disector), *Iranian Biomed. J.*, 4: 41-49.
 4. Buchman V. L., Davies A. M., 1993, Different neurotrophins are expressed and act in a developmental sequence to promote the survival of embryonic sensory neurons, *Development*, 118: 989-1001.
 5. Buj-Belle A., Pinon L. G., Davies A. M., 1994, The survival of NGF-dependent but not BDNF-dependent cranial sensory neurons is promoted by several different neurotrophins early in their development, *Development*, 120: 1573-1580.
 6. Close R., 1969, Dynamic properties of fast and slow skeletal muscles of the rat after nerve cross-union, *J. Physiol.*, 204: 331-346.
 7. Ernfors P., Lee K. F., Jaenisch R., 1994, Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits, *Nature*, 388: 147-150.
 8. Finkelstein D. I., Dooley P. C., Luff A. R., 1993, Recovery of muscle after different periods of denervation and treatments, *Muscle-Nerve*, 16: 769-777.
 9. Fu S. Y., Gordon T., 1995, Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: prolonged axotomy, *J. Neurosci.*, 15: 3876-3885.
 10. Gu Y. M., Spasic Z., Wu W., 1997, The effects of remaining axons on motoneuron survival and NOS expression following axotomy in the adult rat, *Dev. Neurosci.*, 19: 255-259.
 11. Helgren M. E., Squinto S. P., Davis H. L., Parry D. F., Boulton T. G., Heck C. S., Zhu Y., Yancopoulos G. D., Lindsay R. M., Distefano P. S., 1994, Trophic effect of ciliary