

بررسی تاثیر ترمیم عصب سیاتیک بر روی فراساختمان نورونهای عقده ریشه خلفی نخاع در موش صحرایی بالغ

دکتر محمد علی اطلسی^۱، دکتر مهدی مهدی زاده^۲، دکتر محمد هادی بهادری^۳، دکتر محمد تقی جغتایی^۲

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به ضرورت یافتن راههای مطلوب جهت حفظ و بقاء جسم نورونها به دنبال آسیب سیستم عصبی، و از طرفی کمبود مطالعات در زمینه تاثیر ترمیم عصب محیطی بر روی فراساختار نورونهای حسی، این تحقیق در سال ۱۳۸۳ در دانشگاه علوم پزشکی ایران به انجام رسید.

مواد و روشها: در این مطالعه تجربی، ۲۴ سر رت بالغ نر نژاد ویستار (*Wistar*) به وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم بطور تصادفی انتخاب و در سه گروه مساوی شامل آکسوتومی، ترمیم و شش تقسیم شدند. در گروه آکسوتومی عصب سیاتیک چپ در وسط ران قطع، ولی ترمیم نگردید. در گروه ترمیم، عصب سیاتیک در وسط ران قطع و به روش سوچور اپی نورال ترمیم گردید. بعد از هشت هفته پنجمین عقده ریشه خلفی چپ و راست (سالم) خارج شد. برای انجام شمارش نورونی، بعد از تهیه برشهای انجمادی و رنگ آمیزی کریزل و یوله، با استفاده از عدسی مدرج چشمی، نورونها مورد شمارش قرار گرفتند. برای مطالعه فراساختمانی، عقده ها پس از فیکس اولیه و ثانویه، آگیری، با رزین آرالدیت قالب گیری شدند و بعد از تهیه برشهای نیمه نازک و نازک و رنگ آمیزی، توسط میکروسکوپ نوری و الکترونی TEM مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها: میزان نورونهای سالم در گروه قطع عصب (آکسوتومی) بعد از دو ماه $27/4 \pm 7/7$ و در گروه ترمیم عصب $33/4 \pm 11/4$ بود ($P < 0.03$). برشهای نیمه نازک در گروههای سالم و شش نمایی طبیعی داشتند، در گروه آکسوتومی جابجایی هسته و هستک، چروکیدگی، و پیکنوزیس را نشان دادند. در گروه ترمیم این تغییرات کاهش یافته بود. برشهای نازک در گروه سالم و شش کاملاً طبیعی، در گروه آکسوتومی تراکم کروماتین، مارژیناسیون و پیکنوزیس هسته، شکلهای غیر طبیعی و تخریب میتوکندری و گشاد شدن شبکه آندوپلاسمی دیده شد. در گروه ترمیم نیز در بعضی از نورونها تراکم کروماتین، مارژیناسیون و پیکنوزیس و گشاد شدن میتوکندری و شبکه آندوپلاسمی مشاهده گردید.

نتیجه گیری و توصیه ها: ترمیم عصب به روش ترمیم اپی نورال می تواند باعث کاهش تغییرات منجر به مرگ سلولی در نورونهای حسی عقده ریشه خلفی نخاع شود، اما نمی تواند کاملاً آنها را از بین ببرد. بررسی تاثیر روشهای دیگر ترمیم عصب بر روی وضعیت نورونها و ارزیابی دقیق تر با استفاده از تکنیکهای هیستوشیمی و ایمونوهیستوشیمی توصیه می شود.

واژگان کلیدی: آکسوتومی، ترمیم جراحی، عقده ریشه خلفی، فراساختمان، رت

تاریخ دریافت مقاله: ۸۴/۱/۷

تاریخ تایید: مقاله ۸۴/۳/۲۰

۱- مربی، عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی کاشان، گروه آناتومی

۲- عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی ایران، گروه آناتومی

۳- عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی گیلان، گروه آناتومی

• پاسخگو: دکتر محمدعلی اطلسی

کاشان، کیلومتر ۵ جاده راوند، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی

مقدمه

آسیب های اعصاب محیطی از جمله شایع ترین بیماریها در جوامع مختلف است و باعث تحمیل هزینه های بالا، از دست رفتن کارایی فرد و اختلال در فعالیت جامعه می شوند (۱). بنابراین مطالعه بر روی مکانیسم ایجاد این آسیبها و عواملی که باعث کاهش عوارض آنها و در نتیجه منجر به حفظ و بقای نورونها می شوند، ضروری به نظر می رسد. آکسوتومی یا قطع کامل عصب نخاعی یکی از معمول ترین مدلها برای بررسی مرگ نورونی القا شده توسط آسیب است (۲). با استفاده از این مدل در مطالعات مختلف بعضی از مکانیسم هایی که به دنبال آن باعث تخریب (دژنراسیون) و مرگ نورونهای حرکتی و حسی می شوند گزارش شده اند (۳، ۴، ۵). مطالعات نشان می دهد که در حین تکامل جنین و ابتدای تولد قطع آکسونها و جدا کردن آنها از بافت هدفشان منجر به مرگ گسترده نورونها و کاهش تعداد آنها می شود (۳). در موش یا رت بالغ هم مرگ نورونی به دنبال قطع عصب با شدت کمتری گزارش گردیده است (۶، ۷) بین ۵۰ تا ۷۰ درصد اولین نورونهای راه حسی بعد از آسیب عصب محیطی می میرند (۲). خصوصیات مورفولوژیکی نورونها نشان می دهد که مرگ سلولها از نوع مرگ سلولی آپوپتوزیس است. تغییرات ایجاد شده در نورونها به دنبال آکسوتومی عصب سیاتیک شامل هسته های متراکم شده بازوفیل، تشکیل کلاهی هسته ای، چروک خوردن سلول و تشکیل اجسام آپوپتوتیک می باشد (۳). همچنین تغییرات مورفولوژیکی و متابولیکی تحت عنوان کروماتولیزیس در جسم سلولی نورونها به دنبال آکسوتومی محیطی بوجود می آید که شامل پاره شدن اجسام نسل و تبدیل آنها به ذرات ریز و ناپدید شدن آنها، حجیم و مدور شدن پریکاریون، قطعه قطعه شدن نوروفیبریلها، تغییر مکان دستگاه گلژی و جابجایی هسته از مرکز به محیط می باشد (۷). در بالغین نورونهای حسی نسبت به آکسوتومی حساس تر از نورونهای حرکتی هستند (۸). مرگ گسترده نورونهای حسی (۹) و رشد آکسونها در جهتی غیر از بافت هدف (۱۰) از فاکتورهای اصلی در بازگشت ضعیف بالینی عصب پس از قطع عصب نخاعی است. معهذاً تاکنون با وجود ترمیم مطلوب جراحی، بهبود اعصاب آسیب دیده محیطی ناکامل و غیر مطلوب بوده و بازگشت کامل حس عصب مربوطه ضعیف است (۹). متد های جراحی مختلفی جهت ترمیم عصب و بهبود رژنراسیون اعصاب محیطی انجام می شوند. متد کلاسیک شامل اتصال انتها به انتهای قطعات ابتدایی (پروگزیمال) و انتهایی (دیستال) عصب قطع شده یا اتصال مستقیم اپی نوروم دو قطعه

عصب (سوچور اپی نوریل) است. این در شرایطی است که فاصله ایجاد شده بین دو بخش عصب زیاد نباشد و کششی بین دو قطعه عصب بوجود نیاید (۱۱).

مطالعات مختلفی وجود دارد که میزان مرگ نورونها را به دنبال ترمیم عصب محیطی با استفاده از شمارش نورونی گزارش کرده اند (۱۳، ۱۲، ۴). اما گزارشهای زیادی در دست نیست که وضعیت جسم نورونها را به دنبال ترمیم جراحی عصب از طریق مطالعه فراساختمان آنها نشان داده باشند. عقیده بر این است که مطالعه فراساختمانی با میکروسکوپ الکترونی، روش استاندارد طلایی برای تشخیص مرگ سلولی است (۱۴). آیا با ترمیم جراحی عصب محیطی، مرگ نورونها از بین خواهد رفت؟ ما در این مطالعه از مدل آکسوتومی و روش ترمیم مستقیم اپی نوریل عصب سیاتیک در موش صحرایی بالغ استفاده کرده ایم و با استفاده از میکروسکوپ نوری و الکترونی، ساختمان و فراساختمان نورونهای عقده ریشه خلفی نخاع را در گروههای قطع عصب (آکسوتومی)، ترمیم عصب و شتم مورد بررسی قرار داده ایم تا وضعیت بقا و مرگ این نورونها را به دنبال ترمیم عصب نشان دهیم.

مواد و روشها

این مطالعه به روش تجربی بر روی بیست چهار سر موش صحرایی بالغ نر از نژاد ویستار (*wistar*) با حدود وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم در سال ۱۳۸۳ در دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام گرفت. موشها از انستیتو پاستور ایران خریداری شده و اجازه داده شد که به مدت دوهفته با شرایط حیوان خانه دانشگاه علوم پزشکی ایران انطباق حاصل کنند. آب، غذا، دما و رطوبت برای همه یکسان بود. همچنین حیوانات، در سیکل ۱۲ ساعت روشنایی و تاریکی قرار گرفتند. آنها به صورت تصادفی به سه گروه هشت تایی تقسیم شدند:

گروه اول: گروه آزمایشی یا گروه ترمیم بود.

گروه دوم: گروه شتم بود. در این گروه به عصب سیاتیک چپ دسترسی پیدا کرده ولی هیچگونه قطع و ترمیمی روی آن صورت نگرفت.

گروه سوم: گروه کنترل یک یا گروه آکسوتومی بود. در این گروه، عصب سیاتیک چپ در وسط ران قطع شده و دو انتهای عصب قطع شده، توسط نخ نایلون ۴-۰ بسته شد تا از عدم رژنراسیون اطمینان حاصل گردد.

آب گیری شده و در رزین آرالدیت (TAAB Araldite 502/812) قالب گیری شدند. در ادامه با اولترامیکروتوم (Leica, ultracut) برشهای نیمه نازک با ضخامت ۵۰۰ نانومتر و نازک به ضخامت ۷۰ نانومتر تهیه گردید. برشهای نیمه نازک با استفاده از رنگ تولیدین بلو رنگ آمیزی و برشهای نازک توسط رنگ اورانیل استات و سیترات سرب رنگ آمیزی شدند. در نهایت برشهای نیمه نازک با میکروسکوپ نوری (Olympus, provis AX70) و برشهای نازک با میکروسکوپی الکترونی ترانس‌میشن (TEM, Leo 906) مورد مطالعه فراساختمانی قرار گرفتند.

در مطالعه برشهای فرا نازک، برای هر گروه سه گرید از چند ناحیه عقده ریشه خلفی تهیه گردید، و بطور متوسط ۴۵ نورون از نظر مورفولوژی هسته، میتوکندری، شبکه آندوپلاسمی و غشا سلولی مورد مطالعه قرار گرفتند. در صورت مشاهده تغییرات مورفولوژیکی در ساختمانهای فوق تا ۲۵ درصد «+»، بین ۲۵ تا ۵۰ درصد «+++» و بالاخره بیش از ۵۰ درصد «++++» ثبت گردید.

یافته ها

• شمارش نورونی: میزان نورونهای سالم شمارش شده در عقده ریشه خلفی سالم $13/7 \pm 4/4$ ، و در عقده آکسوتومی شده $7/7 \pm 2/7$ بود که نشان می دهد بعد از گذشت دو ماه از قطع عصب، حدود $3/8 \pm 1/8$ کاهش نورونی وجود دارد (جدول ۱). به دنبال ترمیم عصب بعد از دو ماه میزان نورونها $11/4 \pm 3/3$ بود که کاهشی برابر $2/5 \pm 1/4$ را نشان می دهد ($P < 0.03$). این در حالی است که این میزان در گروه ترمیم نسبت به عقده سالم به صورت معنی داری کمتر است ($P < 0.003$).

در جدول شماره (۱) وضعیت نورونهای سالم و کاهش یافته بر حسب گروههای مورد مطالعه ارائه گردیده است که نشان می دهد در گروه شم ۲/۵ درصد، در گروه آکسوتومی ۳۸/۸ درصد، و در گروه ترمیم ۲۵/۴ درصد کاهش نورونی وجود دارد. آزمون نشان داد که این اختلاف به لحاظ آماری معنی دار است ($P < 0.05$).

جدول ۱- توزیع نورونهای عقده ریشه خلفی L5 بر حسب بقاء و مرگ نورونها و به تفکیک گروههای مورد مطالعه

نورنها	گروه شم	گروه آکسوتومی	ترمیم
سالم	۱۲۲۳ (۹۷/۵)	۶۳۴ (۶۱/۵)	۹۳۶ (۷۴/۶)
کاهش یافته	۳۲ (۲/۵)	۳۹۷ (۳۸/۵)	۳۱۸ (۲۵/۴)
جمع	۱۲۵۵ (۱۰۰)	۱۰۳۱ (۱۰۰)	۱۲۵۴ (۱۰۰)

• یافته های برشهای نیمه نازک (semithin). در گروههای شم و سالم نورون پیکتوزه ای مشاهده نگردید، اما در

طرف مقابل همه گروهها سمت راست به عنوان گروه کنترل دوم (گروه سالم) در نظر گرفته شد.

□ روش جراحی گروه آزمایشی یا گروه ترمیم

موش ها با تزریق کتامین (100 mg/kg) و گزبلازین (10 mg/kg) به صورت داخل صفاقی بیهوش شدند. به عصب سیاتیک چپ در فاصله بین حفره پوپلیتئال و خار ایسکیال دسترسی پیدا کرده و عصب سیاتیک چپ قطع گردید. سپس دو انتهای عصب قطع شده، با نخ نایلون ۱۰-۰ (Ethicon) بخیه زده شد. و در پایان بخشهای بریده عضله با نخ کرومیک ۵-۰ (سوپا) و پوست حیوان با نخ نایلون ۵-۰ (سوپا) بخیه زده شد.

بعد از هشت هفته موشها با تزریق مخلوطی از بافر فسفات $0/1$ مولار، گلو تار آلدوئید $1/4$ (Merck) و پارافرمالدوئید $1/4$ (Merck) با $\text{pH} = 7/4$ به روش پرفیوژن کشته شدند و پنجمین عقده ریشه خلفی نخاع چپ و راست برداشته شد، دو تا از آنها در هر گروه، برای انجام رنگ آمیزی نیسل (کریزل ویوله) و بقیه برای مطالعه میکروسکوپ الکترونی مورد استفاده قرار گرفت.

□ رنگ آمیزی کریزل ویوله

عقده های برداشته شده در همان فیکساتیو قبلی برای یک شب قرار داده شدند. سپس برای یک شب به محلول سوکروز 30% در بافر فسفات با $\text{pH} = 7/4$ منتقل گردید. در ادامه پس از انجماد، توسط دستگاه کرایواستات (Leica) از تمام عقده ها برشهای $20 \mu\text{m}$ میکرونی تهیه گردید و بر روی لامهای ژلاتینه قرار گرفت. لامهای مذکور بعد از آبگیری در غلظت های نزولی اتانول، توسط رنگ کریزل ویوله $0/1\%$ درصد رنگ آمیزی گردید، و شمارش نورونی توسط میکروسکوپ نوری با لنز $40\times$ انجام گرفت.

برای شمارش نورونی در هر برش دو یا سه منطقه مشابه مشخص و با استفاده از لنز مدرج چشمی، هسته نورونهای سالم مورد شمارش قرار گرفت.

نتایج بدست آمده در جداولی تنظیم، و با استفاده از تست آماری t student مورد آنالیز آماری قرار گرفت.

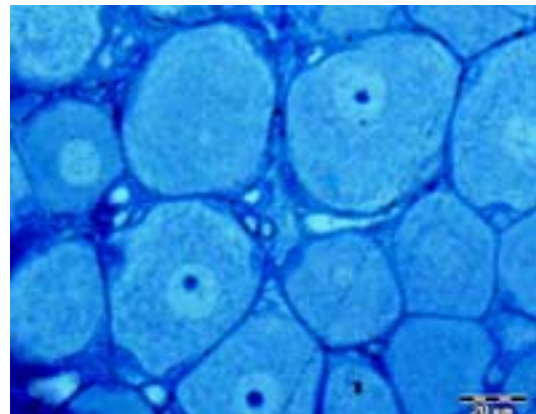
□ مطالعه میکروسکوپ الکترونی

برای بررسی فراساختمانی، عقده های برداشته شده به داخل گلو تار آلوئید $2/5$ درصد به مدت ۲ ساعت در درجه حرارت 4°C درجه سانتی گراد و $\text{pH} = 7/4$ قرار داده شدند. بعد از شستشو، نمونه ها به محلول فیکساتیو تتراکسیداسمیوم 1% (Merck) منتقل گردیدند، و به مدت ۲ ساعت در درجه حرارت اتاق و $\text{pH} = 7/4$ نگهداری شدند. پس از شستشو، توسط غلظت های تدریجی استن،

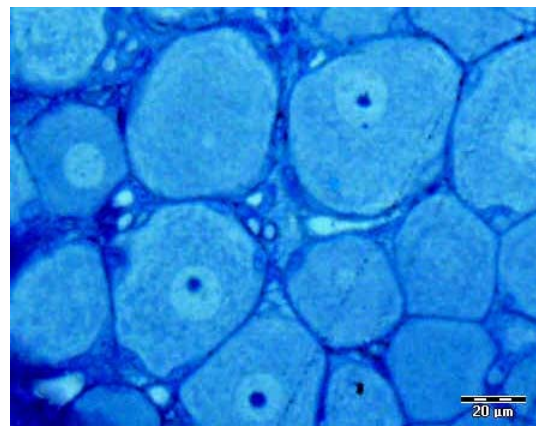
گروه آکسوتومی بعد از دوماه پیکنوزیس (شکل ۱) دیده شد. به دنبال ترمیم این روند کمتر بود به طوری که بعد از دو ماه تقریباً نمایی شبیه به گروه سالم (شکل ۲) مشاهده گردید.

بعد از دو ماه در گروه آکسوتومی نورونهای زیادی مشاهده گردید که دارای هسته های خارج از مرکز و جابجایی هستک (شکل ۱) بودند. اما دو ماه بعد از ترمیم اپی نوریا، میزان آن کاهش یافته بود.

آتروفی و چروکیدگی سلول در گروههای آکسوتومی و ترمیم اپی نوریا بعد از دوماه وجود داشت که شدت آن در گروه آکسوتومی به مراتب بیشتر دیده شد.



شکل ۱- مقطع نیمه نازک با رنگ آمیزی تولیدین بلو از عقده ریشه خلفی L5 در گروه آکسوتومی دو ماه بعد از قطع عصب. به آتروفی و چروکیدگی سلولها، هسته خارج از مرکز، جابجایی هستک و پیکنوزه شدن یک نورون (فلش) شکل توجه کنید.



شکل ۲- مقطع نیمه نازک با رنگ آمیزی تولیدین بلو از عقده ریشه خلفی L5 در گروه اپی نوریا سوچور دو ماه بعد از ترمیم. نورونها شکل منظم تری دارند.

یافته های برشهای نازک (ultrathin): نورونهای پیکنوزه در گروه آکسوتومی در ماه دوم پس از قطع عصب مشاهده

شدند. در گروه ترمیم نورونهای با هسته متراکم (الکترون دنس) نیز در ماه دوم (شکل ۳) قابل مشاهده بود، در گروههای شم و سالم هسته نورونها یوکروماتین و شفاف (الکترون لوسنس) بودند (شکل ۴).

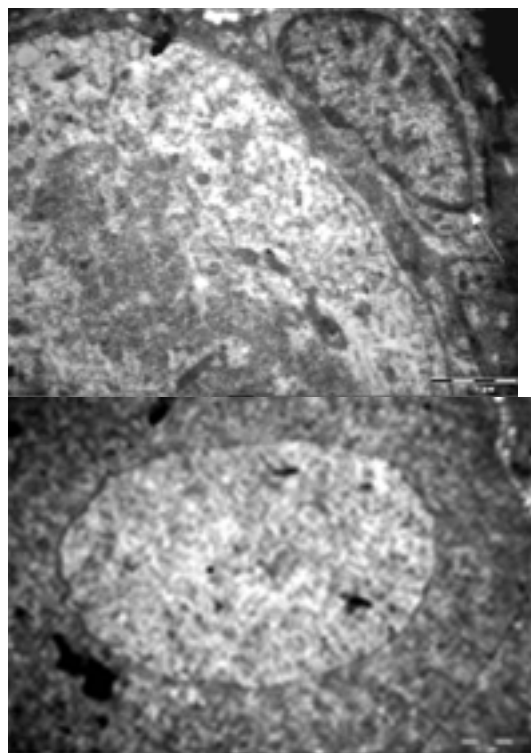
سیتوپلاسم در نورونهای گروههای سالم و شم نمایی شفاف داشت (شکل ۴). سیتوپلاسم متراکم (الکترون دنس) در بعضی از نورونهای گروه آکسوتومی و ترمیم در ماه دوم بعد از قطع عصب مشاهده شد.

بعضی از نورونها در گروه آکسوتومی دارای میتوکندریهای متسع شده و کریستاهای نامشخص بودند. در گروه ترمیم نیز میتوکندریهای متسع شده مشاهده شد. در گروه شم و سالم شبکه آندوپلاسمی سالم دیده شد. در گروه آکسوتومی بعضی از سلولها دارای شبکه آندوپلاسمی متسع شده و بعضاً واکوئله بودند. در گروه ترمیم نیز با شدت کمتری شبکه آندوپلاسمی متسع شده دیده شد.

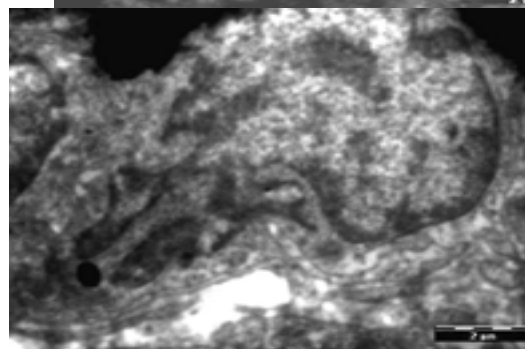
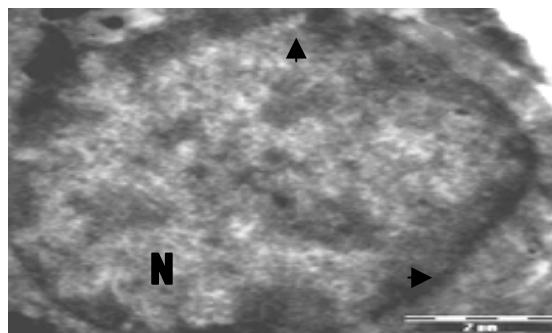
در گروه آکسوتومی چین دار شدن غشاء سلول مشاهده شد. در گروه ترمیم چنین وضعیتی مشاهده نگردید. چروکیدگی و چین دار شدن غشاء هسته و ایجاد پاهای کاذب نیز در گروه آکسوتومی وجود داشت (شکل ۳)، و در گروه اپی نوریا سوچور نیز به میزان کمتری مشاهده گردید.

متراکم شدن و مارژیناسیون کروماتین هسته و پیکنوزیس در گروههای آکسوتومی مشاهده گردید (شکل ۳) بطوری که در بعضی از آنها کلاهیک هسته ای ایجاد کرده بود. در گروههای ترمیم تعداد کمتری از نورونها دارای هسته الکترون دنس، تراکم و مارژیناسیون کروماتین دیده شد (شکل ۳). در گروههای سالم و شم چنین وضعیتی مشاهده نگردید.

همچنین در گروه آکسوتومی و با شدت کمتری در گروه ترمیم، در بعضی از نورونها واکوئله شدن سیتوپلاسم وجود داشت. در گروههای سالم و شم واکوئلاسیون دیده نشد.



شکل ۴- میکروگراف الکترونی دو نورون سالم عقده ریشه خلفی L5 در گروههای سالم و ترمیم اپی نورال. در شکل پایینی هسته یوکروماتین در مرکز سلول و در بالا سلول گلیال ستاره ای (فلش سفید رنگ) اطراف نورون سالم مشاهده می شود.



شکل ۳- میکروگراف الکترونی هسته (N) دو نورون در مراحل مختلف آپوتوزیس دو ماه بعد از قطع (شکل بالایی) و ترمیم عصب (شکل پایینی). در نورون بالایی چین دار شدن غشاء هسته، تشکیل پاهای کاذب (فلش) و چروکیدگی سیتوپلاسم و در نورون پایینی تراکم و مارژیناسیون کروماتین (فلش) دیده می شود.

جدول ۲- خلاصه ای از ویژگیهای فراساختمانی نورونهای عقده ریشه خلفی L5 در گروههای مورد مطالعه

گروهها	واکونولاسیون سفید پلاسم	تخریب میتوکندریها و شبکه اندوپلاسمی	چین خوردگی غشای هسته	پیکنوز	مارژیناسیون کروماتین	تراکم کروماتین
نرمال	-	-	-	-	-	-
شم	-	-	-	-	-	-
اکسوتومی	++	++	+++	+++	+++	+++
ترمیم	+	+	+	+	+	+

بحث

این مطالعه نشان داد که به دنبال قطع عصب سیاتیک، مرگ معنی دار نورونهای عقده ریشه خلفی اتفاق می افتد و فراساختمان بعضی از نورونهای عقده ریشه خلفی، ویژگیهای مرگ سلولی آپوتوزیس را نشان می دهد. بدنبال ترمیم عصب به روش ارتباط اپی نورال، بعد از دو ماه در گروه ترمیم، کاهش مرگ سلولی و بهبودی فراساختمان نورونها مشاهده می شود. در بعضی از نورونهای گروه آکسوتومی و ترمیم، تخریب میتوکندریها و آندوپلاسمی و واکوئل شدن سیتوپلاسم مشاهده گردید که معمولا از ویژگیهای آپوتوزیس نمی باشد.

Groves و همکاران در ۱۹۹۷ با استفاده از متد *ISEL(In situ end labeling)* و شمارش نورونهای عقده ریشه خلفی نخاع در رت بالغ نشان دادند که بدنبال آکسوتومی عصب سیاتیک مرگ نورونی اتفاق می افتد و حداقل بخشی از این مرگ به علت روند آپوتوزیس است (۵). Hart و همکاران معتقدند که این متد نمی تواند تنها آپوتوزیس را تشخیص دهد، بلکه سلولهای نکروزه هم توسط آن رنگ خواهند گرفت (۴). بنابراین برای تشخیص نوع مرگ نورونی متد مذکور به تنهایی قابل اعتماد نیست، و مطالعه فراساختاری با میکروسکوپ الکترونی اطلاعات دقیق تری را بدست خواهد داد. بهادری و همکاران در ۲۰۰۱ با بررسی فراساختمانی نشان دادند که مرگ نورونهای عقده ریشه خلفی

نخاع در نوزاد رت بدنال آکسوتومی به علت آپوتوزیس است (۳). یافته های فراساختمانی ما در این مطالعه نشان می دهد که به دنبال آکسوتومی چین دار شدن غشاء سلول و هسته، و تشکیل پاهای کاذب، ایجاد هسته الکترون دنس و متراکم شدن کروماتین، و پیکنوزه شدن آن صورت می گیرد. این خصوصیات فراساختمانی نشان دهنده وقوع روند آپوتوزیس است. اما از طرفی مطالعه ما تغییرات سیتوپلاسمی مانند تغییر شکل میتوکندریها و تخریب بعضی از آنها، واکوئله شدن سیتوپلاسم را هم به دنبال آکسوتومی نشان داد که از ویژگیهای آپوتوزیس نیست. Clarke چنین تغییراتی در سیتوپلاسم را مرگ سلولی غیر لیزوزومی نوع سوم نامگذاری می کند که از آپوتوزیس و نکروزیس متفاوت است (۱۵). این نوع مرگ بدنال آکسوتومی عصب اپتیک در سلولهای گانگلیونی شبکه جنین جوجه نیز دیده شده است (۱۶). به همین دلیل به نظر می رسد به دنبال آکسوتومی مکانیزمهای مختلفی در ایجاد مرگ نورونها دخالت داشته باشند.

به دنبال ترمیم عصب سیاتیک بعد از دوماه، مرگ نورونی کاهش معنی داری یافته بود و تغییرات فراساختمانی آپوتوزی مانند متراکم شدن کروماتین و مارژیناسیون آن و پیکنوزه شدن هسته با شدت کمتری مشاهده گردید. به نظر می رسد اتصال قطعات پروگزیمال و دیستال با تکنیک سوچور اپی نورיום توانسته است تغییرات فراساختمانی که در نهایت منجر به مرگ نورونها می شود را کاهش دهد، تصور می شود قطعه دیستال نقش مهمی در تامین فاکتورهای تروفیک بوسیله انتقال رتروگراد از انتهای عصب آسیب دیده دارد (۹). Glover معتقد است که مرگ سلولی بدنال آکسوتومی به از دست رفتن آکسوپلاسم وابسته است (۱۷) در حالیکه Johnson و همکاران از دست رفتن فاکتورهای رشد آزاد شده از بافت هدف و سلولهای شوان که بطور رتروگراد به جسم نورون منتقل می شوند را دلیل مرگ نورونی می داند (۱۸). بعد از آکسوتومی و بدنال رزئراسیون عصب محیطی نوروتروفین هایی مانند

NGF(Nerve growth factor), NT-3(Neurotrophin-3), BDNF (Brain derived nerve growth factor)

نقش بارزی در بقای نورونهای حسی عقده ریشه خلفی نخاع دارند (۱۹). Ma و همکاران نشان داده اند که اتصال قطعه پروگزیمال و دیستال به روش ارتباط اپی نورיום مرگ نورونهای حسی را به نصف تقلیل می دهد و نورونهای حرکتی تقریباً به طور کامل جلوگیری می نماید (۸). نتایج مطالعه ما نیز نشان می دهد که بدنال اتصال دو قطعه عصب سیاتیک تغییرات فراساختمانی نورونهای حسی کاهش می یابد که با نتایج گزارش مطالعه ذکر

شده مطابقت دارد. بنابراین می توان نتیجه گرفت اتصال قطعه پروگزیمال و دیستال باعث برقراری مجدد انتقال رتروگراد فاکتورهای آزاد شده از بافت هدف و سلولهای شوان در محل اتصال دو قطعه عصب، و در نتیجه باعث بقای جسم نورونهای مربوطه گردیده است. در مطالعه حاضر، مرگ نورونها بعد از ترمیم عصب از ۳۸/۸٪ به ۲۵/۴٪ رسید، و تغییرات فراساختمانی آپوتوزی نورونها بدنال ترمیم عصب بعد از دو ماه کاملاً از بین نرفت. علت آن می تواند مربوط به حساسیت بیشتر نورونهای حسی به محرومیت از فاکتورهای رشد باشد، بطوری که در مطالعه Ma و همکاران نیز بدنال ترمیم عصب، مرگ نورونهای حسی از ۵۰٪ به ۲۵٪ رسید و کاملاً از بین نرفت از طرفی در این مطالعه آنها بعد از ۱۶ هفته نورونها مورد بررسی قرار گرفت ۸ ولی ما بعد از ۸ هفته این بررسی را انجام دادیم. بنابراین احتمالاً با گذشت زمان بیشتری از ترمیم عصب، می توان نورونهای زنده با فراساختمانی طبیعی تر را در عقده ریشه خلفی یافت. وجود پیش سازهای نورونی در عقده ریشه خلفی و احتمال نورونز در عقده بعد از تولد (۲۰)، می تواند این احتمال را مطرح کند که سلولهای مرده با گذشت زمان توسط نورونهای جدید جایگزین شوند، و با گذشت زمان تعداد نورونهای بیشتری دیده شون.

دهها سال است که محققین مختلف برای بررسی پدیده مرگ سلولی و مکانیزمها و عوامل مؤثر در ایجاد و کنترل آن از مدل آکسوتومی استفاده می کنند (۲،۳،۴). ما نیز از این مدل برای ایجاد مرگ سلولی استفاده نمودیم. ما در این مطالعه نورونهای پنجمین عقده ریشه خلفی نخاع را مورد بررسی قرار دادیم زیرا حدود ۷۰ درصد نورونهای این عقده به داخل عصب سیاتیک رشته می فرستند (۶). بنابراین اثرات قطع و ترمیم عصب سیاتیک بر روی نورونهای این عقده بخوبی قابل بررسی است. ترمیم عصب به روش اتصال اپی نورיום دو قطعه پروگزیمال و دیستال عصب که در این مطالعه انجام گرفت، یک متد کلاسیک برای ترمیم عصب است (۱۱). بنابراین می توان آثار ترمیم عصب را (با یک روش رایج ترمیم بر روی جسم نورونها مورد بررسی قرار داد. با توجه به اینکه محققین مختلف در مطالعات فراساختمانی نورونهای عقده ریشه خلفی به دنبال آکسوتومی نشان داده اند که آکسوتومی باعث مرگ سلولی از نوع آپوتوزیس می شود (۳،۵) و از طرفی این اعتقاد وجود دارد که تکنیک مطالعه فراساختاری با کمک میکروسکوپ الکترونی در مقایسه با سایر تکنیکهای ارزیابی آپوتوزیس و مرگ نورونی از اعتبار بالاتری برخوردار است (۱۴) بنابراین با استفاده از اطلاعات فراساختاری بدست آمده از میکروسکوپ الکترونی، این توانایی بوجود خواهد

آمد تا تاثیر ترمیم عصب قطع شده بر کاهش تغییرات مرگ سلولی مورد ارزیابی قرار گیرد. در مطالعه ما ساختمان و فراساختمان نوروها ۸ هفته بعد از قطع و ترمیم عصب مورد ارزیابی قرار گرفت، زیرا Hart و همکاران نشان داده اند که حداکثر مرگ نوروئی در نوروهای عقده ریشه خلفی دو ماه بعد از قطع عصب است (۴).

Guntinas-Lichius و همکاران در سال ۱۹۹۷ بدنبال آناسوموزعصب هیپوگلوکوسال-عصب فاشیال وبه بدنبال دژنراسیون نوروهای حرکتی فاشیال و رژنراسیون نوروهای حرکتی هیپوگلوکوسال نشان دادند که کروماتولیزس و جابجایی هسته و هستک در نوروهای در حال دژنراسیون تا ۱۱۲ روز بعد از عمل و در نوروهای در حال رژنراسیون تا قبل از روز ۵۶ بعد از عمل دیده می شود. آنها همچنین نشان دادند که نوروهای در حال رژنراسیون سریعتر این تغییرات را نشان می دهند در حالیکه نوروهای در حال مرگ برای مدت زیادتری این تغییرات را حفظ می کنند (۲۱). در مطالعه ما، به بدنبال آکسوتومی تا ۶۰ روز پس از قطع عصب همچنان چنین تغییراتی در نوروهای حسی عقده ریشه

خلفی مشاهده می شد، در حالیکه بدنبال ترمیم بعد از ۶۰ روز این تغییرات کاهش یافته بود. کاهش سریعتر این تغییرات در نوروهای عصب ترمیم شده نسبت به نوروهای گروه آکسوتومی با چنین اتفاقی در نوروهای در حال دژنراسیون در مطالعه گانتیناسن مطابقت دارد.

پیشنهاد می شود تا جهت ارزیابی بهتر نقش ترمیم عصب در بهبود و بقای جسم نوروها از تکنیکهای دیگر ترمیم مانند گرافت عصبی و استفاده از کانالهای راهنمای عصب و همچنین برای ارزیابی وضعیت نوروها علاوه بر میکروسکوپ الکترونی از تکنیکهای ردیابی، هیستوشیمی و ایمونوهیستوشیمی استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

مجربان این تحقیق از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران به خاطر تامین هزینه ها و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی این دانشگاه به خاطر کمک در اجرای این طرح تشکر و قدردانی می نمایند.

References:

- 1- Wilson ADH, Hart A, Brannstrom T, Wiberg M, Terenghi G. Primary sensory neuronal rescue with systemic acetyl-L-carnitine following peripheral axotomy. A dose-response analysis. *British Journal of Plastic Surgery*. 2003; 56:732-739
- 2- Li L, Houenou LJ, Wu W, Lei M., Prevette DM, Oppenheim RW. Characterization of spinal motoneuron degeneration following different types of peripheral nerve injury in neonatal and adult mice. *J Comp Neurol*. 1998; 396:158-168
- 3- Bahadori MH, Al-Tiraihi T, Rezazadeh-Valojerdi M. Sciatic nerve transection in neonatal rats induces apoptotic neuronal death in L5 dorsal root ganglion. *J Neurocytology*. 2001; 30(2):125-130
- 4-Hart AM, Wiberg M, Youle M, Terenghi G. Primary sensory neurons and satellite cells after peripheral axotomy in the adult rat-Timecourse of cell death and elimination. *Exp Brain Res*. 2002;142:308-318.
- 5- Groves MJ, Christopherson T, Giometto B, Scarvilli F. Axotomy-induced apoptosis in adult rat primary sensory neurons. *Journal of Neurocytology*. 1997; 26:615-624.
- 6- Himes BT, Tessler A. Death of some dorsal root ganglion neurons and plasticity of others following sciatic nerve section in adult and neonatal rats. *J Comp Neurol*. 1989; 284: 215-230
- 7- Fawcett DW. A textbook of histology. 12th ed. Chapman & Hall Company. 1994
- 8- Ma J, Novikov LN, Kellerth JO, Wiberg M. Early nerve repair after injury to the postganglionic plexus: an experimental study of sensory and motor neuronal survival in adult rat. *Scand J Plast. Reconstr Sur. Hand Surg*. 2003; 37: 1-9
- 9- Schenker M, Kraftsik R, Glauser L, Kuntzer T., Bogousslavsky J, Barakat-Walter I. Thyroid hormone reduces the loss of axotomized sensory neurons in dorsal root ganglia after sciatic nerve transection in adult rat. *Experimental Neurology*. 2003; 184(1):225-236
- 10- Guntinas-Lichius O, Irintchev A, Streppel M., Lenzen M, Grosheva M, Wewetzer K, Neiss WF, Angelov DN. Factors limiting motor recovery after facial nerve transection in the rat: combined structural and functional analysis. *Eur J Neuroscience* 2005; 21: 391-402
- 11- Lundborg G. Nerve regeneration and repair. A review. *Acta orthop Scand*. 1987; 58:145-169
- 12- Valero-Cabre A, Tsironis K, Skouras E, Navarro X, and Neiss WF. Peripheral and spinal motor reorganization after nerve injury and repair. *J Neurotrauma*. 2004; 21(1): 95-108
- 13- Hollowell JP, Villadiego A, Rich KM. Sciatic nerve regeneration across gaps within silicone chambers: long-term effects of NGF and consideration of axonal branching. *Experimental Neurology*. 1990;110: 45-51
- 14- LeBlanc AC. Apoptosis techniques and protocols. Second Edition. Humana Press. 2002
- 15- Clarke PGH Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)*. 1990; 181:195-213

- 16-Borsello T, Motter V, Castagne V, Clarke PGH **Ultrastructure of retinal ganglion cell death after axotomy in chick embryos.** *The Journal of Comparative Neurology.* 2002;453:361-371
- 17-Glover RA. **Sequential cellular changes in the nodose ganglion following section of the vagus nerve at two levels.** *Anat Rec.* 1967;157:248
- 18- Johnson EM, Chang JY, Koike T, Martin DP. **Why do neurons die when deprived of trophic factor.** *Neurobiol Aging.* 1989;10:549-552
- 19- Terenghi G. **Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors.** *J Anat.* 1999; 194:1-14
- 20- Namaka MP, Sawchuk M, Macdonald SC, Jordan LM, Hochamr S. **Neurogenesis in postnatal mouse dorsal root ganglion.** *ExpNeurol.* 2001; 172:60-69
- 21-Guntinas-Lichius O, Schulte E, Stennert E., Neiss W. **The use of texture analysis to study the time course of chromatolysis.** *Journal of Neuroscience Methods.* 1997; 78:1-6