بررسی تأثیر آنتی اکسیدان ملاتونین بر شکنج‌های حسی- حرکتی مغز موش بعد از القاء تورم مغزی

نرگس جانزاده[۱]، *دکتر منصوره موحدین[۲]، دکتر تقی محمد تقی‌الطریحی[۳]

چکیده

هدف: ترکیبات زیادی را می‌توان نام برد که برای سلولهای عصبی دارای نقش محافظتی هستند. یکی از این مواد ملاتونین است که به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی و جمع کننده رادیکالهای آزاد مطرح می‌باشد.هدف این مطالعه بررسی تأثیر ملاتونین بر قشر (کورتکس) حسی- حرکتی مغز موش بعد از ایجاد ضایعه مغزی با استفاده از شوک سرمایی بود.

روش بررسی: به منظور دستیابی به این هدف، در یک مطالعه مداخله‌ای و تجربی ملاتونین با دوزهای mg/kg ۱۰۰ و ۵۰، ۵، ۱ به صورت داخل صفاقی به موشهای گروههای آزمون از کل موش‌هایی که بطور تصادفی به ۸ گروه تقسیم شده بودند و در ناحیه آهیانه (پاریتال) مغز آنها با استفاده از شوک سرمایی ضایعه ایجاد شده بود تزریق شد. تزریق در سه نوبت (۰/۵ ساعت قبل، ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت بعد از ایجاد ضایعه) انجام شد.۷۲ ساعت بعد از ایجاد ضایعه، مغز موش‌ها برداشته شد و برشهایی به منظور مطالعه با میکروسکوپ نوری تهیه و پس از رنگ آمیزی کرزیل ویوله، مطالعات ایمونوهیستوشیمیایی به منظور بررسی آنتی بادی‌های Bax و Survivin در مقاطع بافتی انجام و نهایتاً سلولهای زنده در قشر مغز این موش‌ها شمارش شد.

یافته‌ها: نتایج حاصله نشان داد که شوک سرمایی به شکل معنی‌داری باعث کاهش تعداد سلولهای زنده شده است. تجویز ملاتونین بعد از ایجاد ضایعه در گروه‌های مورد مطالعه باعث افزایش تعداد سلولهای زنده شد. افزایش تعداد این سلولها در گروه‌هایی که ملاتونین را با دوزهای پایین (mg/kg ۱و۵) دریافت کردند نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نبوده، ولی در گروهی که ملاتونین را با دوز بالا دریافت کردند (mg/kg ۵۰)، افزایش تعداد سلولها نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۵$). دوز mg/kg ۱۰۰ سمی بود. بررسی‌های ایمونوهیستوشیمی نشان دادکه مسیرهای مختلف مرگ سلولی (نکروز وآپوپتوز) به دنبال شوک سرمایی ایجاد گردیده است.

نتیجه‌گیری: تجویز ملاتونین با دوز مناسب می‌تواند سبب کاهش آسیب ناحیه قشری در مغز موش‌هایی که بااستفاده از شوک سرمایی دچار ضایعه مغزی شده‌اند، گردد و به این ترتیب باعث کاهش مرگ سلولها بعد از ایجاد ضایعه گردد.

کلید واژه‌ها: شوک سرمایی / ملاتونین / قشر مغز / آنتی اکسیدان / سلولهای عصبی

۱- کارشناس ارشد علوم تشریح
۲- دکترای آناتومی، دانشیار دانشگاه تربیت مدرس
۳- پاتولوژیست، استاد دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ دریافت مقاله: ۸۵/۷/۱۶
تاریخ پذیرش مقاله: ۸۵/۱۱/۲۴

* آدرس نویسنده مسئول:
تهران، تقاطع بزرگراه جلال آل احمد و دکتر چمران، دانشگاه تربیت مدرس، گروه علوم تشریح،تلفن۸۸۰۱۱۰۰۱
* E-mail: mansoure@modares.ac.ir

مقدمه

آسیب مغزی[1] نوعی از آسیبهای C.N.S می‌باشد که بنا به تعریف درنواحی بالاتر ازفورامن مگنوم[2] واقع شده‌اند. این نواحی شامل نیمکره‌های مخ، ساقه مغز، مخچه و هسته‌های قاعده‌ای می‌باشد که آسیب هرکدام علائم عملکردی[3] مربوط به خود را ایجاد می‌کند. آسیب به مغز سبب ایجاد اختلالات حسی ــ حرکتی گوناگونی می‌شود که بسیار ناتوان کننده هستند، مثل فلج نیمه بدن، فلج چهار اندام، اختلالات حسی، گفتاری، حافظه، ادراک و غیره. این ضایعات به دلایل مختلفی ممکن است ایجاد شوند، ازجمله ضربه‌های مغزی، هایپوکسی، ایسکمی، عوامل عفونی، واکنشهای ایمنی بدن و غیره (۱).

این عوامل آسیب رسان از طریق مکانیسمهای مختلفی سبب ایجاد ادم مغزی می‌شوند که با افزایش میزان رادیکالهای آزاد در سلول سبب آسیب سلولی[4] می‌شود که می‌تواند قابل برگشت[5] ویا غیر قابل برگشت[6] باشد. در صورت دوم منجر به صدمه جدی به بافت مغز و مرگ پاتولوژیک سلول[7] می‌شود که می‌تواند در صورت وسیع بودن ضایعه و درگیر کردن مناطق حیاتی مغز منجر به مرگ فرد گردد(۲).

مطالعات نشان داده است که آنتی اکسیدان‌ها نظیر ویتامین E، چای سبز، ویتامین B۳ و غیره قادر هستند اثر رادیکال‌های آزاد را خنثی کنند(۵-۳).

ملاتونین یک هورمون اصلی است که از غده صنوبری[8] ترشح می‌شود(۶). این ترکیب چربی دوست و غیر سمی است و به راحتی از سد خونی - بافتی مغز عبور می‌کند و خاصیت نوروپروتکتیو و آنتی‌اکسیدانی دارد(۷).با توجه به خاصیت آنتی اکسیدانی ملاتونین این سئوال مطرح می‌شود که آیا این ماده می‌تواند با خنثی کردن اثر رادیکال‌های آزاد از آسیب و در نهایت مرگ سلول‌های مغزی در اثر ادم مغزی جلوگیری کند؟ لذا هدف از این مطالعه بررسی تأثیر تجویز ملاتونین بر آسیب مغزی در موش مدل ادم مغزی می‌باشد.

روش بررسی

در این مطالعه از موشهای سفید نژاد NMRI استفاده شد.این حیوانات از موسسه رازی کرج خریداری شدند وبه مدت یک هفته در شرایط حیوانخانه دانشگاه قرار گرفتند تا با شرایط محیط جدید سازگاری حاصل کنند. این حیوانات همگی نربوده ودر هنگام اجرای مراحل آزمایش ۸-۶ هفته سن داشتند. موشها به ۸ گروه به شرح زیر بطور تصادفی تقسیم شدند.

۱ـ گروه کنترل: موشهایی هستند که ادم مغزی در آنها ایجاد نشده ودارو هم دریافت نکردند.

۲ـ گروه آزمون۱ (مدل): موشهایی هستند که ادم مغزی در آنها ایجادشده ولی دارو دریافت نکردند.

۳ـ گروه آزمون۲: موشهایی هستند که ادم مغزی شدند و داروی ملاتونین را با دوز ۱mg/kg دریافت کردند.

۴ـ گروه آزمون۳: موشهایی هستند که ادم مغزی شدند و داروی ملاتونین را با دوز ۵mg/kg دریافت کردند.

۵ـ گروه آزمون۴: موشهایی هستند که ادم مغزی شدند و داروی ملاتونین را با دوز ۵۰mg/kg دریافت کردند.

۶ـ گروه آزمون۵: موشهایی هستند که ادم مغزی شدند و داروی ملاتونین را با دوز ۱۰۰mg/kg دریافت کردند.

۷ـ گروه آزمون۶ (شم)[9]: موشهایی هستند که ادم مغزی شدند و هم حجم داروی سایر گروه‌ها (۱۲۰ لاندا) حلال دارو (سالین/ اتانول، ۵/۹۵ v/v) دریافت کردند.

۸ـ گروه آزمون۷: موشهایی هستند که فقط در حالت بیهوشی پوست سر آنها باز وسپس بسته شده وداروییی هم دریافت نکردند.

در این مطالعه موش نر بالغ ۸-۶ هفته ای (NMRI) برای ایجاد مدل انتخاب شد. موشها ابتدا به کمک تزریق داخل صفاقی با دوز ۱µl/g از Ketamin/Xylazin (به نسبت حجمی ۲/۱)، بیهوش شدند. برای ایجاد ادم مغزی به روش انجمادی پوست ناحیه فوقانی سر با یک برش ساژیتال در بخش مرکزی باز شد، سپس یک پروب فلزی که از قبل به‌مدت ۲ دقیقه در نیتروژن مایع نگهداری شده بود در ناحیه آهیانه (پاریتال) سمت راست از روی اسکالپ به مدت ۳۰ ثانیه (با فشار ثابت) قرار گرفت. پس از ایجاد ضایعه محل باز شده با بخیه یا گیره بسته شد و برای جلوگیری از عفونت احتمالی کمی پودر پنی سیلین در محل عمل ریخته شد(۸).

سپس داروی ملاتونین با ۴ دوز ۱، ۵، ۵۰ و ۱۰۰mg/kg به شکل داخل صفاقی(با حجم ۱۲۰ لاندا) به موشهای مدل تزریق شد. موشهاقبل و بعد از عمل جراحی در سه زمان مختلف ملاتونین دریافت کردند که به ترتیب عبارتند از:

۰/۵ ساعت قبل از جراحی و ایجاد ضایعه

۲۴ ساعت بعد از جراحی و ایجاد ضایعه

۴۸ ساعت بعد از جراحی و ایجاد ضایعه

1- Brain damage
2- Foramen magnum
3- Functional
4- Cell injury
5- Reversible
6- Irreversible
7- Pathological cell death
8-Pineal
9- Sham

در کنار گروههای ذکر شده یک گروه به عنوان شم در نظر گرفته شد که این گروه تنها حلال ملاتونین (اتانول/ سالین به نسبت حجمی۵/۹۵) را در زمانهای فوق الذکر دریافت کردند. علاوه بر شم گروه دیگری تحت عنوان شم اپراتور[1] لحاظ شد که در آن موشها، بدون ایجاد ضایعه به کمک پروب، جراحی شدند (پس از بیهوشی پوست سر باز شده وسپس بخیه شد).

۷۲ ساعت پس از جراحی، مغز موشها پس از پرفیوژن برای بررسی بافتی استخراج شد و پس از طی پروسه معمول آماده‌سازی بافت، بلوک‌های پارافینی تهیه شده و نمونه‌ها برای مطالعه با میکروسکوپ نوری آماده شدند. به این ترتیب که به کمک دستگاه میکروتوم نوع Leitz (با تیغه ثابت از نوع C) ابتدا کل نمونه به شکل سریال به ضخامت ۱۰mμ برش داده شد، سپس از هر نمونه ۱۲۰ قطعه که تمامی قشر حسی-حرکتی را شامل می‌شد انتخاب گردید. تعیین ناحیه حسی حرکتی به کمک اطلس مغز موش انجام شد(۹). در مجموع ۲۴ لام که روی هرکدام ۵ برش قرار داشت تهیه شد. سپس نمونه‌ها مراحل رنگ‌آمیزی با کرزیل ویوله[2] را طی کردند.

پس از رنگ‌آمیزی اسلایدها، ۵ لام بشکل اتفاقی انتخاب گردید و ازآنجایی که روی هر لام ۵ برش قرار داشت، یکی بصورت تصادفی انتخاب شد. به کمک میکروسکپ Olympus مجهز به دوربین، در هر برش از ۷ ناحیه با عدسی۴۰ عکس گرفته شد. به‌این ترتیب از ناحیه حسی و حرکتی هر مغز ۳۵ عکس تهیه شد. سپس سلولهای زنده که دارای هسته‌هایی با سایز ۱۰μm با ویژگی متراکم (دنس) و تیره بودند شمارش شدندو تعداد این سلولها در واحد سطح محاسبه شد.

در پایان با استفاده از نرم‌افزار آماری اس‌پی‌اس‌اس نسخه ۱۳ تستهای آنووا[3] و توکی[4] روی اطلاعات خام بدست آمده انجام شد.

یافته‌ها

در این مطالعه نمونه‌ها در ۸ گروه مورد بررسی قرار گرفتند (مدل، کنترل، شم، شم اپراتور، ملاتونین با دوز ۱ mg/kg، ملاتونین با دوز ۵ mg/kg، ملاتونین با دوز ۵۰ mg/kg وملاتونین با دوز ۱۰۰mg/kg). در بررسی برش‌های مورد مطالعه با استفاده از رنگ‌آمیزی کریزل ویوله سلول‌هایی که دارای هسته گرد، روشن با ظاهری یوکروماتین و دارای چند هستک با قطر ۱۰ میکرون بودند به عنوان سلول سالم در نظر گرفته شدند و سلول‌هایی که هسته آنها متراکم، چند وجهی و هترو کروماتین بود به‌عنوان سلول مرده در نظر گرفته شدند (شکل ۱). نتایج حاصل از شمارش سلولها و مقایسه تعداد سلولها در واحد سطح بین گروهها در حالتهای مختلف مقایسه در جداول ۱ تا ۳ نشان داده شده است.

جدول۱- مقایسه تعداد سلول‌های قشر مغز در واحد سطح بین گروه شم اپراتور و مدل به منظور تأیید مدل. اختلاف بین a ,b در سطح P<۰/۰۵ معنی‌دار می‌باشد.

گروه‌ها	میانگین تعداد سلولها در هر میلیمتر مربع ± میانگین انحراف معیار
کنترل	a۱۲/٤٤ ± ٦٨/١٧٠٧
مدل	b۳۳/٤٥ ± ٤٣/٩٤٣
شم اپراتور	a۸۸/۳۹ ± ۷٥/١٦٩٦

جدول ۲- مقایسه تعداد سلول‌های قشر مغز در واحد سطح بین گروههای کنترل، مدل، شم، ۵۰mg/kg، ۵mg/kg و ۱mg/kg به‌منظور تعیین دوز مناسب. اختلاف بین b, a و c در سطح P<۰/۰۵ معنی‌دار می‌باشد.

گروه‌ها	میانگین تعداد سلولها در هر میلیمتر مربع ± میانگین انحراف معیار
کنترل	a۱۲/٤٤ ± ٦٨/١٧٠٧
مدل	b۳۳/٤٥ ± ٤٣/٩٤٣
شم	b٥٨/٥٠ ± ٩٦/٩١٨
۵۰mg/kg	a۱۱/۳٤ ± ١٩/١٦٨١
۵mg/kg	b۳٤/٥۳ ± ۲۳/١۳٠۷
۱mg/kg	b٦٥/٤٥ ± ٤۲/١۲۷١

جدول ۳- مقایسه تعداد سلول‌های قشر مغز در واحد سطح بین گروه‌های ۵۰mg/kg ، مدل و کنترل.اختلاف بین a و b در سطح P< ۰/۰۵ معنی‌دار می‌باشد.

گروه‌ها	میانگین تعداد سلولها در هر میلیمتر مربع ± میانگین انحراف معیار
کنترل	a۱۲/٤٤ ± ٦٨/١٧٠٧
مدل	b۳۳/٤٥ ± ٤٣/٩٤٣
۵۰mg/kg	a۱۱/۳٤ ± ١٩/١٦٨١

بحث

این مطالعه به منظور بررسی تأثیر داروی ملاتونین بر کورتکس حسی-حرکتی مغز موش پس از ایجاد ادم مغزی به روش شوک سرمایی انجام شد. تاکنون محققین مطالعات گوناگونی در زمینه آسیب‌های مغزی انجام داده‌اند.استفاده از داروهایی که ترکیبات آنتی اکسیدان دارند در درمان بیماری‌های سیستم عصبی که ماهیت نورودژنراتیو دارند، مورد توجه محققان مختلف قرار گرفته ونتایج قابل توجهی داشته است.

ریت و همکاران در سال ۲۰۰۳ از ملاتونین به عنوان یک داروی نورو پروتکتیو در مدل سکته استفاده کردند و با مطالعاتی که بر روی رت، گربه و موش صحرایی انجام دادند، تأثیر ملاتونین را بر کاهش تعداد سلول‌هایی که دچار آپوپتوز شده‌اند وافزایش تعداد سلولهای نجات‌یافته، کاهش میزان واکنش گلیکوزیس و اکسیداسیون چربی‌های

1 - Sham Operator
2- Cresyl fast violet
3 - ANOVA
4 - TUKEY

نرونها، فعال شدن ژن bcl-2 که منجر به نجات نرونها می‌شود و کاهش آسیب اکسیداتیو DNA نرونها را گزارش کردند(۱۰).

در این پژوهش برای ایجاد آسیب مغزی از مدل شوک سرمایی استفاده شد. مدل شوک سرمایی یک مدل اثبات شده برای ضایعات تروماتیک مغز می‌باشد که ادم مغزی وازوژنیک را به دنبال دارد. ادم مغزی به معنای افزایش میزان آب موجود در بافت مغز، یک پدیده پاتوفیزیولوژیک است که معمولاً در پاسخ به عوامل آسیب رسان مثل ایسکمی، ضربه، تومور و عفونت بروز می‌کند و بین‌بافتی[1] است(۱۲، ۱۱). در صورتیکه عملکرد سلول‌های اندوتلیال مغز دچار اختلال گردد، نفوذ پذیری سد خونی ـ بافتی مغز مختل می‌گردد که سبب ایجاد ادم وازوژنیک می‌گردد(۱۴،۱۳).

پروسه التهاب با افزایش ورود خون به ناحیه آزار دیده مشخص می‌شود که به طور عمده ناشی از اتساع سرخرگچه‌ها و اتساع شبکه مویرگی و افزایش نفوذ پذیری سد خونی ـ بافتی مغز است که در اثر اختلال در عملکرد سلول‌های اندوتلیال دیواره عروق پدید می‌آید. افزایش نفوذپذیری رگی منجر به تجمع مایع خارج رگی غنی از پروتئین می‌شود که یکی از عوامل ایجاد ادم در منطقه است(۱۴). میانجی‌های شیمیایی زیادی در پروسه التهاب دخیل هستند که برخی از آنها شناخته شده هستند از جمله این میانجی‌ها می‌توان به متابولیت‌های اسیدآراشیدونیک اشاره کرد(۱۴). این متابولیت‌ها می‌توانند در هر مرحله‌ای ازالتهاب به عنوان میانجی عمل کنند(۱۵). دژنراسیون فسفولیپیدهای موجود در غشاء سلول‌های اندوتلیال که منجر به آزادشدن اسیدآراشیدونیک می‌شود و سپس تجزیه آن توسط آنزیمهای مربوطه و تولید متابولیت‌ها، سبب تولید رادیکالهای آزاد از جمله رادیکال آزاد اکسیژن می‌گردد که ممکن است در ایجاد ادم وازوژنیک نقش اساسی ایفاکنند. تجمع رادیکالهای آزاد اکسیژن سبب اکسیداتیو استرس می‌شود که به نوبه خود آبشاری از واکنشهای شیمیایی را به‌دنبال دارد که سلول را وارد مسیر نکروز یا آپوپتوز می‌نماید(۱۵). البته منبع اصلی تولید رادیکالهای آزاد اکسیژن در میان سلول‌های موجود در بافت یعنی نورون‌ها، گلیاها یا سلول‌های اندوتلیال، هنوز ناشناخته است و روشن شدن آن نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد، شوک سرمایی باعث مرگ تعداد قابل توجهی از سلول‌های قشر مغز می‌گردد و در نتیجه ضایعه مغزی ایجاد می‌کند. علاوه براین براساس بررسی‌های ایمونوهیستوشیمی مرگ تعداد زیادی از این سلول‌ها از نوع آپوپتوز است و استفاده از ملاتونین به عنوان یک آنتی اکسیدان در هنگام ایجاد ادم مغزی سبب توقف روند آپوپتوز می‌شود. از میان دوزهای مورد مطالعه دوزهای ۵mg/kg و۱ به عنوان دوز مؤثر، ۵۰ mg/kg به عنوان مؤثرترین دوز و ۱۰۰mg/kg به عنوان دوز سمی شناخته شد. پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های بعدی اختلال حسی در مدل شوک سرمایی بررسی گردد. همچنین نقش زمان استفاده از ملاتونین بر میزان تأثیر آن در این مدل مورد مطالعه قرار گیرد. منبع اصلی تولید رادیکال‌های آزاد در میان سلول‌های مغزی و همچنین ارگانل‌های سلولی و مکانیزم دقیق عملکرد اسید آراشیدونیک و ملاتونین هنوز ناشناخته بوده و نیاز به پژوهش در این زمینه احساس می‌شود.

منابع:

۱ـ سلطان زاده، ا. بیماریهای مغز و اعصاب و عضلات، تهران، ۱۳۷۴

۲ـ کاترن ــ کومار ـ کالینز، رابینز. پایه آسیب شناختی بیماریها، بهادری، م. چهر، ۱۳۷۸، اول

3- Ikeda K, Negishi H, Yamori Y. Antioxidant nutrients and hypoxia/ ischemia brain injury in rodents. Toxicology 2003 Jul 15; 189(1-2):55-61

4-Pietri S, Seguin JR, d'Arbigny P, Drieu K, Culcasi M. Ginkgo biloba extract (EGb 761) pretreatment limits free radical-induced oxidative stress in patients undergoing coronary bypass surgery. Cardiovasc Drugs Ther 1997 Apr; 11(2):121-31

5-Louajri A, Harraga S, Godot V, Toubin G, Kantelip JP, Magnin P. The effect of ginkgo biloba extract on free radical production in hypoxic rats. Biol Pharm Bull. 2001 Jun; 24(6):710-2

6- Ward Dean MD, Morgenthaler J, Fowkes W. (Larry King Live) Melatonin chapter from Smart Drugs II , PP:1-7

7- Kondoh T, Uneyama H, Nishino H, Torii K. Melatonin reduces cerebral edema formation caused by transient forebrain ischemia in rats. Life Sci. 2002 Dec 20; 72(4-5):583-90.

8- Murakami K, Kondo T, Yang G, Chen SF, Morita-Fujimura Y, Chan PH. Cold injury in mice: a model to study mechanisms of brain edema and neuronal apoptosis. Prog Neurobiol 1999 Feb;57(3):289-99

9- Mouse Brain Atlases, The mouse brain library, Supported by national institute of http://www.mbl.org/atlas/atlas.php health from the site

10- Reiter RJ, Sainz RM, Lopez-Burillo S, Mayo JC, Manchester LC, Tan DX. Melatonin ameliorates neurologic damage and neurophysiologic deficits in experimental models of stroke. Ann N Y Acad Sci 2003 May; 993:35-47

11- Klatzo I, Piraux A, Laskowski EJ.The relationship between edema, blood-brain-barrier and tissue elements in a local brain injury. J Neuropathol Exp Neurol 1958 Oct;17(4):548-64

12- Fishman RA.Brain edema. N Engl J Med 1975 Oct 2; 293(14):706-11

13- Chan PH, Longar S, Fishman RA. Phospholipid degradation and edema development in cold-injured rat brain. Brain Res 1983 Oct 31; 277(2):329-37

14- Chan PH, Fishman RA.The role of arachidonic acid in vasogenic brain edema. Fed Proc. 1984 Feb;43(2):210-3

15- Chan PH, Yang GY, Chen SF, Carlson E, Epstein CJ. Cold-induced brain edema and infarction are reduced in transgenic mice overexpressing CuZn-superoxide dismutase. Ann Neurol 1991 May; 29(5):482-6

1 - Interstitial