

بررسی رفتاری (شاخص عملکرد) و هیستوپاتولوژی اثر هیستیدین بر ترمیم له‌شدگی تجربی عصب سیاتیک در موش صحرایی

دکتر امیر امنیت طلب^{۱*}، دکتر اسماعیل تمدن فرد^۲، سیامک چراغیان^۳

تاریخ دریافت: ۸۸/۸/۱۰ تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۱/۷

چکیده

پیش زمینه و هدف: هیستیدین یک اسید آمینه ضروری مهم است و در این بررسی تأثیر هیستیدین بر شاخص عمل عصب در موش‌های صحرایی دارای له‌شدگی عصب سیاتیک توأم با هیستوپاتولوژی آن در روند ترمیم عصب ارزیابی شد.

مواد و روش کار: ۵۷ سر موش صحرایی برای ارزیابی شاخص عمل عصب سیاتیک و بررسی مقاطع عصب سیاتیک با سه روش رنگ آمیزی معمولی و اختصاصی استفاده شد و فاکتورهای مؤثر در روند ترمیم عصب مثل تعداد هسته سلول‌های شوان و فیبرهای عصبی میلینه مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در گروه دریافت کننده هیستیدین در مقدار ۴۰۰ mg/kg نسبت به گروه کنترل (دریافت کننده سالین نرمال) کاهش معنی‌دار ($p < 0/05$) در شاخص عمل عصب سیاتیک و در گروه‌های مورد، کاهش معنی‌دار ($p < 0/05$) و در گروه نرمال سالین افزایش معنی‌دار در تعداد هسته سلول‌های شوان مشاهده شد ($p < 0/05$) در گروه هیستیدین ۴۰۰ mg/kg در تعداد فیبرهای میلینه در روز ۴۲ نسبت به روزهای ۱۴ و ۲۸ افزایش معنی‌دار ($p < 0/05$) ایجاد شد.

بحث و نتیجه گیری: نتایج نشان می‌دهد در ضایعات له‌شدگی، هیستیدین با مقدار ۴۰۰ mg/kg باعث بازگشت طبیعی عمل عصب سیاتیک شد. تحقیقات اخیر نشان داده تزیاد سلول‌های شوان در طول دژنراسیون والرین برای ترمیم و رملیناسیون اعصاب محیطی ضروری نمی‌باشد. اما افزایش فیبرهای میلینه در گروه دریافت کننده هیستیدین ۴۰۰ mg/kg در روز ۴۲ نشان دهنده اثر بسیار مفید هیستیدین در ترمیم اعصاب محیطی می‌باشد.

کلید واژه‌ها: هیستیدین، له‌شدگی تجربی، عصب سیاتیک، مطالعه رفتاری، هیستوپاتولوژی، موش صحرایی

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و یکم، شماره دوم، ص ۱۱۱-۱۰۳، تابستان ۱۳۸۹

آدرس مکاتبه: ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده دامپزشکی، صندوق پستی ۹۶۹ تلفن: ۰۹۱۴۴۴۱۴۶۱۳

E-mail: a.amniatlab@iaurmia.ac.ir

مقدمه

هیستیدین برای رشد و ترمیم بافت لازم است و وجود آن برای بقای غلاف میلین ضروری است ولی با این حال تاکنون تحقیقی در رابطه با اثر مستقیم هیستیدین بر روی ترمیم اعصاب محیطی دارای له‌شدگی انجام نشده است هیستیدین به میزان زیاد در محصولات لبنی، گوشت مرغ و ماهی یافت می‌شود و خاصیت آنتی اکسیدانی بسیار قوی دارد (۱). علاوه بر اثر آنتی اکسیدانی، هیستیدین دارای اثرات بیولوژیک گسترده شامل اثر ضد ادم، ضد پروستاگلندین، ضد اینترلوکین و ضد درد می‌باشد. اسید آمینه هیستیدین ادم مغزی ناشی از

امروزه با روش‌های تجربی، تحقیقات در اعصاب محیطی به منظور بررسی روند دژنراسیون و ترمیم عصب، بررسی مکانیسم‌های دردهای نوروپاتیک و بررسی وجود ارتباط بین دژنراسیون عصبی و درد انجام می‌گیرد. همچنین با تجویز مواد دارویی، شیمیایی و گیاهی و حتی استفاده از روش‌های فیزیکی مثل ایجاد جریان‌های الکتریکی و میدان‌های مغناطیسی در حیوانات آزمایشگاهی سعی شده است تا اثرات مفید این مواد و روش‌ها بر روی روند ترمیم اعصاب محیطی که در معرض جراحات فیزیکی مثل له‌شدگی و قطع شدن در اثر سوانح هستند بررسی شود با این‌که ذکر شده، وجود

^۱ استادیار پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه (نویسنده مسئول)

^۲ دانشیار فیزیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

^۳ کارشناس علوم آزمایشگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه

حیوانات به ۳ گروه ۱۸ سری به صورت زیر تقسیم شدند: گروه اول: در این گروه عمل جراحی و له کردن عصب سیاتیک انجام و از روز اول تا هفتم پس از جراحی، تزریق داخل صفاقی سالین نرمال انجام شد. به دلیل ارزیابی هیستوپاتولوژیک در روزهای ۱۴، ۲۸ و ۴۲ پس از جراحی، این گروه به سه زیر گروه دیگر تقسیم شدند. گروه دوم: در این گروه هم عمل جراحی و له کردن عصب سیاتیک انجام شد و از روز اول تا هفتم پس از جراحی، از هیستیدین در مقدار ۵۰ mg/kg به روش داخل صفاقی دریافت کردند. به دلیل ارزیابی هیستوپاتولوژیک در روزهای ۱۴، ۲۸ و ۴۲ پس از جراحی، این گروه نیز به سه زیر گروه تقسیم شدند. گروه سوم: در این گروه به مدت ۷ روز پس از عمل جراحی و له کردن عصب سیاتیک، هیستیدین در مقدار ۴۰۰ mg/kg به روش داخل صفاقی تزریق شد. به دلیل ارزیابی هیستوپاتولوژیک در روزهای ۱۴، ۲۸ و ۴۲ پس از جراحی، این گروه نیز به سه زیر گروه تقسیم شدند. در بررسی رفتاری، رفتار مورد نظر (شاخص عمل عصب سیاتیک) قبل از جراحی از حیوانات گرفته شد و به عنوان گروه‌های شاهد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای بررسی هیستوپاتولوژیک، گروه شاهد شامل ۳ سر موش صحرایی بود. در این تجربه از محصول سالین نرمال (کلرور سدیم ۰/۹ درصد) استریل و پودر هیستیدین دی هیدروکلراید (تهیه شده از شرکت دارویی سیگمای آمریکا) استفاده شد. از سالین نرمال در گروه کنترل به روش تزریق داخل صفاقی و نیز برای حل کردن پودر هیستیدین استفاده شد. همچنین از محلول فرمالین ۳۸ درصد مرک آلمان به منظور تهیه فرمالین ۱ درصد استفاده شد. محصول استون از داروخانه‌های محلی تهیه شد.

۲- روش جراحی له کردن عصب سیاتیک

پس از پرهیز غذایی ۱۲ ساعت (پرهیز غذایی چرخه تاریکی). موش‌ها با تزریق داخل صفاقی مخلوطی از کتامین (۸۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) بی‌هوش شدند. سپس موهای ناحیه جراحی از پایین برآمدگی هانش تا بالای مفصل زانو به‌طور کامل تراشیده شد. بعد با بتادین رقیق ضدعفونی و ناحیه مورد نظر شان بندی شد. پوست ناحیه مورد نظر به طول ۳-۲ سانتی‌متر برش شده و پس از جدا نمودن پوست از بافت‌های زیر پوست، ناحیه جراحی با چهار عدد قلاب متصل به پوست گشاد شد. به منظور رسیدن به عصب سیاتیک به عضله چهار سر ران یک برش طولی داده شد و بعدها آن در زیر قلاب‌ها قرار داده شد. پس از مشخص شدن عصب سیاتیک، با جدا کردن از بافت‌های اطراف، تنه عصب سیاتیک در یک سانتی‌متری بالای محل سه شاخه شدن عصب سیاتیک با پنس هوموستاتیک متوسط جراحی تحت فشار قرار داده شد. فشار

جراحی سرما را در موش‌های صحرایی کاهش داده است (۲). فعالیت ضد روماتوئیدی از هیستیدین به‌علت مهار تولید پروستاگلندین E2 گزارش شده است (۳). اسید آمینه هیستیدین ترشح اینترلوکین IL-8 از سلول‌های اپی تلیال روده تحریک شده به‌وسیله پراکسید هیدروژن و فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF- α) را مهار کرده است (۴). هیستیدین تولید اینترلوکین IL-7 فاکتور نکروز تومور آلفا و سطوح گلوکز و تری گلیسریدهای پلازما را در بیماری دیابت تضعیف کرده است (۵). همچنین در یک بررسی رفتاری مشخص شده است تزریق داخل صفاقی هیستیدین موجب کاهش پاسخ درد به‌دنبال تزریق کف پای فرمالین در موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی شده است (۶). ارزیابی رفتاری یا تست S.F.I^۱ برای ارزیابی دقیق از روند ترمیم عصبی احتیاج به تست‌ها و آزمایشات معتبر وجود دارد و با توجه به این‌که اولین اکسون‌ها که ترمیم می‌شوند اکسون‌های حرکتی می‌باشند بدین ترتیب ارزیابی رفتاری و حرکتی در این مورد اهمیت می‌یابد. تست SFI (شاخص کاری عصب سیاتیک) یک شاخص حساس برای مرحله عصب دار شدن عضله هدف می‌باشد. ارزیابی رفتاری اولین بار در سال ۱۹۸۲ توسط دانشمندی به نام مدی ناسلی^۲ مطرح شد که از فیلم اشعه X برای این منظور استفاده نمود. ولی استفاده از کاغذ و جوهر توسط محقق به نام لودن^۳ پیشنهاد شده است که روش کار در این تحقیق نیز چنین می‌باشد (۷). در این بررسی تأثیر تزریق داخل صفاقی هیستیدین در مقادیر ۵۰ و ۴۰۰ mg/kg بر آزمون رفتاری شاخص عمل عصب سیاتیک در موش‌های صحرایی دارای له‌شدگی عصب سیاتیک توأم با بررسی اثرات هیستوپاتولوژیک آن در روند ترمیم عصب و تغییرات تعداد هسته سلول‌های شوان و فیبرهای عصبی میلیانه انجام شد.

مواد و روش کار

۱- حیوانات

در این تجربه از ۵۷ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن بین ۲۵۰-۳۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات پس از تهیه در قفس‌های پرورشی به سه سر موش صحرایی در هر قفس، در آزمایشگاه با درجه حرارت ۲۵-۲۲ درجه سانتی‌گراد چرخه روشنایی - تاریکی ۱۲ ساعت (شروع روشنایی ساعت ۷ و شروع تاریکی ساعت ۱۹) با دسترسی آزادانه به آب و غذا نگهداری شدند.

¹ Sciatic Functional Index

² Medinaceli

³ Lowden

نسبی در داخل کانال انتخاب شد. قبل از تجربه، حیوانات هر ۵ روز یکبار برای شناسایی و عبور از کانال تمرین داده شدند. این آزمون در روزهای ۷ قبل و ۳۵، ۲۸، ۲۱، ۱۴، ۷ و ۴۲ پس از جراحی انجام و ردپاهای به دست آمده آنالیز شد. برای انجام آزمون، کف کانال به وسیله کاغذ جوهر جذب کن به ابعاد طول ۶۰ و عرض ۷ سانتی متر پوشیده شد. سپس حیوان به آرامی مقید و کف پاهای آن بر روی استامپ یا جوهر آبی فشار داده شد و سپس حیوان در کانال قرار داده شد. پس از عبور از کانال، کاغذها براساس گروه بندی حیوانات مجزا و ارزیابی شدند. هر کاغذ به دست آمده از آزمون به دو تست نرمال و آزمایش تقسیم شد و تعداد ۶-۴ رد پا از تست‌های نرمال و آزمایش اندازه گیری و میانگین آن‌ها در فرمول‌های مربوطه قرار داده شدند. قسمت‌های اندازه گیری شده از ردپاها عبارت بودند از: فاصله بین انگشتان دوم و چهارم، فاصله بین انگشتان اول و پنجم و فاصله بین نوک انگشت وسط تا پاشنه پا. پس از محاسبه در فرمول زیر قرار داده شدند (۸).

$$SFI = -38.3 \left[\frac{EPL - NPL}{NPL} \right] + 109.5 \left[\frac{ETS - NTS}{NTS} \right] + 13.3 \left[\frac{EIT - NIT}{NIT} \right] - 8.8$$

بهبودی عملی را نشان می‌دهد و نتیجه‌های ± 10 علامت طبیعی بودن کارپا است و هر روز می‌توان نتایج را بدست آورد تا نمودار سیر ترمیم عصب به صورت اعداد ۱۰۰- و بالاتر تا صفر (بهبودی کامل) بدست آید و ارزیابی لازم صورت گیرد (۹، ۱۰). این روش بهترین ارزیابی برای سنجش رفتار است زیرا دقیق تر و ارزان تر است و نیز استرس را نمی‌باشد و ظرفیت کاری عضو مشخص می‌شود (۱۱، ۱۲).

۴- روش تهیه و رنگ آمیزی مقاطع هیستوپاتولوژی
به منظور ارزیابی هیستوپاتولوژیک اعصاب سیاتیک، حیوانات در روزهای ۱۴ و ۲۸ و ۴۲ پس از جراحی ابتدا با مخلوط کتامین و زایلازین بی‌هوش و سپس با تزریق داخل صفاقی تاپونتال سدیم (نسدونال) به روش مرگ با ترحم (Euthanasia) معدوم شدند. بلافاصله موضع جراحی باز شده و پس از مشاهده تنه عصب سیاتیک، دو رشته نخ به طور ۱۰ cm از دو طرف ناحیه له شده عصب عبور داده و گره زده شد. از قسمت خلفی گره‌ها، عصب بریده شده و مجموعه نخ‌ها و عصب بر روی اسلاید شیشه‌ای که مسیر عصب از مرکز به محیط بر روی آن با فلش مشخص شده بود، بسته شد. در بر داشتن و بستن عصب به دور اسلاید شیشه‌ای هیچ‌گونه فشاری روی عصب وارد نشد. نمونه‌های تنه عصب سیاتیک در بافر فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد و برای تهیه مقاطع و بررسی ضایعات به آزمایشگاه پاتولوژی تحویل داده شدند.

ایجاد شده ۲-۲/۵ کیلوگرم بر هر میلی مترمربع مساحت محل له‌شدگی ۳-۴ میلی‌متر محاسبه شد. قبل و پس از عمل له کردن عصب سیاتیک، عصب سیاتیک با محلول سالین نرمال استریل شستشو داده شد. پس از باز کردن پنس و مشاهده میزان له‌شدگی عصب سیاتیک، عضلات توسط بخیه سر تا سر و پوست توسط ۳ عدد بخیه ساده تکی توسط نخ کاتکوت شماره ۴ صفر بخیه شدند. روی بخیه‌های پوست اسپری اکسی تتراسیکلین اسپری شد. حیوانات تا به هوش آمدن کامل تحت مراقبت قرار گرفتند.

۳- طریقه انجام آزمون حرکتی شاخص عمل عصب سیاتیک
آزمون حرکتی شاخص عمل عصب سیاتیک در کانال مربوط به بررسی شاخص عمل عصب سیاتیک انجام شد. این کانال از جنس چوب و به ابعاد (ارتفاع) ۵۰ × (عرض) ۷ × (طول) ۶۰ سانتی‌متر ساخته شد. طول ۶۰ سانتی‌متر برای بدست آوردن حداقل ۵-۷ ردپا، عرض ۷ سانتی‌متر برای جلوگیری از دور زدن حیوان در هنگام حرکت و ارتفاع ۵۰ سانتی‌متر برای ایجاد تاریکی

نتیجه این فرمول توسط ۴ مشخصه قابل اندازه گیری است. (هر قسمتی که جای پنجه حک می‌شود را در سمت راست نرمال در نظر گرفته و با N (Normal) نشان می‌دهند که پای شاهد است و در قسمت چپ که روی عصب سیاتیک این قسمت جراحی انجام گرفته را به عنوان پای آزمایش در نظر گرفته و با E (Experimental) نشان می‌دهند شاخص‌های سنجش عبارتند از:

۱- عرض و پهنای پا یا درجه انتشار انگشتان (فاصله میلی‌متری بین انگشت اول و پنجم) که با TS (Toe spread) و در پای نرمال با NTS در پای جراحی شده با ETS نشان داده می‌شود.

۲- طول و درازای پنجه (به صورت میلی‌متری) با PL (Printlength) و در پای نرمال با NPL و در پای سمت چپ با EPL نشان داده می‌شود.

۳- فاصله میلی‌متری بین انگشت دوم تا چهارم را با IT (Internal toe spread) و در پای نرمال با NIT و در پای سمت چپ با EIT نشان داده می‌شود.

۴- فاصله بین پاهای مخالف را نیز با (DOF) نشان می‌دهیم. پس از اندازه‌گیری و بدست آوردن اعداد آن‌ها را در فرمول فوق قرار می‌دهیم و عدد حاصله نتیجه SFI است. نتیجه حاصله برای SFI اگر ۱۰۰- یا کم‌تر باشد یعنی فعالیت عملی به‌طور کامل از بین رفتن است و عددهای ۱۰۰- الی ۱۰- سیر عصب به‌سوی

پس از ۴۸ ساعت و ثبوت نمونه‌ها از اعصاب سیاتیک از ناحیه له شده به صورت طولی و عرضی برش داده شد و با سه روش هماتوکسیلین وائوزین، لوکسول فست بلو و تولوئیدین بلو رنگ آمیزی شدند. قابل ذکر است که به منظور رنگ آمیزی مقاطع عصبی با تولوئیدین بلو پس از معدوم کردن حیوانات مورد نظر، ۲۰ ml از محلول آبی گلو تار آلدهاید (۲/۵ درصد بافری شده (کاکودیلات سدیم ۰/۱ مول، pH=۷/۴) به منظور ثبوت اولیه به صورت دستی به بافت تزریق شد. نیم ساعت بعد اعصاب سیاتیک راست و چپ هر دو به طور کامل قطع شدند و به منظور جلوگیری از چروکیدگی شدن بر روی اسلاید شیشه‌ای گره زده شدند. عموماً به منظور ثبوت دوباره در داخل همان فیکساتیو به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. اعصاب تریم شده (trim) به اندازه ۵mm از آن‌ها به طوری که قسمت ضایعه‌دار در وسط قرار گرفته بود، قطعات مشخص شده عصب، با یک محلول آبی تتروکسید آسمیوم بافری شده (کاکودیلات سدیم ۰/۱ مول، pH=۷/۴) به مدت ۲ ساعت در ۴°C ثبوت ثانویه انجام شد. سپس آن‌ها توسط همان بافر (کاکودیلات سدیم) به مدت ۱ ساعت شستشو شدند و بعد توسط محلول‌های آبی الکل اتیلیک با غلظت‌های صعودی (۲۵درصد، ۳۵درصد، ۵۰درصد، ۷۰درصد، ۷۵درصد، ۸۰درصد و ۹۵درصد) به مدت ۵ دقیقه برای هر محلول الکلی، آگیری شدند سپس به مدت ۱۰ دقیقه در الکل مطلق قرار داده شدند. پس از آگیری قطعات عصب به صورت روتین فرآوری شده و توسط اپوکسی رزین (Poly/Bed 812®, Polysciences Inc.) قالب‌گیری شدند (در ۶°C به مدت ۷۲ ساعت). مقاطع عرضی سریال نیمه نازک (۲µm) که با اولترامیکروتوم جنس (MT6000-XL, RM Inc.) برش داده شدند و توسط تولوئیدین بلو (۱درصد رنگ آمیزی شدند و توسط

نتایج

اثر هیستیدین بر شاخص عمل عصب سیاتیک: جدول شماره ۱ اثر درمان با سالیین نرمال و هیستیدین در مقادیر ۵۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم با ازای یک کیلوگرم وزن بدن را بر شاخص عمل عصب سیاتیک در رت‌های دارای له‌شدگی تجربی در عصب سیاتیک را نشان می‌دهد. شاخص عمل عصب سیاتیک در هر سه گروه قبل از له کردن عصب سیاتیک تفاوت معنی‌داری نشان نداد. در روزهای ۷ و ۱۴ پس از جراحی نیز تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها مشاهده نشد. گروه دریافت کننده هیستیدین در مقدار ۵۰ میلی‌گرم با ازای یک کیلوگرم وزن بدن، اختلاف معنی‌داری را با گروه کنترل نشان نداد. در روزهای ۲۱، ۲۸، ۳۵ و ۴۲ پس از جراحی در گروه دریافت کننده هیستیدین در مقدار ۴۰۰ میلی‌گرم با ازای یک کیلوگرم وزن بدن نسبت به گروه کنترل (دریافت کننده سالیین نرمال) کاهش معنی‌دار ($p < 0.05$) در شاخص عمل عصب سیاتیک مشاهده شد. در گروه دریافت کننده هیستیدین در مقدار ۴۰۰ میلی‌گرم با ازای یک کیلوگرم وزن بدن در روزهای ۳۵ و ۴۲ پس از له کردن عصب سیاتیک، تفاوت معنی‌داری با روز ۷ قبل از له کردن عصب سیاتیک مشاهده نشد.

جدول شماره (۱): ارتباط تزریق داخل صفاقی هیستیدین به مدت ۷ روز و شاخص عمل عصب سیاتیک له شده

روز گروه	-۷	+۷	+۱۴	+۲۱	+۲۸	+۳۵	+۴۲
NS	+۵/۵±۲/۳	-۸۴/۶* ± ۵/۹	-۶۱/۲* ± ۶/۱	-۵۵/۸* ± ۴/۶	-۴۶/۳* ± ۴/۳	-۲۸/۶* ± ۳/۲	-۲۰/۸* ± ۳/۰
His 50	-۴/۸±۱/۹	-۷۰/۴* ± ۶/۴	-۵۱/۳* ± ۵/۲	-۴۵/۶* ± ۷/۳	-۴۱/۲* ± ۵/۴	-۳۰/۴* ± ۳/۶	-۲۱/۸* ± ۴/۲
His 400	۱۰/۴±۳/۶ -	-۴۷/۶* ± ۴/۸	-۴۷/۶* ± ۴/۸	-۳۳/۸** ± ۵/۲	-۲۹/۹** ± ۶/۱	-۱۸* ± ۲/۳	-۹/۶* ± ۱/۹

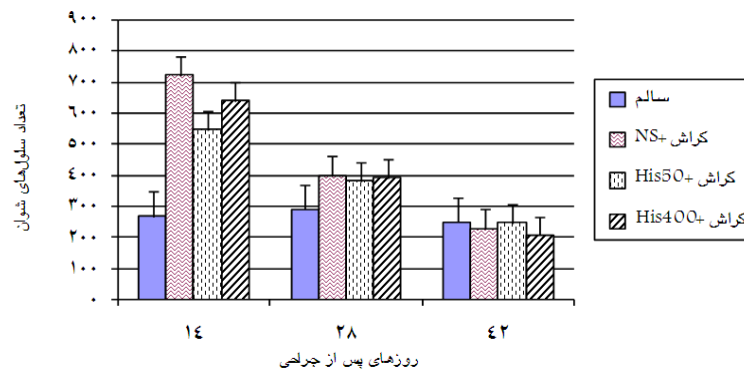
* نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0.05$ با روز ۷- می‌باشد.

** نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0.05$ با گروه دریافت کننده سالیین نرمال می‌باشد. تعداد حیوان در هر گروه به ۶ سر

موش صحرایی

داخل صفاقی هیستیدین در مقادیر ۵۰ و ۴۰۰ میلی گرم با ازای یک کیلوگرم وزن بدن به مدت ۷ روز، بر روی افزایش تعداد سلول‌های شوان ناشی از له کردن عصب سیاتیک به طور معنی دار اثر نگذاشت. در گروه‌های دارای له‌شدگی تجربی عصب سیاتیک درمان شده با سالیین نرمال و هیستیدین در مقادیر ۵۰ و ۴۰۰ میلی گرم با ازای یک کیلوگرم وزن بدن، در تعداد سلول‌های شوان در روزهای ۲۸ و ۴۲ نسبت به روز ۱۴، کاهش معنی دار ($p < 0.05$) مشاهده شد.

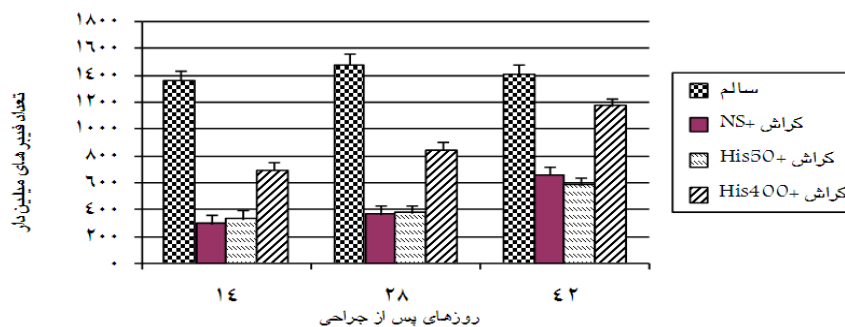
اثر هیستیدین بر تعداد سلول‌های شوان عصب سیاتیک: نمودار شماره ۱ اثر هیستیدین بر تعداد سلول‌های شوان را در مقاطع بافتی عصب سیاتیک دارای ضایعه تجربی له‌شدگی نشان می‌دهد. در مقاطع بافتی گرفته شده از حیوانات سالم، تعداد سلول‌های شوان در روزهای ۱۴، ۲۸ و ۴۲ تفاوت معنی‌داری نشان ندادند. در مقاطع بافتی گرفته شده از حیوانات دارای ضایعه له‌شدگی در عصب سیاتیک به دنبال تزریق داخل صفاقی سالیین نرمال، در روزهای ۱۴ و ۲۸ و در روز ۴۲ نسبت به گروه سالم افزایش معنی‌دار در تعداد سلول‌های شوان مشاهده گردید. تزریق



نمودار شماره (۱): اثر تزریق داخل صفاقی هیستیدین بر تعداد سلول‌های شوان در عصب سیاتیک له شده

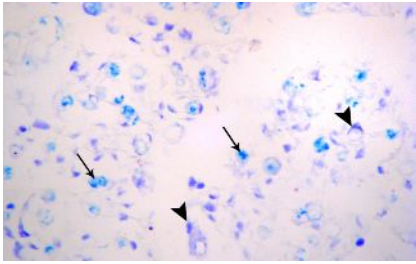
در تعداد فیبرهای عصبی میلین دار، کاهش معنی دار ($p < 0.05$) نسبت به گروه سالم در روزهای ۱۴ و ۲۸ و ۴۲ و افزایش معنی دار ($p < 0.05$) در روز ۴۲ نسبت به روزهای ۱۴ و ۲۸ مشاهده گردید. در حیوانات دارای له‌شدگی تجربی عصب سیاتیک و درمان شده با هیستیدین در مقدار ۴۰۰ میلی گرم با ازای یک کیلوگرم وزن بدن، در روزهای ۱۴ و ۲۸ در مقایسه با گروه‌های سالم، دارای له‌شدگی عصب سیاتیک درمان شده با سالیین نرمال و با هیستیدین ۵۰ میلی گرم با ازای یک کیلوگرم وزن بدن، افزایش معنی دار ($p < 0.05$) بروز کرد. در گروه دریافت کننده هیستیدین در مقدار ۴۰۰ میلی گرم با ازای یک کیلوگرم وزن بدن، در تعداد فیبرهای میلین دار در روز ۴۲ نسبت به روزهای ۱۴ و ۲۸ افزایش معنی دار ($p < 0.05$) ایجاد شد.

اثر هیستیدین بر تعداد فیبرهای میلین دار در عصب سیاتیک: نمودار شماره ۲ اثر هیستیدین بر تعداد فیبرهای میلین دار را در مقاطع بافتی عصب سیاتیک دارای ضایعه تجربی له‌شدگی نشان می‌دهد. در مقاطع عصبی گرفته شده از حیوانات سالم، تعداد فیبرهای میلین دار در روزهای ۱۴، ۲۸ و ۴۲ تفاوت معنی‌داری نشان ندادند. در حیوانات دارای له‌شدگی تجربی در عصب سیاتیک و درمان شده با سالیین نرمال، کاهش معنی دار ($p < 0.05$) در تعداد فیبرهای میلین دار نسبت به گروه سالم در روزهای ۱۴، ۲۸ و ۴۲ مشاهده شد. در این گروه، تعداد فیبرهای میلین دار در روز ۴۲ نسبت به روزهای ۱۴ و ۲۸ افزایش معنی دار ($p < 0.05$) را نشان داد. در گروه دارای له‌شدگی در عصب سیاتیک و درمان شده با هیستیدین در مقدار ۵۰ میلی گرم با ازای یک کیلوگرم وزن بدن،

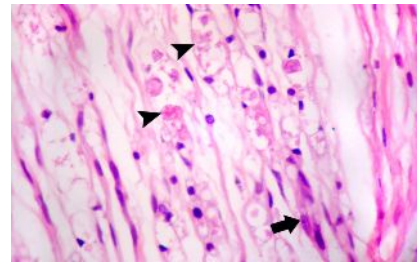


نمودار شماره (۲): اثر تزریق داخل صفاقی هیستیدین بر تعداد فیبرهای میلین دار عصب

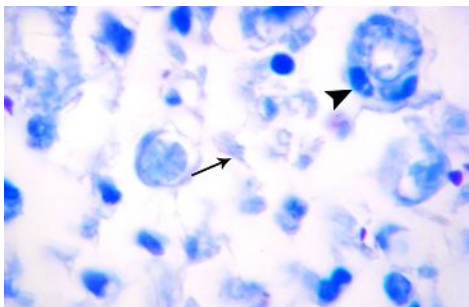
اشکال هیستوپاتولوژی:



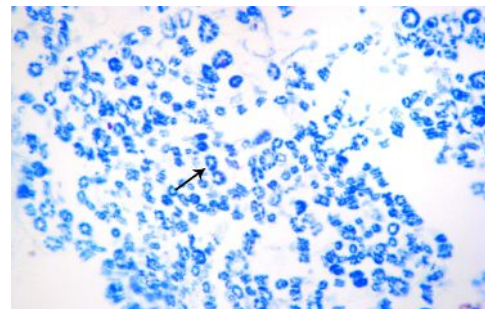
شکل شماره (۲): مقطع عرضی عصب سیاتیک له شده. از بین رفتن غلاف میلین اکثر آکسون‌ها و عدم رنگ پذیری آن‌ها. رنگ پذیری تعداد اندکی از فیبرهای میلینه (پیکان) و افزایش تعداد سلول‌های شوان (سر پیکان)؛ رنگ آمیزی (Luxol Fast Blue) بزرگ‌نمایی X۱۳۲۰



شکل شماره (۱): مقطع طولی عصب سیاتیک له شده در روز ۱۴. دژتراسیون والرین شدید. افزایش تعداد سلول‌های شوان و آرایش آن‌ها به صورت نوارهای بانگتر (پیکان ضخیم). اجسام ائوزینوفیلیک که نشانه ارگانل‌های دژتره شده هستند (سر پیکان)؛ رنگ آمیزی (H&E) بزرگ‌نمایی X۱۱۲۰



شکل شماره (۴): مقطع عرضی عصب سیاتیک له شده در روز ۱۴. تخریب اکثر فیبرهای عصبی میلینه و باقی مانده بقایای آن‌ها (پیکان). افزایش سلول‌های شوان (سر پیکان)؛ رنگ آمیزی (Toluidine blue) بزرگ‌نمایی X۴۰۰۰



شکل شماره (۳): افزایش تعداد فیبرهای عصبی میلینه (پیکان) در عصب سیاتیک له شده و دریافت کننده هیستیدین به مقدار ۴۰۰ mg/kg در روز ۴۲؛ رنگ آمیزی (Luxol Fast Blue) بزرگ‌نمایی X۱۳۲۰

بحث و نتیجه گیری

بالاخره در روز ۴۲ به $3 \pm 20/8$ - رسید که نشان می‌دهد بدون دخالت هیچ نوع عامل خارجی، شاخص عمل عصب سیاتیک در دراز مدت (۲-۳ ماه)، بسته به شدت ضایعه، به حالت تقریباً قبل از ضایعه بر می‌گردد. به این موضوع در تحقیق Swett و همکاران (۱۹۹۱) که از آزمون SFI برای بررسی میزان بازگشت عمل عصب سیاتیک استفاده کرده‌اند، اشاره شده است. یافته‌های مطالعه حاضر

از آزمون شاخص عمل عصب سیاتیک (آزمون SFI) در انواع مختلف ایجاد ضایعه تجربی در عصب سیاتیک به منظور بررسی میزان بهبودی عملی عصب سیاتیک استفاده شده است (۱۳). در مطالعه حاضر در روز ۷ پس از ایجاد ضایعه شاخص عمل عصب سیاتیک $9 \pm 5/84$ - به دست آمد و در روز ۲۸ به $3 \pm 4/46$ - و

در استفاده از تست SFI برای ارزیابی بازگشت عمل عصب سیاتیک با یافته‌های سایر محققان هم‌خوانی دارد (۱۵،۱۴،۱۲،۱۰). دژنراسیون آکسونی باید کنترل شده باشد. باقی ماندن نوار سلول‌های شوان و فیبروز اندونوریال معمولاً وجود دارد. ترمیم ناموفق می‌تواند منجر به ایجاد یک توده در هم پیچیده از نوریت‌ها، سلول‌های شوان و فیبروسیت‌ها در محل ضایعه شود که این امر بعد از قطع عصب در صورتی که فاصله جدایی انتهایی رشته عصبی خیلی زیاد باشد، اتفاق خواهد افتاد (۱۶). در تحقیق حاضر که له‌شدگی عصب سیاتیک انجام گرفت، افزایش سلول‌های شوان تا مقطعی بعد از له‌شدگی (روز ۱۴) صورت گرفت ولی در روزهای آتی افزایش مشاهده نشد و نیز گره‌های ناشی از تجمع سلول‌های شوان و فیبروسیت‌ها مشاهده نشد. عملکرد سلول‌های شوان دیستال به عنوان پیش برنده ترمیم عصبی به خوبی مشخص شده است و نیز نقش آن‌ها در تولید برخی از فاکتورهای نوروتروفیک که باعث بقای نورون‌های صدمه دیده می‌شوند، ثابت شده است ولی با این حال عنوان شده است، رملیناسیون و غلاف‌دار شدن آکسون‌های ترمیم شده به طور طبیعی در فقدان تزیاید سلول‌های شوان دیستال اتفاق می‌افتد (۱۷). نتایج مطالعه حاضر با این نتایج هم‌خوانی دارد که سلول‌های شوان در مقاطعی از له‌شدگی عصب و نیز تجویز هیستیدین به موش‌های دارای له‌شدگی افزایش می‌یابد که این امر به دلیل پیشبرد امر ترمیم و تولید فاکتورهای نوروتروفیک می‌باشد که پس از افزایش کنترل شده این سلول‌ها، مجدداً تعداد سلول‌های شوان کاهش می‌یابد تا به تعداد عادی خود برسد هرچند که در بعضی مقاطع عصبی این تعداد به حد طبیعی خود نرسید. ولی تنها این فاکتور به منظور بررسی میزان ترمیم کافی نیست و به همین دلیل علاوه بر آن تغییرات تعداد فیبرهای عصبی میلینه نیز که فاکتور قوی‌تری برای بررسی ترمیم است بررسی شد. همچنین تحقیقات نشان داده، تفاوت درجات مختلف ترمیم عصبی که بعد از جراحات له‌شدگی عصب مشاهده می‌شود با قطع شدن عصب، مربوط به باقی ماندن سلول‌های شوان، غشاء پایه و پری نوریوم است که در له‌شدگی هر چند شدید هم باشد، این امر باعث تسهیل در امر ترمیم می‌شود (۱۸). در مطالعه حاضر نیز با این‌که تعداد سلول‌های شوان در روزهای ۱۴ و ۲۸ در موش‌های دارای ضایعه له‌شدگی عصب که در آن‌ها تزریق داخل صفاقی سالیین نرمال صورت گرفت، افزایش یافت ولی تزریق داخل صفاقی هیستیدین در مقادیر ۵۰ و ۴۰۰ mg/kg به مدت ۷ روز در حیوانات دارای له‌شدگی عصب سیاتیک باعث افزایش معنی‌دار تعداد سلول‌های شوان نشد. ولی غشاء‌های پایه‌ای و پری نوریوم در آن‌ها باقی ماند که موارد اخیر احتمال دارد در روند ترمیم نقش مثبت داشته باشند. در مطالعه دیگری که توسط دستگاه

(Universal testing machine) و با وزنه‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ گرم به مدت ۱۰ دقیقه عصب سیاتیک موش صحرایی له شد، مشاهدات میکروسکوپی در اعصاب سیاتیک له شده شامل هماتوم‌های داخلی - سلول‌های التهابی، فیبرهای عصبی و آکسون‌های آسیب دیده و سلول‌های کف آلود بود و نیز دیستروفی فیبرهای عصبی میلینه و غیرمیلینه نیز مشاهده شد (۲۰). نتایج این مطالعه با تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد چرا که در مطالعه حاضر نیز یافته‌های میکروسکوپی در مقاطع طولی و عرضی اعصاب سیاتیک له شده مثل خون‌ریزی در اپی نوریوم، دژنراسیون والرین، نفوذ سلول‌های التهابی، سلول‌های کف آلود و دیستروفی فیبرهای عصبی مشاهده شد که میزان دژنراسیون آکسونی در گروه با له‌شدگی عصب در روز ۱۴ به صورت شدید پرخونی متوسط و خون‌ریزی در اپی نوریوم و نفوذ سلول‌های التهابی متوسط بود. در موش‌های با له‌شدگی متوسط و خون‌ریزی شدید در اپی نوریوم و نفوذ سلول‌های التهابی متوسط بود. در موش‌های با له‌شدگی و دریافت کننده هیستیدین ۵۰ mg/kg در روز ۴۲ نسبت به روزهای ۱۴ و ۲۸، دژنراسیون جزئی، و پرخونی جزئی، عدم خون‌ریزی، نفوذ جزئی سلول‌های التهابی مشاهده شد که مشابه نتایج موش‌های دارای له‌شدگی عصب سیاتیک و دریافت کننده هیستیدین ۴۰۰ mg/kg در روز ۴۲ بود. براساس نتایج بدست آمده به طور کامل مشخص می‌شود که در ضایعه له‌شدگی عصب سیاتیک یک بازگشت طبیعی عمل عصب سیاتیک ایجاد می‌شود تغییرات رفتاری به طرف بهبودی مشاهده شده در مطالعه حاضر با تغییرات هیستوپاتولوژیک یافت شده در مطالعه حاضر مثل افزایش تعداد فیبرهای میلین دار قابل توجه می‌باشد به عبارت دیگر با تغییرات هیستوپاتولوژیک تغییرات رفتاری تایید می‌گردد. عصب سیاتیک دارای فیبرهای عصبی میلین دار و بدون میلین می‌باشد. فیبرهای حسی عصب سیاتیک به منظور انتقال پیام‌های حسی از قسمت‌های مختلف اندام خلفی را به مراکز بالاتر و فیبرهای حرکتی آن به منظور انتقال پیام‌های حرکتی از مراکز بالاتر به قسمت‌های مختلف اندام حرکتی خلفی عمل می‌کنند. به دنبال ایجاد ضایعه در عصب سیاتیک کار هر دو سیستم‌های حسی و حرکتی آن به هم خورده و بر روی اعمال رفتاری اثر می‌گذارد (۲۰، ۱۳). ذکر این نکته لازم است که اگرچه هیستیدین پیش ساز هیستامین است و هیستامین به عنوان یک واسطه بسیار مهم التهاب محسوب شده است (۲۱). اثرات ایجاد شده در مطالعه حاضر نمی‌تواند به علت هیستامین باشد چون برای تبدیل هیستیدین به هیستامین آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز ضروری است. ولی تا به حال در رژنراسیون عصبی گزارشی دال بر فعال شدن آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز ارائه نشده است. از طرف

به عنوان یک حفاظت کننده عصبی و ضد مسمومیت با تحریک نوروترنسمیترهای تحریکی مثل گلوتامات مورد بررسی قرار بگیرد (۲۵). براساس نتایج مطالعه حاضر در ارتباط با ارزیابی رفتاری و هیستوپاتولوژیک دژنراسیون عصبی ناشی از له کردن تجربی عصب سیاتیک در موش‌های صحرایی و اثر هیستیدین بر ترمیم عصبی می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که شاخص عمل عصب سیاتیک آزمون مناسبی برای ارزیابی رفتاری ترمیم عصبی می‌باشد. همچنین هیستیدین با اثر افزایش دهنده بر تعداد فیبرهای عصبی میلین‌دار توانسته است موجب بهبودی عملی عصب سیاتیک شود. در رابطه با اثرات جانبی مضر هیستیدین گزارشی نشده است. اما مقادیر خیلی بالای آن احتمال دارد منجر به استرس و اختلالات ذهنی و اضطراب شود و در افرادی که اسکیزوفرنی داشته‌اند مقادیر بالای هیستیدین یافت شده است. پیشنهاد می‌شود برای تاثیر هر چه بیشتر هیستیدین و استفاده از آن در جراحات تروماتیک اعصاب محیطی انسان بخصوص عصب سیاتیک دامنه مقادیر تبدیل هیستیدین به هیستامین در انسان نیز مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با مساعدت مالی حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه به انجام رسیده است که بدین‌وسیله از آن معاونت محترم تشکر و قدردانی می‌شود.

دیگر برای تبدیل هیستیدین به هیستامین، مقادیر زیادی از هیستیدین لازم است. این مقدار در موش‌های صحرایی بالای ۵۰۰ میلی‌گرم به ازای یک کیلوگرم وزن بدن و در موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی بالای ۸۰۰ میلی‌گرم به ازای یک کیلوگرم وزن بدن گزارش شده است (۲۲). همچنین اگر قرار بر این باشد که در همه موارد هیستیدین به هیستامین تبدیل شود و اثرات هیستامین ایجاد شود خوردن مواد غذایی دارای هیستیدین مثل جگر، تخم مرغ و ماهی اصولاً باید با شوک آنافیلاکسی، اثرات ناخواسته هیستامین همراه باشد. تا به حال هیچ‌گونه گزارشی دال بر اثر مستقیم هیستیدین بر ترمیم عصبی ارائه نشده است ولی در یک مدل از تورم عصبی ناشی از آلرژی در خرگوش، میزان اسید آمینه هیستیدین در عقده ریشه پشتی افزایش یافته است و مطرح کرده‌اند که این اسید آمینه در متابولیسم، پروتئینی به منظور ایجاد واکنش در مقابل ضایعات آکسون‌های محیطی وارد عمل می‌شود (۲۳). در نورون‌های حسی دریافت کننده اطلاعات حسی از فیبرهای عصبی نوع C (فیبرهای عصبی مستقل کننده درد)، به دنبال ایجاد ضایعه شیمیایی توسط کاپسایسین در عصب سیاتیک، بیان ژن مربوط به پپتید هیستیدین - ایزولوسین افزایش می‌یابد (۲۴). کارنوزین اسید آمینه پیش ساز هیستیدین می‌باشد و از بتا - آلانین و L-هیستیدین تشکیل شده است. کارنوزین اثر حفاظت عصبی به صورت جلوگیری از مرگ سلول‌های فنوکروموسیتوم (PC12) ناشی از مسمومیت با N-متیل-D-آسپاراتات ایجاد کرده است و مطرح کرده‌اند که کارنوزین می‌تواند

References:

1. Wada AM, Tucker HN. Antioxidant characteristics of L-histidine. *J Nutr Biochem* 1998; 9: 308-15.
2. Ikeda Y, Mochizuki Y, Matsumoto H, Nakamura Y, Dohi K, Jimbo H. L-histidine but not D-histidine attenuates brain edema following cryogenic surgery in rats. *Acta Neurochir Suppl* 2000; 76:195-7.
3. Steinhauer HB, Jakisch R, Scholmeyer P. Modification of prostaglandin generation by L-histidine: possible pathogenic implication in rheumatoid arthritis. *Prosta Leukotr Med* 1984; 13: 211-16.
4. Son DO, Satsu H, Shimizu M. Histidine inhibits oxidative stress and TNF-alpha-induced interleukin-8 secretion in intestinal cells. *FEBS Lett* 2005; 579: 4671-7.
5. Lee YT, Hsu CC, Lin MH, Liu KS, Yin MC. Histidine and carnosine delay diabetic deterioration in mice and protect human low density lipoprotein against oxidation and glycation. *Eur J Pharmacol* 2005; 513: 145-50.
6. Tamaddonfard E, Rahimi S. Central effect of histamine and peripheral effect of histidine on the formalin- induced pain response in mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004; 31: 518-22.
7. Lowden IM, Seaber AV, Urbaniak JR. An improved method of recording rat tracks for measurements of the sciatic functional index of De Medinaceli. *J Neurosci Meth* 1998; 24: 279-81.

8. Varejao SA, Melo-Pinto P, Meek MF, Filipe VM, Bulas-Cruz J. Methods for the experimental functional assessment of rat sciatic nerve regeneration. *Neurol Res* 2004; 26: 186-94.
9. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg* 1989; 83: 129-36.
10. Swett JE, Hong CZ, Miller P. All peroneal motoneurons of the rat survive crush injury but some fail to reinnervate their original targets. *J Comp Neurol* 1991; 304: 234-52.
11. Johnston RB, Zachary L, Dellon AL, Seiler WA, Teplica DN. Improved imaging of rat hind footprints for walking track analysis. *J Neurosci Meth* 1991; 38: 111-14
12. Chen S, Bisby MA. Impaired motor axon regeneration in the C57BL/Ola mouse. *J Comp Neurol* 1983; 333: 449-54.
13. Varejao SA, Meek MF, Ferreira AJ, Patricio JA, Cabrita AM. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *J Neurosci Meth* 2001; 108: 1-9.
14. AL-Bisbri A, Dablin L, Sunzel B, Rosenquist J. Systemic betamethasone accelerates functional recovery after a crush injury to rat sciatic nerve. *J Oral Maxill Surg* 2005; 63: 973-7.
15. Welch JA, Kraus KH, Wells D, Blundt MR, Weremowitz J. Effect of combined administration of insulin-like growth factor and platelet-derived growth factor on the regeneration of transected and anastomosed sciatic nerve in rats. *Am J Vet Res* 1997; 58: 1033-7.
16. Maxie M, Youssef S. Nervous system. In: Jubb KV, Kennedy CP, Palmer CN, Editors. *Pathology of domestic animals*. 5th Ed. Edinburgh: Saunders Elsevier Pub; 2007. P.287-9.
17. Yang DP, Zhang DP, Mak KS, Bonder DE, Pomeroy SL, Kim HA. Schwann cell proliferation during wallerian degeneration is not necessary for regeneration and remyelination of the peripheral nerves: axon-dependent removal of newly generated Schwann cells by apoptosis. *Mol Cell Neurosci* 2008; 38: 80-8.
18. Johnson EO, Zoubos AB, Soucacos PN. Regeneration and repair of peripheral nerves. *Injury* 2005; 36S: S24-9.
19. Mazzer PY, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VP. Morphologic and morphometric evaluation of experimental acute crush injuries of the sciatic nerve of rats. *J Neurosci Meth* 2008; 173: 249-58.
20. Schmalbrush H. Loss of sensory neurons after sciatic nerve section in rats. *Anat Rec* 1987; 219: 323-9.
21. McGlashan JD. Histamine: a mediator of inflammation. *J Allergy Clin Immun* 2003; 112: 53-9.
22. Malmberg-Aiello P, Lamberti C, Ghelardini C, Giotti A, Bartolini A. Role of histamine in rodent antinociception. *Br J Pharmacol* 1994; 111: 1269-79.
23. Molnar GK, Korpi ER, Kalimo H. Amino acid and protein metabolism in dorsal root ganglia of rabbits with experimental allergic neuritis. *Neurochem Path* 1985; 3: 181-93.
24. Jancso G. Pathobiological reactions of C-fibre primary sensory neurones to peripheral nerve injury. *Exp Physiol* 1992; 77: 405-31.
25. Shen Y, Fan Y, Dai H, Fu Q, Hu W, Chen Z. Neuroprotective effect of carnosine on neurotic cell death in PC12 cells. *Neurosci Lett* 2007; 414: 145-9.