اثر عصاره آبی گیاه آلوئه‌ورا در بیان سیناپتوفیزین پس از ضایعه فشاری طناب نخاعی در موش صحرایی بالغ

مرجان حشمتی[1]*، محمدرضا جلالی ندوشن[2]، الهام انتظاری[3]، زهره خداشناس[4]

1 - استادیار، گروه علوم تشریح و پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران

2 - استاد، گروه علوم تشریح و پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران

3 - دانش‌آموخته پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران

*آدرس مکاتبه: تهران، بلوار کشاورز، خیابان شهید عبدالله‌زاده، دانشکده پزشکی شاهد، گروه علوم تشریح و پاتولوژی، تلفن: 88964792 (021) داخلی 241، نمابر: 88966310 (021)

پست الکترونیک: heshmati@shahed.ac.ir

تاریخ دریافت: 91/6/18 **تاریخ تصویب:** 91/11/8

چکیده

مقدمه: صدمات طناب نخاعی یکی از عوامل ایجاد معلولیت است که امروزه یکی از آرزوهای جامعه پزشکی یافتن راهی برای به حداقل رساندن این عوارض می‌باشد.

هدف: تأثیر عصاره آبی گیاه آلوئه‌ورا یا صبرزرد را در حفظ سلول‌های عصبی حرکتی و انتقال پیام عصبی در موش‌های صحرایی فلج شده.

روش بررسی: 32 موش صحرایی ماده از انسیتو رازی استفاده شد. به طور تصادفی به 4 گروه تقسیم شدند: 1 - گروه کنترل 2 - گروه تحت تیمار با عصاره آبی آلوئه‌ورا 3 - گروه تحت تیمار با عصاره آبی آلوئه‌ورا + فشار مکانیکیکلیپس آنوریسم بر نخاع 4 - گروه کنترل + فشار مکانیکی کلیپس آنوریسم بر نخاع. تزریقات داخل صفاقی روزانه به مدت 4 هفته ادامه یافت. عصاره آبی آلوئه‌ورا نیز با دوز 2/5 میلی‌گرم / کیلوگرم تهیه شد.

نتایج: فشار مکانیکی بر طناب نخاعی سبب کاهش سلول‌های عصبی حرکتی شاخ قدامی به مراه حفره شد. در گروه دوم این تغییرات کمتر مشاهده شد ($p<0/05$). تأثیر عصاره سبب افزایش سیناپتوفیزین در الگوی کامل و نقطه‌ای شد ($p<0/05$).

نتیجه‌گیری: برای اولین بار تأثیر عصاره آلوئه‌ورا در چگونگی انتقال پیام عصبی مشخص شد. به طوری‌که موجب افزایش تعداد و درصد سلول‌های عصبی حرکتی و همچنین افزایش سیناپتوفیزین در الگوی کامل و نقطه‌ای شد.

گل‌واژگان: آلوئه‌ورا، سیناپتوفیزین، ضایعات طناب نخاعی

مقدمه

در بررسی به عمل آمده در ایران تصادفات و ترومای حاد عامل بسیاری از مرگ و میرها است. متأسفانه آمار دقیقی از میزان صدمات نخاعی به دنبال تصادف در کشور وجود ندارد. از آنجایی‌که آمار تصادفات رانندگی بسیار بالاست، احتمال آن می‌رود که آمار صدمات نخاعی و قطع نخاع نیز زیاد باشد. با توجه به اهمیت موضوع توجه تعداد زیادی از محققین و مراکز تحقیقاتی کشور به این مسأله معطوف شده است که مطالعات پایه‌ای متعدد و متنوعی در زمینه ضایعات نخاعی با در نظر گرفتن ابعاد مختلف آن طرح‌ریزی شود.

جهت بررسی صدمات مکانیکی از روش تجربی فشار به روی نخاع حیوانات آزمایشگاهی نظیر موش صحرایی استفاده می‌شود که ابتدا باید با استفاده از جراحی لامنیکتومی طناب نخاعی در معرض دید قرار گرفته و ضایعه طناب نخاعی صورت گیرد. این روش برای اولین بار توسط کاتوه (Katoh) و همکاران توضیح داده شد [1].

به دنبال صدماتی نظیر اختلالات خود ایمنی سرطان بیماری آلزایمر و پارکینسون مرگ برنامه‌ریزی شده سلول یا مرگ آپوپتوتیک رخ می‌دهد لازم به ذکر است که این مرگ سلولی در طول دوران تکوین در تمام موجودات زنده رخ می‌دهد و سپس فروکش می‌کند. مجدداً در هنگام بیماری یا صدمات محیطی فعال می‌شود. به طوری‌که کِر (Kerr) در سال 1972 در طی دوران تکوین سلول‌های خاص پدیده فیزیولوژیکی مرگ را توضیح داد که با مرگ منتج از عوامل پاتولوژیکی فرق می‌کند این مرگ به دنبال برنامه از پیش طراحی شده مشخص و منظمی رخ می‌دهد که همان مرگ آپوپتیک است [2].

پاره‌ای از مواد شیمیایی و آسیب عصب موجب فعال شدن تعدادی از رادیکال‌های آزاد می‌شود و به دنبال آن کنش و واکنش درون سلولی است که در نهایت موجب بروز تغییرات در طیف وسیعی می‌شود. بررسی‌های انجام شده در سیستم عصبی پستانداران نشان می‌دهد که به دنبال فشار و ضربه روی سلول عصبی در مراحل تکوین و بعد از تولد سلول‌های عصبی مربوطه دچار مرگ سلولی با درجات مختلفی می‌شوند که این درجات وابسته به شدت فشار، محل آسیب، نوع سلول عصبی و محل قرار گرفتن آن در سیستم عصبی و سن حیوان دارد [3]. ارتباطات بین سلولی به کمک انتقال پیام شیمیایی و الکتریکی انجام می‌شود. اصطلاح سیناپس به معنی اتصال برای ارتباطات سلول عصبی است. مطالعات در این زمینه توسط محققین ادامه یافت تا در سال 1955 گرای (Gray) بررسی دقیق‌تری از سلول‌های شاخ قدامی نخاع و سیناپس‌های آن را ارائه کرد [4].

با پیشرفت علم اعصاب نقش واسطه‌های شیمیایی نیز مشخص شد. این واسطه‌ها درون وزیکول‌های سیناپسی قرار دارند. در هنگام انتقال پیام عصبی غشای وزیکول‌ها با غشای پیش سیناپسی ادغام شده و تخلیه واسطه‌ها را به درون فضای سیناپسی امکان‌پذیر می‌سازند. در ادامه مطالعات ساختمان غشای وزیکول‌های سیناپسی نیز مشخص شد. از اجزای اصلی غشا پروتئین‌هایی نظیر سیناپتوفیزین سیناپتو پورین و سیناپتو بروین است و امروزه مشخص شده سلول‌های عصبی برای زنده ماندن نیازمند دریافت سیگنال‌های منظم هستند. در صورت کاهش یا حذف این پیام‌ها سلول‌ها می‌میرند [5].

با توجه به گسترش روزافزون استفاده از داروهای گیاهی و طبیعی به جای مواد ساخته شده شیمیایی محققین علوم اعصاب نیز به این امر توجه کرده و بخش وسیعی از مطالعات خود را با رویکردی جدید در جهت استفاده از این مواد طبیعی ارائه می‌کنند.

با توجه به این نکته که مرگ سلولی ناشی از وقوع اختلالات در ارتباطات سلولی و تغییر در نوع و میزان حضور واسطه‌های شیمیایی است. بر آن شدیم این رویکرد را با هدف بررسی عصاره آبی گیاه آلوئه‌ورا در بیان سیناپتوفیزین پس از ضایعه فشاری طناب نخاعی در موش صحرایی بالغ انجام دهیم، تا بتوانیم راهکارهای مناسب‌تری برای درمان یا کاهش عوارض ناشی از ضایعات نخاعی به ارمغان بیاوریم.

مواد و روش‌ها

از موش‌های صحرایی بالغ ماده به وزن 300 - 250 گرم از انسیتیو رازی حصارک کرج تهیه می‌کنیم. تعداد 24 عدد موش را خریده و آنها را به طور تصادفی در 4 گروه به تعداد مساوی تقسیم می‌کنیم. یعنی در هر گروه 6 حیوان قرار می‌گیرد.

تمامی موش‌ها به مدت 1 هفته تحت تغذیه جهت تطابق با محیط آزمایشگاهی جدید در شرایط استاندارد 12 ساعت روشنایی و 12 ساعت تاریکی و دمای 23 - 22 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. همهٔ موش‌های صحرایی با غذای مخصوص پلیت از شرکت خوراک دام پارس و آب به صورت دسترسی آزاد تغذیه شدند. محل نگهداری حیوان‌خانه دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد درنظر گرفته شد و بر روی هر قفس برچسبی جهت مشخص کردن تاریخ خرید، گروه مربوطه، تاریخ عمل جراحی لامنیکتومی و تاریخ کشتن نصب شد. عمل لامینکتومی مهره‌های نهم تا یازدهم پشتی یعنی بالاتر از محل تشکیل شبکه کمری انجام شد. تمام مراحل تحقیق با توجه به رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه شاهد انجام شد.

گروه‌های آزمایش: گروه‌های آزمایشی بدین شرح بودند:

گروه الف - گروه کنترل سالم که تنها تزریق روزانه داخل صفاقی سرم فیزیولوژی.

گروه ب - گروه تحت تیمار با عصاره آبی آلوئه‌ورا 2/5 میلی‌گرم / کیلوگرم به صورت تزریق روزانه داخل صفاقی.

گروه ج - گروه تحت تیمار با عصاره آبی آلوئه‌ورا 2/5 میلی‌گرم/کیلوگرم به صورت تزریق روزانه داخل صفاقی + فشار مکانیکی به نخاع (30 گرم بر واحد سطح به مدت 1 دقیقه).

گروه د - گروهی که تزریق روزانه داخل صفاقی سرم فیزیولوژی (دو دهم سی‌سی) + فشار مکانیکی به نخاع (30 گرم بر واحد سطح به مدت 1 دقیقه).

روش تهیه عصاره آبی آلوئه‌ورا

بر اساس روشی که در مقاله فرح‌نژاد و همکاران (2011) توصیف شده بود، تهیه شد. به طوری که فیله برگ گیاه آلوئه‌ورا را استخراج دستی کرده، پودر خشک از آن تهیه شد. سپس رقت‌های مختلف از آن با محلول آب مقطر به دست آمد. لازم به ذکر است که به منظور جدا کردن اجزای غیرقابل حل با دوز 14000 به مدت 15 دقیقه سانتریفوژ انجام و از فیلتر Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Device (ACFD, Germany) عبور داده شد. محلول استریل به دست آمده که به صورت محلول شفاف زردرنگی است داخل سرنگ انسولین تا زمان مصرف در دمای 4 درجه در محیط یخچال نگهداری شد [6].

روش انجام کار

پس از گذشت یک هفته از زمان خرید موش‌ها تمام موش‌ها وزن شدند. موش‌ها با وزنی در محدوده 250 - 300 گرم جهت ادامه مراحل کار تحقیق در داخل قفس‌هایی به صورت مجزا از هم قرار گرفتند. در صورت کمتر یا بیشتر بودن از وزن استاندارد موش‌های مزبور حذف و موش‌های جدید جایگزین شدند. در هر گروه 6 حیوان قرار گرفت که 3 حیوان برای مطالعات مرفولوژیک و شمارش سلولی، 3 حیوان برای مطالعات ایمنوهیستوشیمیایی در نظر گرفته شد.

روش جراحی

ابتدا موش‌ها با تزریق داخل صفاقی 25 - 20 واحد سرنگ انسولین از محلول ترکیبی کتامین (به میزان 2 سی‌سی) و گزیلایزین (به میزان 1/25 سی‌سی) بیهوش عمیق شده با شمارش دنده‌های موش مهره 13 پشتی مشخص ولامینکتومی مهره‌های T9-T11 انجام شد [7].

پس از روئیت نخاع گیره کلیپس آنوریسم را در طرفین طناب نخاعی به مدت 1 دقیقه قرار دادیم. سپس محل‌های برش زده شده یعنی عضلات، فاسیا و پوست را به ترتیب با نخ 6 - 0 و 3 - 0 بخیه کردیم و تزریق داخل صفاقی آنتی‌بیوتیک سفازولین به میزان 2 واحد از سرنگ انسولین جهت جلوگیری از عفونت مثانه انجام شد.

گاهی جهت کاهش خونریزی تزریق سرم لاکتات دامپزشکی به میزان 8 - 5 میلی‌لیتر/سی‌سی انجام شد. تزریق روزانه داخل صفاقی عصاره آبی آلوئه‌ورا یا سرم فیزیولوژی پس از عمل لامنیکتومی در حیوانات بر حسب اینکه مربوط به کدام گروه هستند انجام شد پس از گذشت 6 - 5 ساعت تخلیه مثانه شروع شد. این کار روزی سه مرتبه تکرار شد.

تهیه نمونه‌های بافتی و ایمنو هیستو شیمیایی

برای بررسی اثرات عصاره آبی آلوئه‌ورا در حفظ حیات سلول‌های عصبی حرکتی و انتقال پیام شیمیایی در این سلول‌ها بعد از گذشت 28 روز یا 4 هفته از روز عمل لامینکتومی موش‌ها بیهوش عمیق شده و به وسیله پرفیوژن قلبی کشته شدند. به طوری که ابتدا سرم فیزیولوژی 0/9 درصد حاوی هپارین به نسبت 1:5000 و سپس محلول پارافرمآلدئید 4 درصد در بافر فسفات 0/1 مولار از طریق بطن چپ در تمام بدن جریان یافت. همه بافت‌های بدن از جمله نخاع محکم شد. سپس نمونه نخاعی خارج و محکم شد پس از درآوردن سگمان نخاعی مجدداً درون محلول بافر فرمالین 10 درصد منتقل و بعد از گذشت 12 ساعت مراحل مختلف آب‌گیری، شفاف‌سازی، آغشتگی و قالب‌گیری با پارافین به روش روتین انجام شد. سپس برش‌هایی 8 میکرومتری به کمک دستگاه میکروتوم مدل820 لایکا تهیه شد و برش‌های پارافینی از روی آب گرم به روی لام منتقل و یک شب در دمای اتاق نگه داشته شد تا کاملاً خشک شود. جهت بررسی دقت تهیه برش‌ها از روش رنگ‌آمیزی روتین هماتوکسیلین ائوزین استفاده شد. جهت شمارش سلولی و مورفومتری از روش رنگ‌آمیزی کرسیل فست ویولت یک دهم درصد شرکت مرک آلمان استفاده شد.

جهت شمارش سلولی در این مرحله، نرون‌های حرکتی که در قسمت قدامی خارجی در هر دو نیمه‌ی نخاع قرار دارد با بزرگنمایی X400 میکروسکوپ نوری زایس مورد شمارش قرار گرفتند.

برای بررسی میزان حضور و الگوی حضور سیناپتوفیزین به صورت یکی از انواع الگوی کامل نقطه‌ای یا پراکنده سیتوپلاسمی و منفی مطالعه ایمنوهیستو شیمیایی انجام شد. به طوری که همانند مرحله تهیه برش بافتی جهت شمارش سلول‌های عصبی نمونه‌ها تهیه شد، سپس به صورت تصادفی ساده از هر قالب پارافینی 20 برش به مرحله ایمنوهیستوشیمی اختصاص یافت. تکنیک ایمنوهیستوشیمی مورد استفاده در این تحقیق روش غیرمستقیم دو مرحله‌ای بود در مرحله اول یک آنتی‌بادی مونوکلونال بر علیه یک آنتی‌ژن خاص موجود در بافت به کار برده شد یعنی Mouse Anti-Synaptophysin (شرکت Serotec آلمان) (آنتی‌بادی اولیه) که به نسبت 1/500 با PBS یک صدم مولار رقیق و مورد استفاده قرار گرفت.

در مرحله دوم از آنتی‌بادی حاوی پراکسیداز علیه آنتی‌بادی اولیه استفاده شد یعنی Peroxidase conjugated goat anti mouse immunoglobulins (شرکت DAKO آلمان) (آنتی‌بادی ثانویه) که آن به نسبت 1/100 با PBS یک صدم مولار رقیق و مورد استفاده قرار گرفت و در نهایت با به کار بردن DAB (Diaminobenzidine tetrahydro chloride) بر روی نمونه‌ها DAB با پراکسیداز موجود در آنتی‌بادی ثانویه واکنش کرده و رسوب قهوه‌ای رنگی ایجاد کرد که در زیر میکروسکوپ نوری قابل مشاهده بود. همان‌طورکه قبلاً توضیح داده شد سیناپتوفیزین به عنوان یک مارکر چگونگی حضور و توزیع وزیکول‌سیناپسی حاوی واسطه شیمیایی را نشان می‌دهد. بر اساس مطالعات کروس سانچز شمارش الگوی تظاهر آن در سلول‌های عصبی انجام شد [8]. به طوری‌که در خاتمه تکنیک سلول‌های عصبی حرکتی با بیان سیناپتوفیزین شمارش و میانگین و درصد انواع الگوهای آن محاسبه شد.

بررسی آماری

داده‌های به دست آمده به صورت میانگین ± خطای استاندارد (SEM) بیان شد. پس از مشخص نمودن توزیع داده‌ها برای مقایسه نتایج از آزمون تی تست و آنووای یک طرفه با نرم‌افزار SPSS Ver19 استفاده شد. به علاوه سطح معنی‌داری $p \leq 0/05$ برای تمام آنالیزها در نظر گرفته شد.

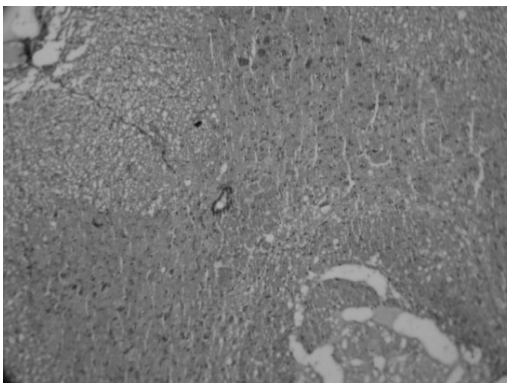
نتایج

یافته‌ها در 2 بخش مجزا مورد بررسی قرارگرفت. 1- نتایج مطالعات مورفومتری سلول‌ها و 2- مطالعات ایمنوهیستوشیمیایی سیناپتوفیزین و محاسبه‌ی درصد این پاسخ‌گویی.

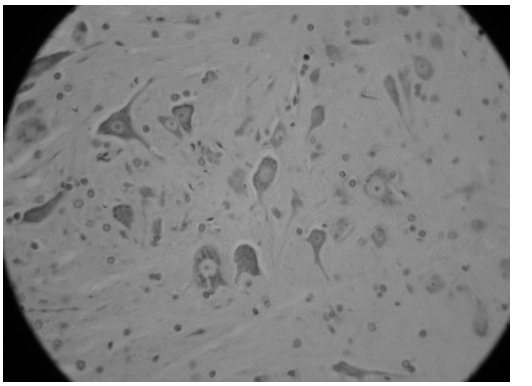
نتایج بررسی مورفومتری سلول‌های عصبی

بررسی سلول‌های عصبی حرکتی نخاع حاکی از کاهش سلول‌های عصبی حرکتی در شاخ قدامی نخاع به همراه ایجاد حفره در بین سلول‌ها و خونریزی در لابه‌لای سلول‌ها و داخل این حفرات است (شکل شماره 1).

شمارش سلول‌های عصبی حرکتی نخاع در محل ضایعه حاکی از این است که تعدادی از سلول‌های عصبی حرکتی در محل اعمال فشار دستخوش کروماتولیز شده یعنی اجسام نیسل در اطراف هسته به مقدار زیادی از بین رفته و سیتوپلاسم اطراف هسته روشن دیده می‌شود (شکل شماره 2).



شکل شماره 1- برش عرضی از نخاع موش صحرایی مربوط به گروه د. علاوه‌بر کاهش سلول‌های عصبی حرکتی در شاخ قدامی نخاع ایجاد حفره در بین سلول‌ها و خونریزی در بافت منطقه خاکستری و سفید نخاع نیز دیده می‌شود (با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین و بزرگنمایی 100)



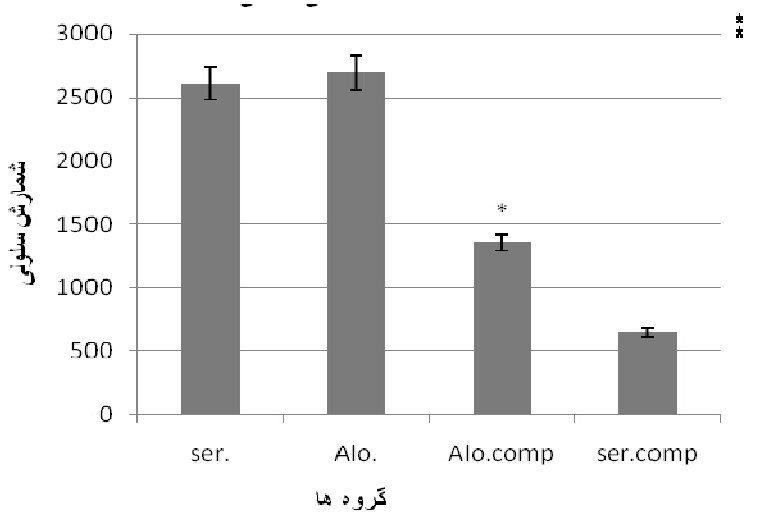
شکل شماره 2- تصویر دو نرون در شاخ قدامی نخاع موش صحرایی مربوط به گروه د. آپوپتوز را در دو مرحله Early (E) و Late (L) نشان می‌دهد.

در مرحله E اجسام نیسل به ویژه در اطراف هسته از بین رفته‌اند و سیتوپلاسم روشن‌تر دیده می‌شود و در مرحله L دانیسیته کاملاً افزایش یافته و هسته و سیتوپلاسم از یکدیگر قابل تشخیص نیست و سلول کاملاً چروکیده شده است (با بزرگ‌نمایی X400 رنگ‌آمیزی کرسیل فست ویولت)

نتایج با استفاده از آزمون تی تست نشان می‌دهد مقایسه تعداد سلول‌های عصبی حرکتی در دو گروه جراحی نشده یعنی الف و ب تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارد (p<0/05). مقایسه تعداد سلول‌های عصبی حرکتی در هر یک از گروه‌هایی که جراحی نشدند با دو گروهی که جراحی و فشار مکانیکی به روی نخاع داشتند تفاوت معنی‌داری دارد p< 0/05. همچنین مقایسه گروهی که عصاره آبی آلوئه‌ورا به همراه فشار مکانیکی دریافت کردند با گروهی که همین فشار را به همراه تزریق سرم فیزیولوژی داشتند تفاوت معنی‌داری را نشان داد. به طوری که تعداد سلول‌های عصبی حرکتی پس از ضایعه مکانیکی در گروهی که سرم فیزیولوژی داشتند کاهش معنی‌داری دارد (p<0/05) (جدول شماره 1). در گروهی که 4 هفته عصاره آبی آلوئه‌ورا دریافت کرده‌اند تأثیر عصاره در حفظ سلول‌های عصبی حرکتی با اختلاف معنی‌داری بیشتر است (نمودار ستونی 1). مقایسه میزان کاهش سلول‌های عصبی حرکتی نشان می‌دهد در گروهی که عصاره آبی آلوئه‌ورا را به همراه فشار مکانیکی دریافت کردند با تفاوت معنی‌داری کمتر از گروهی است که همین فشار را به همراه سرم فیزیولوژی دریافت کردند (p<0/05). همچنین در گروهی که بدون هیچ‌گونه دستکاری سرم فیزیولوژی دریافت کردند در مقایسه با گروهی که بدون هیچ‌گونه دستکاری عصاره آلوئه‌ورا دریافت کردند، درصد کاهش 3/08 است. اما از نظر آماری تفاوت معنی‌دار نیست (جدول شماره 2).

جدول شماره 1 - میانگین و انحراف معیار تعداد کل سلول‌های عصبی حرکتی در 4 گروه

تحلیل آماری	میانگین و انحراف معیار سلول‌های عصبی حرکتی در بخش آسیب دیده	گروه‌ها
p<0/05	2612± 196	گروه الف: کنترل سالم به همراه تزریق روزانه سرم فیزیولوژی **(Ser.)**
p<0/05	2692± 131	گروه ب: تحت تیمار با تزریق روزانه عصاره آلوئه‌ورا **(Alo.)**
p<0/05	1354 ± 135	گروه ج: تحت تیمار باتزریق روزانه عصاره آبی آلوئه‌ورا به همراه اعمال فشار مکانیکی بر نخاع **(Alo. comp)**
p<0/05	648 ± 152	گروه د: تزریق روزانه سرم فیزیولوژی به همراه اعمال فشار مکانیکی بر نخاع **(Ser. comp)**



نمودار ستونی 1 - میانگین و انحراف معیار سلول‌های عصبی حرکتی در سگمان ضایعه دیده در تمام گروه‌ها

جدول شماره 2 - درصد کاهش نرون‌های حرکتی شاخ قدامی نخاع در سگمان ضایعه دیده نسبت به گروه کنترل (گروه ب)

گروه‌های بررسی	درصد کاهش یا افزایش تعداد سلول‌های حرکتی نسبت به گروه دریافت کننده عصاره آلوئه‌ورا (گروه ب)
گروه الف	3/08 – درصد
گروه ب	0 درصد
گروه ج	48/2 - درصد *
گروه د	75/93 - درصد *

* = Significant ($p \leq 0.05$)

نتایج مطالعات میکروسکوپ نوری (ایمنوهیستوشیمی)

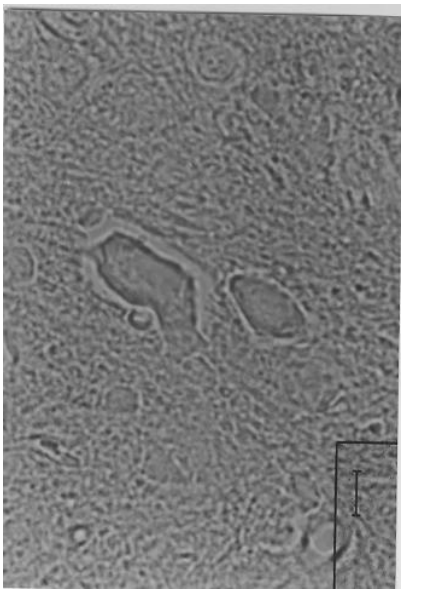
در پایان این تکنیک محصول نهایی واکنش ایمنوهیستوشیمی سیناپتوفیزین به شکل رسوب ذرات قهوه‌ای رنگی دیده شد که در واقع محل قرارگرفتن وزیکول‌های سیناپسی را نشان می‌دهد (شکل شماره 3). تعیین انواع الگوی واکنش ایمنوهیستوشیمیایی سیناپتوفیزین براساس نتیجه مطالعات کروس سانچزانجام شد. مقایسه این نتایج با نمونه‌های کنترل منفی که در آنها آنتی‌بادی اولیه حذف شد حساسیت و دقت آنتی‌بادی را تأیید می‌کند (شکل شماره 4).

محاسبه میانگین و انحراف معیار درصد انواع الگوی تظاهر سیناپتوفیزین در سلول‌های عصبی حرکتی نخاع در مقاطع بافتی انجام شد (جدول شماره 3). با استفاده از آزمون آماری S-K test جهت بررسی نرمالیتی، نتایج نشان می‌دهد که داده‌های گروه‌های مورد بررسی از توزیع نرمال تفاوتی ندارد ($p<0/05$) و بدین‌ترتیب با استفاده از روش‌های آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) مقایسه بین میانگین الگوی تظاهر سیناپتوفیزین گروه‌ها انجام شد.

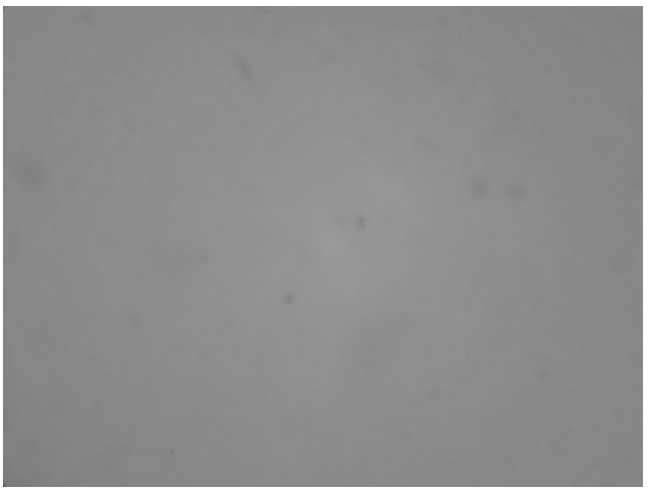
بررسی نتایج نشان می‌دهد تظاهر سیناپتوفیزین به صورت نقاط تیره رنگ متراکم - نقطه‌ای و سیتوپلاسمی با تفاوت معنی‌داری در تمام گروه‌ها دیده می‌شود. به طوری‌که تظاهر الگوی سیناپتوفیزین درموتونرون‌های شاخ قدامی نخاع در گروه ب که عصاره آبی آلوئه‌ورا را دریافت کرده‌اند در مقایسه با سه گروه دیگر در الگوی نقطه‌ای بیشترین میزان را با تفاوت معنی‌دار نشان می‌دهد ($p<0/05$). در گروه الف که سرم فیزیولوژی دریافت کرده‌اند درصد تظاهر سیناپتوفیزین در الگوی نقطه‌ای و سیتوپلاسمیدر مقایسه با گروه ب که عصاره آبی آلوئه‌ورا دریافت کرده‌اند کاهش معنی‌داری دارد ($p<0/05$). در گروه ج که آلوئه‌ورا را به همراه فشار دریافت کردند تظاهر الگو به سه صورت کامل نقطه‌ای و سیتوپلاسمی بود. نوع الگوی منفی در این گروه مشاهده نشد و در مقایسه با سه گروه دیگر الگوی کامل افزایش دارد که این افزایش با گروه د معنی‌دار است و با دو گروه دیگر یعنی الف و ب معنی‌دار نیست.

بحث

روش شمارش سلولی در این تحقیق با روش تأیید شده جهت بررسی مورفومتری و بررسی میزان مرگ سلول‌های عصبی توسط بسیاری از محققین مانند Oppenheim ارائه شد [9]. از آنجایی که تا به حال تحقیقی درخصوص اثر نروپروتکتیوی گیاه آلوئه‌ورا در ضایعات مکانیکی سلول‌های عصبی انجام نشده است. در این تحقیق از عصاره آبی آلوئه‌ورا استفاده شده و انتخاب این گیاه بر اساس مدارک و مستندات موجود در کتب سنتی قدیمی در دوران‌های گذشته بود که در این کتب گیاه آلوئه‌ورا گیاهی با خواص معجزه‌گر معرفی شده است. نتایج مطالعات مورفومتری نشان می‌دهد که تعداد سلول‌های عصبی حرکتی نخاع در دو گروهی که تحت اعمال فشار مکانیکی بر نخاع بودند کاهش یافته است به طوری‌که این کاهش در گروهی که عصاره آبی آلوئه‌ورا دریافت کردند 48/2 درصد و در گروهی که سرم فیزیولوژی دریافت کردند 75/93 است. این کاهش سلول‌های عصبی حرکتی در شاخ قدامی نخاع به همراه ایجاد حفره در لابه‌لای سلول‌ها و



شکل شماره 3 - چند نرون حرکتی سالم را نشان می‌دهد که سیناپتوفیزین به صورت الگوی نقطه‌ای شکل دراطراف سلول یا به صورت الگوی کامل در حاشیه سلول قرار دارد و همچنین به صورت الگوی پراکنده در سیتوپلاسم قرار دارد (با بزرگ‌نمایی X1000)



شکل شماره 4 - نمونه کنترل منفی که حساسیت و دقت آنتی‌بادی را تأیید می‌کند (با بزرگنمایی X1000)

جدول شماره 3 - میانگین و انحراف معیار درصد انواع الگوی تظاهر سیناپتوفیزین در تمام گروه‌ها

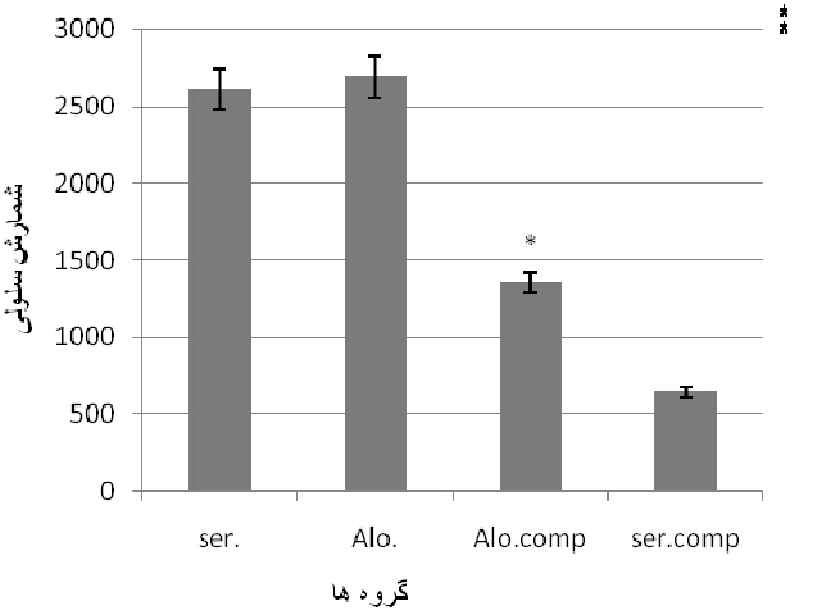
گروه‌ها	گروه الف	گروه ب	گروه ج	گروه د
کامل (a)	70±13/6	65±11/23	72/10±11/78	16/80±14/18
نقطه‌ای (b)	12±5/30	* 30/6±10/02	22/90±6/87	13/33±26/00
سیتوپلاسمی (c)	11±5/3	18/16±6/67	7/49±7/02	20/0±12/90
منفی (d)	3/30±10/5	2/40±10/37	0/0±0/0	44/5±7/90

{جهت نشان دادن تفاوت معنی‌دار ($p<0/05$) } *

خونریزی در داخل این حفره‌ها است. در این تحقیق با استفاده از رنگ‌آمیزی اختصاصی اجسام نیسل مرگ سلول‌های عصبی را از نوع مرگ برنامه‌ریزی شده یا آپوپتوتیک نشان می‌دهد. مرگ سلولی و به دنبال آن کاهش سلول‌های عصبی حرکتی در نمونه‌هایی که عصاره آبی آلوئه‌ورا دریافت کرده‌اند کمتر از نمونه‌هایی است که سرم فیزیولوژی دریافت نموده‌اند و حتی نتایج نشان می‌دهد در نمونه‌هایی که بدون هیچ‌گونه دستکاری و جراحی فقط عصاره آبی آلوئه‌ورا را دریافت نمودند میزان سلول‌های عصبی حرکتی دارای افزایشی نسبت به گروه مشابهی است که به جای عصاره آبی آلوئه‌ورا محلول سرم فیزیولوژی دریافت کرده‌اند یعنی سرم فیزیولوژی سبب کاهشی معادل 3/08 نسبت به عصاره آبی آلوئه‌ورا شد. بررسی آماری نشان داد این تغییر از نظر آماری معنی‌دار نیست. نتایج به دست آمده در این تحقیق هم‌راستا با نتایج به دست آمده کرو (Crowe) و همکاران در سال 1997 است که وقوع آپوپتوز را به دنبال ضربات مکانیکی نخاع اشاره و اظهار داشتند که سلول‌های آپوپتوتیک را از 6 ساعت تا 3 هفته بعد از ضایعه بخصوص در بافت سفید نخاع مشاهده کردند [10]. هاینس (Hains) در راستا همین نتایج سال 2001 مرگ سلول‌های عصبی و سلول‌های گلیال را در صدمات مکانیکی طناب نخاعی از نوع مرگ آپوپتوتیک ارائه نمود [11].

نتایج تحقیقات نشان می‌دهد فاکتورهای زیادی بر روی آسیب سلول‌های عصبی ناشی از فشار تأثیر دارند و باعث می‌شوند سلول‌ها به طرف مرگ یا حیات پیش بروند و پاسخ سلول‌های عصبی با توجه به سن حیوان، شدت ضایعه، مدت اعمال فشار، محل آسیب، نژاد و گونه حیوان و نوع عصب اعم از حسی و حرکتی تفاوت دارد. در نهایت طیف وسیعی از وقایع درون سلولی که می‌نواند منجر به پدیده مرگ یا حفظ نرون شود را به دنبال دارد [12].

احتمال می‌رود که این گیاه بر حفظ حیات سلول‌های عصبی اثر داشته باشد. همان‌طور که در نمودار ستونی 1 نشان می‌دهد در گروهی که عصاره را به همراه فشار مکانیکی



نمودار ستونی 1 - میانگین و انحراف معیار سلول‌های عصبی حرکتی در سگمان ضایعه دیده در تمام گروه‌ها

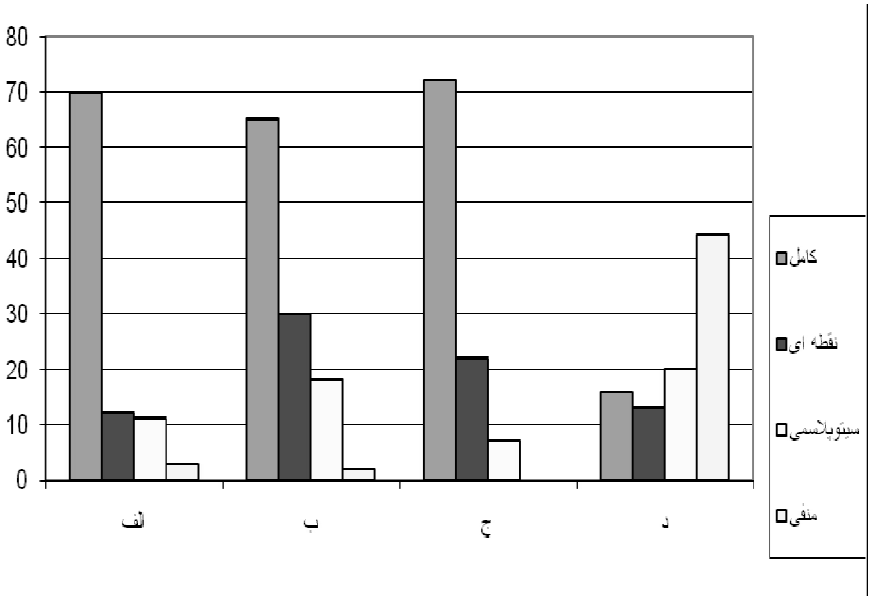
دریافت کردند نسبت به گروهی که سرم فیزیولوژی را به همراه فشار مکانیکی دریافت کردند میانگین تعداد سلول‌های حرکتی تفاوت آماری معنی‌داری دارد (p<0/05). برای طیف گسترده اثرات گیاه آلوئه‌ورا فرضیه‌هایی مطرح شده مبنی بر این که در روند ترمیم و بهبودی زخم مؤثر است ولی اینکه با چه مکانیسمی روی حفظ سلول‌های عصبی یا افزایش تکثیر تأثیر دارد نیازمند بررسی‌های بیشتر می‌باشد.

در این تحقیق جهت تأثیر عصاره آلوئه‌ورا بر روند انتقال پیام شیمیایی در محل سیناپس از پروتئین سیناپتوفیزین استفاده شد. بررسی تعیین و تقسیم‌بندی الگوی تظاهر واکنش ایمنوهیستوشیمیایی سیناپتوفیزین در موش صحرایی به صورت کامل، قطعه‌ای یا نقطه‌ای، سیتوپلاسمی و منفی می‌باشد. در بررسی اثر عصاره آبی آلوئه‌ورا بیان الگوی تظاهر پروتئین سیناپتوفیزین نیز از همین 4 الگو پیروی می‌کند. نتایجی که به دست آمد نشان می‌دهد سیناپتوفیزین به عنوان یک پروتئین اصلی غشا وزیکول سیناپسی در تمام گروه‌ها بیان می‌شود. چیزی که حائز اهمیت است میزان بیان و الگوی این بیان است که در گروه‌های بررسی شده تفاوت معنی‌داری دارد (جدول شماره 3). بیان الگوی نقطه‌ای در گروهی که سرم فیزیولوژی را دریافت کردند نسبت به گروهی که آلوئه‌ورا دریافت کردند تفاوت آماری معنی‌داری دارد (p<0/05). از آنجایی‌که این پروتئین برای تشخیص وزیکول‌های سیناپسی و تکمه‌های پیش‌سیناپسی است. میزان بیان و نوع الگوی بیان پروتئین با توجه به عملکرد نرون در دوران تکوین و پس از تولد، ضایعات و صدمات مکانیکی یا شیمیایی سلول‌های سیستم عصبی، بیماری نورودژنراتیو تغییر می‌کند. این تغییر نشانه‌ی اختلالات در انتقال پیام در محل سیناپس‌ها است. گزارش هاروی (Harvey) نشان می‌دهد کاهش واکنش سیناپتوفیزین نشانه کاهش سیناپتوفیزین موجود در غشاء وزیکول‌های سیناپسی و در نتیجه کاهش وزیکول‌های سیناسپی و انتقال پیام از یک سلول به سلول بعدی است [13]. نتایج مطالعات کروز سانچز (Cruz-Sanchez) نیز نشان می‌دهد که پاسخ به محرک‌های محیطی در افراد سالخورده نسبت به افراد جوان کاهش می‌یابد. این کاهش همراه با کاهش سیناپتوفیزین در افراد پیر نسبت به افراد جوان است [8]. همچنین در بررسی بیماران ALS که مشکلات نرون‌های حرکتی همراه با افزایش مرگ آپوپتیک است سیناپتوفیزین همانند افراد مسن کاهش دارد [14]. بررسی در بیماری‌های Lewy body کاهش سیناپتوفیزین را نشان می‌دهد [15]. در همین راستا نتایج تحقیق زلانو (Zelano) نشان می‌دهد بیان ژن سیناپتوفیزیندر دوران جنینی کم و بعد از تولد این بیان افزایش می‌یابد. در دوران پیری که مقارن با کاهش واکنش عصبی نسبت به تحریکان محیطی است، مجدداً کاهش می‌یابد [16] که هم‌راستا با نتایج محققین دیگری نظیر هنما (Honma) [17]، وانوچی (Vannucchi) [18]، راو (Rao) [19] و کاپفهامر (Kapfhammer) [5] می‌باشد.

نتایج مطالعات ما نیز هم‌راستا با نتایج مطالعات درخصوص کاهش بیان این پروتئین در هنگام صدمه به سیستم عصبی است. در جمع‌بندی نتایج می‌توان فرضیه‌ای را مبنی بر تأثیر عصاره در تشکیل و شکل‌گیری اولیه سیناپتوفیزین ارائه نمود. به دلیل حضور سیناپتوفیزین در الگوی سیتوپلاسمی و نقطه‌ای در سلول‌های عصبی حرکتی. با توجه به نتایج شاید بتوان چنین استنباط کرد که در درون سلول حضور سیناپتوفیزین ذخیره در وزیکول‌ها تغییری نکرده و اگر میزان سیناپتوفیزین در حاشیه به صورت نقطه‌ای افزایش دارد نشانه فانکشنال بودن این اثر عصاره بر پروتئین است. در 2 گروهی که آلوئه‌ورا دریافت کردند نیز الگوی کامل بیشترین میزان را نشان می‌دهد. همچنین درصد تظاهر تفاوت‌هایی دارد و این می‌تواند ناشی از تأثیر فشار مکانیکی بر روند مرگ سلولی از یک طرف و تأثیر آلوئه‌ورا بر جلوگیری از این مرگ سلولی از طرف دیگر بوده که در نهایت با بیان بیشتر در الگوی کامل به گونه‌ای نقل و انتقالات پیام شیمیایی افزایش و در نتیجه میزان مرگ سلولی کاهش می‌یابد نکته حائز اهمیت این است که در گروهی که به همراه فشار مکانیکی آلوئه‌ورا دریافت کردند هیچ الگوی منفی از سیناپتوفیزین دیده نشد. یعنی تمام سلول‌های عصبی حرکتی ضایعه دیده که از مرگ رهایی یافته‌اند با تأثیر آلوئه‌ورا دارای

نقشی بارز در نقل و انتقال پیام شیمیایی می‌باشند مقایسه بین دو گروهی که آلوئه‌ورا دریافت کردند نشان می‌دهد که فشار مکانیکی باعث کاهش بیان الگوی سیتوپلاسمی شد. این تفاوت معنی‌دار است ($p<0/05$) یعنی الگوی ذخیره نیز کاهش یافته و همه‌ی پروتئین‌ها در حال انجام نقش خود در روند انتقال پیام هستند. در گروهی که فشار مکانیکی را به همراه سرم فیزیولوژی دریافت نمودند بیان سیناپتوفیزین در الگوی کامل کاهش معنی‌داری دارد. به طوری‌که الگوی کامل و نقطه‌ای و سیتوپلاسمی مشابه یکدیگر بود و از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشت. نکته حائز اهمیت در این گروه این است که تعداد زیادی از سلول‌های عصبی حرکتی فاقد بیان سیناپتوفیزین است. یعنی می‌توان گفت واسطه‌های شیمیایی در محل سیناپس‌ها دیده نمی‌شود. عدم بیان سیناپتوفیزین یا همان الگوی منفی در این گروه از نظر آماری تفاوت معنی‌داری دارد (نمودار ستونی 2).

لذا با توجه به این مطالعه می‌توان این نتیجه را گرفت که مهم‌ترین الگوی بیان سیناپتوفزین الگوی کامل است. یعنی حداکثر ارتباطات نرونی در حال انجام می‌باشد. این الگو در ضایعه فشاری نخاع کاهش می‌یابد. با تأثیر عصاره این الگو افزایش معنی‌داری می‌یابد. به عبارتی عصاره بر رویکرد حفظ و نگهداری حیات سلول‌های عصبی با مکانیسم افزایش انتقال در پیام‌های شیمیایی محل سیناپس‌ها تاثیر دارد. به طوری‌که ساخته شدن سیناپتوفیزین تسریع شده و این نتیجه‌گیری از حضور الگوی نقطه‌ای و سیتوپلاسمی استنباط می‌شود. با توجه به نتایج این تحقیق که نشان داد مصرف روزانه عصاره آبی آلوئه‌ورا به مدت 4 هفته سبب کاهش مرگ آپوپتوتیکی سلول‌های عصبی شد و همچنین سبب افزایش بیان سیناپتوفیزین در الگوی کامل و نقطه‌ای شد. پیشنهاد می‌شود بررسی بیشتری روی نحوه عملکرد و مکانیسم درون سلولی در زمان‌های طولانی‌تر و همچنین دوزهای مختلف عصاره انجام شود.



نمودار ستونی شماره 2 - میانگین تظاهر انواع الگوی بیان پروتئین سیناپتوفیزین در گروه‌های مورد بررسی (الف – ب – ج - د)

تشکر و قدردانی

از کارکنان و کارشناسان آزمایشگاه تحقیقاتی علوم تشریح و پاتولوزی دانشکده پزشکی شاهد و پرسنل آزمایشگاه حیوانات کمال تشکر را دارم.

منابع

1. Martin L.J. Neuronal cell death in the nervous system development, disease, and injury (Review). *Int. J. Mol. Medic*. 2001; 7: 455 - 78.

2. Kerr J, Gobe G, Winter ford CM and Harmon B. Anatomical methods in cell death. *Meth. Cell. Biol*. 1995; 46: 1 - 21.

3. Liu X and Xu X. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J. Neurosci*. 1997; 17: 5395 - 406.

4. Davis GW. The making of a synapse: target-derived signals and presynaptic differentiation. *Neuron*. 2000; 26: 551 - 4.

5. Kapfhammer JP, Christ F and Schwab ME. The expression of GAP-43 and synaptophysin in the developing rat retina. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 1994; 15: 80 (1 - 2): 251 - 60.

6. Farahnejad Z, Ghazanfari T and Yaraee R. Immunomodulatory effects of Aloe Vera and its fractions of macrophages against Candida albicans. Immunopharmacol. *Immuunotoxicol*. 2011; 33; 676 - 81.

7. Poon PC, Gupta D, Shoichet MS and Tator CH. Clip compression model is useful for thoracic spinal cord injuries: histologic and functional correlates. *Spine* 2007; 32: 2853 - 9.

8. Cruz-Sanchez F, Moral A, Rossi M, Quinto L, Castejon C, Tolosa E and Belleroche J. Synptophysin in spinal anterior horn in aging and ALS: an immunohistological study. *J. Neural. Trans*. 1996; 103: 1317 - 29.

9. Oppenheim R W, Ler M and Houenou L. Neurotrophic agents prevent motoneuron death following sciatic nerve section the neonatal mouse. *J. Neurobiol*. 1994; 7: 759 - 66.

10. Crow M, Bresnahan J and Shuman S. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat. Med*. 1997; 3: 240 - 53.

11. Hains B, Yucra J and Hulsebosch C. Reduction of pathological and behavioral deficits following spinal cord contusion injury with the selective cyclooxygenase -2 inhibitor NS- 398. *J. Neurotrauma* 2001; 18: 409 - 23.

12. Simon Cm, Sharif S and Tan RP. Spinal cord contusion causesacute plasma membrane damage. *J. Neurotrauma* 2009; 4: 38 - 41.

13. Harvey B and Donald E. Synaptophysin immunocytochemistry with thermal intesification: a marker of terminal axonal maturation in the human fetal nervous system. *Brain and Development* 1999; 21: 41 - 50.

14. Sasaki S and Maruyama S. Synapse Loss in anterior horn neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*. 1994; 88: 222 - 7.

15. Hansen L, Danial S, Wilcock G and Love S. Frontal cortical synaptophysin in lewy body diseases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1988; 64: 653 - 6.

16. Zelano J, Berg A, Thams S, Hailer NP and Cullheim S. SynCAM1 expression correlates with restoration of central synapses on spinal motoneurons after two different models of peripheral nerve injury. *J. Comp. Neurol*. 2009; 10: 670 - 82.

17. Honma S, Varathan V and Wakisaka S. Postnatal development of synaptic inputs to rat masseter motoneurons. *Brain Res. Dev. Brain Res*. 2002; 15: 67 - 71.

18. Vannucchi MG, Midrio P, Zardo C and Faussone-Pellegrini MS. Neurofilament formation and synaptic activity are delayed in the myenteric neurons of the rat fetus with gastroschisis. *Neurosci. Lett*. 2004; 2: 81 - 5.

19. Rao JS, Kellom M, Kim HW, Rapoport SI and Reese EA. Neuroinflammation and synaptic loss. *Neurochem. Res*. 2012; 37: 903 - 10.

The Effect of Aquae Extract of *Aloe vera* on Synaptophysin Expression after Spinal Cord Compression in Adult Rats

Heshmati M (Ph.D.)[1]*, Jalali Nadoushan MR (MD.)[1], Entezari E (M.Sc.)[2], Khodashenas Z (M.Sc.)[2]

1- Anatomy and Pathology Department, Shahed University, Tehran, Iran
2- Pathologist, Mostafa Khomeini Hospital, Italy Street, Tehran, Iran
* Corresponding author: Anatomy and Pathology Department, Shahed University, Tehran, Iran
Tel: +98-21- 88964792 (indoor: 241), Fax: +98-21-88966310
Email: heshmati@shahed.ac.ir

Abstract

Background: Spinal cord compression is one of causes for disability. Nowadaysto minimize these complication is a goal.

Objective: The effect of aquae extract of *Aloe vera* on motoneuron death and chemical neurotransmitter for cell signaling in paralysed rats.

Methods: We used 32 female rats from Razi institute. They were randomized divided to 4 groups: 1- control 2- treated with *Aloe vera* 3- treated with *Aloe vera* + spinal cord compression by clips aneurysm 4- control+spinal cord compression by clips aneurysm. Perituneal injection continued for 4 weeks (every day). We used 2.5 mg/kg aquae extract of *Aloe vera*.

Results: Compression hascaused, motoneuron in ventral horn decreases with cavitation. Insecond group these changes are less ($p \leq 0.05$). *Aloe vera* increasessynaptophysin in complete and partial model ($p \leq 0.05$).

Conclusion: For the first time *Aloe vera* has studied for synaptic reaction. It seems the number and percentage of motoneurons increased, as the same as synaptophysin in complete and partial model.

Keywords: *Aloe vera*, Spinal cord injury, Synaptophysin