

افزایش سرعت ترمیم عصب سیاتیک با مهار TNF- α توسط داروی اتانرسپت

فاطمه بصیری^۱ MSc، عباسعلی ایمانی فولادی^۲ PhD، قاسم باقرپور^۲ MSc، حمیده محمودزاده حسینی^۲ MSc،
معصومه فروتن کودهی^۳ MSc، محمدرضا نورانی^۴ PhD

^۱ گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران
^۲ مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران
^۳ بخش مهندسی بافت، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران
^۴ مرکز تحقیقات نانو بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران

چکیده

اهداف: متعاقب آسیب آکسونی در سیستم عصبی محیطی شبکه وسیع و پیچیده‌ای از سیتوکین‌ها فعال می‌شوند که در راس این شبکه، سیتوکین پیش التهابی TNF- α از اهمیت چشمگیری برخوردار است. به نظر می‌رسد غلظت بالای آن در سرعت ترمیم عصب محیطی تاثیر گذار بوده و احتمال افزایش سرعت ترمیم متعاقب استفاده از مهار کننده‌های این پروتئین وجود دارد.

روش‌ها: در این مطالعه ۱۱۰ سر موش صحرایی در دو گروه تجربی و کنترل دسته بندی شدند. بلافاصله بعد از ایجاد جراحت آکسونی، ۱۰/۶ اتانرسپت به هر یک از رت‌ها در گروه تجربی و همین مقدار نرمال سالین به هر یک از رت‌های گروه کنترل به صورت داخل صفاقی، تزریق شد. برای بررسی میزان شدت بیان ژن TNF- α ، رت‌ها ۱ و ۳ روز، ۱، ۳ و ۶ هفته بعد از جراحت و برای بررسی ایمنو هیستوشیمی و مورفولوژی ۱، ۳ و ۶ هفته بعد از جراحت مورد آزمایش قرار گرفتند.

یافته‌ها: بیان ژن TNF- α ، ۱ روز بعد از آسیب به عصب محیطی بطور چشمگیری افزایش می‌یابد. استعمال اتانرسپت در گروه تجربی بعد از جراحت، این افزایش ناگهانی در میزان بیان ژن TNF- α را بطور معناداری کاهش می‌دهد ($P > 0.001$). در بررسی های ایمنو هیستوشیمی و مورفولوژی نیز ترمیم عصب در گروه‌های تجربی که در آنها، پروتئین TNF- α توسط اتانرسپت مهار شده بود، در مقایسه با گروه کنترل، بهتر صورت گرفته است.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد استفاده از آنتاگونیست، TNF- α بعد از جراحت موجب مهار این پروتئین و تسریع ترمیم عصب می‌گردد.

کلیدواژه‌ها: TNF- α ، جراحت عصبی، اتانرسپت

مقدمه

یکی از ضایعات متداول در جنگ‌ها آسیب به اعصاب محیطی بالاخص عصب سیاتیک می‌باشد، که متعاقب کار با اسلحه گرم دیده می‌شود. آسیب ناشی از برخورد گلوله به ناحیه ران به علت حرکت چرخشی و نوسانی بودن آن متفاوت از ضربات ناشی از اجسام تیز است [۱]. مطالعات اندکی در ارتباط با ترمیم عصب سیاتیک در مجروحین جنگی صورت گرفته است. دو مطالعه در طی جنگ جهانی دوم در آمریکا و استرالیا به ترتیب بر روی ۱۳۸۰ و ۳۶۵ مجروح جنگی انجام شد، که نتایج حاصل از جراحی انجام شده در این دو مطالعه مطلوب نبوده است. در مطالعه انجام شده توسط دکتر گوشه بر روی ۶۴۸ جانبازان جنگ تحمیلی ایران-عراق که از آسیب عصب سیاتیک رنج می‌بردند، از روش جراحی برای ترمیم استفاده شده است. اگرچه این روش نتایج مطلوبی را به همراه داشت، [۲] اما روش جراحی روشی مطمئن برای درمان قطعی، بگونه‌ای که شرایط بعد از ترمیم در حد کاملاً طبیعی باشد، نیست [۳]. نکته قابل توجه آن است که برخلاف سیستم عصبی مرکزی، فیبرهای عصبی محیطی قادر به بازسازی و عصب‌دهی هدف‌های دیستال می‌باشند [۴] و این پروسه ترمیم تقریباً بلافاصله بعد از جراحی آغاز می‌شود [۵، ۶]، بنابراین شاید بتوان این فرضیه را مطرح نمود که درک مکانیزم‌هایی که تعدیل‌کننده‌های اولیه ترمیم آکسونی جهت تنظیم رشد عصب بکار می‌برند، ممکن است برای بیان روش‌هایی جدید جهت تسریع و تقویت بازسازی عصبی مفید باشد [۷]. سیتوکین‌های التهابی از قبیل Tumor necrosis factor- α (TNF- α) از جمله ترکیبات پاراکرینی هستند که میانجی‌گری تغییرات متابولیکی مذکور در سلول را بر عهده داشته و در پروسه‌های فیزیولوژیکال موضعی سهیم می‌باشند [۸-۱۰]. TNF- α از جمله آغازکننده‌های دژنراسیون والرین شناخته می‌شود [۱۱] و آغازگر التهاب سیستمیک می‌باشد [۱۲-۱۴] و متعاقب جراحی به آکسون عصب محیطی، غلظت آن به میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد [۷، ۱۱، ۱۴-۱۹]. سلول‌های شوان که به جراحی آکسون‌های مجاور خود و ایسکمی حساس هستند [۶، ۱۲، ۱۹] در پاسخ به چنین محرک‌هایی، فعال شده و سیتوکین‌هایی مانند TNF- α را به عنوان یک عکس العمل به این استرس‌ها تولید می‌نمایند [۱۸، ۱۹]. این سیتوکین پیش التهابی نقش تاثیرگذاری در مراحل تخریب و ترمیم از خود نشان می‌دهند [۲۰].

وظیفه اصلی TNF- α تنظیم سلول‌های ایمنی است. این ملکول می‌تواند مسبب بروز تب با منشأ درونی، ایجاد آپوپتوزیس و مرگ تنظیم شده سلولی، ایجاد عفونت همراه با اینترلوکین ۱ و اینترلوکین ۶، ایجاد کاشکسی، ایجاد التهاب، مهار تومورزایی می‌باشد [۱۳، ۱۴].

اختلال در میزان طبیعی TNF- α موجب بروز بیماری‌هایی همچون آلزایمر [۲۱] سرطان [۲۲]، افسردگی ماژور [۲۳]، و روده ملتهب [۲۴] می‌شود. در مراحل اولیه کشت‌های سلولی، افزودن مجله طب نظامی دوره ۱۵، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۲

دوزهای مشخصی از TNF- α موجب القای آپوپتوزیس سلول‌های شوان می‌شود. در عین حال مهار سیگنالدهی متاثر از TNF- α به وسیله بلوک کردن فعالیت p38، آپوپتوزیس سلول‌های شوان را کاهش می‌دهد [۲۵، ۲۶]. تفاوت در بیان سطوح TNF- α و اثرات این ماده بر سلول‌های شوان می‌تواند موجب تفاوت در سطوح بیماری‌های دمیالینه‌کننده عصب مانند IDPC گردد [۱۳]. تولید TNF- α با دوز بالا منجر به تشدید پاسخ‌های التهابی و اکسیداسیون می‌شود. در پاتوژنز بسیاری از بیماری‌ها نظیر آرترواسکلروزیس نقش دارد [۱۲]. بطوریکه برداشت و حذف TNF- α اضافی از مکان‌های التهاب یک هدف درمانی محسوب می‌شود [۲۷، ۲۸]. تحقیقات جدید نشان می‌دهد که TNF- α بر سرعت ترمیم عصب محیطی نیز اثر داشته و موجب کاهش سرعت ترمیم می‌گردد [۷، ۱۲، ۲۹]. در این پروژه ما قصد داریم ضمن بررسی تغییر در میزان بیان ژن TNF- α متعاقب آسیب به عصب محیطی و مهار TNF- α اثرات حاصله را بر ترمیم عصب محیطی مورد تجزیه و تحلیل قرار دهیم.

روش‌ها

تحقیق حاضر بر روی ۵۰ سر موش صحرایی بزرگ (رت) نر بالغ، نژاد ویستار، به وزن تقریباً ۲۵۰-۳۰۰ گرم انجام شد. رت‌ها از مرکز تحقیقات انیستیتو پاستور تهران خریداری شدند و در مرکز حیوانات آزمایشگاهی یک دانشگاه علوم پزشکی، تحت شرایط یکسان، چرخه‌ی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و در دمای ۲۳-۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند، آب و مواد غذایی در اختیار حیوانات قرار داده شد.

رت‌ها به صورت تصادفی در گروه‌های کنترل و تجربی کلاسه بندی شدند و هر گروه نیز به ۵ زیر گروه طبقه بندی شده، براساس ۱ روز، ۳ روز، ۱ هفته، ۳ هفته و ۶ هفته بود. هر زیر گروه نیز شامل ۵ سر رت بود. برای بررسی موفولوژی و ایمونوهیستوشیمی فقط هفته اول، سوم و ششم مورد آزمایش قرار گرفتند.

روش جراحی: رت‌ها را توسط داروی بیهوشی کتامین به مقدار ۹۰ و گزیزالین ۱۰ به صورت داخل صفاقی بیهوش نمودیم. برشی در پوست ناحیه بالای ران و مجاورت عضله گلوئوس در پای راست، ایجاد نمودیم. عضله و فاسیا را به آرامی کنار زده و عصب سیاتیک را در فاصله‌ی بین بریدگی سیاتیک تا محل دو شاخه شدن اعصاب تیپیا و پروتال مشترک نمایان نمودیم. عصب سیاتیک در ۵ میلی متر پایین تر از بریدگی سیاتیک، توسط فورسپس جولری به مدت ۳۰ ثانیه کراش داده شد. محل کراش توسط تولویدین بلو علامت گذاری شد. عضله و پوست به آرامی در موقعیت آناتومیکی طبیعی خود قرار داده شدند و محل برش با نخ بخیه ۵-۰ سیلک دوخته شد و با بتادین ۱۰٪ رقیق شده ضد عفونی شد. به هر رت در گروه تجربی، بعد از جراحی ۰.۶ اتانرسپت و در گروه کنترل به همان مقدار نرمال سالین به صورت داخل صفاقی تزریق شد.

لومیناتور UVP (UVIDOC) قابل مشاهده و عکسبرداری گردید. با استفاده از نرم افزار Scion Image باندها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. جهت بررسی و مقایسه و سنجش کیفیت cDNA سنتز شده و استفاده از آن به عنوان استاندارد و Normalizer، پرایمرهای بتاکتین مربوط به ژن بتاکتین رت نیز طراحی و خریداری (سیناژن) شد (House-keeping gene). برای هر نمونه اصلی یک نمونه حاوی پرایمر بتا اکتین و با cDNA الگو نمونه اصلی نیز، PCR گذاشته شد.

طراحی پرایمر ژن TNF- α : ابتدا توالی ژن TNF- α رت نژاد ویستار از سایت UCSC و NCBI گرفته شد و به کمک نرم افزار پرایمر تری طراحی پرایمر انجام شد. توالی نوکلئوتیدی پرایمر Forward و توالی نوکلئوتیدی پرایمر Revers مکمل ژنهای مورد نظر به صورت دستی طراحی و blast شد تا از اختصاصی بودن محل جفت شدن پرایمرها اطمینان حاصل گردد. نتایج جستجو نشان دادند که کلیه پرایمرها محل باند شدن منحصر به فردی را دارا می‌باشند. پرایمرها توسط شرکت Bioneer ساخته شدند.

تبادل پرایمرهای بکار گرفته شده و نیز بهترین دمای annealing برای هر جفت پرایمر که از طریق گرادیان دمایی تعیین شده به شرح جدول ۱ می‌باشد.

جدول ۱. توالی پرایمرها و اطلاعات مربوط به آنها

نام ژن	نوع پرایمر	توالی پرایمر	دمای اتصال	طول قطعه مورد نظر
TNF- α	F	CCAGGAGAAAGTCCTCCT	۷۰	۲۷۹
	R	TCATACCAGGGCTTGAGCTCA		
Act- β	F	TCATGAAGATCCTCACCGAG	۵۹	۱۹۰
	R	TTGCAATGGTGATGACCTG		

در پایان شدت باندها با استفاده از نرم افزار Scion Image اندازه گیری شد. به منظور آنالیزهای آماری روش ANOVA و Chi-Square استفاده شد.

بررسی بیان پروتئین TNF- α با روش ایمونو

هیستوشیمی: برش‌های یخی از بیوپسی‌ها با میکروتوم کرایوستات به ضخامت ۲۰ میکرومتر تهیه و بر روی اسلایدهای پوشش داده شده با سیلان قرار گرفتند. اسلایدهای حاوی برش‌ها را با آنتی بادی اولیه پلی کلونال خرگوش (abcam) با رقت ۱:۲۰۰ در دمای ۴ و به مدت ۱۲ ساعت آنتی بادی ثانویه، انکوبه نموده و پس از شستشوی با PBS آن را به مدت ۱ ساعت با آنتی بادی ثانویه Biotinilated Anti Rabbit Igg انکوبه کرده و سپس با سیستم اوبدین-بیوتین و محل‌های حضور کمپلکس آنتی ژن-آنتی بادی با DAB قابل رویت شده و با میکروسکوپ نوری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها

بررسی بیان ژن TNF- α در عصب سیاتیک گروه کنترل و تجربی: پرایمرهای طراحی شده برای ژن TNF- α توانایی

سپس حیوان را در قفس تمیزی گذاشته شده و بعد از بهوش آمدن، به قفس خود در حیوانخانه انتقال داده شد.

بررسی میزان بیان ژن TNF- α : رت‌ها ۱ و ۳ روز، ۱، ۳ و ۶ هفته بعد از جراحی قربانی شدند، عصب سیاتیک آسیب دیده از بدن رت خارج شد و بلافاصله در محلول Trepure Isolation Reagent قرار داده شد. نمونه‌ها در دمای ۸۰- نگهداری شدند. بعد از انجام مراحل استخراج RNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر نانودراپ خلوص RNA استخراج شده، تعیین شد. سپس از روی RNA استخراج شده (Bioneer) cDNA می‌سازیم. فرایند نسخه برداری معکوس انجام شد واکنش PCR برای تکثیر ژن TNF- α ابتدا با آنزیم Taq پلی مراز (سیناژن) در غلظت ۱ میکرولیتر $MgCl_2$ ، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر، ۱ میکرولیتر $dNTPs$ ، ۲،۵ میکرولیتر بافر $PCR \times 10$ در حجم ۲۵ میکرولیتر دمای ۷۰ صورت گرفت. چرخه های PCR شامل یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر به رشته الگو در دمای ۷۰ به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر قطعه مورد نظر در دمای ۷۲ به مدت ۱ دقیقه و در پایان یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ به مدت ۵ دقیقه بود. محصول PCR بر روی ژل آگارور ۲% جداسازی شده و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد و به وسیله دستگاه ترانس

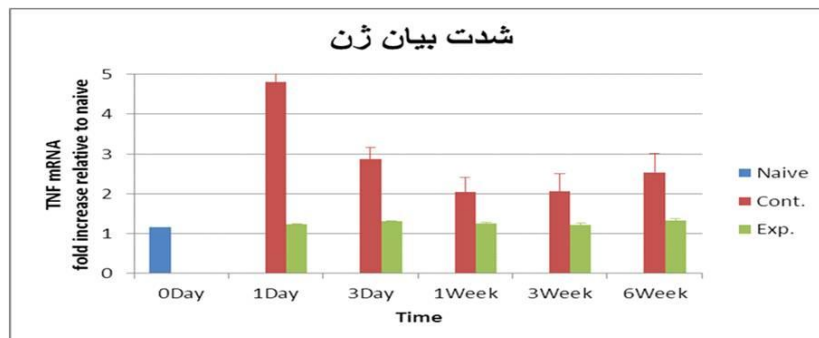
در پایان شدت باندها با استفاده از نرم افزار Scion Image اندازه گیری شد. به منظور آنالیزهای آماری روش ANOVA و Chi-Square استفاده شد.

بررسی مورفولوژی: تمام رت‌های مربوط به این مرحله، در پایان هفته‌ی سوم و ششم جهت انجام مطالعات بافت شناسی به وسیله‌ی اتر قربانی شدند.

عصب سیاتیک را از انتهای محل ضایعه تا ۵ میلی‌متر مربع از محل ضایعه بریده و نمونه تمام شب در ثابت کننده‌ی گلو تار آلدهید و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از فیکس کردن بافت‌ها با استفاده از درجات مختلف اتانول، نمونه‌ها آبیگری شدند. پس از این مرحله با استفاده از رزین (Germany, resin, 812Epon) قالبگیری انجام شد. بعد از قالب‌گیری، بلوک‌های تهیه شده را توسط دستگاه اولترامیکروتوم (ultracut-Leica) به اندازه ۵۰۰ نانومتر، ۰۰ میکرون برش زدیم و برش‌ها را روی لام قرار دادیم. سپس با محلول تولوئیدین ۱ درصد به مدت ۳-۲ دقیقه رنگ آمیزی نمودیم. پس از شستن در آب مقطر و خشک شدن، لام‌ها با میکروسکوپ نوری

از نرم افزار Scion Image محاسبه کمی شد و نسبت میزان بدست آمده برای نمونه اصلی تقسیم بر میزان بدست آمده برای نمونه بتا اکتین معادل، به عنوان شاخص شدت بیان ژن در نظر گرفته شد. برای مقایسه بیان این ژن در بین دو گروه تجربی و کنترل مربوط به هر بازه زمانی از آزمون test-T استفاده شد. بر اساس مقایسه شدت بیان ژن در بین گروه‌ها مشاهده شد که میزان دانسیومتری در طی زمان بین گروه‌های مربوط به هر بازه زمانی به میزان معناداری با یکدیگر متفاوتند ($P < 0.001$) خصوصاً در ۲۴ ساعت بعد از آسیب، این تفاوت بسیار بارز می‌باشد (نمودار ۱).

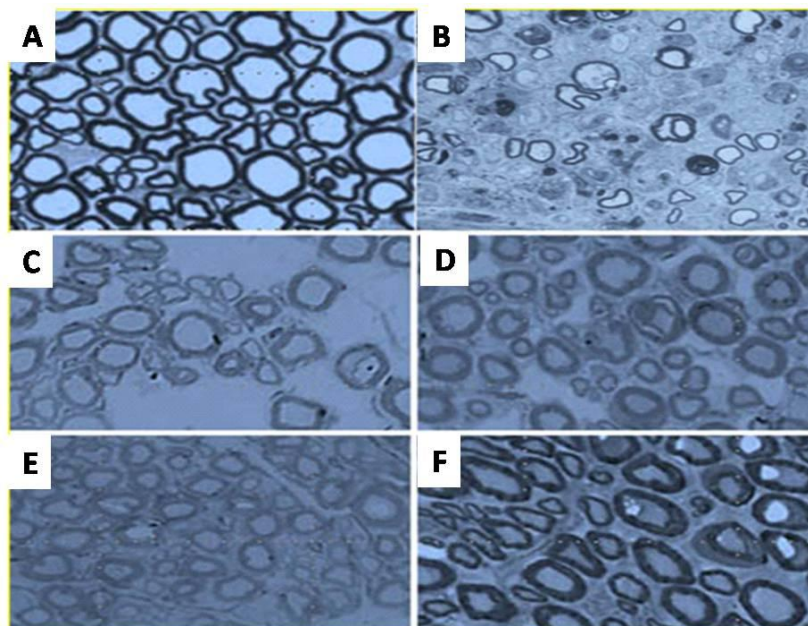
سنتز قطعاتی به طول ۲۷۹ جفت بازی از ژن متناظر را داشت. هم زمان با انجام PCR برای ژن فوق، پرایمر ژن بتا اکتین که قطعه‌ای به طول ۱۹۰ جفت بازی را سنتز می‌کردند استفاده شد. محصولات حاصل از PCR-RT ژن $TNF-\alpha$ با روش الکتروفوریز مورد بررسی قرار گرفتند. بیان ژن در نمونه نرمال قابل مشاهده نبود. بیشترین و قابل توجه‌ترین میزان در ۲۴ ساعت پس از آسیب دیده می‌شود در حالیکه در گروه تجربی افزایش بیان ژن مهار شده است. شدت بیان ژن در زمان‌های ۱ روز، ۳ هفته، ۶ هفته بتدریج کاهش بیان را نشان می‌دهند. شدت باندهای $TNF-\alpha$ و ژن بتا اکتین برای هر نمونه با استفاده



نمودار ۱. بررسی شدت بیان ژن $TNF-\alpha$ در بین گروه‌های تجربی و کنترل در بازه‌های زمانی ۱ روز، ۳ روز، ۱ هفته، ۳ هفته و ۶ هفته

گرفته است، اما تعداد آکسون‌ها در گروه‌های مختلف متفاوت بوده و عملاً در گروه ۱ هفته ترمیم مشاهده نمی‌شود، اما در هفته ۳ و هفته ۶ ترمیم مشهود است، با این حال رزرناسیون در گروه تجربی ۳ هفته بهتر از گروه کنترل ۳ هفته می‌باشد، اما در بین گروه تجربی ۶ هفته و کنترل ۶ هفته خیلی تفاوتی به چشم نمی‌خورد (شکل شماره ۱).

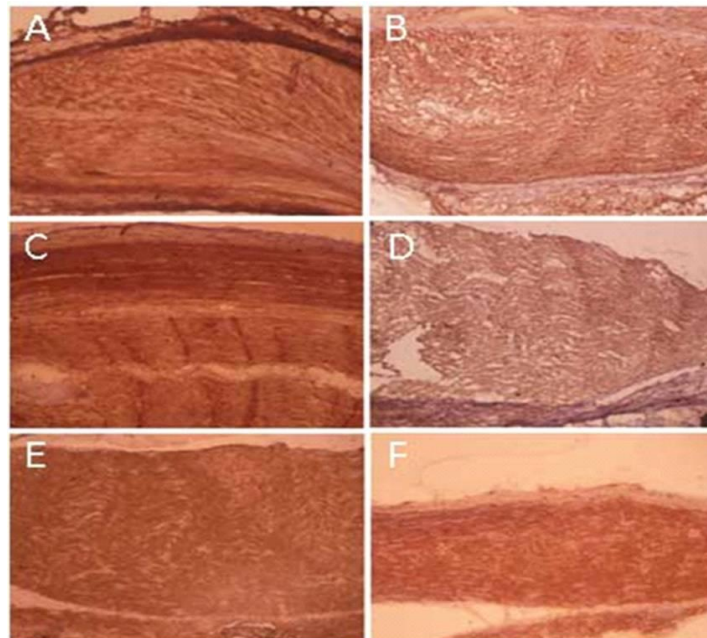
بر اساس نمودار فوق مصرف آنتاگونیست اتانرسپت، بیان ژن مذکور بالاخص پس از گذشت ۲۴ ساعت در گروه تجربی افزایش معناداری را در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد ($P < 0.001$)
بررسی نتایج بافت شناسی عصب سیاتیک: نتایج بافت شناسی شامل بررسی میزان رزرناسیون آکسون‌ها با میکروسکوپ نوری بود. نتایج میکروسکوپی نشان داد که گرچه در تمام گروه‌ها اعم از کنترل و تجربی با گذشت زمان، رزرناسیون بافتی صورت



شکل ۱. مورفولوژی عصب سیاتیک. تصاویر A,B,C,D,E,F به ترتیب مربوط به نمونه‌های نرمال، کنترل ۱ هفته، کنترل ۳ هفته، تجربی ۳ هفته، کنترل ۶ هفته و تجربی ۶ هفته می‌باشد. نمونه‌های تجربی در مقایسه با نمونه‌های کنترل تفاوت قابل توجهی در میزان رشد عصب نشان می‌دهند.

نمونه کنترل عصب ۱ روز پس از آسیب فیبرهای عصبی میلینی را بصورت دسته های منظم و موجی شکل نشان می دهد عکس العمل ایمنی در بالاترین سطح قرار داشته است (شکل شماره ۲) .

بررسی یافته های مربوط به آزمایش های ایمنو هیستوشیمی:
برشهای طولی تهیه شده از عصب های سیاتیک گروه های کنترل و تجربی در ۱ روز، ۳ هفته و ۶ هفته پس از ایجاد آسیب با آنتی بادی مونو کلونال TNF- α رنگ آمیزی شدند . دربرش طولی



شکل ۲. تصویری از ایمنو هیستوشیمی بافت عصب سیاتیک. تصاویر A, B, C, D, E, F به ترتیب مربوط به نمونه های ۱ روز کنترل، ۱ روز تجربی، ۳ هفته کنترل، ۳ هفته تجربی، ۶ هفته کنترل و ۶ هفته تجربی می باشد. بر اساس نتایج بدست آمده با مصرف اتانرسپت به عنوان آنتا گونیست ، تولید پروتئین TNF- α در گروه های تجربی در مقایسه با کنترل در بازه زمانی یکسان کاهش نشان می دهد.

میزان ژن TNF- α بسیار کم و به سختی قابل شناسایی می باشد [۱۲، ۱۷]. میزان شناسایی شده به روش الایزا ۶,۵۳ پیکوگرم در ۵ میلی گرم بافت مرطوب می باشد [۱۷]. متعاقب آسیب آکسونی میزان بیان ژن TNF- α در ناحیه جراحی افزایش می یابد [۶، ۷، ۱۶، ۳۴]. بطوریکه یک ماکزیمم افزایش گذرا در ۲۴ ساعت اول بعد از کراش مشاهده می شود و بعد از آن این میزان رو به کاهش دارد [۶، ۷، ۱۷] و به مقدار نرمال نزدیک می شود، که این تغییرات نشانه آسیب آکسونی می باشد [۷، ۱۷]. در یافته های ما نیز این تغییرات کاملا مشهود است، بطوریکه ۱ روز بعد از کراش در گروه کنترل بیشترین میزان شدت بیان ژن به چشم می خورد که این افزایش ناگهانی و گذرا در شدت بیان ژن، نشانه آسیب آکسونی است [۷، ۱۷، ۲۹، ۳۴]. لافلر و همکارانش نیز نشان دادند، جراحی به فیبرهای آکسونی در سیستم اعصاب محیطی، موجب افزایش بیان ژن TNF- α در سیستم اعصاب محیطی موش [۱۶] و رت [۱۵] و در سلول های شوان رت [۱۶، ۳۴] می شود و گزارشات کلینشونیتزر و همکاران ، کاتو و همکاران ، شماش و همکاران و جرج و همکاران نیز مشابه یافته ای بدست آمده در تحقیق ما می باشد. از سویی دیگر شدت میزان بیان ژن در گروه تجربی ۱ روز بعد از کراش، که بلافاصله بعد از آسیب داروی اتانرسپت دریافت کرده اند، بطور معناداری از گروه کنترل همزمان خود کمتر است . ($P > 0.05$). در سایر گروه ها نیز بین گروه کنترل و تجربی تفاوت معناداری وجود دارد، بطوریکه شدت میزان بیان ژن در گروه

بحث

متعاقب جراحی آکسونی در فیبرهای سیستم عصبی محیطی، فرایند تخریب والرین و ترمیم آکسونی به موازات یکدیگر و به صورت مستقل از هم، آغاز می شود [۳۰]. در این راستا، شبکه پیچیده ای از سایتوکاین ها فعالیت های پیاپی و منظم خود را آغاز می کنند، که حضور به موقع و میزان معین هر یک از آنها، مسبب بروز مرحله ای از واکنش ها و در نتیجه پیشرفت مراحل متوالی فرایند می گردد [۱۴، ۲۱-۲۸، ۳۰-۳۲]. سایتوکاین پیش التهابی TNF- α از جمله سایتوکاین های آغازگر این شبکه پیچیده می باشد [۳۳]. بگونه ای که حضور این سایتوکاین سبب افزایش تولید سایر سایتوکاین های التهابی در مراحل اولیه و کندی در سرعت ترمیم می شود [۷، ۱۰، ۱۲، ۱۷]. بصورت تئوری با مهار TNF- α انتظار داریم تا پدیده ترمیم با سرعت بیشتری انجام گردد. در این پروژه از آنتاگونیست این مولکول استفاده شده است.

مقایسه داده های کمی بیان ژن TNF- α در نمونه های کنترل و تجربی: در این مطالعه ما ابتدا با روش PCR-RT بیان ژن TNF- α را بعد از جراحی در سطح ژنومیک، در حضور اتانرسپت و بدون استفاده از اتانرسپت را مورد بررسی قرار دادیم.

پاسخ های بدست آمده از تحقیق ما نشان می دهد که در گروه نرمال شدت میزان بیان ژن در حداقل مقدار خود می باشد، بطوریکه شماش و همکارانش نیز نشان دادند، که در حالت عادی

مقایسه داده‌های حاصل از ایمونوهیستوشیمی: از آنجاییکه نسخه‌برداری، ترجمه و ترشح سائتوکاین‌ها می‌تواند پیرو مکانیزم-های متفاوتی باشد، بگونه‌ای که همواره بیان یک ژن لزوماً به معنای سنتز پروتئین و سنتز پروتئین لزوماً مشخصه ترشح آن نمی‌باشد [۲۹]، ما با استفاده از ایمونوهیستوشیمی به بررسی میزان حضور پروتئین TNF- α متعاقب کراش به عصب سیاتیک در حضور و عدم حضور اتانرسپت پرداختیم. نتایج ایمونوهیستوشیمی نیز کاهش قابل ملاحظه‌ای را در سطح بیان پروتئین TNF- α در گروه تجربی نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد که در اینجا نیز یک همخوانی میان mRNA و ترشح پروتئین در ناحیه جراحی، به دنبال استعمال آنتاگونیست مشاهده می‌شود. شماش و همکارانش نیز در ۲۰۰۴ نشان دادند که ترشح پروتئین TNF- α وجود دارد، که با نتایج ایمونوهیستوشیمی بدست آمده همخوانی دارد. نتایج بدست آمده از آزمایشات ما نشان می‌دهد میزان بیان پروتئین در محل جراحی متعاقب استعمال اتانرسپت، در گروه تجربی نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است.

نتیجه‌گیری

با توجه به یافته‌ها به نظر می‌رسد استفاده از آنتاگونیست TNF- α بلافاصله بعد از جراحی، موجب مهار اثرات ناشی از پیک غلظتی بیان TNF- α در ۲۴ ساعت بعد از جراحی می‌گردد و نکته حائز اهمیت آن است که تاثیر مهار این پیک غلظتی در تسریع ترمیم عصب قابل توجه می‌باشد. بطوری‌که در گروه‌های تجربی ترمیم بطور معناداری بهتر از گروه‌های کنترل می‌باشد. نکته قابل توجه دیگر این است که در این تحقیق تنها با استعمال یک دوز اتانرسپت بلافاصله بعد از کراش، پیک افزایش میزان TNF- α که ۲۴ ساعت بعد از کراش دیده می‌شود، مهار شده و به نظر می‌رسد مهار این مرحله، باعث بروز نتایج مذکور گردیده است. بطوریکه اثرات ناشی از آن یعنی تسریع ترمیم، حتی در هفته ۳ و ۶ بعد از کراش نیز پایدار بوده است. به نظر می‌رسد، مهار اثرات ناشی از پیک ناگهانی تولید TNF- α در ۲۴ ساعت بعد از کراش تاثیر چشمگیری بر فرایندهای متعاقب جراحی آکسونی دارد.

منابع

1. Sanderland S. Nerve Injury and Repair. Edinburge: Churchil Livingston. 1999.p.183-6.
2. Goushe J, Beikpour H. Study of results from the treatment of sciatic nerve lesions in the lacerated of Iran-Iraq War. Pejouhandeh. 2005.p.362-5.[persian]
3. He C, Chen Z, Chen Z. Enhancement of motor nerve regeneration by nerve growth factor. Microsurgery. 1992;13(3):151-4.
4. Namiko A, Valeria C. Nerve injury signaling. Current opinion in Neurobiology. 2008;18(3):276-83.

تجربی هر بازه زمانی بطور معناداری از شدت میزان بیان ژن در گروه کنترل همزمان با خود کمتر است می‌کند ($P < 0.001$) با در نظر گرفتن نیمه عمر ۳-۵ روزه اتانرسپت [۱۳] تجویز این دارو می‌تواند بر بیان ژن TNF- α اثر داشته باشد و موجب مهار بیان این ژن شود. یافته‌های شاین نیز در سال ۲۰۰۶ مشابه همین یافته‌ها می‌باشد. بررسی روند تغییرات در طی زمان نشان می‌دهد، که شدت میزان بیان ژن در گروه کنترل بعد از ماکزیمم افزایش روز اول، رو به کاهش داشته و با گذشت زمان به مقدار نرمال نزدیک تر می‌شود، اما همچنان تفاوت معناداری بین دو گروه کنترل و تجربی در هر بازه زمانی وجود دارد. ($p < 0.001$). در اینجا نیز یافته‌های ما از این الگو تبعیت می‌کند، اما استعمال اتانرسپت در گروه‌های تجربی، بطور معناداری بیان ژن را مهار نموده است.

مقایسه داده‌های حاصل از مورفولوژی: در مطالعات مورفولوژی نتایج بافت‌شناسی، میزان رزئراسیون آکسون‌ها با میکروسکوپ نوری بررسی شد. نتایج ماکروسکوپی نشان داد، که گرچه در تمام گروه‌ها اعم از کنترل و تجربی، رزئراسیون بافتی صورت گرفته است، اما تعداد آکسون‌ها در گروه‌های تجربی قابل توجه‌تر از گروه‌های کنترل همزمان با خود می‌باشد (شکل ۱). به این ترتیب در نمونه‌های تجربی که با استفاده از آنتاگونیست TNF- α یعنی اتانرسپت طبق جواب‌های بدست آمده در ژنومیک و ایمونوهیستوشیمی کاهش میزان بیان ژن و ترشح TNF- α وجود دارد، عملاً تعداد آکسون‌های رشد یافته بیشتر بوده و ترمیم قابل توجه‌تر می‌باشد. مارتین بندسروس در ۲۰۰۴ نشان داد، ۲۴ ساعت بعد از جراحی، تخریب آکسونی و میلین مشاهده می‌شود و یک هفته بعد اغلب فیبرها تخریب میشوند و ادم اندونوریال کاملاً مشهود است و ۳ هفته بعد از جراحی، ترمیم مشاهده می‌شود، بطوری‌که این روند تا هفته ۶ تکمیل می‌گردد، درحالی‌که یافته‌های ما نشان می‌دهد در نتیجه مهار بیان TNF- α ، ترمیم سریعتر می‌شود [۳۵].

گرچه بعد از آسیب در صورت حفظ تداوم لوله‌های اندونوریال، معمولاً ترمیم به تدریج و در طی گذشت زمان امکان پذیر است، اما در این پژوهش به نظر می‌رسد که در فواصل زمانی یکسان گروه‌هایی که بلافاصله بعد از کراش از آنتاگونیست TNF- α یعنی اتانرسپت استفاده کرده‌اند، از ترمیم بهتری برخوردار بوده‌اند.

5. Smith D, Tweed C, Fernyhough P, Glazner G. Nuclear factor-B activation in axons and Schwann cells in experimental sciatic nerve injury and its role in modulating axon regeneration: studies with Etanercept. Neuropathol Exp Neurol. 2009;68(6):691-700.
6. Stoll G, Jander S, Myers RR. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to

- neuroinflammation. *J Peripher Nerv Syst.* 2002;7(1):13-27.
7. Kinshi K, Li H, Kikuchi S, Myers R, Shubayev V. Immediate Anti-tumor Necrosis Factor- α (Etanercept) Therapy Enhances Axonal Regeneration After Sciatic Nerve Crush. *Neurosci Res.* 2010;88(2):360-8.
 8. Cao Z, Gao Y, Bryson JB, Hou J, Chaudhry N, Siddiq M, et al. The cytokine interleukin-6 is sufficient but not necessary to mimic the peripheral conditioning lesion effect on axonal growth. *J Neurosci.* 2006;26(20):5565-73.
 9. Kleinschnitz C, Brinkhoff J, Zelenka M, Sommer C, Stoll G. The extent of cytokine induction in peripheral nerve lesions depends on the mode of injury and NMDA receptor signaling. *J Neuroimmunol.* 2004;149(1-2):77-83.
 10. Temporin K, Tanaka H, Kuroda Y, Okada K, Yachi K, Moritomo H, et al. Interleukin-1 beta promotes sensory nerve regeneration after sciatic nerve injury. *Neurosci Lett.* 2008;440(2):130-3.
 11. Gillen C, Jander S, Stoll G. Sequential expression of mRNA for proinflammatory cytokines and interleukin-10 in the rat peripheral nervous system: comparison between immune-mediated demyelination and Wallerian degeneration. *J Neurosci Res.* 1998;51(4):489-96.
 12. Myers RR, Campana WM, Shubayev VI. The role of neuroinflammation in neuropathic pain: mechanisms and therapeutic targets. *Drug Discov Today.* 2006;11(1-2):8-20.
 13. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther.* 2008;117(2):244-79.
 14. Oppenheim JJ, Feldman M. Introduction to the role of cytokines in innate and defense and adaptive immunity. In: Oppenheim JJ, Feldman M, editors. *Cytokine reference.* New York: Academic; 2001. p 3-20.
 15. Fleur ML, Underwood J, Rappolee D, Werb Z. Basement membrane and repair of injury to peripheral nerve: defining a potential role for macrophages, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Exp Med.* 1996;184:2311-26.
 16. Taskinen HS, Olsson T, Bucht A, Khademi M, Svelander L, Roytta M. Peripheral nerve injury induces endoneurial expression of IFN- γ , IL-10 and TNF- α mRNA. *J Neuroimmunol.* 2000;102(1):17-25.
 17. Shamash S, Reichert F, Rotshenker S. The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor- α , interleukin-1 α , and interleukin-1 β . *J Neurosci.* 2002;22(8):3052-60.
 18. Wagner R, Myers R. Schwann cells produce TNF- α : Expression in injured and non-injured nerves. *Neuroscience Research.* 1996;73:625-9.
 19. Bonetti B, Valdo P, Stegagno C, Tanel R, Zanusso GL, Ramarli D, et al. Tumor necrosis factor α and human Schwann cells: signalling and phenotype modulation without cell death. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2000;59(1):74-84.
 20. Navarro X, Verdu E, Buti M. Comparison of regenerative and reinnervating capabilities of different functional types of nerve fibers. *Exp Neurol.* 1994;129(2):217-24.
 21. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 2001;104(4):487-501.
 22. Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, et al. A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry.* 67(5):446-57.
 23. Brynskov J, Foegh P, Pedersen G, Ellervik C, Kirkegaard T, Bingham A, et al. Tumour necrosis factor α converting enzyme (TACE) activity in the colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut.* 2002;51(1):37-43.
 24. Mikocka-Walus AA, Turnbull DA, Moulding NT, Wilson IG, Andrews JM, Holtmann GJ. Controversies surrounding the comorbidity of depression and anxiety in inflammatory bowel disease patients: a literature review. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13(2):225-34.
 25. Myers RR, Sekiguchi Y, Kikuchi S, Scott B, Medicherla S, Protter A, et al. Inhibition of p38 MAP kinase activity enhances axonal regeneration. *Exp Neurol.* 2003;184(2):606-14.
 26. Lee JC, Kumar S, Griswold DE, Underwood DC, Votta BJ, Adams JL. Inhibition of p38 MAP kinase as a therapeutic strategy. *Immunopharmacology.* 2000;47(2-3):185-201.
 27. Knight DM, Trinh H, Le J, Siegel S, Shealy D, McDonough M, et al. Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. *Mol Immunol.* 1993;30(16):1443-53.
 28. Brennan FM, Chantry D, Jackson A, Maini R, Feldmann M. Inhibitory effect of TNF α antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet.* 1989;29;2(8657):244-7.
 29. Dinarello C. IL-1: discoveries, controversies and future directions. *Eur J Immunol.* 2010;;40(3):599-606.
 30. Donald DM, Cheng C, Chen Y, Zochodne D. Early events of peripheral nerve regeneration. *Neuron Glia Boil.* 2006;2(2):139-47.
 31. Bruck W, Bruck Y, Friede RL. TNF- α suppresses CR3-mediated myelin removal by macrophages. *J Neuroimmunol.* 1992;38(1-2):9-17.
 32. Rotshenker S. The cytokine network of wallerian degeneration. *Curr Topics Neurochem.* 1997;1:147-56.
 33. Shubayev VI, Myers RR. Upregulation and interaction of TNF α and gelatinases A and B in painful peripheral nerve injury. *Brain Res.* 2000;7;855(1):83-9.
 34. George A, Buehl A, Sommer C. Wallerian degeneration after crush injury of rat sciatic nerve increases endo- and epineurial tumor necrosis factor- α protein. *Neurosci Lett.* 2004;6;372(3):215-9.
 35. Beendszus M, Wessig C, Solymosi L. MRI of peripheral nerve degeneration and regeneration: correlation with electrophysiology and histology. *Exp Neurology.* 2004;188(1):171-77

