Original Article

Localization of Epidermal-Type Fatty Acid Binding Protein in Degeneration and Regeneration of Sciatic Nerve after Crush Injury in Mouse

Jamalpoor Z., M.Sc., Nourani M.R., Ph.D.*, Taghipour H.R., M.D., Owada Y., M.D., Ph.D.

******Chemical Injury Research Center (CIRC), Baqiyatallah Medical Sciences University (BMSU), Mollasadra Avenue, Tehran, Iran*

Abstract

Purpose: The regeneration of axon and myelin sheet after crush injury of peripheral nerves involves interaction of several types of cells, including Schwann cells, monocyte, macrophage and fibroblast. Among them, haematogenous macrophages invading into the peripheral nervous system play a major role in myelin uptake during Wallerian degeneration.

Materials and Methods: In this study 35 C57/BL6 male mice 10 weeks old were used and classified in 7 groups of 5 mice. The localization of epidermal-type fatty acid binding protein (E-FABP) in the mature mouse sciatic nerve after crush injury was examined by immuno-light microscopy.

Results: Numerous macrophages immunopositive for both anti-E-FABP and F4/80 a macrophage marker, were found in degeneration process of sciatic nerve. Macrophages contained phagosomes of various sizes and they were regarded as those actively involved in the phagocytosis of sciatic nerve debrise.

Conclusion: The present detection of E-FABP immunopositivity selectively in invading macrophages suggests possible involvement of E-FABP and/or its fatty acids ligand in the process of peripheral nerve regeneration.

Key words: Sciatic nerve, Regeneration, Macrophages, FABP

مقاله تحقیقی

بیان نوع پوستی پروتئین متصل شونده به اسیدهای چرب (E-FABP) در مراحل آسیب و ترمیم عصب سیاتیک موش

زهرا جمالپور .M.Sc *، محمد رضا نورانی .Ph.D **، حمیدرضا تقی پور .M.D *، یوجی اوادا .M.D.,Ph.D *****

* گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

** مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

*** مرکز تحقیقات تروما دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

**** گروه ارگان آناتومی دانشگاه یاماگوچی، ژاپن

تاریخ وصول: دی‌ماه ۸۷ ، تاریخ پذیرش: اسفندماه ۸۷

چکیده

هدف: پس از اعمال تروما به یک عصب محیطی، تغییرات گسترده‌ای در سطح مولکولی و سلولی اتفاق می‌افتد تا شرایط لازم برای ترمیم عصب به وجود بیاید. با شناخت مولکول‌هایی که در تعامل بین پارامترهای موثر در روند ترمیم عصب محیطی مانند سلول‌های شوآن، منوبیت، ماکروفاژ و فیبروبلاست نقش دارند و شناخت عملکرد آن‌ها می‌توان به مکانیزم مولکولی ترمیم عصب دست یافت.

مواد و روش‌ها: این مطالعه به روش تجربی انجام شد. ۳۵ موش نژاد C57BL6 در ۷ گروه ۵ عددی شامل طبیعی، ۱، ۲، ۳ روزه و ۱، ۳، ٦ هفته بعد از عمل جراحی له شدگی عصب بررسی شد. مقاطع نیمه نازک عصب تحت آنالیز مورفومتری و مورفولوژی قرار گرفتند و برش‌های عرضی ۲۰ میکرونی یخی برای لوکالیزاسیون مولکول FABP (Fatty Acid Binding Proteins) در مراحل دژنرسانس و رژنرسانس استفاده شد.

یافته‌ها: در این مطالعه مولکول E-FABP (Epidermal-type Fatty acid Binding Protein) در ماکروفاژهای مهاجم به محل آسیب عصب به شدت بیان شد.

نتیجه‌گیری: بیان مولکول E-FABP بر نقش فعال آن یا لیگاندهایش و اسیدهای چرب موجود در عصب سیاتیک در پروسه ترمیم دلالت دارد.

کلید واژه‌ها: عصب سیاتیک، ترمیم، ماکروفاژ، E-FABP

مقدمه

امروزه آسیب‌های وارده به سیستم عصبی محیطی یکی از معضلات تهدید کننده سلامت جامعه بوده و در اکثر موارد تروما مشاهده می‌شود. در بسیاری ازموارد این آسیب دیدگان برای تمام طول عمر خود از ناتوانی های جسمی رنج می‌برند [۱]. همچنین ۵ درصد موارد زخم‌های باز ناشی از جراحاتی مانند سوانح رانندگی و مصدومیت‌های ورزشی با آسیب‌های سیستم عصبی محیطی همراه هستند [۲]. تنها در سال ۱۹۹۵ در ایالات متحده بیش از ۵۰۰۰۰ مورد عمل‌های ترمیمی برای درمان ضایعات اعصاب محیطی انجام شده است [۳]. صدمات و به‌دنبال آن آسیب اعصاب محیطی موجب ایجاد دردهای

آدرس مکاتبه: تهران، خیابان ملاصدرا، خیابان شیخ بهایی، مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)

E-mail:rnourani@bmsu.ac.ir

نروپاتک (Neuropathic pains) می‌شوند که یکی از موارد شایع مراجعات بالینی را تشکیل می‌دهند [٤].

آکسون هر فیبر عصب محیطی به‌وسیله میلین پوشیده شده و توسط بافت همبندی به‌نام اندونوریوم (Endoneurium) احاطه شده است. یک دسته از آکسون‌ها (فاسیکول) توسط غلاف محکم‌تری از بافت همبند به‌نام پری نوریوم (Perineurium) پوشیده شده است. این غلاف علاوه بر محافظت الیاف عصبی شامل عروق خونی است که تغذیه عصب را تأمین می‌کند. چند فاسیکول که یک عصب محیطی را تشکیل می‌دهند به‌وسیله غلاف نسبتاً محکمی که حالت ارتجاعی نسبتاً خوبی دارد به‌نام اپی‌نوریوم (Epineurium) پوشیده شده که عروق خونی در ضخامت آن وجود داشته و تغذیه عصب را تأمین می‌کند. این غلاف نسبتاً ضخیم بوده و با توجه به خاصیت ارتجاعی خوبی که دارد عصب را در مقابل کشش‌های وارده به آن محافظت می‌نماید.

ترمیم و روش‌های ترمیمی اعصاب محیطی آسیب دیده

بعد از ایجاد آسیب در اعصاب محیطی قطعه پروگزیمال عصب قطع شده تا حدودی توانایی بازسازی و بازگشت مجدد عملکرد را دارد. سلول‌های شوان، فیبروبلاست‌ها، ماکروفاژها و مونوسیت‌ها با کمک یکدیگر با پاکسازی باقیمانده‌های میلین، آزاد نمودن نوروتروفین‌ها و هدایت آکسون‌ها موجبات فعالیت مجدد رشته عصبی را فراهم می‌آورند. برای بهبود این روند ترمیمی دو انتهای عصب قطع شده را مجدداً به هم بخیه می‌زنند در حالی‌که این اتصال مجدد در صورتی به‌درستی صورت می‌گیرد که دو انتهای رشته عصبی قطع شده به دقت و بدون اینکه تحت فشار باشند در مجاورت یکدیگر قرارگیرند و بایستی توجه ویژه‌ی نیز به آرایش و جهت قرارگیری فاسیکول‌های موجود در رشته عصبی صورت گیرد [٥]. اما به‌طور کلی فرایند ترمیم رشته عصبی یک فرایند پیچیده بیولوژیک بوده و هنگامی که یک رشته عصبی آسیب می‌بیند به سختی بهبود یافته و در نهایت نقصان عملکرد در اندام‌های مرتبط با آن مشاهده می‌شود [٦].

پس از اعمال تروما به یک عصب محیطی، تغییرات گسترده‌ای در سطح مولکولی و سلولی اتفاق می‌افتد تا شرایط لازم برای ترمیم عصب به‌وجود بیاید. تغییرات مورفولوژیکی که به‌دنبال آسیب اتفاق می‌افتد شامل والرین دژنرسانس (Wallerian Degeneration) قطعه دیستال نسبت به محل ضایعه، تکثیر سلول‌های شوان ، جوانه زدن و رشد بطئی و طویل شدن آکسون، میلینی شدن و سرانجام ترمیم است [٧].

مرحله میلینی شدن آکسون در حال رشد از مراحل بحرانی پروسه ترمیم است، ۷۰ تا ۸۰ درصد مواد تشکیل دهنده میلین چربی و ۲۰ تا ۳۰ درصد پروتئین است [٨]. در سیستم اعصاب محیطی سلول‌های شوان سازنده غلاف میلین هستند و نقش مهمی را نه تنها در تکامل، مورفولوژی و فعالیت عصب سالم بلکه در مراحل آسیب و ترمیم عصب بازی می‌کند [٩ و١٠].

سیگنال‌های ارسالی توسط پدیده والرین دژنرسانس ماکروفاژهای مهاجم را به محل عصب در حال تخریب جذب می‌کند و علاوه بر اینکه بقایای میلین و آکسون عصب در حال دژنره را می‌بلعند بلکه نقش مهمی را در باز جذب میلین در حین WD بازی می‌کند [١١]. کلسترول میلین توسط ماکروفاژها بازیافت و ذخیره می‌شود و سپس در اختیار سلول‌های شوان گذاشته می‌شود تا در ساخت میلین در مرحله ترمیم قرار گیرد [١٢].

اسیدهای چرب با زنجیره طولانی

اسیدهای چرب با زنجیره طولانی (Long chain fatty acid) علاوه بر تأمین انرژی سلولی، سوبسترای لازم برای بیوژنز غشایی هستند و به‌عنوان مولکول سیگنال‌دهنده هم عمل می‌کنند. این اسیدهای چرب و مشتقاتشان مستقیم یا غیرمستقیم مراحل سلولی را تنظیم می‌کنند، مانند تمایز (Differentiation)،

تکامل (Development) ، بیان ژن (Geneexpression)، فعالیت‌های آنزیمی، رسپتورهای غشایی و کانال‌های یونی. اسیدهای چرب یا متابولیت‌های آن به‌سختی در محیط آبکی سیتوپلاسم قابل حل شدن هستند بنابراین برای جابجایی آن‌ها درون سلول بین ارگانل‌های مختلف یا پروتئین‌ها توسط پروتئین‌های متصل به اسیدهای چرب به‌عنوان حامل عمل می‌کنند [۱۵-۱۳].

پروتئین‌های متصل به اسیدهای چرب

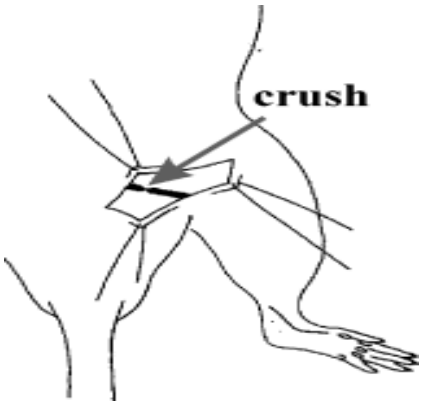
Fatty Acid Binding Proteins) FABPs) پروتئین داخل سیتوپلاسمی و غیرآنزیمی با وزن مولکولی ۱٤ کیلو دالتون است که قابلیت اتصال به اسیدهای چرب با زنجیره طولانی را دارد. ایزومرهای مختلفی از این مولکول شناخته شده و براساس اینکه از چه بافتی تخلیص شده باشد نام‌گذاری شده‌اند مانند نوع پوستی (Epidermal-type FABP)، نوع مغزی (Brain-type-FABP)، نوع چربی (Adipocyte-type-FABP)، نوع قلبی (Heart-type)، نوع روده‌ای (Intestinal-typeI-FABP)، نوع کبدی (Liver-type L-FABP) و غیره [۲۲-۱٦].

مطالعات متفاوتی ثابت کرده‌اند که هر کدام از گونه‌های FABP علاوه بر بافت منشا در بافت‌های دیگری هم وجود دارند [۲۹- ۲۳]. بعضی از این پروتئین‌ها به نوع خاصی از اسیدهای چرب گرایش دارند؛ به عنوان مثال B-FABP گرایش زیادی به اسیدهای چرب گروه غیراشباع N-3 دارد [۳۰ و ۳۱]. در حالی که E-FABP وابستگی خاصی به اسیدهای چرب اشباع و H-FABP به گروه غیراشباع N-3 گرایش دارد [۳٤-۳۱].

نقش‌های متفاوتی به این مولکول مانند کنترل در دریافت اسیدهای چرب و مشتقات آن‌ها و توزیع داخل سلولی آن‌ها، تلفیق فعالیت آنزیم‌های مؤثر در متابولیسم اسیدهای چرب، محافظت از غشای سلولی در قبال دترژنت‌ها(detergent) و انجام وظیفه به عنوان مولکول سیگنال دهنده نسبت داده شده‌است. اسیدهای چرب پس از عبور از غشای سلول و به‌دلیل غیرمحلول بودن در محیط آبکی سیتوپلاسم، بایستی به FABP مورد نظر متصل شده و به ارگانل‌های داخل سلول مانند میتوکندری برای تولید انرژی، غشای سلول برای ترمیم و بازسازی، هسته برای بیان ژن و غیره. حمل شود [۳۷-۳۵]. با توجه به فعالیت زیاد عوامل موثر در مراحل آسیب و ترمیم عصب محیطی در جذب و بازیافت اسیدهای چرب و متابولیسم آن‌ها انتظار می‌رود تا ژن بعضی از انواع FABP ها در این روند فعال شوند. در این مطالعه تلاش خواهد شد تا نسبت به لوکالیزاسیون این مولکول در مراحل دژنرسانس و رژنرسانس عصب به روش ایمونوهیستوشیمی اقدام شود و سپس نقش مولکولی آن‌ها در روند آسیب و ترمیم بررسی شود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه که به روش تجربی انجام شد، موش نژاد C57BL6 نر ۸ تا ۱۲ هفته‌ای با وزن حدود ۲۰ تا ۲۵ گرم استفاده شد. ۳۵ موش در ۷ گروه ۵ عددی شامل طبیعی، ۱، ۲ و ۳ روزه و ۱، ۳ و ٦ هفته بعد از عمل جراحی بررسی شدند. موش‌ها در شرایط استاندارد و براساس دستورالعمل حیوانخانه مرکزی با رعایت مسایل اخلاقی نگهداری شدند. آن‌ها قبل از عمل حراحی با تزریق داخل صفاقی نمبوتال بیهوش شده و سپس با برش پوستی به عصب سیاتیک در ناحیه بالایی ران دسترسی پیدا کرده (شکل ۱) و با یک میکروفورسپس آغشته به تولوییدن بلوی غلیظ، عصب سیاتیک در ۵ میلی‌متر پایین‌تر از بریدگی سیاتیک به مدت ۱ دقیقه تحت فشار قرار داده شد. ۳ تا ٤ میلی‌متر پایین‌تر از محل آسیب با یک بخیه اپی‌نورال مشخص و پس از بخیه زدن فاصله دقیق بین کنار پایینی محل آسیب تا بخیه اندازه‌گیری شد [۳۸].



شکل ۱. محل اعمال آسیب فشاری به عصب سیاتیک

مطالعه مورفولوژی

عصب سیاتیک موش‌ها تحت بیهوشی کامل پس از ۱، ۳ و ٦ هفته پس از جراحی و نمونه طبیعی، تحت بیهوشی کامل خارج شده و بلافاصله در تثبیت کننده ۲/۵ درصد گلوتارالدئید در ۰/۰۵ مولار بافر فسفات pH= 7.4 به‌مدت ۲ ساعت قرار داده شد و عصب سیاتیک تثبیت شده از کنار پایینی محل آسیب به‌طول ۳ میلی متر برش زده شد و به‌مدت ۲ ساعت در محلول ۲ درصد تتراکسیدسدیم- فسفات بافر pH= 7.4 قرار گرفت. با قرار دادن نمونه در درجات نزولی اتانول آن‌را آبگیری کرده و پس از گذراندن از پروپیلن اکساید در اپوکسی رزین قالب‌گیری شد. با استفاده ار اولترامیکروتوم برش‌های عرضی نیمه نازک با ضخامت ۰/۷۵ میکرونی از کنار پروگزیمال قطعه دیستال به سمت دیستال به‌طول ۰/٤ میلی‌متر زده شد و پس از رنگ‌آمیزی با تولوییدن بلو توسط میکروسکوپ نوری مطالعه شد.

مطالعه مورفومتری

مورفومتری به‌وسیله برنامه نرم افزاری آنالیز تصویر (NIH Image, National Instituted of Health) انجام شد. تصاویر دیجیتال توسط دوربین سه مگا پیکسل نیکون که متصل به میکروسکوپ نوری بود تهیه شد. فیبرهای میلینی (MFs) هر عصب در ۵ منطقه که به‌صورت تصادفی انتخاب شده بودند به مساحت کلی ۲۰۰ میکرومتر مربع شمارش (۳۸) و مقایسه شدند.

مطالعه ایمونوهیستوشیمی

برای مطالعه بیان پروتئین‌ها ۵ میلی‌متر از عصب سیاتیک موش ها تحت بیهوشی کامل پس از ۱ و ۳ روز و ۱، ۳ و ٦ هفته پس از جراحی به‌صورتی که شامل ۱ میلی‌متر قسمت سالم بالایی و ۱ میلی‌متر محل آسیبی و ۳ میلی‌متر از قسمت پایینی باشد، خارج شد. نمونه‌ها در تثبیت کننده ٤ درصد پارافرمالدییید در فسفات بافر سالین (PBS: Phosphate Buffer Saline) به مدت ٤ ساعت قرار گرفت و پس از شستشو با PBS در محلول ۲۰ درصد ساکروز قرار می‌گیرد. با استفاده از کرایواستات برش‌های طولی به ضخامت ۲۰ میکرون تهیه شد. آنتی‌بادی اولیهE-FABP و F4/80 که یک مارکر ماکروفاژ است، استفاده شد. آنتی‌بادی ثانویه-Anti Rabbit IgG برای E-FABP و آنتی‌بادی ثانویه Anti-rat IgG برای F4/80 استفاده شد (جدول ۱). با ا استفاده از پروتکل ایمونوهیستوشیمی استراپتاویدین- بیوتین برش‌های تهیه شده رنگ‌آمیزی انجام شد.

جدول ۱. لیست آنتی‌بادی های مورد استفاده

آنتی‌بادی	غلظت در PBS	نوع آنتی‌بادی	هدف اختصاصی
E-FABP	0.5 ug/ml	اولیه	در این پروژه مشخص می‌شود
آنتی F4/80	۱:۲۰۰	اولیه	مارکر ماکروفاژ
Anti Rabbit IgG conjugate to fluorescent Alexa488	۱:۲۰۰	ثانویه	آنتی‌بادی ثانویهE-FABP
Anti Rabbit IgG. biothinilated	۱:۲۰۰	ثانویه	آنتی‌بادی ثانویه E-FABP
Anti Rat IgG conjugate to fluorescent Alexa594	۱:۲۰۰	ثانویه	آنتی‌بادی ثانویه F4/80
Anti Rat IgG. biothinilated	۱:۲۰۰	ثانویه	آنتی‌بادی ثانویه F4/80

مطالعه فلوئورسنت ایمونوهیستوشیمی

در این مطالعه از رنگ‌های فلوئورسنت متصل به آنتی‌بادی ثانویه Anti-Rat IgG-Alexa594 برای آنتی‌بادی اولیه F4/80 و Anti-Rabbit IgG- Alexa488 (Molecular Probe, Eugene, OR, USA) برای آنتی‌بادی اولیه E-FABP استفاده و با میکروسکوپ فلوئورسنت بررسی شد.

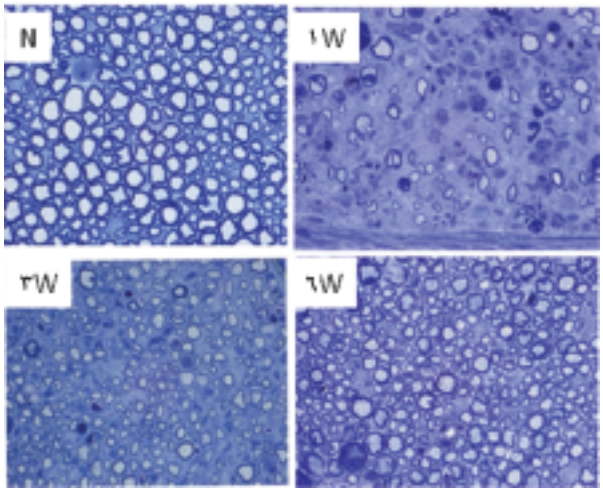
یافته‌ها

مورفولوژی و مورفومتری

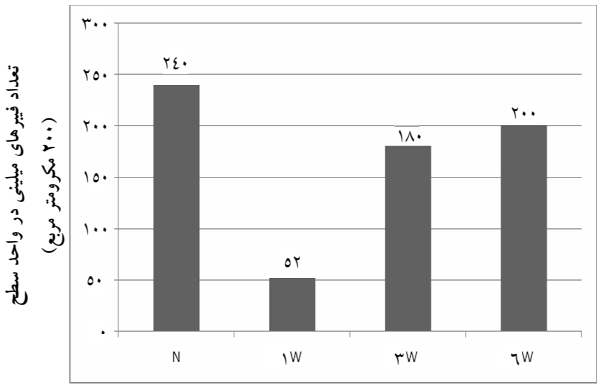
در این مطالعه به عصب سیاتیک دراثر فشار فورسپس آسیب وارد کرده و با ثابت نمودن نمونه‌ها توسط گلوتارآلدئید و تتراکسیداسمیوم، چربی غلاف میلین حفظ شده و در برش‌های عرضی به‌صورت یک حلقه تقریباً سیاه که پیرامون آکسون قرار دارد، دیده می‌شود. برش‌های نیمه نازک با تولوئیدین بلو رنگ‌آمیزی شده و با میکروسکوپ نوری فیبرهای عصبی میلینی عصب‌های سیاتیک در واحد سطح شمارش شدند (قطر> ۳ میکرومتر). در نمونه سالم فیبرهای میلینی به‌صورت دوایری که آکسون را احاطه کرده‌اند در دستجات منظم سازماندهی شده‌اند. یک هفته پس از ایجاد آسیب تعداد فیبرهای عصبی میلینی به‌طور قابل توجهی (۲۱/۷ درصد باقی مانده) کاهش پیدا کردند و در نمای برش عرضی به‌صورت پراکنده توزیع شده و قطعات شکسته این فیبرهای میلینی توسط ماکروفاژها بلعیده می‌شوند. تعداد فیبرهای عصبی میلینی پس از ۳ هفته از آسیب و طی مراحل ترمیم افزایش پیدا کرد (۷۵ درصد)، قطر آکسون‌ها و ضخامت غشای میلین در مقایسه با گروه طبیعی بسیار کوچکتر به نظر می‌رسند. این تعداد پس از گذشت ٦ هفته نسبت به ۳ هفته افزایش کمی دارد و تقریباً نمای نزدیک به نمونه سالم را دارد (۸۳ درصد) (شکل ۲ و۳).

ایمونوهیستوشیمی

E-FABP: برش‌های طولی تهیه شده از عصب‌های سیاتیک نمونه‌های طبیعی، ۱ و ۳ روزه و ۱، ۳ و ٦ هفته پس از ایجاد

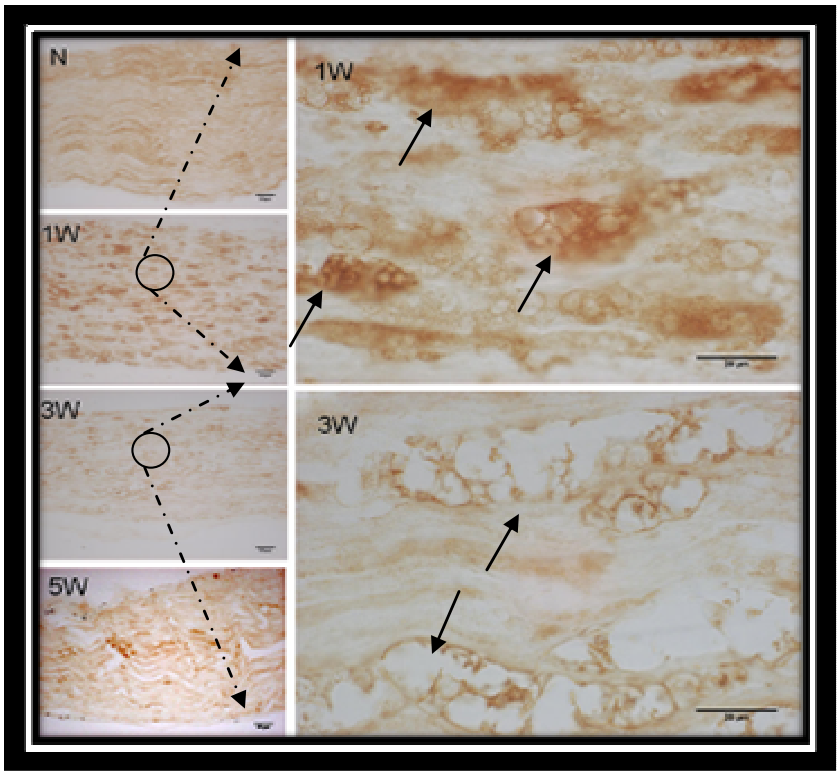


شکل ۲. در این شکل برش عرضی از یک عصب سیاتیک قبل و بعد از آسیب له شدگی نمایش داده شده است. در نمونه طبیعی رشته های عصبی میلین دار بصورت منظم سازماندهی شده‌اند (N). ۱ هفته پس از آسیب و شروع دژنرسانس تقریبا اکثر رشته‌های عصبی دژنره می‌شوند و فقط تعدادی رشته عصبی میلین دار به چشم می‌خورد. در شکل مربوط به ۳ هفته پس از آسیب تعداد زیادی رشته عصبی میلین دار در حال بازسازی دیده می‌شوند. قطر آکسونها و ضخامت غشای میلین در مقایسه با نرمال بسیار کوچک است و ٦ هفته پس از آسیب با نمای تقریبا مشابه با نمونه نرمال روبرو هستیم و بازسازی تقریبا رو به اتمام است. (بزرگنمایی x100)



شکل ۳. یک هفته پس از ایجاد آسیب تعداد فیبرهای عصبی میلینی به‌طور قابل توجهی در نمای برش عرضی (۲۱/۷ درصد باقی مانده) کاهش پیدا کرده‌اند. تعداد فیبرهای عصبی میلینی پس از ۳ هفته از آسیب و طی مراحل ترمیم افزایش پیدا می‌کنند (۷۵ درصد)، این تعداد پس از گذشت ٦ هفته نسبت به ۳ هفته افزایش کمی‌دارد و تقریباً نمای نزدیک به نمونه سالم را دارد (۸۳ درصد).

آسیب با آنتی‌بادی پلی کلونال E-FABP رنگ‌آمیزی شدند. در برش طولی نمونه طبیعی، عصب فقط یک رنگ زمینه‌ای



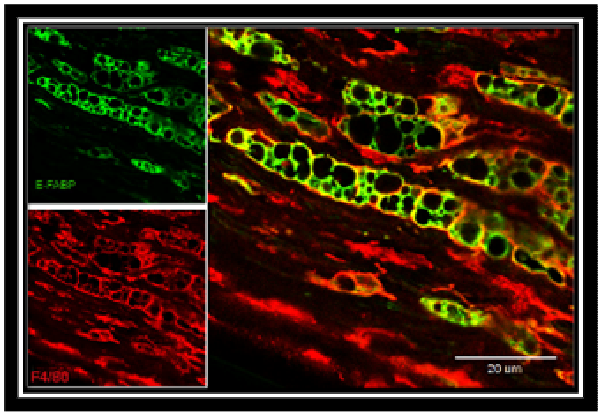
شکل ٤. در این شکل برش طولی عصب سیاتیک که با آنتی‌بادی E-FABP رنگ‌آمیزی ایمنی شده اند به چشم می‌خورد. (N) دربرش طولی نمونه نرمال عصب هیچ عکس العمل ایمنی وجود ندارد. (1W) یک هفته پس از آسیب سازماندهی منظم فیبرهای عصبی از بین رفته و تعداد زیادی سلول که به این آنتی‌بادی واکنش مثبت دارند دیده می‌شوند. با بزرگنمایی بیشتر نمای واکوئوله و فومی‌شکل این سلول‌ها (پیکان) بخوبی نمایان است. (3W) شدت واکنش آنتی‌بادی در سلول‌های مثبت پس از سه هفته از آسیب کاهش یافته و تعدادشان نیز کمتر شده است. سلول‌های فوق متورم بنظر میرسند و پس از پنج هفته (5W) نمای برش طولی عصب در حال ترمیم مشابه نمونه سالم به نظر می‌رسد.

فیبرهای عصبی میلینی را به‌صورت دسته‌های منظم و موجی شکل نشان می‌دهد و هیچ‌گونه عکس‌العمل به آنتی‌بادی دیده نمی‌شود. مشابه این الگو در یک روز بعد از آسیب نیز به چشم می‌خورد. سازماندهی منظم فیبرهای عصبی از روز دوم پس از آسیب به‌صورت تصاعدی دچار بی‌نظمی شده و در روز هفتم پس از آسیب این بی‌نظمی به حداکثر می‌رسد. E-FABP آنتی‌بادی یک هفته پس از آسیب عصب درتعداد زیادی سلول که به‌صورت ساختمان دوکی شکل در موازات طولی عصب سازماندهی شده‌اند به‌شدت بیان می‌شوند. سیتوپلاسم این سلول‌ها واکوئوله و نمای کف صابونی دارند (شکل ٤). در هفته سوم پس از آسیب تعداد این سلول‌ها کمتر شده و واکوئول‌های آن‌ها متورم به نظر می‌رسند و شدت واکنش به E-FABP نیز کاهش می‌یابد (شکل ٤). در هفته پنجم فیبرهای عصبی به‌صورت موازی و در امتداد طولی عصب کنار یکدیگر به‌صورت منظم قرار می‌گیرند و با توجه به مورفولوژی به نظر می‌رسد که عصب ترمیم یافته است؛ گرچه هنوز تعداد کمی از سلول‌های دوکی شکل به چشم می‌خورد.

ایمونوفلوئورسنس

حضور ساختمان‌های دوکی شکل حاوی پروتئینE-FABP در عصب آسیب دیده یک سئوال اساسی را در ذهن مطرح می‌کند که چه سلولی این پروتئین را بیان می‌کند؟ برای فهم دقیق و شناخت نوع سلول‌هایی که مولکول E-FABP را به مقدار زیاد بیان می‌کنند اقدام به طراحی آزمایش رنگ‌آمیزی دوگانه به روش ایمونو فلوئورسنت شد. در این مطالعه

برش‌های ۲۰ میکرونی طولی عصب سیاتیک یک هفته پس از اعمال له شدگی به‌صورت همزمان با آنتی‌بادی F4/80 که یک نشانگر شناخته شده برای ماکروفاژ است و آنتی‌بادی E-FABP رنگ‌آمیزی شدند. تقریباً تمامی سلول‌هایی که به آنتی‌بادیE-FABP عکس‌العمل نشان داده‌اند همزمان به بیومارکر ماکروفاژ هم پاسخ ایمنی مثبت نشان دادند (شکل ۵). در نتیجه می‌توان گفت که سلول‌هایی که واکنش ایمنی مثبتE-FABP دارند و همزمان واکنش ایمنی مثبت به بیومارکرF4/80 دارند ماکروفاژ هستند. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که در این مرحله از آسیب و ترمیم عصب سیاتیک در موش‌های بالغ، ژن مولکول E-FABP در ماکروفاژهای مهاجم به محل ضایعه به شدت بیان شده‌اند.



شکل ۵. در تصویر آنتی‌بادی F4/80به رنگ قرمز و آنتی‌بادیE-FABP به رنگ سبز و رنگ زرد مربوط به سلول‌هایی است که هردو آنتی‌بادی در آنها عکس‌العمل نشان داده‌اند.

بحث

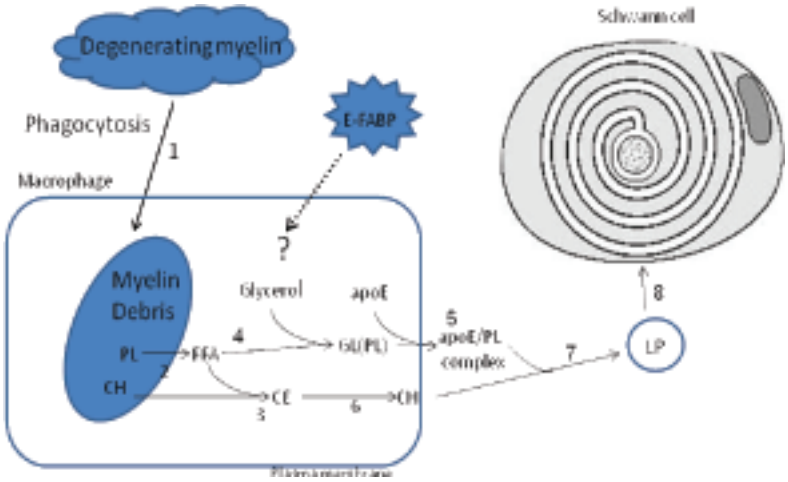
آسیب اعصاب محیطی یکی از شایع‌ترین جراحت‌های ناشی از حوادث و به‌خصوص جنگ است. پس از اعمال تروما به یک عصب محیطی، تغییرات گسترده‌ای در سطح مولکولی و سلولی اتفاق می‌افتد تا شرایط لازم برای ترمیم عصب به‌وجود بیاید. تغییرات مورفولوژیکی که به‌دنبال آسیب اتفاق می‌افتد شامل والریان دژنرسانس قطعه دیستال نسبت به محل ضایعه، تکثیر سلول‌های شوان جوانه زدن و رشد بطئی و طویل شدن آکسون، میلینی شدن و سرانجام ترمیم است [۷].

در این مطالعه در اثر فشار وارده به عصب سیاتیک علاوه بر آسیب غلاف میلین، آکسون سلول عصبی نیز قطع شده ولی غلاف نگهدارنده سالم است و موجب اکسنوتمزیز (Axonotmesis) می‌شود و والریان دژنرسانس در سگمان پایین نسبت به محل آسیب اتفاق می‌افتد.

برای بررسی مراحل آسیب و ترمیم در سطح میکروسکوپ نوری اقدام به تهیه برش‌های نیمه نازک شد و مشاهده شد که در برش عرضی از یک عصب سالم، رشته‌های آکسونی که توسط حلقه‌های میلینی احاطه شده‌اند وجود دارند. این رشته‌ها به‌صورت منظم در دسته‌های مختلف توسط Epi-, Peri- and Endoneurium سازماندهی می‌شوند. در حین دژنرسانس عصب، این نظم به هم خورده و رشته‌های عصبی میلین دار به‌طور چشمگیری کاهش می‌یابد، به‌طوری که یک هفته پس از آسیب حدود ۲۱ درصد رشته‌ها سالم باقی می‌مانند و بقیه طی فرایند والرین دژنرسانس و فعالیت ماکروفاژ ها حذف می‌شوند. تعداد رشته‌های عصبی میلین‌دار در مرحله رژنرسانس افزایش یافته به‌صورتی که سه هفته پس از آسیب حدود ۷۵ درصد رشته‌ها ترمیم شده و پس از ۶ هفته تقریباً نمای یک عصب سالم را نشان می‌دهد غلاف‌های میلینی حاوی آکسون‌های ترمیم یافته به‌صورت دسته‌جات (Fescicles) منظم در برش عرضی به چشم می‌خورند؛ بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که در ضایعات فشاری عصب سیاتیک موش حداقل سه هفته وقت نیاز است تا شاهد برگشت فعالیت حرکتی باشیم.

اتو (Eto) و همکارانش عصب سیاتیک موش را به‌مدت ۳۰ ثانیه تحت فشار قراردادند و مراحل آسیب و ترمیم را با استفاده از برش‌های عرضی ۰/۷۵ میکرومتری و میکروسکوپ نوری بررسی و نتایج مشابه با یافته‌های این تحقیق را گزارش کردند [۳۹] (شکل ۲).

رنگ‌آمیزی ایمنی دوگانه با آنتی‌بادی‌های E-FABP و F4/80 ، واکنش ایمنی E-FABP در ماکروفاژهای مهاجم به منطقه والرین دژنرسانس به‌صورت واضح نشان داده شده است به‌صورتی که تمامی سلول‌هایی که واکنش مثبت ایمنی به



شکل٦. میلین درون سلول شوآن در حال دژنره شدن بوسیله ماکروفاژ بلعیده می‌شود [۱]. فسفولیپید (PL) میلین هیدرولیز شده و اسید چرب آزاد (FFA) تولید می‌شود [۲] و سپس در اثراستری شدن به کلسترید استر (CE) [۳] و گلیسرولیپید/ فسفولیپید [٤] تبدیل می‌شود. PL با آپولیپوپروتئین E (apoE) کمپلکس تشکیل داده و به خارج از ماکروفاژ ترشح می‌شوند [۵]. کلسترول دیواره سلولی از کلسترید استر (CE) داخل سلولی تامین می‌شود [٦]. کمپلکس PL با آپولیپوپروتئین E (apoE) با دریافت کلسترول غشا پلاسمایی , ذرات لیپوپروتئین خارج سلولی را تشکیل می‌دهند [۷]. ذرات لیپوپروتئین خارج سلولی بتدریج توسط سلول‌های شوآن که در بازسازی میلین دخالت دارند جذب می‌شوند و به عنوان ماده اصلی در فرایند بازسازی میلین شرکت می‌کنند [۸].

E-FABP داشتند همزمان به آنتی‌بادی F4/80 نیز واکنش مثبت نشان دادند. این یافته که برای اولین بار گزارش می‌شود این سئوال را مطرح می‌کند که چرا مولکول E-FABP در یک زمان خاص در ماکروفاژهای مهاجم بیان می‌شود و چه نقشی در سیکنالینگ سلولی و مولکولی در مراحل آسیب و ترمیم بازی می‌کند؟

گودروم(Goodrum) و همکارانش گزارش کردند که با شروع دژنرسانس عصب قطعات میلین توسط ماکروفاژها بلعیده شده و سپس متابولیسم چربی برای تبدیل دبریدها به اسیدهای چرب آزاد و در نهایت ترشح لیپوپروتین خارج سلولی افزایش می‌یابد. قطعات میلین عصب در حال دژنره شدن به‌وسیله ماکروفاژ بلعیده می‌شود. فسفولیپید (Phospholipid) میلین هیدرولیز شده و اسید چرب آزاد (FFA) تولید می‌شود و سپس در اثر استری شدن به کلسترید استر (CE) و گلیسرولیپید/ فسفولیپید تبدیل می‌شود. فسفولیپید با آپولیپوپروتئین E (apoE) کمپلکس تشکیل داده و به خارج از ماکروفاژ ترشح می‌شوند. کمپلکس PL با آپولیپوپروتئین E (apoE) با دریافت کلسترول غشای پلاسمایی (کلسترول دیواره سلولی از کلسترید استر (CE) داخل سلولی تأمین می‌شود)، ذرات لیپوپروتئین خارج سلولی را تشکیل می‌دهند. ذرات لیپوپروتئین خارج سلولی به‌تدریج توسط سلول‌های شوان که در بازسازی میلین دخالت دارند جذب می‌شوند و به عنوان ماده اصلی در فرایند بازسازی میلین شرکت می‌کنند و بدین وسیله مواد لازم برای بازسازی میلین در اختیار سلول‌های شوان فعال در میلین‌سازی قرار می گیرد (شکل٦). هیراتا (Hirata) و همکارانش در بررسی نقش ماکروفاژها در مراحل آسیب و ترمیم عصب محیطی گزارش کردند که ماکروفاژها علاوه بر شرکت در فاگوسیتوزیس میلین، ترشح فاکتورهای میتوژنیک و اینترلوکین ۱، در ساخت و ترشح آپولیپوپروتئین E برای به‌کارگیری مجدد چربی‌ها در مراحل بازسازی عصب سیاتیک نقش دارند [٤۰].

اخیراً بیان مولکول E-FABP در سلول‌های دندریتی پالپ سفید طحال پس از اعمال LPS (Lipopoly Sacharide) توسط کیتاناکا (Kitanaka) و همکارانش گزارش شده است؛ آن‌ها ۲٤ ساعت پس از اعمال داخل صفاقی LPS با لمفوسیت‌های آپوپتوز شده در پالپ سفید طحال مواجهه شدند که سپس

توسط سلول‌های دندریتی بلعیده می‌شوند. سلول‌های دندریتی در این مرحله ظاهری گرد و بزرگ دارند و سلول‌های مرده بلعیده شده با رنگ‌آمیزی TUNEL نیز مشخص شده است که نشان‌دهنده فعالیت فاگوسیتوزی سلول‌های دندریتی است. سلول‌های دندریتی که پاسخ ایمنی مثبت به E-FABP نشان داده‌اند جزء سلول‌های دندریتی CD^{8+} طبقه‌ندی شده‌اند [٤١] که نقش اختصاصی در متابولیسم و انتقال سیگنال اسیدهای چرب دارد و در نهایت این مولکول را به عنوان نشانگر زیستی سلول‌های دندریتی پالپ سفید طحال معرفی کردند [٤٢]. نورانی (Nourani) و همکارانش حضور مولکولE-FABP را در ماکروفاژهای مهاجم به فولیکول‌های در حال آترزی تخمدان گزارش کرده‌اند؛ در هر پریود جنسی و اوولاسیون تخمدان، تعداد زیادی فولیکول شروع به رشد می‌کنند و در موش تعداد کمی از آن‌ها به مرحله بلوغ و اوولاسیون می‌رسند و بقیه در مسیر رشد دچار آترزی می‌شوند و توسط ماکروفاژهای مهاجم بلعیده می‌شوند. با توجه به اینکه سلول‌های فولیکولی سرشار از هورمون‌های استروئیدی هستند و ترکیب بیوشیمیایی این هورمون‌ها از اسیدهای چرب است بنابراین حضور مولکول E-FABP در ماکروفاژهای فعال براساس نقش ذاتی‌اش قابل انتظار است [٣٦]. با توجه به نقش‌های متفاوتی مولکول‌های FABP مانند کنترل در دریافت اسیدهای چرب و مشتقات آن‌ها و توزیع داخل سلولی آن‌ها، تلفیق فعالیت آنزیم‌های مؤثر در متابولیسم اسیدهای چرب، محافظت از غشای سلولی در قبال دترژنت‌ها و انجام وظیفه به‌عنوان مولکول سیگنالینگ و با توجه به یافته‌های این تحقیق و نتایج تحقیقات دیگران ، می‌توان گفت که ماکروفاژهای مهاجم به عصب در حال دژنرسانس، تخمدان و پالپ سفید طحال با تغییرات ناشناخته داخل سلولی در متابولیسم اسیدهای چرب و چربی‌ها به‌وسیله فاگوسیتوزیس فعال ارتباط دارد.

سیگنال‌های ارسالی توسط پدیده والرین دژنرسانس ماکروفاژهای مهاجم را به محل عصب در حال تخریب جذب می‌کند. آن‌ها علاوه بر این‌که بقایای میلین و آکسون عصب در حال دژنره را می‌بلعند، نقش مهمی را در باز جذب میلین در حین والرین دژنرسانس بازی می‌کنند. کلسترول میلین توسط ماکروفاژها بازیافت و ذخیره می‌شود و سپس در اختیار سلول‌های شوان گذاشته می‌شود تا در ساخت میلین در مرحله ترمیم استفاده شود. بیان مولکول E-FABP در ماکروفاژهای مهاجم به محل آسیب عصب و منطقه والرین دژنرسانس دلالت بر نقش فعالE-FABP یا لیگاندهایش و اسیدهای چرب موجود در عصب سیاتیک در پروسه دژنرسانس و رژنرسانس دارد.

References

1. **Noble J, Munro CA, Prasad VSSV, Midha R.** Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. J Trauma 1998; 45: 116-22.
2. **Van Dijk J, PondaagW, Malessy M.** Obstetric lesions of the brachial plexus. Muscle Nerve 2001; 24: 1451-61.
3. **Evans GRD, Brandt K, Katz S, Chauvin P, Otto L, Bogle M, et al.** Bioactive poly (L-lactic acid) conduits seeded with Schwann cells for peripheral nerve regeneration. Biomaterials 2003; 841-8.
4. **Portenoy RK, Foley KM, Inturrisi CE.** The nature of opioid responsiveness and its implications for neuropathic pain: new hypotheses derived from studies of opioid infusions. Pain 1990; 43: 273-86.
5. **Lundborg G.** Nerve injury and repair. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1988.
6. **Huang YC, Huang YY.** Biomaterials and strategies for nerve regeneration. Artificial Organs 2006; 7: 514-22.
7. **De León M, Welcher AA, Nahin RH, Liu Y, Ruda MA, Shooter EM, et al.** Fatty acid binding protein

is induced in neurons of the dorsal root ganglia after peripheral nerve injury. J Neurosci Res 1996; 44(3): 283-92.

8. **Garbay B, Heape AM, Sargueil F, Cassagn C.** Myelin synthesis in the peripheral nervous system. Prog Neurobiol 2000; 61: 267-304.
9. **Frostick SP, Frcs DM, Yin Qi, Kemp GJ.** Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. Microsurgery 1998; 18(7): 397-405.
10. **Chen Z, Chen ZX, Chen HX, Chen HS, Zhou T, Lu HS.** Schwann cell apoptosis in Wallerian-degenerated sciatic nerve of the rat. Chin J Traumatol 2004;7(4): 220-8.
11. **Mueller M, Wacker K, Bernd Ringelstein EB, William F, Imai Y, Kiefer R.** Hickey, Yoshinori Imai, Reinhard Kiefer. Rapid Response of Identified Resident Endoneurial Macrophages to Nerve Injury. Am J Pathol 2001; 159: 523-31.
12. **Goodrum JF, Weaver JE, Goines ND, Bouldin TW.** Fatty acid from degenerating myelin lipids are conserved and reutilized for myelin synthesis during regeneration in peripheral nerve. Neurochemistry 1995; 65(4): 72-83.
13. **Kitanaka N, Owada Y, Abdelwahab SA, Iwasa H, Sakagami H, Watanabe M, Spener F, Kondo H.** pecific localization of epidermal-type fatty acid binding protein in dendritic cells of splenic white pulp. Histochem Cell Biol 2003; 120 (6): 465-73. Epub 2003 Nov 12.
14. **Nourani MR, Owada Y, Kitanaka N, Sakagami H, Hoshi H, Iwasa H, Spener F, Kondo H.** Occurrence of immunoreactivity for adipocyte-type fatty acid binding protein in degenerating granulosa cells in atretic antral follicles of mouse ovary. J Mol Histol 2005; 36(8-9):491-7.
15. **Duttaroy AK, Spener F.** Cellular Proteins and their Fatty Acids in Health and Disease. Wiley-vch Verlag GMBH& Co. KGaA, Weinheim,Germany, 2003.
16. **Gordon JI, Alpers DH, Ockner RK, Strauss AW.** The nucleotide sequence of rat liver fatty acid binding protein mRNA. J Biol Chem 1983; 258: 3356-63.
17. **Glatz JF, Vork MM, van der Vusse GJ.** Significance of cytoplasmic fatty acid-binding protein for the ischemic heart. Mol Cell Biochem 1993; 123:167-73.
18. **Alpers DH, Strauss AW, Ockner RK, Bass NM, Gordon JI**. Cloning of a cDNA encoding rat intestinal fatty acid binding protein. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81: 313-317.
19. **Hunt CR, Ro JH, Dobson DE, Min HY, Spiegelman BM.** Adipocyte P2 gene:developmental expression and homology of 5¢-flanking sequences among fat cell-specific genes. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83:3786 - 90.
20. **Siegenthaler G, Hotz R, Chatellard-Gruaz D, Jaconi S, Saurat JH.** Characterization and expression of a novel human fatty acidbinding protein:the epidermal type (E-FABP). Biochem Biophys Res Commun 1993; 190: 482-7.
21. **Feng L, Hatten ME, Heintz N.** Brain lipid-binding protein (BLBP):a novel signaling system in the developing mammalian CNS. Neuron 1994; 12: 895-908.
22. **Kurtz A, Zimmer A, Schnutgen F, Bruning G, Spener F, Muller T.** The expression pattern of a novel gene encoding brain-fatty acid binding protein correlates with neuronal and glial cell development. Development 1994; 120: 2637-49.
23. **Iseki S, Kondo H, Hitomi M, Ono T.** Immunocytochemical localization of hepatic fatty acid binding protein in the liver of fed and fasted rats. Histochemistry 1988; 89:317-22.
24. **Veerkamp JH, Paulussen RJ, Peeters RA, Maatman RG, van Moerkerk HT, van Kuppevelt TH.** Detection, tissue distribution and (sub) cellular localization of fatty acid-binding protein types. Mol Cell Biochem 1990; 98:11-18.
25. **Watanabe M, Ono T, Kondo H.** Immunohistochemical studies on the localisation and ontogeny of heart fatty acid binding protein in the rat. J Anat 1991; 174:81-95.
26. **Owada Y, Suzuki R, Iwasa H, Spener F, Kondo H.** Localization of epidermal-type fatty acid bin-

ding protein in the thymic epithelial cells of mice. Histochem Cell Biol 2002a; 117:55- 60.

27. **Owada Y, Takano H, Yamanaka H, Kobayashi H, Sugitani Y, Tomioka Y, et al.** Altered water barrier function in epidermal-type fatty acid binding protein-deficient mice. J Invest Dermatol 2002b; 118: 430-5.
28. **Owada Y, Utsunomiya A, Yoshimoto T, Kondo H.** Changes in gene expression for skin-type fatty acid binding protein in hypoglossal motor neurons following nerve crush. Neurosci Lett 1997; 223: 25-8.
29. **Yun X, Nourani MR, Abdelwahab SA, Kitanaka N, Owada Y, Spener F, et al.** Differential localization of brain-type and epidermal-type fatty acid binding proteins in the adrenal gland of mice. Tohoku J Exp Med 2004; 203:77- 86.
30. **Xu LZ, Sanchez R, Sali A, Heintz N.** Ligand specificity of brain lipid-binding protein. J Biol Chem 1996; 271:24711-9.
31. **Balendiran GK, Schnutgen F, Scapin G, Borchers T, Xhong N, Lim K, Godbout R, Spener F, Sacchettini JC.** Crystal structure and thermody - namic analysis of human brain fatty acid- binding protein. J Biol Chem 2000; 275:27045-54.
32. **Kingma PB, Bok D, Ong DE.** Bovine epidermal fatty acid-binding protein: determination of ligand specificity and cellular localization in retina and testis. Biochemistry 1988; 37:3250-7.
33. **Hohoff C, Borchers T, Rustow B, Spener F, van Tilbeurgh H.** Expression, purification, and crystal structure determination of recombinant human epidermal-type fatty acid binding protein. Biochemi- stry 1999; 38: 12229-39.
34. **Zimmerman AW, van Moerkerk HT, Veerkamp JH.** Ligand specificity and conformational stability of human fatty acid-binding proteins. Int J Biochem Cell Biol 2001; 33: 865-76.
35. **Yun X, Nourani MR, Abdelwahab SA, Kitanaka N, Owada Y, Spener F, et al.** Differential localization of brain-type and epidermal-type fatty acid binding proteins in the adrenal gland of mice. Tohoku J Exp Med 2004; 203:77- 86.
36. **Nourani M, Owada Y, Kitanaka N, Abdelwahab S, Iwasa H, Sakagami H, et al.** Localization of epidermal-type fatty acid binding protein in macrophages in advanced atretic follicles of adult mice. J Mol Histol 2006; 23:503-8.
37. **Nourani MR, Owada Y, Kitanaka N, Sakagami H, Hoshi H, Iwasa H, et al.** Occurrence of immunoreactivity for adipocyte-type fatty acid binding protein in degenerating granulosa cells in atretic antral follicles of mouse ovary. J Mol Hist 2005; 36:491-7.
38. **Lee KS, Wolfe SW.** Peripheral nerve injury and repair. J AM Acad Ortho Sur 2000; 8(4):431-9.
39. **Eto M, Yoshikawa H, Fujimura H, Naba I, Sumi-Akamaru H, Takayasu S, et al.** The role of CD36 in peripheral nerve remyelination after crush injury. Eur J Neurosci 2003;17(12): 2659-66.
40. **Hirata K, Kawabuchi M.** Myelin Phagocytosis by Macrophages and Nonmacrophages During Wallerian Degeneration. Microscopy research and technique 2002; 57: 541-47.
41. **Leenen PJ, Radosevic K, Voerman JS, Salomon B, van Rooijen N, Klatzmann D,et al.** Heterogeneity of mouse spleen dendritic cells: in vivo phagocytic activity, expression of macrophage markers, and subpopulation turnover. J Immunol 1998; 160: 2166-73.
42. **Kitanaka N, Owada Y, Abdelwahab SA, Iwasa H, Sakagami H, Watanabe M, et al.** Specific localization of epidermal-type fatty acid binding protein in dendritic cells of splenic white pulp. Histochem Cell Biol 2003; 120: 465-73.