

نقش مولکول لیپوکالین ۲ در مراحل آسیب و ترمیم عصب سیاتیک

فاطمه آقانصیر^۱، حسن آقایی^۱، *محمدرضا نورانی^۲

تاریخ اعلام وصول: ۱۳۹۱/۱/۲۲

تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۱۳۹۱/۵/۱۷

چکیده

سابقه و هدف: امروزه آسیب‌های وارده به سیستم عصبی محیطی یکی از معضلات تهدید کننده سلامت جامعه بوده و در تروماها مانند جنگ، بلایای طبیعی و غیره مشاهده می‌شود. پس از اعمال تروما، رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابند. نقش مخرب رادیکال‌های آزاد توسط آنتی اکسیدان‌ها مهار می‌شود. در این مطالعه نقش آنتی اکسیدانی مولکول لیپوکالین ۲ (NGAL) پس از آسیب له شدگی عصب سیاتیک رت بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر عصب سیاتیک ۴۰ رت، دچار آسیب له شدگی گردید و سپس ۱، ۳، ۵، ۷، ۱۰، ۱۵، ۳۰ و ۶۰ روز پس از آسیب عصب سیاتیک آسیب دیده خارج شد. ابتدا mRNA کامل از نمونه‌ها استخراج و سپس cDNA ساخته شد و بیان ژن NGAL با استفاده از آنالیز RT-PCR نیمه کمی تایید شد. به منظور آزمایش‌های ایمنونوهیستوشیمی نمونه‌ها در پارافورمالدئید فیکس شدند و با استفاده از کرایو استات برش‌های طولی به ضخامت ۲۰ میکرون زده شد. این مطالعه برگرفته از پایان‌نامه دانشجویی می‌باشد. **یافته‌ها:** با توجه به مشاهدات به دست آمده از نتایج RT-PCR در نمونه‌های دچار آسیب، بیان ژن NGAL در روزهای اول و سوم و در هفته اول نسبت به نمونه‌های نرمال به صورت معنی‌داری ($p < 0.001$) افزایش نشان داد. نتایج ایمنونوهیستوشیمی نیز در مورد این پروتئین تایید کننده بیان ژنی بود.

بحث و نتیجه‌گیری: آسیب‌های وارده به عصب سیاتیک باعث تولید استرس اکسیداتیو می‌شود. با توجه به نقش آنتی اکسیدانی NGAL انتظار داشتیم تا افزایش بیان این ژن را در مراحل آسیب، زمانی که استرس اکسیداتیو بیشترین افزایش را دارد، شاهد باشیم. در این پروژه برای اولین بار به نقش مولکول فوق در مراحل آسیب و ترمیم عصب محیطی پرداخته شده است و با آزمایش‌های تکمیلی ممکن است به عنوان مکمل در درمان مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: آسیب‌له شدگی، استرس اکسیداتیو، آنتی اکسیدان، NGAL

مقدمه

عمر خود از ناتوانی‌های جسمی رنج می‌برند (۲). همچنین ۵٪ موارد زخم‌های باز ناشی از جراحاتی مانند سوانح رانندگی و مصدومیت‌های ورزشی با آسیب‌های سیستم عصبی - محیطی همراه می‌باشند (۳). اختلال‌های آناتومیک و عملکردی شدیدی می‌تواند پس از آسیب عصب محیطی دیده شود. در جوامع صنعتی

آسیب‌های وارده به اعصاب محیطی یکی از شایع‌ترین آسیب‌ها در جوامع امروز است. عوارض این آسیب‌های، شامل: ناتوانی، هزینه‌ی بالای درمان، از دست دادن شغل و اختلال‌های اجتماعی است (۱). در بسیاری از موارد این آسیب دیدگان برای تمام طول

۱- پژوهشگر، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک

۲- استادیار، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه فیزیولوژی

۳- دانشیار، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی (*نویسنده مسئول)

تلفن: ۰۲۱-۸۸۲۱۱۵۲۳ آدرس الکترونیک: r.novrani@yahoo.com

رادیکال‌های آزاد عمر کوتاهی دارند و اغلب در غلظت‌های پایین وجود دارند، اندازه‌گیری آنها در نمونه‌های بیولوژیکی دشوار است (۱۱). وضعیت پایدار سلول توسط آنزیم‌های آنتی اکسیدان از قبیل: سوپراکسیددسموتاز، کاتالاز، گلوکاتایون S ترانسفراز، لیپوکالین ۲، مواد دیگر غیر آنزیمی، از قبیل: متالوتیونین‌ها، گلوکاتایون، ویتامین E، C، که حذف ROS را ایجاد می‌کنند، حفظ می‌شود (۱۲). لیپوکالین ۲ با نام Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocaline (NGAL) ترکیبی گلیکو پروتئینی بوده و اولین بار به عنوان یک پروتئین ذخیره‌ای در گرانول‌های اختصاصی نوتروفیل انسانی شناخته شد (۱۳، ۱۴) و در انواع بافت‌های نرمال و پاتولوژیک انسان بیان می‌شود (۱۵، ۱۶). برای لیپوکالین ۲ عملکردهای مختلفی تعریف شده است: از جمله انتقال چربی‌ها و آهن، القا آپوپتوز و مهار رشد باکتری‌ها در نظر گرفته شده است (۱۷، ۱۸). لیپوکالین ۲ همچنین، با ژلاتیناز (MMP-B) (۹)، یا کلاژناز تیپ ۴ ارتباط نزدیکی دارد و با آن اتصال برقرار می‌کند (۱۷) که دلیل آن حفاظت از فعالیت آنزیمی ژلاتیناز B و جلوگیری از تخریب این پروتئین است (۱۹) و به دلیل ارتباط محکم این پروتئین با ژلاتیناز B، می‌توان نقش تنظیم‌کنندگی مسیرهای ایمنی را برای لیپوکالین ۲ در نظر گرفت (۲۰). به طور طبیعی، پروتئین لیپوکالین ۲ اغلب در غلظت‌های کم در چندین بافت انسانی از قبیل، مغز استخوان (۱۴)، توپول‌های کلیه، نای، ریه‌ها، معده و روده بزرگ بیان می‌شود ولی در اثر آسیب و التهاب پوستی (۲۱) و برخی سرطان‌ها (۲۰) مقدار آن افزایش می‌یابد. همچنین میزان بیان آن، به دنبال تحریکات آسیب رسان توبولی بیشتر می‌شود (۲۱، ۲۲). بیان لیپوکالین ۲ توسط گونه‌های واکنشی اکسیژن ایجاد می‌شود و نقش حفاظتی بر علیه سمیت H_2O_2 ایفا می‌کند (۲۳، ۲۴). بنابراین $Lcn2/NGAL$ می‌تواند یک نشانگر زیستی مفید برای تعیین استرس اکسیداتیو در شرایط *in vitro* و *in vivo* باشد (۱۷).

تغییرات در بیان mRNA مولکول‌های آنتی اکسیدان که پس از آسیب و ترمیم عصب محیطی بوقوع می‌پیوندد هنوز به طور کامل شناخته نشده است. با توجه به نقش مؤثر آنتی اکسیدان‌ها در سم زدایی محصولات تولید شده ناشی از استرس‌های اکسیداتیو و همچنین تولید رادیکال‌های آزاد ناشی از آسیب عصب محیطی، انتظار می‌رود تا بیان بعضی از ژن‌های آنتی اکسیدان در قطعه دیستال عصب محیطی آسیب دیده تغییر نمایند. بر همین اساس در این

این نوع آسیب‌ها همراه با پیشرفت تکنولوژی افزایش می‌یابند (۴). آسیب یک عصب محیطی واکنشی به نام دژنراسیون والریان را بر می‌انگیزد که محیط سلولی و مولکولی مناسب برای رشد متعاقب آکسون در حال ترمیم را در قطعه دیستال عصب فراهم می‌آورد (۵). سیگنال‌هایی از آکسون‌های در حال تخریب و سلول‌های شوان، به فعال شدن و فراخوانی ماکروفاژها می‌انجامد که به نوبه خود فاکتورهایی را تولید می‌کنند که به نظر می‌رسد تکثیر و تمایز یافتن سلول‌های شوان را تسریع می‌بخشند (۶، ۷). این وقایع باعث می‌شوند تا خرده‌های سلولی پاک شوند، ماتریکس خارج سلولی دوباره مدل‌سازی شود و باندهای بونگنر تشکیل شده و آماده دریافت آکسون‌هایی گردند که از قطعه‌ی بالایی با ایجاد جوانه‌های جانبی و انتهایی به طرف پایین کشیده می‌شوند (۶). در حالی که ویژگی‌های بافت‌شناسی دژنراسیون والریان به صورت گسترده‌ای توصیف شده است، مکانیسم‌های سلولی و مولکولی مربوط به آن به طور زیادی ناشناخته مانده است. مکانیسم آسیب‌های له شدگی عصب بسیار مشابه با مکانیسم‌های آسیب ایسکمیک است. علاوه بر آن این آسیب بافت عصبی می‌تواند باعث تجمع پلاکتی، تولید زیاد رادیکال‌های آزاد، مداخلات لوکوسیتی - اندوتلیالی منجر به آسیب اندوتلیوم شود، و بنابراین تامین اکسیژن برای بافت عصبی را معیوب می‌سازد (۸). رادیکال‌های آزاد از مولکول‌های اکسیژن، نیتروژن، و سولفور در سیستم‌های بیولوژیکی مشتق می‌شوند و به دلیل الکترون‌های جفت نشده شان به شدت برای واکنش با مولکول‌های دیگر فعال هستند. این رادیکال‌ها بخش مهمی از گروهی از مولکول‌ها هستند که گونه‌های اکسیژن/نیتروژن واکنشی (ROS/RNA: Reactive oxygen species/Reactive nitrogen species) نامیده می‌شوند و در حین متابولیسم سلولی و فعالیت‌های عملکردی تولید شده و نقش‌های مهمی در سیگنالینگ سلولی، بیان ژن و انتقال یونی دارند (۹). عمده رادیکال‌های آزاد موجود در بدن دارای اکسیژن می‌باشند. استرس اکسیداتیو به عنوان عدم تعادل بین رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) و سیستم دفاع آنتی اکسیدان تعریف می‌شود. استرس اکسیداتیو در بسیاری از حالت‌های پاتولوژیک و بیماری‌ها دخالت دارد. استرس اکسیداتیو نقش مهمی در پاتوژنز آسیب عصب محیطی تروما دیده بازی می‌کند (۱۰). ROS و دیگر اکسیدان‌ها می‌توانند اکسیداسیون لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA را به دنبال آسیب بافتی ایجاد نمایند. چون

بررسی بیان ژن‌ها به روش نسخه برداری معکوس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

در ابتدا استخراج RNA با استفاده از محلول Trepure Isolation (Reagent (Roch, Germany) طبق دستور العمل انجام شد. نمونه‌های بافت عصب که در زمان‌های اشاره شده خارج شده‌اند را با استفاده از دستگاه هوموژنایزر یا اولتراسونیک، هوموژن می‌کنیم. سپس نمونه‌ها را به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط قرار داده و سپس ۲۰۰ ماکرولیتر کلروفرم به تیوب‌های محتوی نمونه اضافه کرده و به خوبی هم زدیم تا فاز بی‌رنگ بر روی فاز رنگی قرار بگیرد. پس از قرار دادن به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه (rpm) سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ، فاز رویی توسط سمپلر عاری از RNAse (RNase free) به آزامی جدا و به میکروتیوب‌های استریل منتقل و هم حجم آن ایزوپروپانول به آرامی مخلوط شد و به مدت ۱۵ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد در دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. رسوب، جداسازی و به آن ۱ میلی لیتر اتانول ۷۵ درصد اضافه گردید و به مدت ۸ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در دور ۷۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. در نهایت RNA در آب تیمار شده با DEPC حل شد. پس از استخراج RNA به منظور ارزیابی کمیت RNA استخراج شده و تعیین غلظت و درجه خلوص آن، از دستگاه اسپکتروفتومتر نانو دراپ (NanoDrop, USA) استفاده شد. این دستگاه به طور اتوماتیک غلظت RNA را با استفاده از جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر، محاسبه می‌کند. پس از آماده سازی نمونه و گذاردن آن در مکان قرار گیری نمونه، دستگاه غلظت نمونه مورد نظر را در طول موج مربوطه، بر حسب نانوگرم بر میکرولیتر، محاسبه می‌نماید. از طرفی نمونه‌ی RNA دارای کیفیت استاندارد می‌باشد که الگوی باندهای ویژه‌ای را روی ژل آگاروز نشان می‌دهد. حضور باندهای RNA ریبوزومی ۱۸ S و ۲۸ S نشان دهنده سالم و دست نخورده بودن RNA است. در این مطالعه برای ارزیابی کیفیت RNA استخراج شده الکتروفورز نمونه‌های RNA بر روی ژل آگاروز ۱ درصد انجام شد. ۵۰۰ نانو گرم از RNA استخراج شده از نمونه‌های عصب سیاتیک، به عنوان الگو جهت سنتز cDNA، مطابق با کیت ساخت cDNA

مطالعه بیان ژن و پروتئین NGAL پس از آسیب له شدگی عصب سیاتیک موش بزرگ آزمایشگاهی ارزیابی شده است تا نقش این مولکول در مراحل آسیب و ترمیم ضایعات اعصاب محیطی، بیشتر آشکار گردد.

روش تحقیق

این مطالعه از نوع تجربی می‌باشد. در این مطالعه از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار با میانگین وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. سیکل روشنایی / تاریکی ۱۲ ساعته، دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۵ درصد و دسترسی آزاد به آب و غذا تامین گردید. ۴۰ سررت را به ۵ گروه ۸ راسی تقسیم کردیم. گروه‌ها شامل ۳، ۱، ۳، ۱، ۵، ۳، ۱ هفته پس از جراحی بودند. عصب سیاتیک سالم ۵ رت به صورت تصادفی انتخاب شده و به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. در هر گروه ۵ رت به منظور آزمایش‌های مولکولی و ۳ رت به منظور آزمایش‌های ایمونوهیستوشیمی به صورت تصادفی انتخاب شدند.

روش جراحی

رت‌ها را توسط ماده‌ی بیهوشی کتامین به مقدار ۹۰ mg/kg و زایلازین به مقدار ۱۰ mg/kg به صورت داخل صفاقی بیهوش نمودیم. پس از تراشیدن موی پای راست حیوان، پوست ناحیه را توسط بتادین و الکل تمیز نمودیم. پس از ثابت نگه داشتن دست و پای حیوان توسط مکان‌های مشخص شده بر روی تخت عمل جراحی، برشی در پوست خلفی خارجی ران 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 پروتئال مشترک نمایان نمودیم. ۵ میلی متر پایین‌تر از بریدگی سیاتیک را با استفاده از فورسپس به مدت ۶۰ ثانیه تحت فشار قرار داده، محل آسیب را با بخیه زدن نزدیک‌ترین عضله به محل له شدگی با استفاده از نخ بخیه ۵-۰ سیلک غیر قابل جذب نشانه گذاری کرده و سپس عضلات را کنار هم گذاشته و پوست را بخیه زدیم. ۱، ۳، روز و ۱، ۳، ۵ هفته پس از آسیب ۵ میلی متر از عصب سیاتیک پایین‌تر از محل آسیب را خارج کرده تا شروع آزمایش‌های مولکولی در ۸۰- نگهداری نمودیم.

جدول ۱. پرایمرهای طراحی شده برای بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه.

GENES	Primer sequences (۵'-۳')	Annealing Temperture	Size (bp)
NGAL(Lcn۲)	Forward: ۵'tgtacagcaccatctatgagc۳' Reverse: ۵'tgcacatcgtagctctgtatc۳'	۵۶°C	۱۷۵
-actinβ	Forward: ۵'tcatgaagatcctcaccgag ۳' Reverse: ۵'ttgccaatggtgatgacctg۳'	۵۸°C	۱۹۰

ایمونوهیستوشیمی نمونه‌های جمع‌آوری شده را در محلول فیکساتیو بافر پارا فورمالدئید ۴ درصد قرار دادیم و سپس به محلول ساکروز ۳۰ درصد منتقل کرده و تا انجام آزمایش‌ها در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برش‌های یخی از عصب‌ها با میکروتوم کرایو استات به ضخامت ۲۰ میکرومتر تهیه و بر روی اسلایدهای پوشش داده شده با سیلان قرار گرفتند. اسلایدهای حاوی برش‌ها را با آنتی بادی اولیه مونوکلونال NGAL (شرکت سانتاکروز) با غلظت ۱:۲۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۲ ساعت انکوبه نموده و پس از شستشو با PBS، آنتی بادی ثانویه Anti rat IgG Biotinilated را به مدت ۱ ساعت انکوبه کرده و سپس با سیستم اوبیدن-بیوتین و DAB محل‌های حضور کمپلکس آنتی ژن-آنتی بادی قابل رویت شده و با میکروسکوپ نوری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها

بیان ژن NGAL در نمونه‌های عصب سیاتیک دچار آسیب

شده و نمونه‌های عصب سیاتیک نرمال

به منظور نرمال کردن شرایط بیان ژن NGAL در هر نمونه به بیان ژن

جدول ۲- مقادیر میانگین $\pm$ خطای استاندارد مربوط به بیان ژن NGAL در هر نمونه / بیان ژن بتا اکتین همان نمونه به تفکیک گروه‌ها.

Group	Mean(NGAL/B-actin) $\pm$ SEM
Control	/۷۳۵۹۷ $\pm$ ۰۶۹
day ۱	۲/۱۴۷۲۶ $\pm$ ۰۴۲
day ۳	۱/۸۹۷۱۵ $\pm$ ۱۲۳
week ۱	۱/۷۰۷۳۸ $\pm$ ۰۹۷
week ۳	۱/۰۰۳۳۰ $\pm$ ۰۴۲
week ۵	/۷۶۴۸۳ $\pm$ ۰۳۱

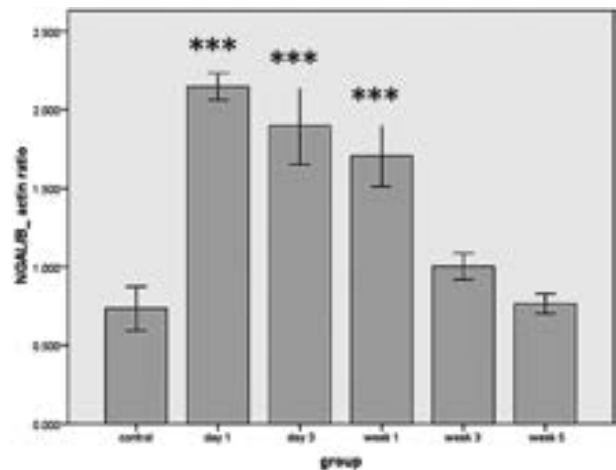
(Bioneer, Korea) استفاده شد. سپس برنامه زمانی-دمایی به صورت ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (۱۲ سیکل) و ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (دمای غیر فعال سازی) انجام شد. پس از اتمام سنتز cDNA، میکروتیوپ‌ها به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد. سپس از cDNA سنتز شده به عنوان الگو برای PCR استفاده شد. برای پی بردن به میزان بیان ژن NGAL از پرایمرهای جدول ۱ استفاده شد و به منظور نرمال سازی بیان این ژن، بیان β -actin به عنوان یک ژن خانه دار (House keeping gene) استفاده شد. برنامه زمانی-دمایی PCR شامل مراحل زیر بود: ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۳ سیکل با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، در نهایت ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد جدا و با اتیدیوم بروماید قابل مشاهده شدند؛ سپس با دستگاه ترانس لومینوتور UV (uvidoc) ارزیابی شدند.

با استفاده از نرم افزار Scion Image بیان ژن‌ها از حالت کیفی به صورت کمی تبدیل می‌شود. بیان آن ژن در هر نمونه به بیان ژن بتا اکتین در همان نمونه تقسیم می‌شود و میانگین بیان ژن/بتا اکتین محاسبه می‌گردد.

برای تجزیه و تحلیل داده‌های PCR از نرم افزار SPSS ۱۷ استفاده شد. تمام نتایج حاصل، به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد (Means $\pm$ SEM) ارائه شده است. از آن جا که داده‌ها از توزیع نرمال برخوردار بودند از آزمون واریانس یک طرفه (Two Way ANOVA) با Post Hoc توکی (Tukey) برای مقایسه گروه‌ها استفاده گردید. اختلاف معنی‌دار در سطح $p < ۰/۰۵$ برای تمامی موارد در نظر گرفته شد. **مطالعه ایمونوهیستوشیمی:** جهت انجام آزمایش‌های

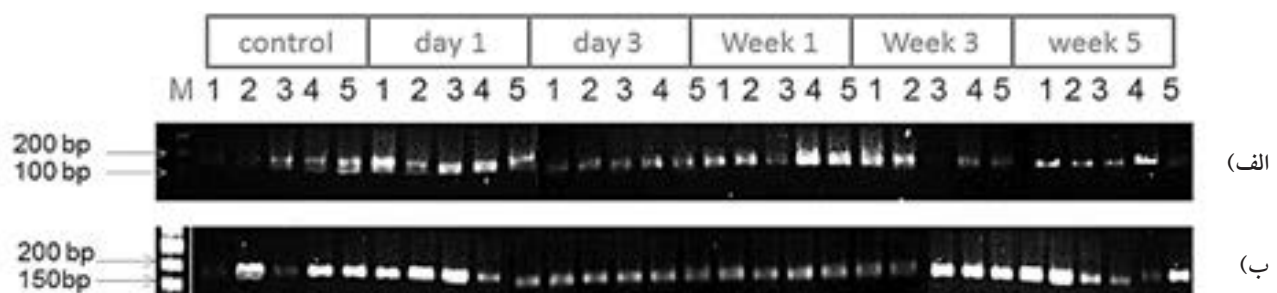
بیان پروتئین Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocaline

برش های طولی تهیه شده از عصب های سیاتیک نمونه های نرمال و ۱، ۳، ۵ روز و ۱، ۳ و ۵ هفته پس از ایجاد آسیب با آنتی بادی مونوکلونال NGAL به روش ایمونوهیستوشیمی رنگ آمیزی شدند. در برش طولی نمونه نرمال عصب فقط یک رنگ زمینه ای فیبرهای عصبی میلینی را به صورت دسته های منظم و موجی شکل نشان می دهد و هیچگونه عکس العمل به آنتی بادی دیده نمی شود (شکل ۲- A، شکل ۳- A) مشابه مورفولوژیکی این الگو در یک روز بعد از آسیب نیز به چشم می خورد و عکس العمل به آنتی بادی به صورت شدید به چشم می خورد که نمایانگر حضور فعال این مولکول در این مرحله از آسیب عصب می باشد (شکل ۲- B، شکل ۳- B). سازماندهی منظم فیبرهای عصبی از روز سوم پس از آسیب به صورت تصاعدی دچار بی نظمی شده اند، تعداد زیادی سلول به صورت ساختمان دوکی شکل در موازات طولی عصب سازماندهی شده اند سیتوپلاسم این سلول ها واکوئوله و نمای کف صابونی دارند و ممکن است ماکروفاژهای مهاجم باشند. عکس العمل ایمنی از روز سوم سیر نزولی را در پیش می گیرد و نسبت به روز اول کمتر شده است (شکل ۲- C). در روز هفتم پس از آسیب این بی نظمی به حداکثر می رسد و شدت عکس العمل به آنتی بادی کاهش دارد. (شکل ۲- D) در هفته سوم پس از آسیب نمای مورفولوژیکی عصب بازسازی شده و شدت واکنش به NGAL نیز کاهش می یابد (شکل ۲- E). در هفته پنجم فیبرهای عصبی به صورت موازی و در امتداد طولی عصب کنار یکدیگر به صورت منظم قرار می گیرند و با

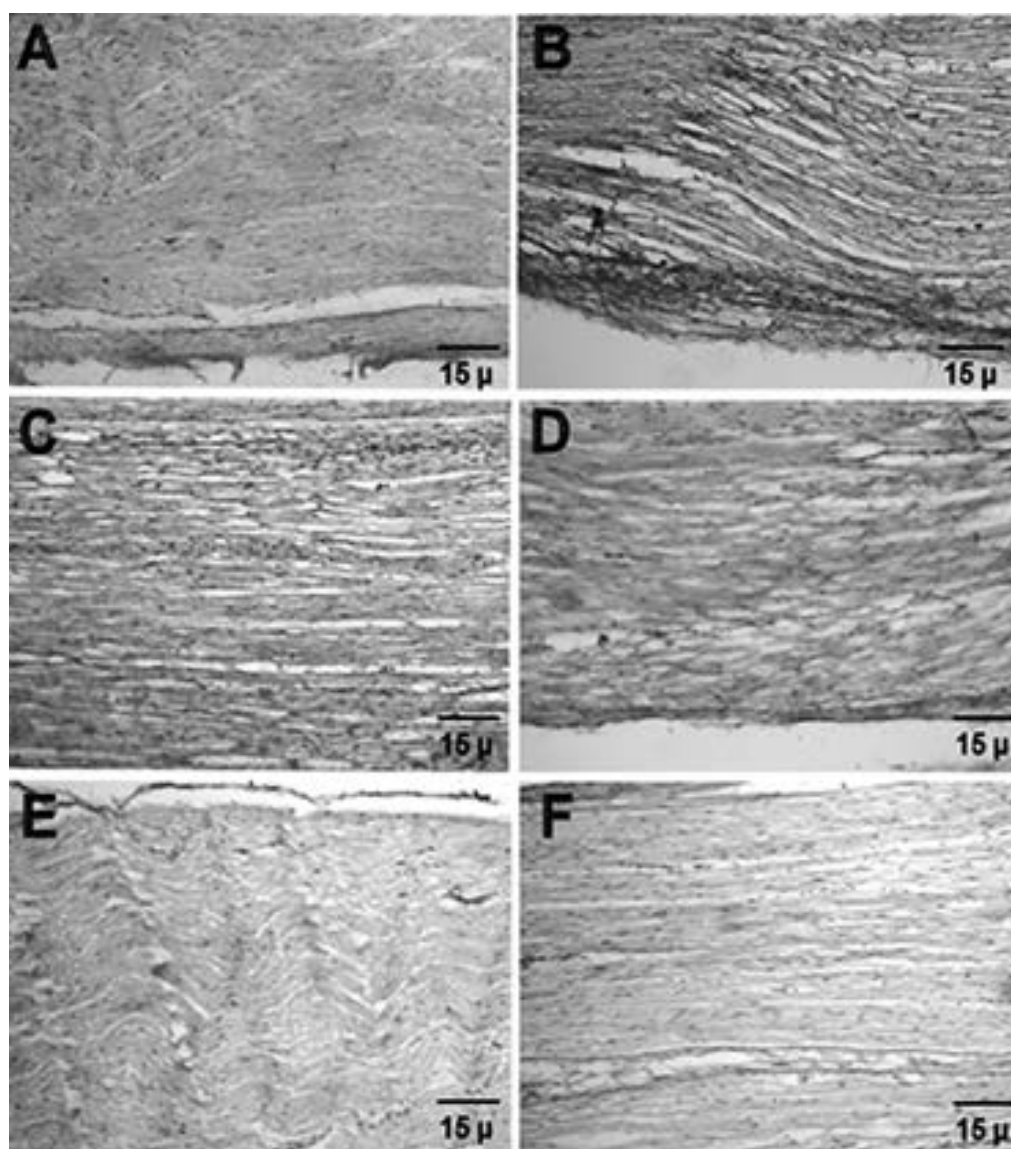


نمودار ۱- بررسی کمی بیان ژن NGAL در گروه های آزمایش. آنالیزهای آماری نشان می دهند بیان این ژن در روزهای اول و سوم و در هفته اول نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری افزایش داشته است. داده ها به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد گزارش شده اند. *** نشان دهنده معنی دار بودن گروه ها نسبت به گروه کنترل است ($p < 0.001$).

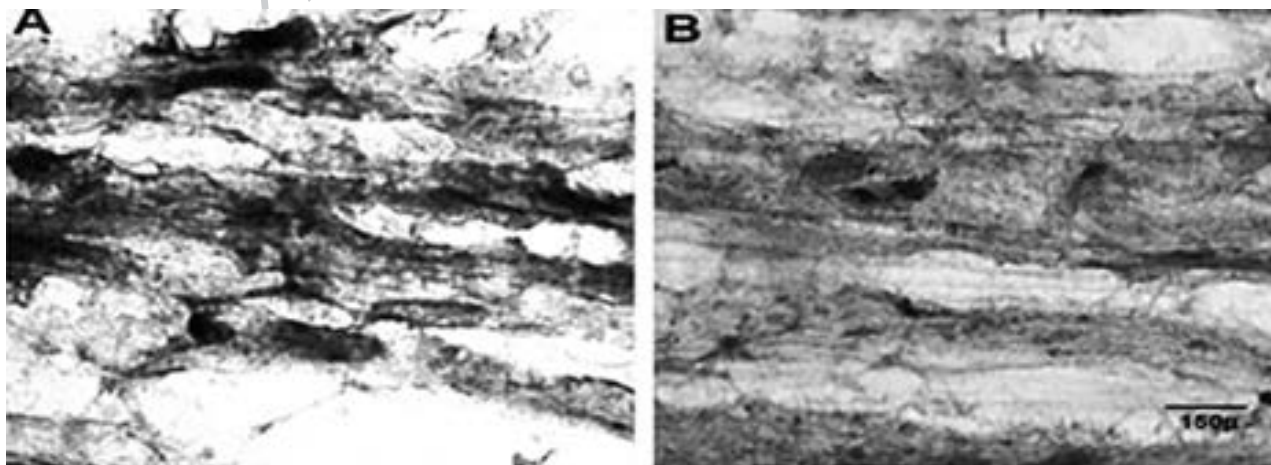
بتا اکتین همان نمونه تقسیم شده و سپس میانگین ۵ نمونه در هر گروه گرفته شده است. (جدول ۲) آنالیز آماری نمونه ها به صورت نمودار آورده شده است. نتایج به دست آمده از تحلیل آماری حاکی از این بود این نتایج نشان داد که هم زمان و هم جراحی در میزان بیان ژن NGAL مؤثر بوده اند. به طوری که متغیر زمان ($p < 0.001$) $F = 36/10$ و متغیر جراحی ($p < 0.001$, $F = 233/69$) و زمان جراحی ($p < 0.001$, $F = 36/10$) را نشان داد. هم چنین بیان ژن NGAL در گروه های دچار آسیب در روزهای اول و سوم و هفته اول پس از آسیب نسبت به گروه نرمال به طور معنی داری افزایش داشته است. ($p < 0.001$) (نمودار ۱).



شکل ۱- الف) الکتروفورز نتایج RT-PCR ژن NGAL نمونه های عصب سیاتیک دچار آسیب شده و نمونه های عصب سیاتیک نرمال: چاهک (M) شاخص اندازه مولکولی ۱۰۰ bp (غلظت ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر)، چاهک های ی پس از M به ترتیب نمونه های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ گروه های کنترل، ۱ روز، ۳ روز، ۱ هفته، ۳ هفته و ۵ هفته را نشان می دهد بیان این ژن در نمونه های عصب سیاتیک دچار آسیب شده افزایش یافته است. ب) الکتروفورز نتایج RT-PCR ژن بتا اکتین نمونه های مذکور: چاهک (M) شاخص اندازه مولکولی ۵۰ bp (غلظت ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر)، چاهک های پس از M به ترتیب نمونه های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ گروه های کنترل، ۱ روز، ۳ روز، ۱ هفته، ۳ هفته و ۵ هفته را نشان می دهد. نتایج نشان داد که میزان بیان ژن NGAL در گروه های دچار آسیب در روزهای اول و سوم و هفته اول پس از آسیب نسبت به گروه نرمال افزایش داشته است.



شکل ۲- برش‌های طولی از نمونه‌های عصب سیاتیک (بزرگنمایی ۱۰۰×). (A) نرمال. (B) یک روز پس از آسیب. (C) سه روز پس از آسیب. (D) یک هفته پس از آسیب. (E) سه هفته پس از آسیب. (F) پنج هفته پس از آسیب. رنگ قهوه‌ای نشان دهنده عکس العمل به آنتی بادی NGAL می‌باشد.



شکل ۳- برش‌های طولی از نمونه‌های عصب سیاتیک (بزرگنمایی ۱۰۰۰×). (A) یک روز پس از آسیب. (B) سه روز پس از آسیب. رنگ قهوه‌ای نشان دهنده عکس العمل به آنتی بادی NGAL می‌باشد.

توجه به مورفولوژی به نظر می‌رسد که عصب ترمیم یافته است و فقط یک رنگ زمینه‌ای فیبرهای عصبی میلینی را به صورت دسته‌های منظم و موجی شکل نشان می‌دهد و هیچ‌گونه عکس العمل به آنتی بادی دیده نمی‌شود. (شکل ۲-۴)

بحث

پس از آسیب ناشی از تخریب بافت عصب محیطی، رادیکال‌های آزاد اکسیژن افزایش می‌یابند و آسیب بافتی ایجاد می‌کنند (۲۵، ۲۶). آنتی اکسیدان‌ها می‌توانند به طور مستقیم از طریق واکنش با رادیکال‌های آزاد یا غیر مستقیم با مهار فعالیت یا بیان آنزیم‌های تولید کننده رادیکال آزاد و همچنین افزایش فعالیت یا بیان آنزیم‌های آنتی اکسیدان درون سلولی، آسیب اکسیداتیو را کاهش دهند (۹). نتایج Lanza و همکاران در ۲۰۱۲ نشان داد پس از آسیب عصب محیطی آنزیم‌های آنتی اکسیدان در قطعه دیستال افزایش بیان دارند که این حالت به افزایش استرس اکسیداتیو در این ناحیه اشاره می‌کند (۱). یکی از این آنزیم‌ها لیپوکالین ۲ یا NGAL می‌باشد. در بسیاری از بیماری‌ها از قبیل: سرطان، صدمات کلیوی و بیماری‌های ریوی که تولید رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد، افزایش لیپوکالین ۲ نیز قابل توجه است، بنابراین احتمال دارد که این مولکول نقش به سزایی را در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از ROS داشته باشد (۲۷). بیان بالای لیپوکالین ۲ در کبد و ریه موش بعد از مواجهه با فشارهای اکسیداتیو گزارش شده است. به دنبال تحقیقی که در سال ۲۰۰۶ بر روی لیپوکالین صورت گرفت، این مطلب که لیپوکالین در شرایط اکسیداتیو به میزان بالایی بیان می‌شود تأیید شد (۲۸، ۱۷). نتایج بررسی حاضر نشان داد میزان بیان ژن و بیان پروتئین NGAL در روزهای اول و سوم و هفته اول پس از آسیب نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری ($P < 0.001$) افزایش می‌یابد که در روز اول بیشترین بیان را دارد و سپس به صورت تدریجی تا هفته پنجم بیان آن به حالت نرمال نزدیک می‌گردد.

افزایش سطوح مس خارج سلولی با افزایش دادن تولید رادیکال‌های اکسیژن در روند آسیب زایی نوروها شرکت می‌کند. در تحقیقی نوروهای GN۱۱ هیپوتالاموس کشت داده شدند و مس به محیط اضافه شد و مشاهده شد مس ترشح مولکول‌های درگیر در حفاظت نوروها علیه استرس اکسیداتیو که NGAL هم شامل آن هاست

افزایش می‌دهد (۲۹). در آسیب‌های عصب به دلیل وجود مقادیر زیاد لیپید در بافت عصبی غلظت مالون دی آلدئید افزایش می‌یابد که در مدل له شدگی عصب سیاتیک در روز اول پس از آسیب غلظت آن بیشترین افزایش را دارد و به تدریج تا پایان هفته اول به میزان نرمال بر می‌گردد (۲۵). پس می‌توان نتیجه گرفت بیشترین مقدار رادیکال آزاد یا استرس اکسیداتیو را در روز اول داریم که این استرس به تدریج تا پایان هفته اول کاهش می‌یابد. همانطور که تحقیق ما نشان داد میزان افزایش بیان ژن NGAL نیز به دقت از همین الگو پیروی کرده و از آن جا که لیپوکالین ۲ توسط گونه‌های واکنشی اکسیژن بیان می‌شود در نتیجه این مولکول می‌تواند نقش موثری در مقابله با رادیکال‌های آزاد یا استرس اکسیداتیو در آسیب‌های وارده به اعصاب محیطی دارا باشد.

Fleur و همکاران در تحقیق خود عصب سیاتیک موش را سه بار، هر بار ۲۰ ثانیه دچار له شدگی کردند و آنالیز پروتئینی zymography، انجام دادند. در قطعه دیستال یک پاسخ مونوفازیک برای ژلاتیناز B مشاهده شد، که با تجمع ماکروفاژهای مهاجم، ۲-۴ روز پس از آسیب ارتباط دارد. از بین ژلاتینازهای موجود در بافت استخراج شده‌ی عصب آسیب دیده، فعالیت ژلاتیناز B در هر دو روزهای ۱، ۴ پس از له شدگی در قطعات crush و دیستال عصب افزایش داشت که در هر دو قطعه بیشتر از عصب نرمال می‌باشد. فعالیت بیشتر در ۱ روز پس از له شدگی در مقایسه با روز ۴ دیده شد. سطوح بالای فعالیت ژلاتیناز B در روزهای ۱، ۴ با تجمع نوتروفیل و ماکروفاژ ارتباط دارد (۳۰). همچنین پیشنهاد شده است سلول‌های شوان مربوط به عصب قطع شده، یک منبع مهم ژلاتیناز B هستند (۳۱). باندهای پروتئین ژلاتینولیتیک که در اندازه ۱۳۵ کیلودالتون قرار می‌گیرند احتمالاً کمپلکس‌های تشکیل شده بین ژلاتیناز B و NGAL می‌باشند (۳۲) و باندها در اندازه بزرگتر از ۱۳۵ کیلودالتون احتمالاً تجمعات ژلاتیناز B می‌باشند (۳۳، ۳۰). از آنجایی که NGAL تمایل به اتصال با ژلاتیناز B را دارد و با توجه به افزایش ژلاتیناز B در مطالعه بالا در روزهای ۱ و ۴ پس از آسیب له شدگی نتیجه‌گیری می‌شود که یافته‌های ما تایید کننده نتایج آنها می‌باشد.

نتیجه‌گیری

به طور کلی و با توجه به نتایج حاصل از این بررسی، افزایش بیان

از ترمیم عصب یعنی به کارگیری روش‌های فیزیولوژی مولکولی در درمان ضایعات اعصاب محیطی، کمتر پرداخته شده است، لذا؛ امیدواریم نتایج این تحقیق در آینده بتواند در درمان ضایعات ایجاد شده در اثر آسیب‌های له شدگی اعصاب محیطی در صدمات ناشی از جنگ، سوانح رانندگی و فعالیت‌های ورزشی، مصدومین حوادث طبیعی مانند زلزله و له شدگی عصب در نتیجه اعمال جراحی در مناطقی نزدیک به اعصاب محیطی، موثر باشد.

ژن و پروتئین NGAL می‌تواند به دلیل ایجاد استرس اکسیداتیو ناشی از آسیب له شدگی عصب سیاتیک باشد. در نهایت نتایج تحقیق حاضر به یک یافته متدولوژیک اشاره می‌کند که می‌تواند در افزایش دانش ما از مکانیسم‌های مولکولی در گیر در روند آسیب و ترمیم عصب محیطی ارزشمند باشد و از جنبه کاربرد کلینیکی می‌تواند برای تعیین دستاوردهای درمانی جدید با هدف مولکول‌های آنتی اکسیدان سودمند واقع گردد. با توجه به اینکه در ایران به این جنبه

References

- 1- Lanza C, Raimondo S, Vergani L, Catena N, Senes F, Tos P, et al. Expression of antioxidant molecules after peripheral nerve injury and regeneration. *J Neurosci Res* 2012; 90(4): 842-8.
- 2- Noble J, Munro CA, Prasad VS, Midha R. Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. *J Trauma* 1998; 45(1): 116-22.
- 3- Van Dijk JG, Malessy MJ, Stegeman DF. Why is the electromyogram in obstetric brachial plexus lesions overly optimistic? *Muscle Nerve* 1998; 21(2): 260-1.
- 4- Kalender AM, Dogan A, Bakan V, Yildiz H, Gokalp MA, Kalender M. Effect of Zofenopril on regeneration of sciatic nerve crush injury in a rat model. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj* 2009; 4: 6.
- 5- Cameron AA, Vansant G, Wu W, Carlo DJ, III CR. Identification of reciprocally regulated gene modules in regenerating dorsal root ganglion neurons and activated peripheral or central nervous system glia. *J Cell Biochem* 2003; 88(5): 970-85.
- 6- Kirsch M, Campos Friz M, Vougioukas VI, Hofmann HD. Wallerian degeneration and axonal regeneration after sciatic nerve crush are altered in ICAM-1-deficient mice. *Cell Tissue Res* 2009; 338(1): 19-28.
- 7- Serarslan Y, Bal R, Altug ME, Kontas T, Keles ON, Unal D, et al. Effects of trimetazidine on crush injury of the sciatic nerve in rats: a biochemical and stereological study. *Brain Res* 2009; 1247: 11-20.
- 8- Kurtoglu Z, Ozturk AH, Bagdatoglu C, Polat G, Aktekin M, Uzmanse D, et al. Effects of trapidil after crush injury in peripheral nerve. *Acta Med Okayama* 2005; 59(2): 37-44.
- 9- Lu JM, Lin PH, Yao Q, Chen C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med* 2010; 14(4): 840-60.
- 10- Westling G, Johansson RS. Factors influencing the force control during precision grip. *Exp Brain Res* 1984; 53(2): 277-84.
- 11- H S. Biological basis of detoxication of oxygen free radicals. In: Caldwell J, Jakoby WB, editors. *Biological basis of detoxication*. New York; London: Academic Press; 1983.
- 12- Kulbacka J, Saczko J, Chwilkowska A. [Oxidative stress in cells damage processes]. *Pol Merkur Lekarski* 2009; 27(157): 44-7.
- 13- Bundgaard JR, Sengelov H, Borregaard N, Kjeldsen L. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding NGAL: a lipocalin expressed in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 202(3): 1468-75.
- 14- Cowland JB, Borregaard N. Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans. *Genomics* 1997; 45(1): 17-23.
- 15- Friedl A, Stoesz SP, Buckley P, Gould MN. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in normal and neoplastic human tissues. Cell type-specific pattern of expression. *Histochem J* 1999; 31(7): 433-41. a
- 16- Sousa MM, do Amaral JB, Guimaraes A, Saraiva MJ. Up-regulation of the extracellular matrix remodeling genes, biglycan, neutrophil gelatinase-associated lipocalin, and matrix metalloproteinase-9 in familial amyloid polyneuropathy. *FASEB J* 2005; 19(1): 124-6.
- 17- Roudkenar MH, Kuwahara Y, Baba T, Roushandeh AM, Ebishima S, Abe S, et al. Oxidative stress induced lipocalin 2 gene expression: addressing its expression under the harmful conditions. *J Radiat Res* 2007; 48(1): 39-44.
- 18- Hamil KG, Liu Q, Sivashanmugam P, Anbalagan M, Yenugu S, Soundararajan R, et al. LCN6, a novel human epididymal lipocalin. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 112.
- 19- Uttenthal L. NGAL: a marker molecule for the distressed kidney. *Clin Lab Internat* November 2005; 29(7): 39-41.
- 20- Kalousek I, Roselova P, Otevrelouva P. [NGAL--neutrophil gelatinase associated lipocalin in biochemistry, physiology and clinical praxis]. *Cas Lek Cesk* 2006; 145(5): 373-6.
- 21- Zappitelli M, Washburn KK, Arian AA, Loftis L, Ma Q, Devarajan P, et al. Urine neutrophil gelatinase-associated

- lipocalin is an early marker of acute kidney injury in critically ill children: a prospective cohort study. *Crit Care* 2007; 11(4): R84.
- 22- Bolignano D, Donato V, Coppolino G, Campo S, Buemi A, Lacquaniti A, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a marker of kidney damage. *Am J Kidney Dis* 2008; 52(3): 595-605.
- 23- Roudkenar MH, Halabian R, Ghasemipour Z, Roushandeh AM, Rouhbakhsh M, Nekogofar M, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin acts as a protective factor against H₂O₂ toxicity. *Arch Med Res* 2008; 39(6): 560-6.
- 24- Roudkenar M H, Ghasemipour Z, Halabian R, Roushandeh A M, Yaghmai P, Gharehbaghian A, et al. Lipocalin 2 acts as a cytoprotective factor against cisplatin toxicity, an in vitro study. *DARU* 2008; 16(2): 106-11.
- 25- Bagdatoglu C, Saray A, Surucu HS, Ozturk H, Tamer L. Effect of trapidil in ischemia/reperfusion injury of peripheral nerves. *Neurosurgery* 2002; 51(1): 212-9; discussion 9-20.
- 26- Arslan E, Milcan A, Unal S, Demirkan F, Polat A, Bagdatoglu O, et al. The effects of carnitine on distally-burned dorsal skin flap: an experimental study in rats. *Burns* 2003; 29(3): 221-7.
- 27- Hemdahl AL, Gabrielsen A, Zhu C, Eriksson P, Hedin U, Kastrup J, et al. Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in atherosclerosis and myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26(1): 136-42.
- 28- Bahmani P, Halabian R, Rouhbakhsh M, Roushandeh AM, Masroori N, Ebrahimi M, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin induces the expression of heme oxygenase-1 and superoxide dismutase 1, 2. *Cell Stress Chaperones* 2010; 15(4): 395-403.
- 29- Spisni E, Valerii MC, Manerba M, Strillacci A, Polazzi E, Mattia T, et al. Effect of copper on extracellular levels of key pro-inflammatory molecules in hypothalamic GN11 and primary neurons. *Neurotoxicology* 2009; 30(4): 605-12.
- 30- La Fleur M, Underwood JL, Rappolee DA, 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(6): 2311-26.
- 31- Clark MB, Zeheb R, White TK, Bunge RP. Schwann cell plasminogen activator is regulated by neurons. *Glia* 1991; 4(5): 514-28.
- 32- Kjeldsen L, Cowland JB, Borregaard N. Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1482(1-2): 272-83.
- 33- Hibbs MS, Hasty KA, Seyer JM, Kang AH, Mainardi CL. Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem* 1985; 260(4): 2493-500.

Lipocalin 2 expression in sciatic nerve regeneration

Fatemeh Aghanasir¹, Hassan Aghai², *Mohammad Reza Nourani³

Received: 10 Apr 2012

Accepted: 7 Aug 2012

Abstract

Background: Trauma is one of the causes of peripheral nerve injuries. Free radicals increase after tissue damages. Usually free radicals are scavenged and detoxified by antioxidants. In this study we assessed antioxidative role of NGAL (Neutrophil gelatinase associated lipocalin= Lipocalin2) molecule on crushed sciatic nerves of rats.

Materials and Methods: In this study 40 rat's sciatic nerves were crushed and then at day 1 and 3 and week 1, 3, 5 after injury the sciatic nerve of rats which suffering crushed were extracted. First of all total mRNA of samples was extracted and then cDNA was synthesized. The expression of NGAL gene was confirmed by using semiquantitative RT-PCR analysis. For immunohistochemistry analysis, the samples were fixed in paraformaldehyde and cut in 20 micrometer slices by cryostat.

Results: The results showed that the expression of lipocalin 2 was significantly higher in day 1, day 3 and week 1 in crushed sciatic nerves in compare with the intact(non-injured) nerves ($p < 0.0001$). Immunohistochemistry results also confirmed the protein expression of these genes.

Conclusion: The sciatic nerve injuries cause oxidative stress which followed by crush injury. In this research NGAL molecule showed maximum up-regulation in degeneration process after injury when oxidative stress have maximum peak. In this project for the first time we demonstrated the role of this molecule in degeneration and regeneration process of peripheral nerves and with more studies it may suggest as new complementary treatment.

Keywords: Crush Injury, Oxidative Stress, Antioxidants, NGAL

1- Researcher, Department of Physiology and Biophysics, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2- Researcher, Chemical Injuries Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- (*Corresponding Author) Associate Professor, Chemical Injuries Research Center, , Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Tel: +98 21 88211523 E-mail: r.novrani@yahoo.com