

بررسی اثر آسزیک اسید بر تغییرات هیستوپاتولوژیک متعاقب آسیب نخاعی حاد در مدل موش صحرایی

رضایی زاده روکرد، م.^۱، عزیزی، ش.^۲، متقی، س.^۳*

دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۱۴ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۲۱

خلاصه

بلافاصله پس از بروز ضایعه نخاعی، التهاب عصبی سبب درد نوروپاتیک و پیشرفت نقص حرکتی می شود. آسزیک اسید به عنوان یک فیتوهورمون با نقش تعدیل کنندگی در گیاهان، دارای اثرات ضد التهابی در بافت های مختلف حیوانی است. در این پژوهش اثرات آسزیک اسید به عنوان یک ماده ضد التهابی در مدل حاد ضایعه نخاعی مورد استفاده قرار گرفت. برای ایجاد مدل ضایعه نخاعی در موش صحرایی از روش پرتاب وزنه استفاده شد. برای این منظور تعداد ۳۶ موش صحرایی بالغ نر استفاده شد گروه بندی حیوانات بصورت زیر بود گروه کنترل: فاقد آسیب و تجویز دارویی، گروه آسیب نخاعی فاقد تیمار دارویی، گروه آسیب نخاعی با تجویز بافر حلال داخل نخاعی، گروه آسیب نخاعی با تیمار آسزیک اسید ($10 \mu\text{g}/\text{rat.IT}$)، گروه آسیب نخاعی با تیمار ($15 \mu\text{g}/\text{rat.IT}$)، گروه آسیب نخاعی با تیمار متیل پردنیزولون ($30 \text{mg}/\text{kg. IP}$). برای ارزیابی اثرات آسزیک اسید بر تغییرات پاتولوژیک در فاز حاد ضایعه نخاعی، از بافت نخاع در محل ضایعه برش گیری شد و توسط پاتولوژیست مورد بررسی قرار گرفت.

این مطالعه نشان داد که تجویز آسزیک اسید سبب بهبودی در میزان ادم و خونریزی و نکروز در سطح پاتولوژیک در گروه های القا ضایعه نخاعی در مقایسه با گروه کنترل می گردد، اگرچه این تفاوت معنی دار نبود. یافته های هیستوپاتولوژیک حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که آسزیک اسید میتواند تنها تا حدودی در کاهش آثار پاتولوژیک در فاز حاد آسیب نخاعی عمل کند و مطالعات تکمیلی در این زمینه لازم است..

واژه های کلیدی: آسزیک اسید، تغییرات پاتولوژیک، آسیب نخاعی.

۱، ۳. گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

۲. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

*نویسنده مسئول: sahelmotaghi@uk.ac.ir

آسیب نخاعی یک آسیب مخرب سیستم عصبی مرکزی است که بدلیل وارد شدن ضربه مکانیکی به طناب نخاعی ایجاد می گردد. آسیب نخاعی با از بین رفتن عملکرد نورون حرکتی و نورون های حسی، قطع عملکرد سیستم اتونوم ناشی از آسیب نسبی یا کامل به نخاع ایجاد می گردد (Adriaansen و همکاران، ۲۰۱۳). ایجاد آسیب نخاعی با هر دلیلی شامل ۳ فاز اصلی حاد، ثانویه و مزمن است. شروع فاز حاد همزمان با وارد شدن ضربه و بروز آسیب است که با شکستگی استخوان، آسیب به لیگامنت ها و خونریزی ناشی از درهم شکستن ساختار عروقی تعریف می شود. خونریزی ایجاد شده در محل ضایعه سبب ایسکمی و کاهش اکسیژن رسانی به بافت می گردد که نتیجه آن راه افتادن آبشار تروما است (Myers و همکاران، ۲۰۰۶). تظاهرات بالینی آسیب ثانویه شامل افزایش نفوذپذیری سلولی، سیگنال دهی آپوپتوتیک، ایسکمی، آسیب عروقی، ادم، سمیت تحریکی، تنظیم زدایی یونی، التهاب، پراکسیداسیون لیپیدی، تشکیل رادیکال های آزاد، دمیلیناسیون، دژنراسیون والرین، اسکار فیبروگلیال و تشکیل کیست است (Dimitrijevic و همکاران، ۲۰۱۵). از هم گسیختگی رگ های خونی باعث خونریزی در بافت های ستون فقرات و به دنبال آن هجوم منوسیت ها، نوتروفیل ها، سلول های لنفوسیتی T و B و ماکروفاژها به بافت های نخاعی می شود. این پدیده همچنین با انتشار سایتوکین های التهابی مانند اینترلوکین $IL-1\alpha$ ، $IL-6$ ، 1β و فاکتور نکروز تومور $(TNF-\alpha)$ ۶ تا ۱۲ ساعت پس از آسیب همراه است. نفوذ سلول های ایمنی و سیتوکین های التهابی باعث افزایش التهاب نورون ها می شود (Turtle و همکاران، ۲۰۱۹). با وارد شدن آسیب به سد خونی-مغزی، سلول های ایمنی جریان خون مانند منوسیت ها، نوتروفیل هاف به محل آسیب وارد می گردند و نوتروفیل ها کموکاین های پیش التهابی را ترشح می کنند و به پاکسازی بقایای فاگوسیتوزی کمک می کنند. علاوه بر این نوتروفیل ها سبب تنظیم افزایشی سایتوکاین هایی چون اینترلوکین-۱، اینترلوکین-۱، $TNF-\alpha$ و اینترلوکین ۸ و فاکتورهای چون $MIP-1\alpha$ ، $MIP-1\beta$ می گردند (Zelenka و همکاران، ۲۰۰۵؛ Bracken MB & Holford، ۱۹۹۳). ماکروفاژهای ساکن در بافت عصبی مرکزی که سلول های ایمنی شبه ماکروفاژی نامیده می

شوند پس از آسیب فعال می شوند و با کمک سایر سلول ها آنتی ژن ترشح می کنند (Fehlings و همکاران، ۲۰۱۷). ایسکمی نخاع باعث ایجاد ادم سیتوتوکسیک، یونی و وازوژنیک می شود. در فیزیولوژی طبیعی، هجوم یون سدیم به دلیل هجوم غیرفعال کلر از طریق کانال های کلرید رخ می دهد و در طی یک وضعیت پاتوفیزیولوژیک، تعادل بین املاح و جریان آب در محفظه داخل سلولی مختل می شود، در نتیجه باعث تورم سلولی و از دست دادن یکپارچگی اسکلت سلولی و ترویج مرگ سلولی می شود (Jha و همکاران، ۲۰۱۹). آسیب و التهاب اندوتلیال متعاقباً اندازه منافذ را افزایش می دهد و بنابراین به مولکول های بزرگ مشتق شده از پلاسما اجازه می دهد از غشای سلولی عبور کنند و در نتیجه ادم وازوژنیک ایجاد شود (Vanzulli و همکاران، ۲۰۱۵). بزرگ شدن مداوم محل ضایعه و تشکیل کیست از ویژگی های بارز SCI است و تشکیل کیست پاسخ های آپوپتوز مداوم را نشان می دهد که سبب از بین رفتن بیشتر بافت عصبی در محل آسیب است (Görizt و همکاران، ۲۰۱۱).

درمان های موجود محدود است و تنها به بیماران دارای ناتوانی در طول عمر کمک های حمایتی می کند (Adriaansen و همکاران، ۲۰۱۳). عوامل ناهمگون مانند ویژگی های پیچیده، ناسازگاری های فراوان و پیامدهای پاتوفیزیولوژیک پیچیده پس از SCI، دلایل اصلی درک ضعیف و شکست درمان SCI هستند. التهاب به طور قابل توجهی بر تغییرات هیستوپاتولوژیک مشاهده شده در نخاع به دنبال آسیب نخاعی (SCI) تأثیر می گذارد. تعامل پیچیده بین پاسخ های ایمنی و بافت عصبی نقش مهمی در شکل گیری هیستوپاتولوژی در حال تکامل پس از آسیب ایفا می کند (Freyermuth-Trujillo و همکاران، ۲۰۲۲).

از نمونه درمان های رایج پس از آسیب نخاعی، تجویز متیل پردنیزولون است که نگرانی هایی در مورد میزان اثر بخشی و عوارض جانبی آن وجود دارد (براکن وهولفورد، ۱۹۹۳، فهلینگ و همکاران ۲۰۱۷). از جمله عوارض جانبی دارو می توان به رسیک افزایش قند خون و عفونت هایی چون پنومونی اشاره کرد (Fehlings و همکاران، ۲۰۱۷؛ Sultan و همکاران، ۲۰۲۰). راهنمای توصیه های درمانی انجمن AOSpine برای بهبود مراقبت از بیماران آسیب

نخاعی پیشنهاد می کند که ریسک تجویز استروئید در ۴۸ ساعت اولیه پس از آسیب بیش از مزایای آن است. بنابراین بررسی برای یافتن درمان موثر در کاهش التهاب پس از علائم آسیب نخاعی از اهداف تحقیقات تیم ما در بررسی اثرات ضد التهابی آبسزیک اسید است.

آبسزیک اسید یک فیتوهورمون است که در گروه متابولیت های گیاهی قرار دارد و نقش تعدیلی مکانیسم های دخیل در تکامل دانه دارد و همچنین عملکرد محافظتی در برابر عوامل عفونت زا و پاتوژن ها دارد. فرمول شیمیایی آن C15H20O4 است و به عنوان یک ترپنوئید شناخته می شود (Baliño و همکاران، ۲۰۱۹). آبسزیک اسید در انواع مختلف میوه و سبزیجات وجود دارد که مرکبات حاوی بیشترین میزان آن 1.25mg/kg است (Zocchi و همکاران، ۲۰۱۷). در اوائل دهه ۱۹۸۰ آبسزیک اسید در بافت های جانوری با نقش تعدیلی در عملکرد های فیزیولوژیکی کشف شد. مسیرهای تولید درونزاد آبسزیک اسید از طریق مسیر بیوسنتز کارتنوئید است که در تمام انواع سلولی از جمله سلول های بنیادی و میتوکندری نیز اتفاق می افتد (Lievens و همکاران، ۲۰۱۷). علاوه بر این آبسزیک اسید در فرآوند های التهابی سلول ای ایمنی مانند منوسیت ها و ماکروفاژها به صورت درونزاد نقش دارد (Bruzzone و همکاران، ۲۰۰۷; Magnone و همکاران، ۲۰۱۲). آبسزیک اسید ویژگی های متعددی دارد از جمله خاصیت ضد سرطانی که با تقویت پاسخ ایمنی همراه است (Livingston، ۱۹۷۶) و ویژگی ضد توموری که با مهار تکثیر سلول های توموری و تعدیل چرخه سلولی و ممانعت از رگ زایی عمل می کند (Hoag و همکاران، ۲۰۰۶). همچنین اثرات ضد آنرواسکلروزیس آبسزیک اسید در مطالعه ای مورد بررسی قرار گرفته است که از طریق مهار ورود سول های T و منوسیت ها به آئورت عمل می کند (Guri و همکاران، ۲۰۱۰). آبسزیک اسید دارای خواص ضد دیابتی است که عملکرد آن از طریق هموستاز گلوکز است و بدلیل مشابهت ساختاریش با تیزولیدین دیون ها و آگونیست گیرنده پراکسیزوم پرولیفیریتور فعال شده گاما می تواند در نرمال کردن قند خون ناشتا عمل می کند (Guri و همکاران، ۲۰۰۸). آبسزیک اسید در کاهش التهاب از طریق فعالسازی گیرنده پراکسیزوم پرولیفیریتور فعال شده گاما و مکانیسم هایی چون تشکیل ماکروفاژ و کاهش پروتئین جذب کننده شیمیایی

مونوسیت (MCP-1) عمل می کند (Li و همکاران، ۲۰۱۱). در مطالعه ای مشخص شد که آبسزیک اسید در کاهش التهاب نورونی هیپوتالاموس نقش دارد که از طریق کاهش سطح فاکتور نکروز توموری آلفا صورت می گیرد. بنابراین با توجه به نقش التهاب در بروز آسیب ثانویه و نقش آبسزیک اسید در کنترل التهاب پس از ضایعه نخاعی، در این مطالعه به بررسی اثر آبسزیک اسید در کنترل تغییرات پاتولوژیکی پس از ضایعه نخاعی پرداخته ایم.

مواد و روش ها

در این مطالعه از ۳۶ راس موش نر نژاد ویستار بالغ با وزن تقریبی ۲۲۰-۲۵۰ گرم استفاده گردید. حیوانات از مرکز حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه باهنر کرمان تهیه گردیدند و با دسترسی آزاد به آب و غذا در اتاق حیوانات گروه زیست شناسی دانشگاه باهنر با کنترل شرایط دمایی و رطوبتی $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ و حفظ چرخه تاریکی روشنایی ۱۲ ساعته نگهداری شدند. حیوانات بطور تصادفی در گروه های ۶ تایی بر اساس گروه های آزمایش تقسیم بندی شدند. تمام آزمایشات بر اساس شیوه نامه اخلاق دانشگاه باهنر انجام شد و کد اخلاق برای این پژوهش از کمیته اخلاق این دانشگاه دریافت گردید (REC.1399.096).

جراحی

جهت القا ضایعه نخاعی موش ها تحت جراحی قرار گرفتند. در ابتدا حیوانات با تجویز صفاقی کتامین و زایلوزین بیهوش شدند و سپس موهای ناحیه پشتی کوتاه گردید و حیوان درون دستگاه استریوتاکس قرار گرفت. سپس پوست در ناحیه T9-T10 و اطراف آن با بتادین 7.5% ضدعفونی گردید و سپس درم باز شد و فاسیا و ماهیچه های اطراف آن کنار زده شد تا لامینای مهره مشخص گردد. سپس لامینکتومی ناحیه مورد نظر انجام گرفت و پس از مشاهده نخاع با تشکیلات تهیه شده برای ایجاد آسیب به روش پرتاب وزنه، وزنه ۱۰ گرمی از ارتفاع ۲.۵ سانتیمتری بر نخاع برهنه انداخته شد. سپس بر اساس گروه مورد مطالعه در صورت نیاز تجویز درون نخاعی در حیوان صورت گرفت و پس از بخیه زدن بافت ماهیچه اطراف ستون مهره ها و سپس درم و ضد عفونی کردن مجدد محل جراحی، حیوان درون قفس با منبع حرارتی جهت تامین گرمای بدن حیوان قرار گرفت. برای بررسی پاتولوژیکی بافت نخاع، ۳ ساعت بعد از القای ضایعه نخاعی، پس از بیهوشی با

CO₂ پرفیوژن با فرمالدهیئد ۴٪ صورت گرفت و بافت ناحیه آسیب جدا و در فرمالین ۱۰ درصد به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفت.

دارو و تزریق دارویی

در این مطالعه از \pm ترانس آسزیک اسید استفاده گردید و برای تهیه بافراز ترکیب دی متیل سولفوکسید (DMSO) و مایع مغزی نخاعی مصنوعی (aCSF) به نسبت ۲ به ۱ استفاده گردید و دوزهای آسزیک اسید $15\mu\text{g}/\text{rat}$ ، $10\mu\text{g}/\text{rat}$ تهیه شد. در گروه های تیمار آسزیک اسید، دارو با حجم $5\mu\text{l}$ بصورت درون نخاعی تجویز گردید و متیل پردنیزولون با غلظت (mg/kg. IP) 30 با حجم 0.5ml به صورت درون صفاقی در گروه شاهد مورد استفاده قرار گرفت و برای کنترل مثبت از حلال آسزیک اسید که شامل ترکیب دی متیل سولفوکسید (DMSO) و مایع مغزی نخاعی مصنوعی (aCSF) بصورت تجویز داخل نخاعی با حجم $5\mu\text{l}$ بوسیله میکرواینجکشن با سرنگ همیلتون استفاده گردید. تمام تیمار ارویی به صورت تک دوز پس از ضایعه نخاعی اعمال گردید. متیل پردنیزولون تهیه شده از شرکت اکسیر ایران و آسزیک اسید محصول شرکت دارویی سیگما-آلدريج (آمریکا) استفاده گردید.

طراحی مطالعه

گروه های حیوانی مورد مطالعه شامل

- ۱- گروه کنترل؛ فاقد آسیب و تجویز دارویی
- ۲- گروه آسیب نخاعی فاقد تیمار دارویی
- ۳- گروه آسیب نخاعی با تجویز بافرحلال داخل نخاعی
- ۴- گروه آسیب نخاعی با تیمار آسزیک اسید (IT) $10\mu\text{g}/\text{rat}$ یا (ABA 10)
- ۵- گروه آسیب نخاعی با تیمار (IT) $15\mu\text{g}/\text{rat}$ یا (ABA 15)
- ۶- گروه آسیب نخاعی با تیمار متیل پردنیزولون mg/kg. (IP) 30 یا (MP)

ارزیابی هیستوپاتولوژیک:

ابتدا نمونه ها با طول تقریبی ۱ سانتی متر شامل ناحیه آسیب مرکز و بافت محیطی اطراف ضایعه بود، بطور جداگانه در اتانول با درجه حلالیت مختلف جهت آبگیری قرار گرفتن و سپس در ادامه جهت شفاف سازی طی چند مرحله از

گزیل استفاده شد. سپس بطور جداگانه با پارافین ۶۰ درجه سانتی گراد قالب گیری شدند و توسط دستگاه میکروتوم برش گیری عرضی سریالی از ناحیه روستروکودال با ضخامت $5\mu\text{m}$ انجام شد. سپس رنگ آمیزی هموکسیلین ائوزین انجام گرفت و تغییرات پاتولوژیک احتمالی بر اساس گلیوز، تشکیل حفره کیستی و تغییرات نورودنراتیو توسط پاتولوژیست توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰ مورد بررسی قرار گرفت. همچنین نمونه های بافتی از نظر میزان ادم، هموراژ و نکروز مورد ارزیابی قرار گرفت و نمره دهی از ۰ تا ۳ انجام شد. نمره ۰ به عدم مشاهده هر یک از رویداد های پاتولوژیک ادم، هموراژ و نکروز بافت عصبی تخصیص داده شد، نمره ۱ به مشاهده خفیف این علائم، نمره ۲ به مشاهده متوسط و نمره ۳ به مشاهده شدید این علائم تخصیص داده شد.

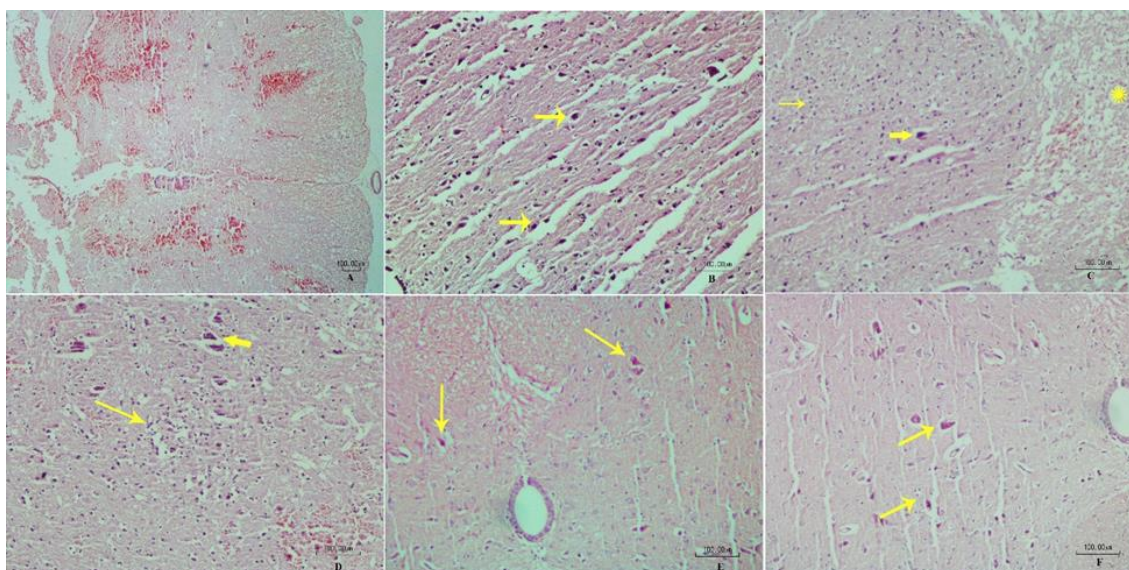
نتایج

نتایج ارزیابی گروه های آسیب نخاعی و آسیب نخاعی با تزریق حلال نشان داد که در این گروه ها یکپارچگی نخاع آسیب دیده از بین رفته و خونریزی شدید رخ داده و اجزای نکروز در ماده خاکستری و سفید بافت نخاع مشهود بود. بررسی نمونه ها نشان داد که در محل آسیب تعدادی از سلول های عصبی حرکتی در محل اعمال فشار دستخوش کروماتولیز شده و اجسام نیسل در اطراف هسته به مقدار زیادی از بین رفته و سیتوپلاسم اطراف هسته روشن دیده می شود همچنین سایر تغییرات عصبی دژنراتیو شامل کروماتولیز مرکزی و نکروز عصبی شدید با هسته پیکنوتیک مشخص و سیتوپلاسم هیپرانوئینوفیل در بافت عصبی نخاع این دو گروه قابل مشاهده بود (شکل 1. A, B). ماده سفید بافت نخاعی حالت اسفنجی شده که ناشی از قطعه قطعه شدن آکسون و جدا شدن صفحات میلینی است را نشان می دهد (شکل C.1). علاوه بر این، نواحی نکروز توسعه یافته؛ بافت اسفنجی شده و گلیوز همراه با تکثیر سلول های گلیا قابل مشاهده بود (شکل 1. D). سلول های تک هسته ای که از عروق خونی به داخل بافت نخاع نفوذ کرده اند در بافت عصبی اطراف عروقی مشاهده شدند. آستروسیت های واکنشی و ژمیستوسیت ها که سلول های گلیا ائوزینوفیلی شده صورتی رنگ با هسته مسطح هستند در پارانشیم بافت نخاع آسیب دیده مشاهده

تغییرات از نظر آماری معنی دار نبودند ($p < 0.05$)، جدول 1). نتایج نمرات بررسی ادم در نمونه ها نشان داد که سطح پایین تر ادم در گروه درمان در مقایسه با آسیب و آسیب همراه با تزریق حلال معنی دار نبود. تفاوت بین گروه های درمان و SCI و SCI با گروه تزریق حلال در نمرات خونریزی از نظر آماری معنی دار نبود، اگرچه گروه های درمان در میزان هموراژ نتایج بهتری داشتند. در نهایت، در گروه تیمار آسزیک اسید دوز ۱۵ از نظر نکروز نمرات کاهش یافته بود. با این حال، تفاوت بین گروه آسیب نخاعی و آسیب با تزریق حلال معنی دار نبود. داده های تجزیه و تحلیل شده از هر سه پارامتر تایید کرد که تغییرات بین گروه های آسیب و گروه کنترل از نظر آماری معنی دار است ($P < 0.001$ ، جدول ۱).

شدند که نشان از تغییرات ایجاد شده پاتولوژیک بدنبال آسیب نخاعی است. در گروه تیمار آسزیک اسید کاهش نکروز و هموراژ دریافت سفید ناحیه آسیب دیده را نشان می دهد (شکل 1.E، F).

کارآزمایی های هیستوپاتولوژیک انجام شده بر روی نمونه ها بر اساس شدت آسیب بررسی شدند (شکل 1.E، F) و همچنین کارآزمایی های هیستوپاتولوژیک مدولا اسپینالیس بر اساس ادم، خونریزی و نکروز به عنوان پارامترهای یکسان بافت های آسیب دیده نخاع مورد ارزیابی قرار گرفت. داده های به دست آمده از کارآزمایی ها نشان داد که درجات هیستوپاتولوژیک در گروه های درمانی MP، ABA 10 و ABA 15 در هر سه پارامتر در مقایسه با گروه آسیب و آسیب با تجویز حلال بهبود یافتند، اما این



شکل ۱. A) خونریزی شدید و اجزای نکروزه در ماده خاکستری و سفید پس از آسیب. B) نکروز شدید عصبی در محل آسیب با هسته پیکنوتیک و سیتوپلاسم هیپرانوزینوفیلیک (فلش) بافت آسیب دیده. C) بافت اسفنجی شده در ماده سفید آسیب دیده (ستاره)، و همچنین نکروز عصبی (فلش ضخیم) و گلیوز (فلش نازک)، پس از آسیب به نخاع تشخیص داده می شود. D) گلیوز با تکثیر سلول های گلیال (فلش نازک) مشخص می شود. نکروز عصبی (فلش ضخیم) در محل آسیب دیده نخاع آشکار بود. E و F) در گروه تیمار فلش نشان دهنده نکروز خفیف (درجه +۱) نورون در نخاع آسیب دیده در گروه های درمانی (F و E) نشان دهنده نکروز عصبی متوسط (درجه +۲) در نخاع آسیب دیده در گروه های درمانی است (فلش).

جدول ۱. ارزیابی هیستوپاتولوژیک و نمره بندی در گروه‌های کنترل، آسیب نخاعی، و تیمار با آبسزیک اسید

Parameter	Control Group	SCI group	SCI+ solvent group	SCI+ ABA 10	SCI+ ABA 15	SCI+ MP
Edema	0/00±0/00	3/00±0/00	3/00±0/00	2/66±0/21	2/5±0/22	2/5±0/22
hemorrhage	0/00±0/00	3/00±0/00	3/00±0/00	2/66±0/21	2/66±0/21	2/66±0/21
Necrosis	0/00±0/00	3/00±0/00	3/00±0/00	2/8±0/16	2/5±0/22	2/66±0/21

SCI: آسیب نخاعی، ABA ۱۰ (اسید آبسزیک ۱۰ میکروگرم بر موش)، ABA ۱۵ (اسید آبسزیک ۱۵ میکروگرم در موش صحرایی)، MP (متیل

پردنیزولون ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم).

بحث

اسید با دوزهای مشابه مطالعه حاضری تواند فاکتورهای پیش التهابی را در بافت نخاع آسیب دیده کاهش دهد و در نتیجه به عنوان یک تیمار ضد التهابی در مقایسه با متیل پردنیزولون عمل کند. همچنین فعالیت حرکتی را بهبود بخشید و درد نوروپاتیک را کاهش داد (Rezaeezadeh Roukerd و همکاران، ۲۰۲۲). ملاشاهی و همکاران نیز در سال ۲۰۱۸ مکانیسم اثر ضد دردی آبسزیک اسید را نشان دادند (Mollashahi و همکاران، ۲۰۱۸). لذا در این مطالعه بر آن شدیم تا عملکرد آبسزیک اسید را با رویکرد کنترل التهاب در سطح میکروسکوپی در بافت آسیب دیده نخاعی مورد ارزیابی قرار دهیم. یافته‌های این مطالعه نشان داد که تجویز آبسزیک اسید پس از ضایعه نکروز را در بافت عصبی تا حدودی کنترل کرده است و سبب کاهش بروز نکروز در بافت آسیب دیده در مقایسه با گروه آسیب نخاعی و آسیب با تجویز حلال شده است. همچنین نتایج نشان داد که تیمار آبسزیک اسید سبب کاهش ایجاد گلیوز در گروه‌های تیمار میشود. این اثرات معنی دار نبودند که شاید یکی از دلایل آن این امر باشد که زمان ۳ ساعت بعد از ایجاد ضایعه برای ایجاد اثرات ضد التهابی کافی نبوده است و یا شاید دوز مصرف دارو باید بیشتر می بود. چرا که ما در مطالعه قبلی بهبود فعالیت حرکتی را مشاهده کردیم (Rezaeezadeh Roukerd و همکاران، ۲۰۲۲). مطالعات قبلی نشان دادند که در بافت عصبی پس از آسیب مکانیکی به نخاع نکروز ایجاد می گردد (Okajima و Taoka، ۱۹۹۸،

نتیجه این مطالعه نشان داد که آسیب نخاعی سبب خونریزی، ادم و نکروز در بافت نخاع شده است. در گروه‌های تیمار با آبسزیک اسید نتایج مشابه با گروه متیل پردنیزولون در پی داشت. بررسی اثر آبسزیک اسید بر هیستوپاتولوژی بافت نخاع نشان داد که در گروه‌های تیمار با آبسزیک اسید دوز ۱۰ و ۱۵ میلی گرم در هر موش سبب کاهش خونریزی، ادم و نکروز در بافت نخاعی شد اگر چه در مقایسه با گروه آسیب نخاعی و گروه آسیب نخاعی با تیمار حلال تفاوت معنی داری مشاهده نشد. پاسخ‌های التهابی و خودایمنی آسیب نخاعی (SCI) به دلیل نقش بالقوه آنها در فرآیندهای ترمیمی طبیعی و به عنوان عوامل پاتولوژی آسیب ثانویه موضوع تحقیقات گسترده باقی می ماند (Popovich و همکاران، ۲۰۰۸). چندین رویکرد درمانی برای بازیابی بافت عصبی و بازیابی توان عملکردی نخاع مانند استفاده از عوامل محافظت کننده عصبی، افزایش بازسازی آکسون و ریمیلیناسیون و تعدیل نورونی مورد توجه قرار گرفته است (David و همکاران، ۲۰۱۲ و Kwon و همکاران، ۲۰۰۵؛ Popovich و همکاران، ۲۰۰۸). التهاب اولیه از علل اصلی ایجاد آسیب ثانویه پس از تروما در بافت عصبی است و ظرفیت ترمیم بافت عصبی آسیب دیده را محدود می کند، بنابراین کنترل التهاب از رویکردهای اصلی درمانی برای تعدیل التهاب به شمار می رود (David و همکاران، ۲۰۱۲). مطالعات قبلی ما نشان داد که آبسزیک

Sehitoglu و همکاران (۲۰۱۶) که در گروه آسیب و آسیب با تجویز حلال مطالعه حاضر نیز این امر نشان داده شد. همچنین، بروز آسیب نخاعی سبب تغییرات در سلول های گلیال می گردد که مهم ترین این تغییرات افزایش CNPase است که سبب کاهش میلین سازی در بافت آسیب دیده بدنبال آسیب به سلول های گلیا است (Amini و همکاران، ۲۰۰۹؛ Lytle و همکاران، ۲۰۰۷). نتایج مطالعات گروه های دیگر نشان داد بدنبال آسیب نخاعی آپیتوز و کاهش سلول های گلیال اتفاق می افتد که نتایج این مطالعه را مورد تایید قرار می دهد (Lytle و همکاران، ۲۰۰۷، Xiao و همکاران، ۲۰۰۶، Sehitoglu و همکاران (۲۰۱۶) همچنین مطالعه قبلی ما نشان داد که تجویز دوز نخاعی آسزیک اسید در گروه های تحت تیمار این ماده، سبب بهبود عملکرد حرکتی حیوانات آسیب دیده شد (Rezaeezadeh Roukerd و همکاران، ۲۰۲۲). علاوه بر این آسزیک اسید دارای خواص آنتی اکسیدانی است و با مهار تشکیل رادیکال های آزاد از تخریب بافت عصبی جلوگیری می کند (Baliño و همکاران، ۲۰۱۹). تشکیل رادیکال های آزاد و آسیب اکسیداتیو به طور گسترده به عنوان عوامل مهم در پاتوفیزیولوژی آسیب حاد سیستم عصبی مرکزی مورد بررسی و تایید قرار گرفته است (Sehitoglu و همکاران (۲۰۱۶). تولید گونه های اکسیژن فعال (ROS) و گونه های نیتروژن فعال (RNS) یک رویداد اولیه پس از آسیب است که در عرض چند دقیقه از ضربه مکانیکی رخ می دهد. آسزیک اسید نیز به عنوان یک آنتی اکسیدانت سبب کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و

کاهش آسیب بافتی متعاقب آن می گردد و نقش مهمی در کاهش آسیب ثانویه پس از آسیب حاد ترماتیکی نخاعی دارد (Baliño و همکاران، ۲۰۱۹). با توجه به نتایج این مطالعه و همچنین نتایج حاصل از بررسی اثر آسزیک اسید بر کنترل التهاب و اثر آن بر پیشگیری از تخریب بافت عصبی در آسیب ثانویه می توان نتیجه گیری کرد که آسزیک اسید می تواند به عنوان یک تیمار مورد مطالعات بیشتری قرار گیرد.

نتیجه گیری

بررسی های نمونه های بافتی بدست آمده نشان داد که آسزیک اسید سبب کاهش نسبی نکروز و هموراژ و ادم در بافت عصبی شد که احتمالاً این اثرات ناشی از اثرات ضد التهابی و آنتی اکسیدانی آسزیک اسید است. با توجه به این ویژگی های آسزیک اسید، می توان آن را به عنوان یک درمان کمکی یا شاید جایگزین بجای متیل پردنیزولون به دلیل آثار جانبی نامطلوب آن در نظر گرفت. توسعه استراتژی های درمانی با رویکرد ضد التهابی و آنتی اکسیدانی می تواند به عنوان یک هدف درمانی امیدوارکننده در تحقیقات درمانی آسیب های نخاعی مورد بحث قرار گیرد اگرچه تحقیقات بیشتری برای دریافتن دوز موثر آسزیک اسید، مدت زمان تجویز و سایر ویژگی های مرتبط با آسزیک اسید در آسیب نخاعی و سایر اختلالات بافت عصبی مرکزی نیاز است.



Investigating the effect of abscisic acid on histopathological changes following acute spinal cord injury in a rat model

Rezaeezadeh Roukerd, M.¹, Azizi, SH.², Motaghi, S.^{3*}

Received: 04.06.2022

Accepted: 10.02.2023

Abstract

Immediately after spinal cord injury, nerve inflammation causes neuropathic pain and motor impairment. As a phytohormone with a modulating role in plants, abscisic acid has anti-inflammatory effects in various animal tissues. In this study, the effects of abscisic acid as an anti-inflammatory agent were used in the acute model of spinal cord injury.

The weight throwing method was used to create a model of spinal cord injury in rats. For this purpose, 36 adult male rats were used and the animals were grouped as follows: the control group: no injury and drug administration, spinal cord injury group without drug treatment, spinal cord injury group with intrathecal administration of fentanyl, spinal cord injury group with abscisic acid treatment (10 μ g /rat. IT), spinal cord injury group treated with 15 μ g/rat.IT), spinal cord injury group treated with methylprednisolone (30mg/kg. IP). To evaluate the effects of abscisic acid on pathological changes in In the acute phase of spinal cord injury, the spinal cord tissues were cut at the lesion site and examined by a pathologist. This study showed that the administration of abscisic acid causes improvement in the amount of edema, bleeding, and necrosis at the pathological level in the spinal cord injury induction groups compared to the control group, although this difference was not significant.

The histopathological findings from the present study showed that abscisic acid can reduce the pathological effects in the acute phase of spinal cord injury to some extent and further studies are necessary in this field.

Keywords: Abscisic acid, pathological changes, spinal cord injury.

1,3. Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

2. Department of Pathobiology,, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

*Corresponding author: sahelmotaghi@uk.ac.ir

Adriaansen, J.J., Post, M.W., de Groot, S., van Asbeck, F.W., Stolwijk-Swuste, J.M., Tepper, M. and Lindeman, E. 2013. Secondary health conditions in persons with spinal cord injury: a longitudinal study from one to five years post-discharge. *Journal of rehabilitation medicine*. **45**, 1016-1022.

Amini, H., Heshmati, M. and Jalali, M. 2020. The Study of the Effect of Deprenyl on Gliosis after Spinal Cord Compression in Adult Rat. *Daneshvar Medicine*. **16**, 27-36.

Baliño, P., Gómez-Cadenas, A., López-Malo, D., Romero, F.J. and Muriach, M. 2019. Is there a role for abscisic acid, a proven anti-inflammatory agent, in the treatment of ischemic retinopathies?. *Antioxidants*. **8**, 104.

Bracken, M.B. and Holford, T.R. 1993. Effects of timing of methylprednisolone or naloxone administration on recovery of segmental and long-tract neurological function in NASCIS. *Journal of neurosurgery*. **79**, 500-50.

Bruzzone, S., Moreschi, I., Usai, C., Guida, L., Damonte, G., Salis, A., Scarfi, S., Millo, E., De Flora, A. and Zocchi, E. 2007. Abscisic acid is an endogenous cytokine in human granulocytes with cyclic ADP-ribose as second messenger. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **104**, 5759-5764.

David, S., López-Vales, R. and Yong, V.W. 2012. Harmful and beneficial effects of inflammation after spinal cord injury: potential therapeutic implications. *Handbook of clinical neurology*. **109**, 485-502.

Dimitrijevic, M.R., Danner, S.M. and Mayr, W. 2015. Neurocontrol of movement in humans with spinal cord injury. *Artificial organs*. **39**, 823-833.

Fehlings, M.G., Wilson, J.R., Harrop, J.S., Kwon, B.K., Tetreault, L.A., Arnold, P.M., Singh, J.M., Hawryluk, G. and Dettori, J.R. 2017. Efficacy and safety of methylprednisolone sodium succinate in acute spinal cord injury: a systematic review. *Global spine journal*. **7**, 116S-137S.

Freyermuth-Trujillo, X., Segura-Uribe, J.J., Salgado-Ceballos, H., Orozco-Barrios, C.E. and Coyoy-Salgado, A. 2022. Inflammation: a target for treatment in spinal cord injury. *Cells*. **11**, 2692.

Görütz, C., Dias, D.O., Tomilin, N., Barbacid, M., Shupliakov, O. and Frisén, J. 2011. A pericyte origin of spinal cord scar tissue. *Science*. **333**, 238-242.

Guri, A.J., Misyak, S.A., Hontecillas, R., Hasty, A., Liu, D., Si, H. and Bassaganya-Riera, J. 2010. Abscisic acid ameliorates atherosclerosis by suppressing macrophage and CD4+ T cell recruitment into the aortic wall. *The Journal of nutritional biochemistry*. **21**, 1178-1185.

Guri, A.J., Hontecillas, R., Ferrer, G., Casagran, O., Wankhade, U., Noble, A.M., Eizirik, D.L., Ortis, F., Cnop, M., Liu, D. and Si, H. 2008. Loss of PPAR γ in immune cells impairs the ability of abscisic acid to improve insulin sensitivity by suppressing monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage infiltration into white adipose tissue. *The Journal of nutritional biochemistry*. **19**, 216-228.

Hoag, T., Baolian, L., Zhideng, L., Jinyan, Z., Jie, Y. and Juan, Z. 2006. New use of natural abscisic acid in developing "differentiation inducer". *drugs of tumor cells*. **18**, 578-589.

- Jha**, R.M., Kochanek, P.M. and Simard, J.M. 2019. Pathophysiology and treatment of cerebral edema in traumatic brain injury. *Neuropharmacology*. **145**, 230-246.
- Kwon**, B.K., Fisher, C.G., Dvorak, M.F. and Tetzlaff, W. 2005. Strategies to promote neural repair and regeneration after spinal cord injury. *Spine*. **30**, S3-S13.
- Li**, H.H., Hao, R.L., Wu, S.S., Guo, P.C., Chen, C.J., Pan, L.P. and Ni, H. 2011. Occurrence, function and potential medicinal applications of the phytohormone abscisic acid in animals and humans. *Biochemical pharmacology*. **82**, 701-712.
- Lievens**, L., Pollier, J., Goossens, A., Beyaert, R. and Staal, J. 2017. Abscisic acid as pathogen effector and immune regulator. *Frontiers in plant science*. **8**, 587.
- Livingston**, V.W., Livingston Virginia WC. 1976. Abscisic acid tablets and process. U.S. Patent 3,958,025.
- Lytle**, J.M. and Wrathall, J.R. 2007. Glial cell loss, proliferation and replacement in the contused murine spinal cord. *European Journal of Neuroscience*. **25**, 1711-1724.
- Magnone**, M., Sturla, L., Jacchetti, E., Scarfi, S., Bruzzone, S., Usai, C., Guida, L., Salis, A., Damonte, G., De Flora, A. and Zocchi, E. 2012. Autocrine abscisic acid plays a key role in quartz-induced macrophage activation. *The FASEB Journal*. **26**, 1261-1271.
- Mollashahi**, M., Abbasnejad, M. and Esmaeili-Mahani, S., 2018. Phytohormone abscisic acid elicits antinociceptive effects in rats through the activation of opioid and peroxisome proliferator-activated receptors β/δ . *European Journal of Pharmacology*, **832**, 75-80.
- Morin-Richaud**, C., Feldblum, S. and Privat, A. 1998. Astrocytes and oligodendrocytes reactions after a total section of the rat spinal cord. *Brain research*. **783**, 85-101.
- Myers**, R.R., Campana, W.M. and Shubayev, V.I. 2006. The role of neuroinflammation in neuropathic pain: mechanisms and therapeutic targets. *Drug discovery today*. **11**, 8-20.
- Popovich**, P.G. and Longbrake, E.E. 2008. Can the immune system be harnessed to repair the CNS?. *Nature Reviews Neuroscience*. **9**, 481-493.
- Rezaeezadeh** Roukerd, M., Motaghi, S., Sadeghi, B. and Abbasnejad, M. 2022. Protective effect of abscisic Acid in a spinal cord injury model mediated by suppressed neuroinflammation. *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology*. **14**, 42-51.
- Sehitoglu**, M.H., Guven, M., Yüksel, Y., Akman, T.A.R.I.K., Aras, A.B., Farooqi, A.A. and Cosar, M., 2016. The effect of glycyrrhizic acid on traumatic spinal cord injury in rats. *Cellular and Molecular Biology*, **62**, 2-8.
- Sultan**, I., Lamba, N., Liew, A., Doung, P., Tewarie, I., Amamoo, J.J., Gannu, L., Chawla, S., Doucette, J., Cerecedo-Lopez, C.D. and Papatheodorou, S. 2020. The safety and efficacy of steroid treatment for acute spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis. *Heliyon*. **6**, 03414.
- Taoka**, Y. and Okajima, K. 1998. Spinal cord injury in the rat. *Progress in neurobiology*. **5**, 341-358.
- Turtle**, J.D., Henwood, M.K., Strain, M.M., Huang, Y.J., Miranda, R.C. and Grau, J.W. 2019. Engaging pain fibers after a spinal cord injury fosters hemorrhage and expands the area of secondary injury. *Experimental neurology*. **311**, 115-124.
- Vanzulli**, I. and Butt, A.M. 2015. mGluR5 protect astrocytes from ischemic damage in postnatal CNS white matter. *Cell Calcium*. **58**, 423-430.

Xiao, Y., Shan, K.R. and Guan, Z.Z. 2006. Effect of beta-amyloid peptides on alpha-7 nicotinic receptor status in astrocytes and neurons, and its relationship to pathogenesis of Alzheimer's disease. *Zhonghua Bing li xue za zhi= Chinese Journal of Pathology*. **35**, 462-466.

Zelenka, M., Schäfers, M. and Sommer, C. 2005. Intraneural injection of interleukin-1 β and tumor necrosis factor-alpha into rat sciatic nerve at physiological doses induces signs of neuropathic pain. *Pain*, **116**,257-263.

Zocchi, E., Hontecillas, R., Leber, A., Einerhand, A., Carbo, A., Bruzzone, S., Tubau-Juni, N., Philipson, N., Zoccoli-Rodriguez, V., Sturla, L. and Bassaganya-Riera, J. 2017. Abscisic acid: a novel nutraceutical for glycemic control. *Frontiers in nutrition*. **4**, 24.