جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقایسه میزان نشان‌دار شدن سلول‌های عصبی با تغییر در پروتکل ردیابی بر روی عصب حنجره‌ای بالایی در سگ

امیر قنبری حسن آباد*
دکتر فخر الدین مصباح اردکانی**
دکتر محمد رضا نام آور***
دکتر بیژن خادمی****
سعید کربلایی دوست*****

*کارشناس ارشد علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی
**دکترای علوم تشریحی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی
***دکترای علوم تشریحی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی
****متخصص گوش و حلق و بینی ، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، گروه گوش، حلق وبینی
*****کارشناس ارشد علوم تشریحی، مربی دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی

تاریخ وصول: ۱۳۸۷/۱۱/۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۲/۲۱

مؤلف مسئول: دکتر فخرالدین مصباح اردکانی
پست الکترونیک: mesbahf@ sums.ac.ir

چکیده:

مقدمه و هدف: از روش ردیابی برای شناسایی ارتباطات سلولی، مسیرهای عصبی و هسته‌های مرتبط با اعصاب استفاده می‌گردد. حساسیت این گونه پژوهش‌ها موجب شد تا در این مطالعه با تغییراتی در پروتکل ردیابی و نحوه قرار دادن عصب در ردیاب، میزان مشاهده ماده ردیاب در جسم سلولی مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها: این یک مطالعه تجربی است که در سال ۱۳۸٤ در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز بر روی ۱۰ قلاده سگ که به روش تصادفی انتخاب و به دو گروه شاهد و آزمون تقسیم شدند، انجام گرفت، در گروه شاهد انتهای قطع شده تنه عصب حنجره‌ای بالایی بعد از شستشو و برداشتن غلاف عصب درلوله حاوی پراکسیداز هورس رادیش قرارداده شد. در گروه آزمون انتهای قطع شده تنه عصب حنجره‌ای بالایی بعد از شستشو در حد امکان شاخه‌های ریز سرخرگی تغذیه کننده عصب جدا شد تا از تشکیل لخته مجدد جلوگیری شود و سپس با استفاده از سر سوزن شماره ۲۲ به دقت غلاف عصب ۳ـ۲ میلی‌متری انتهای قطع شده عصب جدا و انتهای الیاف عصبی ریش ریش گردیده و در لوله حاوی پراکسیداز هورس رادیش قرار داده و به مدت ۲ ساعت بی‌حرکت نگه داشته شد. ۵ـ۳ روز بعد در هر دو گروه پس از پرفیوژن و فیکس کردن، پل بصل‌النخاع برداشته شد. بعد از تهیه مقاطع از هر دو گروه در شرایط یکسان به روش هیستوشیمی دی‌آمینوبنزیدین و رنگ‌آمیزی تیونین مورد مطالعه قرار گرفت. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS وآزمون آماری تی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد تعداد سلول‌های حاوی ماده ردیاب در گروه شاهد ٤ ــ ۲ سلول در هر مقطع و در گروه آزمون ۸ ــ ٤ سلول در هر مقطع مشاهده گردید و از نظر آماری تفاوت معنی‌داری داشت ($P< ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که با افزایش سطح جذب موقع ریش ریش کردن انتهای عصب و بی‌حرکتی در هنگام قرار دادن عصب در ردیاب موجب افزایش جذب میزان ماده ردیاب و افزایش مشاهده ردیاب گردیده است. این مهم می‌تواند در پژوهش‌های آینده ردیابی مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: پر اکسیداز هورس رادیش، عصب حنجره بالایی، سگ

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

از دهه ۱۹۵۰ به بعد روش‌های جدیدی برای شناخت ارتباطات عصبی در سیستم عصبی مرکزی و محیطی ابداع گردید. روش ردیابی یکی از این روش‌ها است(۱). کار تجربی در این روش در سال ۱۹٦٦ آغاز شد، چند سال بعد تغییراتی دراین روش داده شد، سپس برای مشاهده بهتر ردیاب با ایجاد تغییرات در روش و نوع ماده ثبوت و ماده رنگزا به توسعه این متد کمک نمودند. در سال‌های بعد با کشف مواد جدید ردیاب گستردگی بررسی‌های ردیابی در علوم افزایش یافت(۲).

بررسی‌های گذشته نشان داد که با تزریق پراکسیداز هورس رادیش[۱] در ناحیه بروکای مغز میمون انجام گردید، علاوه بر ثبوت بافت با استفاده از آلدئیدها، تغییر زمان ثبوت و غوطه ور کردن بافت در ماده ثبوت و بافر، تعداد سلول‌های حاوی ماده ردیاب افزایش می یابد. همچنین کم بودن میزان غلظت دی آمینوبنزیدین[۲] و زمان واکنش آن موجب عدم مشاهده سلول‌های حاوی ماده ردیاب خواهد شد. نوع ماده ثبوت در میزان مشاهده ردیاب اثر مستقیم دارد(۳). کیم و استریک[۳] (۱۹۷٦) عوامل توزیع و پخش ردیاب در سلول را بر روی کورتکس مغز بررسی کرده‌اند. در این مطالعه بهترین نوع ماده ثبوت در مطالعه‌ها گلوتارآلدئید ۱/۲۵ درصد و پارافرمالدئید ۱ درصد معرفی شده است(۴). بافر حاوی سوکروز نیز در میزان مشاهده سلول دارای ردیاب تأثیرگذار است.

این مطلب در مطالعه مالمگرین و اولسون[٤](۱۹۷۷) محرز گردیده است. آنها به روش ردیابی بر روی عصب زوج دوازدهم مغزی موش سوری، میزان مشاهده ردیاب را بررسی کرده‌اند. در این مطالعه نشان داده شد که شستشو با بافر سوکروز ۵ درصد بعد از استفاده از ماده ثبوت ترکیبی گلوتارآلدئید و پارافرمالدئید موجب افزایش مشاهده ردیاب می‌شود. شستشو با بافر حاوی سوکرز موجب برداشتن اثر مواد ثبوت از روی بافت و افزایش مشاهده ردیاب می‌گردد. استفاده از ماده رنگزای مناسب در مطالعه موجب حساسیت بیشتر در مطالعه خواهد شد(۵). مورل و همکاران[۵] (۱۹۸۱) از ۹ ماده رنگزا برای مشاهده ردیاب استفاده نموده و با مقایسه نتایج نشان دادند که بیشترین حساسیت مربوط به دو ماده رنگزای دی‌آمینوبنزیدین و تترامتیل بنزیدین می‌باشد(۲). در پژوهش چرنیکی و همکاران[٦] (۱۹۸۳) منشأ سلول های عصبی رشته های عصب واگ گردنی در سگ با استفاده از ردیاب تعیین شده است. این مطالعه به روش قطع انتهای عصب و تزریق در عقده عصبی ودر زیرغلاف عصب انجام گرفته است(٦).

پس از برداشتن ساقه مغز و پردازش بافتی، ردیاب در هسته‌های مختلف واگ مشاهده شده است،

1-Horse Radish Peroxidase (HRP)
2-Di Amino Benzedine (DAB)
3-Kim & Strick
4-Malmagren & Olsson
5-Morrell et al
6-Chernicky et al

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

طول هسته‌ها و جایگاه آنها تعیین شده است. هیاکاوا و همکاران[1](۲۰۰۸) با به کار بردن ردیاب آوران‌های عقده عصبی میانتریک و زیر دیافراگمی مری را که از هسته پشتی واگ منشأ می‌گیرد در موش صحرایی شناسایی نموده‌اند(۷).

کویاما[2] (۲۰۰۵)با استفاده از خاصیت پس رو و پیش رو پراکسیداز هورس رادیش، جایگاه هسته‌های حسی و حرکتی عصب واگ و حلقی ـ حنجره‌ای را در لامپری به روش قطع عصب تعیین نموده است(۸). هوور و همکاران[3](۲۰۰۸) با استفاده از تزریق ردیاب در بطن قلب سگ میانیجیگرهای شیمیایی و علامت دهنده‌های وابسته را در رشته‌های حسی موجود در عقده عصبی شناسایی نمودند. البته در این مطالعه رنگ‌آمیزی اختصاصی هیستوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفته است(۹). والچ و همکاران[4] (۱۹۸۳) منشأ سلول‌های عصبی اعصاب حنجره سگ را با استفاده از پراکسیداز هورس رادیش به روش قطع انتهای عصب تعیین کردند. در این تحقیق محل هسته‌های عصب حنجره‌ای بالایی و عصب حنجره‌ای راجعه در بصل‌النخاع، نخاع، عقده‌های عصبی نخاعی و عقده پایینی عصب واگ مشخص شده است(۱۰).

تغییر در نوع روش‌های به کار بردن مواد ردیاب نیز موجب تنوع مطالعه‌ها گردید. از آن جمله می‌توان از روش قطع تنه عصب و قراردادن انتهای قطع شده در ماده ردیاب نام برد. از مزایای این روش حذف عوامل مزاحم همراه است. حساسیت این روش به حدی است که عدم رعایت بعضی از تکنیک‌ها در هنگام قرار دادن عصب در ماده ردیاب و پردازش بافتی موجب از دست دادن ماده ردیاب و کاهش حساسیت بررسی‌ها می‌گردد.

هدف از مطالعه حاضر مقایسه میزان نشان‌دار شدن سلول‌های عصبی با تغییر در پروتکل ردیابی بر روی عصب حنجره‌ای بالایی در سگ می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این یک مطالعه تجربی است که در سال ۱۳۸٤ در بخش علوم تشریح دانشکده پزشکی شیراز بر روی ۱۰ قلاده سگ که به روش تصادفی انتخاب و به دو گروه شاهد و آزمون تقسیم شدند، انجام گرفت.

کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی بر اساس پروتکل تصویب شده از سوی کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شیراز صورت گرفت.

هر دو گروه با استفاده از ٤۰۰ ـ ۱۰۰ میلی‌گرم پنتوباربیتال سدیم به روش داخل سیاهرگی بیهوش شدند. پس از لوله‌گذاری در نای در زیر دستگاه بیهوشی با استفاده از هالوتان، گاز اکسید نیتروژن و اکسیژن، حیوان به مدت لازم (٤ـ۳ ساعت) بیهوش نگه داشته شد. در دو طرف گردن، فاسیای سمت راست و چپ حنجره تمیز شد. عصب حنجره‌ای بالایی به آرامی با استفاده از فورسپس هموستاز از فاسیای

1-Hayakawa et al
2-Koyama et al
3-Hoover et al
4-Wallach et al

اطراف تمیز و تا عبور تنه عصب از پشت سرخرگ کاروتید تعقیب گردید.

در هر دو گروه تنه عصب حنجره‌ای بالایی از بافت اطراف تمیز گردید. انتهای پایین عصب حنجره‌ای بالایی قطع و بر روی قطعه‌ای از مقوای استریل جهت شستشو و برداشتن غلاف عصب قرار گرفت. در گروه شاهد انتهای قطع شده تنه عصب حنجره‌ای بالایی بعد از شستشو و برداشتن غلاف عصب در لوله حاوی ردیاب پراکسیداز هورس رادیش ۳۳ درصد قرار داده شد و سپس لوله با استفاده از نخ ٤ به بافت اطراف ثابت گردید. درب ظرف حاوی پراکسیدازهورس رادیش با دقت با گریس (در دمای یخچال) بسته شد(۱۰ و ٦). در نهایت لایه‌های مختلف و پوست به هم بخیه زده شد و بلافاصله اسپری کلرامفنیکل برای جلوگیری ازعفونت زخم بر روی زخم پاشیده شد و با کم کردن میزان هالوتان دستگاه بیهوشی و اضافه کردن میزان اکسیژن، به تدریج حیوان از بیهوشی خارج گشته و ۵ـ۳ روز حیوان در حالت عادی در قفس باشرایط استاندارد زنده نگه داشته شد.

در گروه آزمون با تغییراتی در پروتکل ردیاب‌گذاری نسبت به گروه اول بعد از شستشو و برداشتن غلاف عصب در حد امکان شاخه‌های ریز سرخرگی تغذیه کننده عصب جدا شد تا از تشکیل لخته مجدد جلوگیری شود و سپس انتهای عصب (۳ـ۲ میلی‌متر) به وسیله سر سوزن شماره ۲۲ ریش ریش گردید. عصب درلوله حاوی پراکسیداز هورس رادیش ۳۳ درصد قرارداده شد سپس لوله با استفاده از نخ ٤ به بافت اطراف ثابت گردید. درب ظرف حاوی ردیاب پراکسیداز هورس رادیش با دقت با گریس (در دمای یخچال) بسته شد تا از بیرون آمدن عصب از درون ظرف و محلول ردیاب جلوگیری شود(۱۰ و ٦). در نهایت لایه‌های مختلف و پوست به هم بخیه زده شد و بلافاصله اسپری کلرامفنیکل برای جلوگیری از عفونت زخم بر روی زخم پاشیده شد. بعد از انجام عمل جراحی و قرار دادن عصب در محلول ردیاب، ۱۲۰ـ۹۰ دقیقه، حیوان در وضعیت خوابیده بیهوش نگه داشته شد. این کار برای جذب بهتر ماده ردیاب به وسیله رشته های عصب و جلوگیری از بیرون آمدن عصب می‌باشد. بعد از این مرحله با کم کردن میزان هالوتان دستگاه بیهوشی و اضافه کردن میزان اکسیژن، به تدریج حیوان از بیهوشی خارج گشته و ۵ـ۳ روز حیوان در حالت عادی در قفس با شرایط استاندارد زنده نگه داشته شد.

۵ـ۳ روز بعد از عمل در هر دو گروه ابتدا حیوان بیهوش شد و با نگه داشتن بیهوشی با استفاده از دستگاه بیهوشی، جهت ثبوت بافت (فیکساسیون) به روش پرفیوژن داخل سرخرگی (سرخرگ کاروتید) آماده شد. پس از کانول‌گذاری درون سرخرگ کاروتید ۲۵ هزار واحد هپارین و ۵ میلی‌گرم نیتروگلیسرین به درون سرخرگ تزریق شد. با استفاده از پمپ،۵ لیتر سرم شستشو به مدت ۲۰ دقیقه، ۳ لیتر ماده ثبوت پارا فرمالدهید وگلوتار الدهید ۱ درصد به مدت۳۰ دقیقه و ۳ لیتربافر فسفات سدیم

همراه با ۱۰ درصد سوکرز به مدت ۳۰ دقیقه از طریق کانول درون سرخرگ‌های کاروتید به درون بافت مغز، سر و صورت حیوان فرستاده شد و از راه کانول درون سیاهرگ‌های جوگولارخارجی خارج گردید. پس از برداشتن پل و بصل‌النخاع به مدت ۳ ساعت به درون ماده ثبوت غوطه‌ور گردید و بعد از آن به مدت ۳ ساعت در بافر فسفات سدیم همراه با سوکرز ۱۰ درصد نگهداری و به دنبال آن بافت جهت تهیه برش به وسیله میکروتوم انجمادی به قطعات کوچکتر تقسیم گردید.

پس از تهیه برش‌های کرونال ۵۰ میکرومتری از بافت مغز و چسباندن روی لام آغشته به مواد چسبنده برش‌ها درون بافر فسفات با سوکرز ۱۰ درصد جمع‌آوری و به مدت ۳ـ۲ ساعت نگهداری گردید، سپس برای واکنش هیستوشیمیایی آماده شد.

برای واکنش هیستوشیمیایی، برش‌های هر دو گروه در محلول دی‌آمینوبنزیدین بر اساس روش مسولام و گوناتاس[1](۱۹۷۹) قرار داده شد(۱۱). برش‌ها پس از واکنش هیستوشیمی جهت رنگ زمینه با تیونین رنگ‌آمیزی شد.

لام‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری زایس استاندارد ۲۵ آلمان بررسی شدند. مقاطع تهیه شده از هر نمونه ۲۰ مقطع بوده و در هر مقطع سلول‌های حاوی پراکسیداز هورس رادیش شمارش شد. با استفاده از دوربین دیجیتال کانن جی ۵ ژاپن از سلول‌های نشان‌دار شده با ردیاب پراکسیداز هورس رادیش عکس گرفته شد.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS [2] و آزمون آماری تی[3] تجزیه و تحلیل شدند.

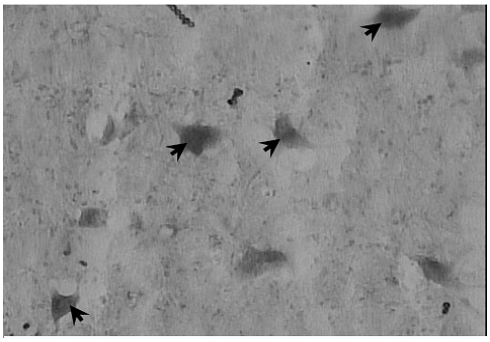
یافته‌ها

سلول‌های بافت عصبی کاملاً واضح با رنگ آبی و هسته تیره‌تر مشاهده گردید. ردیاب پراکسیداز هورس رادیش در اثر ترکیب با ماده رنگی دی‌آمینوبنزیدین به صورت دانه‌های قهوه‌ای در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شد. این دانه‌ها در درون سیتوپلاسم سلولی در اطراف هسته به صورت پراکنده و گاهی نیز به دلیل میزان زیاد پراکسیداز هورس رادیش موجود در سلول، سیتوپلاسم سلول رنگی قهوه‌ای تا تیره مشاهده شد. در اکثر سلول‌های نشان‌دار، پراکسیداز هورس رادیش در اطراف هسته مشاهده گردید. ازگلبول‌های قرمز موجود در مقاطع به دلیل داشتن پراکسیداز داخل سلولی و توانایی واکنش با دی‌آمینوبنزیدین، جهت ارزیابی واکنش هیستوشیمی و صحت واکنش با دی‌آمینوبنزیدین استفاده شد. در مقاطع تهیه شده میزان پراکسیداز هورس رادیش مشاهده شده متفاوت بوده است. در بررسی انتخابی ۲۰ مقطع تهیه شده از هر نمونه جایگاه این سلول‌های حاوی پراکسیداز هورس رادیش در برش‌ها با فاصله ۶ ـ ۵ میلی‌متری بالای سری در ۱۸ـ۱۶ مقطع ۵۰ میکرومتری مشاهده گردید. سلول‌های نشان‌دار شده در مقاطع گروه

1-Mesulam & Gonatac
2-Statistical Package for Social Sciences
3-T-Test

شاهد ٤ـ٢سلول در هر مقطع و متوسط سلول‌های نشان‌دار شده ٣ سلول مشاهده شد(تصویر ١). در گروه آزمون ٨ ــ ٤ سلول در هر مقطع و متوسط سلول‌های نشان‌دار شده به وسیله ردیاب ۶ سلول در هر مقطع وجود داشت که تفاوت آماری معنی‌داری نسبت به گروه شاهد دارد(تصویر ٢)($p<۰/۰۵$). کیفیت ماده رنگی دی‌آمینوبنزیدین و رسوب آن در بافت‌های گروه آزمون نسبت به گروه شاهد بیشتر بوده و مشاهده سلول حاوی ماده رنگی دی‌امینوبنزیدین آسان‌تر می‌باشد(تصویر ٢).

تصویر ١: سلول‌های نشان دار شده با پراکسیداز هورس‌رادیش در مقاطع گروه شاهد درواکنش با دی آمینو بنزیدین (رنگ‌آمیزی زمینه با تیونین، بزرگنمایی ۴۰۰ میکروسکوپ نوری)



تصویر٢: سلولهای نشان‌دار شده با پراکسیدازهورس‌رادیش در مقاطع گروه آزمون در واکنش با دی آمینو بنزیدین (رنگ‌آمیزی زمینه با تیونین، بزرگنمایی ۴۰۰ میکروسکوپ نوری)

بحث و نتیجه‌گیری

در روش ردیابی رعایت عوامل دخیل در مطالعه موجب کاهش در تخریب آنزیمی و افزایش حساسیت مطالعه خواهد شد. از این عوامل به نوع ماده ردیاب، نحوه به کار بردن ماده ردیاب را می‌توان نام برد. نوع ماده ردیاب به مطالعه مورد نظر بستگی دارد(١). هدف از مطالعه حاضر مقایسه میزان نشان‌دار شدن سلول‌های عصبی با تغییر در پروتکل ردیابی بر روی عصب حنجره‌ای بالایی در سگ می‌باشد.

پراکسیداز هورس رادیش به دلیل عبور کم آن از ارتباطات نورونی در مغز، تجمع آن در جسم سلولی، امکان افزایش تجمع ردیاب در هسته مرتبط با عصب و استفاده گسترده در مطالعه‌های ردیابی موجب گردید تا در این مطالعه از همین نوع ردیاب استفاده گردد. انتخاب این ماده ردیاب علاوه بر مزایای فوق در روش مطالعه به شیوه قطع عصب نیز استفاده گسترده دارد. بر اساس مطالعه چرنیکی وهمکاران (١٩٨٣) این ردیاب در مغز کمتر از ارتباطات نورونی عبور می‌کند(۶). والچ و همکاران (١٩٨٣)، هنری و همکاران[1] (١٩٩٨) نشان دادند که در روش قطع عصب امکان ردیابی و تعیین هسته مرتبط با عصب بیشتر می‌باشد(١٢ و ١٠). تسنگ و همکاران[2](٢٠٠١) برای یافتن شاخه ارتباطی در

1-Henry et al
2-Tseng et al

مطالعه خود از روش تزریق استفاده کرده‌اند(۱۳). در مطالعه کویاما (۲۰۰۵) نیز با استفاده از خاصیت ردیاب پراکسیداز هورس رادیش در حرکت پس رو و پیش رو جایگاه هسته‌های عصب نهم و دهم را با قطع انتهای عصب مشخص نمودند(۸). در این مطالعه نیز از روش قطع عصب استفاده گردید تا همه رشته‌های عصب امکان جذب ردیاب را داشته و باعث افزایش حساسیت مطالعه گردد.

از دیگر عوامل دخیل در مطالعات ردیابی می‌توان به زمان قرار دادن عصب در ماده ردیاب اشاره کرد. در روش قطع عصب، انتهای عصب بعد از ۲۰ دقیقه شروع به جمع شدن کرده و در فاصله زمانی کمی بسته می‌شود و امکان جذب ردیاب با گذشت زمان کمتر می‌گردد. در این مطالعه علاوه بر رعایت پروتکل‌های پیشین ریش ریش کردن عصب باعث ازدیاد سطح جذب و افزایش جذب ماده ردیاب در زمان طلایی می‌گردد. در مطالعه حاضر تعداد سلول‌های مشاهده شده حاوی ردیاب در گروه دوم به طور متوسط ۶ـ۳ سلول بوده است و این سلول‌های نشان‌دار شده به وسیله ردیاب در مقاطع بصل‌النخاع یک طرفه مشاهده شد. این یافته با مطالعه والچ و همکاران (۱۹۸۳) از نظر تعداد سلول حاوی ردیاب (۵ـ۲ سلول در هر برش) و مطالعه چرنیکی و همکاران (۱۹۸۳) ۴ـ۳ سلول قابل مقایسه می‌باشد. افزایش تعداد سلول‌های حاوی ردیاب در این مطالعه می‌تواند ناشی از افزایش سطح جذب به علت ریش‌ریش کردن انتهای عصب باشد. جدا کردن شاخه شریانی ریز همرا ه عصب و بیهوش نگه داشتن حیوان در زیر ماشین بیهوشی بعد از ردیاب‌گذاری و عدم تحرک می‌تواند از دیگر عوامل دخیل باشد.

در مجموع می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که حساسیت روش ردیابی به حدی است که در صورتی انتهای عصب با خون لخته بسته شود، امکان جذب ردیاب به وسیله عصب کم می‌شود و انجام مطالعه امکان‌پذیر نیست. زمان قطع و شستشوی عصب نباید بیشتر از ۲۰ دقیقه باشد، زیرا در این مدت غشاء سلولی رشته‌های قطع شده عصب شروع به جمع شدن نموده، مانع جذب ردیاب خواهد شد جدا کردن شاخه شریانی همراه عصب و افزایش سطح جذب با ریش‌ریش کردن انتهای عصب و بی‌حرکتی در هنگام قرار دادن عصب در ردیاب موجب افزایش جذب میزان ماده ردیاب و افزایش مشاهده ردیاب گردیده است. نتایج این مطالعه می‌تواند راهگشایی برای افزایش حساسیت مطالعه‌های آینده ردیابی باشد .

در پایان پیشنهاد می‌شود که این‌گونه مطالعه‌ها با گروه‌های بیشتری انجام پذیرد و همچنین مطالعه بر روی اعصابی که هسته گسترده ندارند نیز انجام گردد.

تقدیر و تشکر

از اساتید و پرسنل محترم گروه علوم تشریح و پرسنل گروه پاتولوژی دانشگاه علوم پزشکی شیراز که در انجام این پژوهش نهایت همکاری را داشتند، تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

Comparison of Marking Changes in Neural Cells Detection Protocol on Superior Laryngeal Nerve in Dogs

Ghanbari Hassanabad A[*], Mesbah Ardekani SF[**], Namavar MR[***], Khademi B[****], Karbalaydoust S[*****].

[*]MSc in Anatomical Sciences, Department of Anatomy , Faculty of Medicine, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran
[**]Associate Professor of Anatomical Sciences, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
[***]Assistant Professor of Anatomical Sciences, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
[****]Associate Professor of ENT, Department of ENT, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
[*****]MSc in Anatomical Sciences, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

KEYWORDS:
Horse radish peroxidase, laryngeal nerve, dog

Received:28/01/2009
Accepted:11/05/2009

Corresponding Author: Rezaie M
Email: md_rezaie@yahoo.co.uk

ABESTRACT

Introduction & Objective: Neuron tracing is a novel method that is used for detecting communications between cells, tracing nervous pathways, and recognizing the nuclei relating to different pathways. One of the most common tracing methods is putting cutting end of nerve inside the tracer solution. This method is so sensitive that improper insertion of the nerve inside a solution or histological preparation, would lead not to observing the tracers. We evaluated methods for observing tracers.

Material & Methods: 10 adult dogs were assigned into two groups. In the first group, the superior laryngeal nerve was cut and its proximal end, after washing and des-heating, was put inside the horse radish peroxidase (HRP) solution. In the second group, after washing the proximal cutting end of superior laryngeal nerve, we separated tiny vessels supplying the nerve to prevent hemorrhage. Then, by using the needle (gauge 22), 2-3 distal end of nerve sheath was precisely removed and nerve fibers were separated and kept inside the HRP solution. In both groups, nerve end was kept inside the HRP solution for 2 hours. Three to five days later, after perfusion and fixation their head and neck, their pons, medulla oblongata, three upper spinal segments and vagal ganglions were removed, sectioned and prepared histochemically and stained with thionin.

Results: The number of labeled cells in the first group was less (2-4 cells per section) than the second group (4-8 cells). This difference was statistically significant ($P < 0.05$).

Conclusion: This study showed that separating nerve fibers and fixation of nerve end inside the solution increased the absorption of tracer.

REFERENCES:

1.Bolam JP. Experimental neuroanatomy, a practical approach.First edition. Pub by neuro anatomical & neuropharmacology unit oxford. IRL Press Oxford 1992; 23: 1-40.
2.Morrell JI, Greenberger LM, Pwfaf DW. Comparision of HRP visualization methods. Journal of histochym cytochym 1981; 29(8): 903-16.
3.Rosene DL, Mesulam MM. Fixation variables in HRP neurohistochemestry: The effect of fixation time and perfusion product upon enzyme activity. J Histochem Cytochem1978; 26: 28-39.
4.Kim CC, Strick PL. Critical factor in demostration of horseradish peroxidase retrograde transport. Brain Res1976; 103: 356-61.
5.Malmagren L, Olsson Y. A sensetive method for histochemical demonstration of HRP in neurons following retrograde axonal transport. Brain Res 1978; 148: 279-94.
6.Chernicky CL, Barners KL, Ferrario CM, Conomy JP. Brainstem distribution of neurons with effrent projection in the cervical vagus of the dog. Brain Res Bull 1983; 10: 345-51.
7.Hayakawa T, Kuwahara S, Maeda S, Tanaka K, Seki M. Direct synaptic projections to the myenteric ganglion of the rat subdiaphragmatic esophagus from the dorsal motor nucleus of the vagus . Neurosci Res 2008; 61(4):368-74.
8.Koyama H. Organization of the sensory and motor nuclei of the glossopharyngeal and vagal nerves in lampreys . Zoolog Sci 2005; 22(4): 469-76.
9.Hoover DB, Shepherd AV, Southerland EM, Armour JA, Ardell JL. Neurochemical diversity of afferent neurons that transduce sensory signals from dog ventricular myocardium**:** Auton Neurosci 2008; 141(1-2):38-45.
10.Wallach JH, Rybicki KJ, Kaufman M. Anatomical localization of origen of efferent fiber in the superior laryngeal & recurrent laryngeal nerves of dog. Brain Res 1983; 261: 307-11.
11.Mesulam MM, Gonatas NK. Sensitivity in horseradish peroxidase nerohistochemistery. A comparative and quantative study nine method . J Histochem Cytochem 1979; 27(3):763-73.
12.Henry C, Cazals Y, Gioux M, Didar A, Aran J M, Traissac L. Nuro anatomical study of Galen anastomosis in dog. Acta Anat 1998; 131: 177-88.
13.Tseng CY, Lue JH, Lee SH, Wen CY, Shieh JY. Evidence of neuroanatomical connection between the superior cervical ganglion and hypoglossal nerve in the hamster as related by tract-tracing and degeneration method .J Anat 2001; 148: 402-28.