مطالعه بافت‌شناسی اثر اتانول بر ساختار تاندون آسیب‌دیده در موش صحرایی

بهروز یحیایی*

گروه پزشکی، واحد شاهرود، دانشگاه آزاد اسلامی، شاهرود، ایران

* مسئول مکاتبات: behroozyahyaei@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱/۹

چکیده

اتانول دارای اثرات سرکوب‌کننده پاسخ‌های التهابی و سیستم ایمنی بوده و آثار مخرب آن در نواحی مختلف بدن مورد بررسی واقع شده است. اما از اثرات اتانول بر ساختار تاندون اطلاعات مفیدی وجود ندارد. هدف از این مطالعه بررسی اثرات بافت‌شناسی اتانول بر ساختار تاندون آسیب دیده در موش صحرایی می‌باشد. تعداد بیست سر موش صحرایی به طور تصادفی انتخاب و به دو گروه اتانول و کنترل تقسیم شدند. میزان اتانول که بصورت ترکیب با گلوکز در آب آشامیدنی موش‌های صحرایی قرار داشت به تدریج افزایش یافته و توسط موش‌های صحرایی مورد مصرف واقع می‌شد. پس از گذشت یک هفته از مصرف، در تاندون آشیل هر کدام از موش‌های صحرایی در محل اتصال به استخوان پاشنه‌ی پا آسیب القا گردید. در هفته چهارم تمامی موش های صحرایی معدوم شدند و از تاندون آسیب دیده آنها نمونه‌گیری انجام شد و مورد ارزیابی بافت‌شناسی قرار گرفت. القای اتانول سبب افزایش تینوسیت‌هایی با مورفولوژی غیرطبیعی، در هم ریختگی و نامنظم شدن الیاف کلاژن با گرایش به سمت افزایش تعداد تینوسیت‌ها و نورگ‌زایی سه هفته پس از آسیب تاندون، گردید. تاندون در گروه اتانول نسبت به گروه شاهد هیچ گونه التیامی نداشت و بهبودی در آن دیده نشد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که اتانول روند التیام تاندون را به تأخیر انداخته و سبب شکل‌گیری مجدد آن بطور غیرطبیعی و با تأخیر زیاد می‌گردد.

کلمات کلیدی: بافت شناسی، تاندون، موش صحرایی، اتانول، تینوسیت

مقدمه

همه ساله موارد بستری شده در اورژانس بیمارستان‌ها بدلیل مصرف الکل رو به افزایش است [۱۴، ۲۱]. مصرف مداوم الکل باعث افزایش مرگ و میر مرتبط با آسیب-دیدگی در حوادث و سوانح، سوختگی و غیره می‌باشد [۲۰،۱۳]. تاثیرات اتانول به طور گسترده‌ای در سال‌های اخیر مورد بررسی قرار گرفته است. از عوارض آن در درجه اول می‌توان به اثر سرکوب‌کننده پاسخ‌های طبیعی التهاب و سیستم ایمنی افراد اشاره نمود [۲۴]. القای اتانول در بیماری‌های استخوان دارای یک تظاهرات عضلانی اسکلتی است که بر روی تشکیل استخوان و جذب مجدد آن اثر می‌گذارد. مصرف مداوم الکل سبب پوکی استخوان و افزایش احتمال ابتلا به استئوپروز می‌گردد. علاوه بر این خطر ابتلا به شکستگی افزایش یافته و همچنین روند بهبود شکستگی‌ها در مصرف الکل به تأخیر می‌افتد [۲]. استفاده از الکل می‌تواند سبب القای تغییرات پاتولوژیک در عضلات اسکلتی گردد. میوپاتی عضلات اسکلتی اغلب در مصرف مداوم الکل مشاهده شده که منجر به ضعف عضلانی و آتروفی آن می‌گردد. پاتوژنز آن ممکن است ناشی از تاثیر الکل بر افزایش آپوپتوز سلول‌های عضلات اسکلتی باشد [۴]. مسمومیت حاد الکل نشان داده است که به صورت انتخابی سبب مختل شدن فاکتور رشد شبه انسولین IGF-1 در پیام‌رسانی به عضلات اسکلتی می-گردد. این حالت ممکن است مکانیسمی باشد که در آن الکل به طور مستقیم سبب اختلال در روند ترجمه

mRNA و سنتز پروتئین در عضله اسکلتی می‌گردد [۱۱]. فاکتور رشد شبه انسولین IGF-1 نقش حیاتی در سنتز پروتئین‌های سلول و تکثیر و تزاید سلولی دارد. نشان داده شده است که IGF-1 در طول فاز التهابی به تکثیر و مهاجرت سلول‌های فیبروبلاست کمک کرده و تولید کلاژن را افزایش می‌دهد [۱۶]. یک گزارش موردی از پارگی تاندون‌های متعدد در ارتباط با مصرف مداوم الکل و تغییرات میوپاتی در عضلات اسکلتی بیان شده است [۱]. ترمیم تاندون همانند مراحل بهبود زخم، از جمله تشکیل عروق جدید، شکل‌گیری و تکثیر فیبروبلاست‌ها و سنتز کلاژن می‌باشد [۱۲]. همچنین نشان داده شده است که اتانول سبب به تأخیر انداختن تشکیل بافت پوششی و نورگ‌زایی، کاهش تکثیر فیبروبلاست‌ها و کاهش میزان کلاژن در طی روند التیام زخم می‌گردد [۲۳،۱۹]. مطالعه زیادی بر روی اثرات مصرف اتانول در روند التیام تاندون وجود ندارد.

هدف از این مطالعه بررسی بافت‌شناسی اثر مصرف اتانول بر ساختار تاندون در مدل تاندون آسیب‌دیده موش صحرایی می‌باشد، با این فرضیه که اتانول یک اثر منفی قابل مشاهده در روند التیام تاندون دارد.

مواد و روش کار

تعداد بیست سر موش صحرایی ماده بالغ از نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۲۰ گرم انتخاب و به طور تصادفی به دو گروه اتانول و شاهد تقسیم شدند. وزن موش‌های صحرایی (وزن اولیه، وزن در هفته اول و وزن در هفته چهارم) به دست آمد. محلولی از اتانول و گلوکز با آب تهیه گردید و به گروه اتانول داده می‌شد. اتانول اولیه با غلظت ۵٪ (۲۶۰ گرم گلوکز در ۸۹۰ میلی‌لیتر آب) بود. این غلظت به تدریج به ۱۰٪ افزایش یافت و در نهایت به ۱۵٪ در روز هشتم رسید. پس از آن به مدت ۲۱ روز و تا پایان زمان مطالعه ادامه یافت. این دوز اتانول سمی نیست و منجر به رسیدن سطح اتاتول در سرم به ۰/۱٪ می‌گردد [۸، ۱۷]. میزان معادل گلوکز به گروه شاهد نیز داده می‌شد. این پروتکل مورد استفاده از مدل تجربی بررسی اثرات اتانول بر شکستگی القا شده در استخوان درشت نی اقتباس گردید [۱۷]. در روز هشتم، تمامی موش‌های صحرایی با تزریق داخل صفاقی ۶۰ میلی‌گرم/کیلوگرم کتامین و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم زایلازین بیهوش شدند. سپس یک پارگی جزئی در ناحیه تاندون آشیل توسط قرار دادن سوزن شماره ۱۶ در ناحیه یک سانتی‌متر بالایی محل اتصال تاندون به استخوان پاشنه‌ی پا در همه موش‌های صحرایی ایجاد شد [۶، ۱۸]. در روز ۲۱ بعد از عمل جراحی تمامی موش‌های صحرایی با یک دوز بالای تیوپنتال کشته شدند. سپس از محل القای آسیب در تاندون، نمونه‌گیری به عمل آمد و برای تهیه مقاطع بافت شناسی آماده شد. در ابتدا به منظور ثبوت بافت نمونه‌ها در محلول فرمالین ۱۰٪ قرار داده شدند. در نهایت تاندون‌ها پس از انجام مراحل معمول جهت تهیه مقاطع بافت‌شناسی، بوسیله پارافین قالب‌گیری شده و برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون توسط میکروتوم چرخشی از ناحیه آسیب‌دیده‌ی آنها تهیه گردید و سپس با هماتوکسیلین-ائوزین (H&E) و آلسین‌بلو رنگ‌آمیزی شدند. در مقاطع بافت‌شناسی شاخص‌های مورفولوژی و تکثیر و تزاید سلول‌های تینوسیت (فیبروبلاست‌های تاندونی)، ویژگی-های دستجات کلاژن، نورگ‌زایی و وجود یا عدم وجود ماده بنیادین مورد بررسی قرار گرفت [۳].

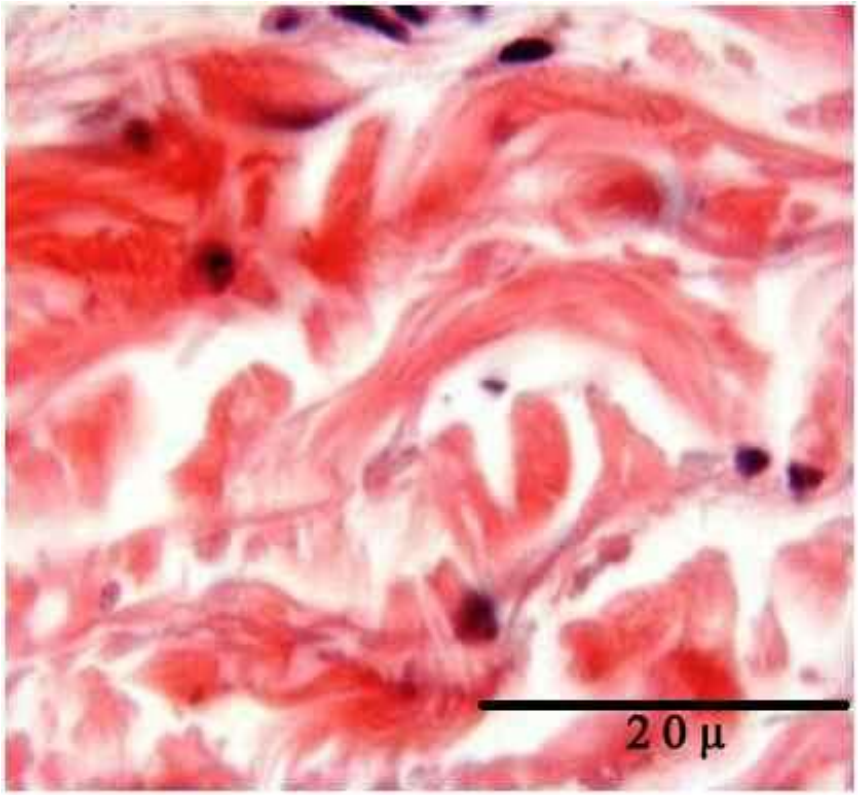
نتایج

وزن موش‌های صحرایی بطور خلاصه در جدول ۱ آمده است. وزن اولیه و افزایش وزن در اولین و چهارمین هفته بین دو گروه اختلاف معنی‌داری نداشت ($P> 0.05$). گروه‌ها از نظر مورفولوژی سلول‌های تینوسیت، تکثیر و تزاید سلول‌های تینوسیت، ویژگی‌های دستجات کلاژن، نورگ‌ایی و رنگ ماده بنیادین مورد بررسی قرار گرفتند. در ناحیه القای آسیب، سلول‌های تینوسیت گروه اتانول دارای هسته‌های بیضی و یا گرد در مقایسه با گروه شاهد بودند (شکل۱). سیتوپلاسم اکثر سلول‌های تینوسیت در

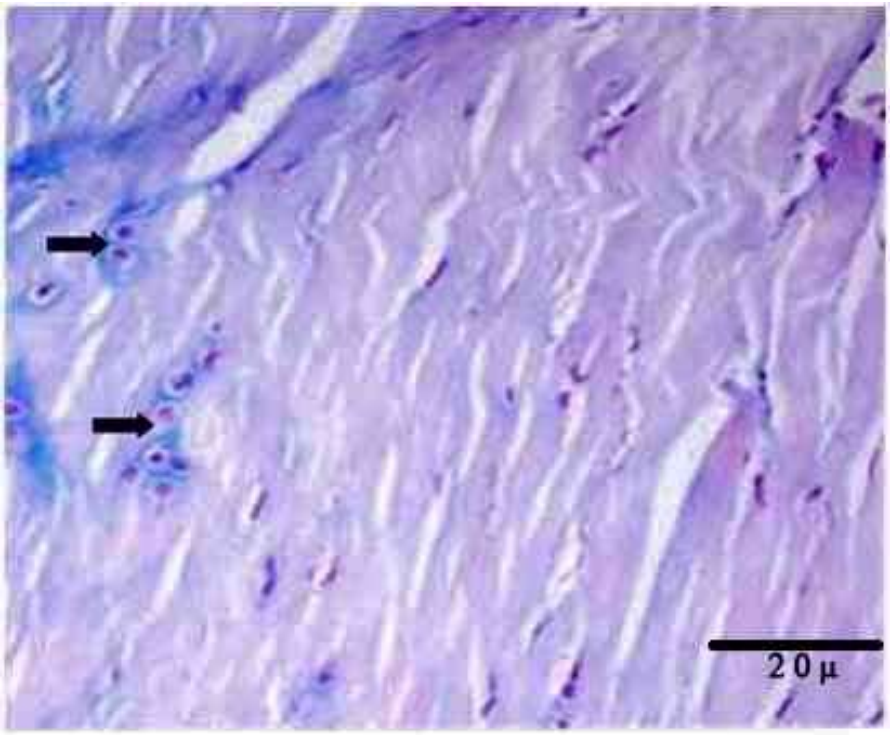
گروه اتانول قابل شناسایی نبود و هست سلول گرد یا بیضی شکل بود. دستجات کلاژن حالت بی‌نظم و جدا از هم داشتند. مرز بین دستجات کلاژن کاملا مشهود بود. هیچ تفاوتی در میزان رنگ‌آمیزی دستجات کلاژن در این دو گروه مشاهده نشد. برخی از سلول‌های تینوسیت گروه اتانول متاپلازی غضروفی را نشان داده و نورگ‌زایی بیشتری در آنها نسبت به گروه کنترل دیده شد. همچنین در روش رنگ‌آمیزی آلسین بلو غلظت بیشتری از رنگ به ویژه در اطراف سلول‌های شبه کندروسیت در گروه اتانول نسبت به گروه شاهد مشاهده گردید (شکل۲). در گروه شاهد دستجات کلاژن به موازات یکدیگر سازماندهی شده بود و هسته سلول‌های تینوسیت دوکی شکل و دراز بودند و نورگ زایی نیز مشاهده نشد (شکل۳).

جدول ۱ـ وزن بدست آمده از موش‌های صحرایی گروه کنترل و اتانول

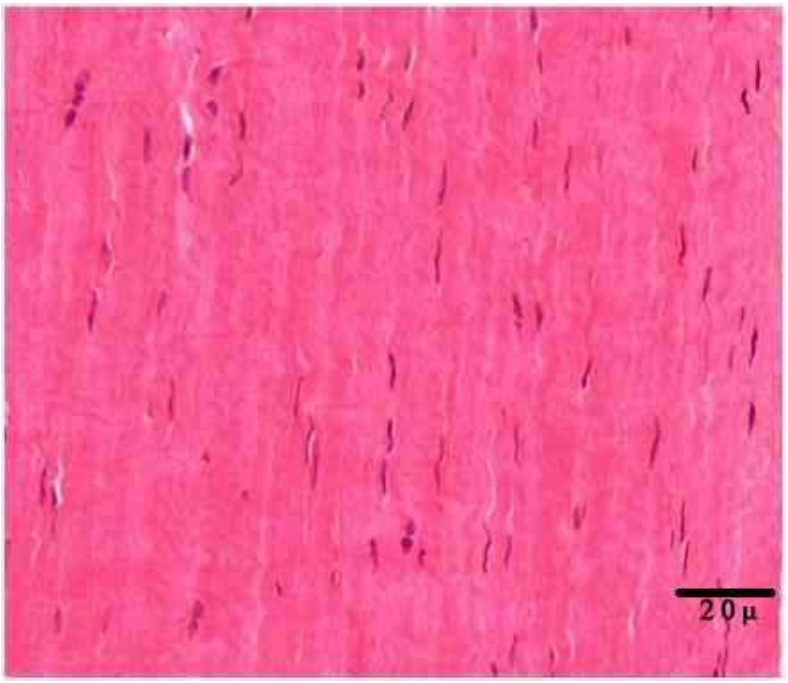
وزن	گروه شاهد	گروه اتانول	P
وزن اولیه	۲۱۷ ± ۲۵/۴	۲۱۸/۳ ± ۲۵/۴	۰/۷۷
وزن هفته اول	۲۲۷/۴ ± ۲۶/۸	۲۲۸/۵ ± ۲۵/۷	۰/۸۱
وزن هفته چهارم	۲۴۵/۶ ± ۲۶/۷	۲۳۴/۳ ± ۲۲	۰/۲۰



شکل ۱ـ نمای میکروسکوپیک تاندون موش صحرایی گروه اتانول. در ناحیه القای آسیب، سلول‌های تینوسیت دارای هسته‌های بیضی و یا گرد بوده و دستجات کلاژن نامنظم است (هماتوکسیلین و ائوزین × ۴۰۰)



شکل ۲ـ نمای میکروسکوپیک تاندون موش صحرایی گروه اتانول. غلظت بیشتری از ماتریکس به ویژه در اطراف سلول‌ها قابل رویت می باشد. نوک پیکان سلول‌های شبه کندروسیت را نشان می دهد (آلسین بلو × ۲۰۰)



شکل ۳ـ نمای میکروسکوپیک تاندون موش صحرایی گروه شاهد. دستجات کلاژن به صورت منظم سازماندهی شده و هسته سلول‌های تینوسیت دوکی‌شکل است. نورگزایی دیده نمی شود (هماتوکسیلین و ائوزین × ۱۰۰)

بحث

اتانول اثرات مخرب متعددی بر روی سیستم‌های مختلف بدن از جمله اثر سرکوب‌کنندگی سیستم ایمنی و کاهش پاسخ‌های التهاب دارد. اتانول جذب سلول‌های التهابی فعالیت سلول‌های آندوتلیال را مهار می‌کند [۱۵، ۲۴]. همچنین اثرات اتانول بر روند بهبود استخوان نیز مورد بررسی قرار گرفته و مشاهده شده که اتانول سبب سرکوب فعالیت‌های سلول‌های استئوبلاست (استخوان ساز) می‌گردد و باعث می‌شود که تشکیل استخوان و بازجذب استخوان کاهش یابد [۲]. ترمیم تاندون در سه مرحله مشترک با هم رخ می‌دهد. در طی مرحله اول که فاز التهابی می‌باشد مونوسیت‌ها و ماکروفاژها سلول‌های غالب ناحیه بوده و بافت آسیب‌دیده و مرده را حذف می‌کنند. مواد شیمیایی جاذب و وازواکتیو رها شده و تکثیر و تزاید فیبروبلاست‌ها را تحریک و سلول‌های التهابی را در محیط جذب می‌کنند. در مرحله دوم که مرحله تکثیر و تزاید سلولی می‌باشد ۴۸ ساعت پس از آسیب شروع می‌شود و حدود ۶ هفته طول می‌کشد. تشکیل عروق خونی جدید، تکثیر و تزاید فیبروبلاست‌ها، سنتز کلاژن و تشکیل ماتریکس در این مرحله رخ می‌دهد. مرحله سوم که در آن بازسازی اتفاق می‌افتد با مرحله تکثیر و تزاید سلولی اشتراک داشته و برای مدتی ادامه می‌یابد، که در طی این زمان دستجات کلاژن سازماندهی و منظم شده و ترمیم بافتی و سلولی اتفاق می‌افتد [۲۲،۱۲].

مطالعه انجام گرفته در شرایط آزمایشگاهی نشان داده که اتانول برای سلول‌های فیبروبلاست اثرات سیتوتوکسیک دارد، و سبب مهار تکثیر فیبروبلاست و سنتز کلاژن می‌گردد [۲۳]. گزارش شده است که اتانول در مدل التیام زخم جلدی در موش صحرایی باعث اختلال در پاسخ التهابی اولیه و فعالیت نوتروفیل‌ها می‌گردد [۵]. همچنین در مطالعه دیگری در مدل التیام زخم جلدی در موش‌های صحرایی که در معرض اتانول حاد قرار گرفتند، روند تشکیل مجدد اپیتلیوم به تاخیر افتاد و سنتز کلاژن مهار گردید و همچنین سلول‌های فیبروبلاست و میزان نورگ زایی کاهش یافت [۱۹]. در این مطالعه، یافته‌های اصلی بافت‌شناسی شامل افزایش در تعداد سلول‌های تینوسیت با هسته بیضی و یا گرد بود که این نتایج با سلول‌های تینوسیت دوکی‌شکل با نسبت کم هسته به سیتوپلاسم در تاندون طبیعی مغایرت دارد [۲۲].

از دیگر یافته‌های مهم این مطالعه حضور سلول‌هایی مانند سلول‌های غضروفی بود که با رنگ‌آمیزی آلسین بلو افزایش رنگ نشان می‌دادند. مطالعات قبلی نشان داده که اتانول اثر تحریکی بر تمایز سلول‌های غضروفی از سلول‌های مزانشیمی را تسریع کرده و افزایش رنگ در روش رنگ‌آمیزی آلسین بلو به دلیل تجمع ماتریکس، و رسوب گلیکوزآمینوگلیکان سولفاته می‌باشد. هر چند که مکانیسم مولکولی که سبب ایجاد این تغییرات می‌گردد هنوز شناخته نشده است [۷، ۹].

این مطالعه همچنین نشان داد که در گروه اتانول در مقایسه با گروه کنترل تمایل برای نورگ‌زایی و افزایش تعداد سلول‌های تینوسیت افزایش می‌یابد و این بر خلاف اثر مهاری اتانول در رگزایی می‌باشد. علت افزایش آن است که التیام تاندون در گروه اتانول در هفته سوم پس از جراحی، هنوز در مرحله تکثیر و تزاید سلولی بود. بدین ترتیب در گروه شاهد مرحله بازسازی همزمان با کاهش تولید سلول و تشکیل عروق شروع می‌گردد در حالیکه در گروه اتانول دچار تاخیر در روند بازسازی مجدد هست.

این منطق توسط مطالعات قبلی صورت گرفته نیز تصدیق می‌گردد، بطوریکه در آن مطالعات بیان می‌شود که اتانول حساسیت و پاسخ سلول‌های اندوتلیال را به تشکیل عروق

مهار کرده و نورگ‌زایی و مهاجرت سلول‌های اپیتلیال را در فرایند التیام زخم به تأخیر می‌اندازد [۱۹].
همچنین در گروه اتانول جدایی و از هم‌گسیختگی دستجات کلاژن نیز مشاهده گردید. سلول‌های تینوسیت هنوز در مرحله فعال بودند که منجر به افزایش تولید ماده بنیادین و در نتیجه جداسازی دستجات کلاژن از یکدیگر می‌گردید. علاوه بر این، اتانول قادر به تشکیل پیوند هیدروژنی می‌باشد. اتانول جذب شده در سطح کلاژن و تبدیل شدن آن به یک ماده سخت، منجر به فاصله افتادن بین دستجات کلاژن می‌گردد [۱۰].
ممکن است که اتانول سبب از دست رفتن آب بدن و یا کاهش کالری شود، که این موضوع در مخدوش کردن و تغییر نتایج نیز تاثیر دارد. با این حال این موضوع، احتمالاً در این مطالعه رخ نداده است زیرا مقدار برابری از آب در هر دو گروه مصرف شد، و وزن بدست آمده در هر دو گروه در هفته اول و چهارم از نظر آماری تفاوت معنی-داری با یکدیگر نداشت.

نتیجه‌گیری

مصرف اتانول منجر به شکل‌گیری مورفولوژی غیرطبیعی سلول‌های تینوسیت، بی‌نظمی دستجات کلاژن و گرایش به افزایش غیر طبیعی تعداد سلول‌های تینوسیت می‌گردد. نورگ‌زایی با تأخیر در زمان سه هفته پس از آسیب تاندون و به شکل غیرطبیعی ایجاد می‌شود. بطور کل التیام تاندون در گروه اتانول کاملاً شکست خورده و نسبت به گروه شاهد روند ناکامل و نادرستی را طی می‌کند.

منابع

1- Bourikas L.A., Kritikos H.D., Papakostantinou O.G., Katsikas G.A., Boumpas D.T., Sidiropoulos P.I. (2007), Chronic alcohol consumption as a predisposing factor for multiple tendon ruptures in unusual sites in a patient with rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 25(3): 461-463.

2- Chakkalakal D.A. (2005), Alcohol-induced bone loss and deficient bone repair. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 29(12): 2077-2090.

3- Cook J.L., Feller J.A., Bonar S.F., Khan K.M. (2004), Abnormal tenocyte morphology is more prevalent than collagen disruption in asymptomatic athletes' patellar tendons. *Journal of Orthopaedic Research*, 22: 334-338.

4- Fernandez-Sola J., Nicolas J.M., Fatjo F., Garci G., Sacanella E., Estrauch R., Tobi E., Badia E., Urbanomarquez A. (2003) Evidence of apoptosis in chronic alcoholic skeletal myopathy. *Human Pathology*, 34(12): 1247-1252.

5- Fitzgerald D.J., Radek K.A., Chaar M., Faunce D.E., DiPietro L.A., Kovacs E.J. (2007), Effects of acute ethanol exposure on the early inflammatory response after excisional injury. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 31(2): 317-323.

6- Frieder S., Weisberg S.J., Fleming B., Stanek A. (1988), The therapeutic effect of ultrasound following partial rupture of Achilles tendons in male rats. *Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy*, 10: 39-46.

7- Hoffman L.M, Kulyk W.M. (1999), Alcohol promotes in vitro chondrogenesis in embryonic facial mesenchyme. *The International Journal of Developmental Biology*, 43: 167-174.

8- Janicke-Lorenz J, Lorenz L. (1984), A radiological study in the rat. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, 103: 286-289.

9- Kulyk W.M., Hoffman L.M. (1996), Ethanol exposure stimulates cartilage differentiation by embryonic limb

10- Kuznetsova N., Rau D.C., Parsegian V.A., Leikin S. (1997), Solvent hydrogen-bond network in protein self-assembly: solvation of collagen triple helices in nonaqueous solvents. *Biophysical* Journal, 72: 353-362.

11- Lang C.H., Pruznak A.M., Deshpande N., Palopoli M.M., Frost R.A., Vary T.C. (2004), Alcohol intoxication impairs phosphorylation of S6K1 and S6 in skeletal muscle independently of ethanol metabolism. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 28(11): 1758-1767.

12- Leadbetter W.B. (1992), Cell-matrix response in tendon injury. *Clinical* Journal of *Sport Medicine*, 11: 533-578.

13- Li G, Keyl P.M., Smith G.S., Baker S.P. (1997), Alcohol and injury severity: reappraisal of the continuing controversy. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 42: 562-569.

14- McGill V., Kowal-Vern A., Fisher S.G., Kahn S., Gamelli R.L. (1995), The impact of substance use on mortality and morbidity from thermal injury. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 38: 931-934.

15- Messingham K.A.N, Fontanilla C.V., Colantoni A., Duffner L.A., Kovacs E.J. (2000), Cellular immunity after ethanol exposure and burn injury: Dose and time dependence. *Alcohol*, 22: 35-44.

16- Molloy T., Wang Y., Murrell G. (2003), The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Medicine*, 33(5): 381–394.

17- Nyquist F., Halvorsen V., Madsen J.E., Nordsletten L., Obrant K.J. (1999), Ethanol and its effects on fracture healing and bone mass in male rats. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 70(2): 212-216.

18- Orhan Z., Ozturan K., Guven A., Cam K. (2004), The effect of extracorporeal shock waves on a rat model of injury to tendo Achilles. A histological and biomechanical study. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 86(B): 613-618.

19- Radek K.A., Matthies A.M., Burns A.L., Heinrich S.A., Kovacs E.J., Dipietro L.A. (2005), Acute ethanol exposure impairs angiogenesis and the proliferative phase of wound healing. *American Journal of Physiology - Heart* and *Circulatory Physiology*, 289: 1084-1090.

20- Rehm J., Room R., Graham K., Monteiro M., Gmel G., Sempos C.T. (2003), The relationship of average volume of alcohol consumption and patterns of drinking to burden of disease: an overview. *Addiction*, 98: 1209-1228.

21- Rivara F.P., Jurkovich G.J., Gurney J.G., Seguin D., Fligner C.L., Ries R., Raisys V.A., Copass M. (1993), The magnitude of acute and chronic alcohol abuse in trauma patients. *Archives of Surgery*, 128: 907-912.

22- Sharma P., Maffulli N. (2005), Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 87(A): 187-202.

23- Stephens P., Al-Khateeb T., Davies K.J., Shepherd J.P., Thomas D.W. (1996), An investigation of the interaction between alcohol and Wbroblasts in wound healing. *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*, 25: 161-164.

mesenchyme cells. *Experimental Cell Research*, 223: 290-300.

24- Waldschmidt T.J., Cook R.T., Kovacs E.J. (2006), Alcohol and inflammation and immune responses: summary of the 2005 Alcohol and Immunology Research Interest Group meeting. *Alcohol*, 38: 121-125.