ORIGINAL ARTICLE

Evaluation of Metallothionein Molecules Gene Expression Following Sciatic Nerve Injury

Fatemeh Aghanassir[1],
Hassan Aghaei[2],
Abbas Ali Imani Fouladi[3],
Mohammad Reza Nourani[4]

[1] MSc in Physiology, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3] Associate Professor, Applied Microbiology Research Center, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4] Associate Professor, Nano-Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received November 23, 2015 ; Accepted April 23, 2015)

Abstract

Background and purpose: Injury to peripheral nerve causes widespread cellular and molecular changes in injured neurons, however, the mechanisms involved remain unknown. One of these changes is increased production of free radicals that causes oxidative stress. Antioxidants participate in nerve repair through the scavenging effect of oxygen free radicals. In this research we studied gene expression of metallothionein 1 and 2 molecules after sciatic nerve crush in rats.

Materials and methods: The sciatic nerve of 40 adult Wistar rats was crushed. In day 1 and 3 and week 1, 3, and 5 after injury the sciatic crushed nerves were extracted. Total mRNA of samples was extracted and then cDNA was synthesized. The expression of metallothionein 1and 2 genes was confirmed using semiquantitative RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) 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 metallothionein was significantly higher in day 1 and 3 after crush injury compared with that of 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. This research found maximum up-regulation of metallothionein molecules in regeneration process, when oxidative stress have maximum peak and with more studies it may suggest as new complemental treatment.

Keywords: Crush injury, oxidative stress, antioxidant, metallothionein 1 and 2.

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(124): 170-182 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و پنجم شماره ۱۲۴ اردیبهشت سال ۱۳۹۴ (۱۸۲-۱۷۰)

ارزیابی بیان ژن مولکول های متالوتیونین پس از آسیب عصب سیاتیک

فاطمه آقانصیر[۱]
حسن آقایی[۲]
عباسعلی ایمانی فولادی[۳]
محمدرضا نورانی[۴]

چکیده

سابقه و هدف: آسیب به عصب محیطی تغییرات سلولی و مولکولی گسترده‌ای در نورون‌های آسیب دیده ایجاد می‌نماید که بسیاری از آن‌ها ناشناخته باقی مانده‌اند. یکی از این تغییرات افزایش تولید رادیکال‌های آزاد می‌باشد که به استرس اکسیداتیو منجر می‌شود. مواد آنتی اکسیدان از طریق اثر پاک کنندگی رادیکال‌های آزاد اکسیژن در ترمیم عصب شرکت می‌کنند. هدف از این مطالعه بیان ژن مولکول‌های متالوتیونین ۱و۲ پس از آسیب له شدگی عصب سیاتیک رت بوده است.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر عصب سیاتیک ۴۰ رتبا آسیب له شدگی مورد استفاده قرار گرفت. سپس ۱ و ۳ روز و ۱، ۳ و ۵ هفته پس از آسیب، عصب سیاتیک آسیب دیده خارج شد. ابتدا mRNA کامل از نمونه‌ها استخراج و سپس cDNA ساخته شد و بیان ژن‌های متالوتیونین ۱و۲ با استفاده از آنالیز نسخه‌برداری معکوس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نیمه کمی تایید شد. به منظور آزمایشات ایمونوهیستوشیمی نمونه‌ها در پارافورمالدئید فیکس شدند و با استفاده از کرایو استات برش‌های طولی به ضخامت ۲۰ میکرون زده شد.

یافته‌ها: نتایج نسخه‌برداری معکوس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در نمونه‌های دچار آسیب نشان دادکه بیان ژن‌های متالوتیونین ۱و۲ در روزهای اول و سوم نسبت به نمونه‌های نرمال به صورت معنی‌داری ($p <$ ۰/۰۰۰۱). افزایش داشته است. نتایج ایمونوهیستوشیمی نیز در مورد این پروتئین تاییدکننده بیان ژنی بود.

استنتاج: آسیب‌های وارد شده به عصب سیاتیک باعث تولید استرس اکسیداتیو می‌شود. مطالعه حاضر افزایش بیان مولکول‌های متالو تیونین را در روندترمیم، زمانی که استرس اکسیداتیو بیش‌ترین افزایش را دارد، نشان می‌دهد و با آزمایشات تکمیلی ممکن است به عنوان مکمل در درمان مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: آسیب له شدگی، استرس اکسیداتیو، آنتی اکسیدان، متالوتیونین ۱و۲

مقدمه

آسیب به عصب محیطی تغییرات سلولی و مولکولی در نورون‌های آسیب دیده و در محیط کوچک اطراف آکسون‌های آن‌ها ایجاد می‌نماید. در طول اولین هفته پس از آسیب، دژنراسیون والریان رخ می‌دهد که در

مولف مسئول: محمدرضا نورانی- تهران، خ ملاصدرا، خ شیخ بهایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...، مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی E-mail: r.nourani@yahoo.com
۱. کارشناسی ارشد فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی و بیو فیزیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)، تهران، ایران
۲. استادیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳. دانشیار، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)، تهران، ایران
۴. دانشیار، مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)، تهران، ایران
تاریخ دریافت :۱۳۹۳/۹/۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۹/۱۰ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۲/۳

نتیجه آن، آکسون‌های دیستال و ورقه های میلین آن‌ها توسط ماکروفاژهای مهاجم فاگوسیته می‌شوند. سلول‌های شوآن مشتق شده از آکسون نقش کلیدی در تنظیم بسیج ماکروفاژها بازی می‌کنند. هم‌چنین به دنبال آسیب، سلول‌های شوآن باقی‌مانده در قطعه دیستال به سمت تکثیر شدن و بسیاری تغییرات در بیان ژن پیش می‌روند. این سلول‌های تکثیریافته به سمت دیستال عصب مهاجرت می‌کنند تا زمینه رشد مجدد آکسون‌ها را فراهم کنند و عصب دوباره بازسازی شده و ترمیم (رژنراسیون) صورت گیرد(۱). ویژگی‌های بافت‌شناسی دژنراسیون والریان به صورت گسترده‌ای توصیف شده است در حالی‌که مکانیسم‌های سلولی و مولکولی مربوط به آن به طور زیادی ناشناخته باقی مانده است(۲). آسیب عصب ممکن است به طول زمان له شدگی مربوط باشد. در یک مطالعه پایلوت نشان داده شد که به طور ویژه ۶۰ ثانیه فشار در عصب سیاتیک آسیب ایجاد می‌کند(۳). پس از آسیب ناشی از تخریب بافت، رادیکال‌های آزاد اکسیژن افزایش می‌یابند و آسیب بافتی ایجاد می‌کنند(۴، ۵). رادیکال‌های آزاد می‌توانند به لیپیدها، پروتئین‌ها و یا DNA سلولی آسیب زده و عملکرد نرمال آن ها را مهار نمایند(۶). رادیکال‌های آزاد باعث آسیب به بافت‌های بدن شده و عامل بیماری‌های التهابی، سرطان، تخریب سلول‌های عصبی، آترواسکلروز(۷)، بیماری‌های قلبی- عروقی و اوتیسم می‌باشند(۸). افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و گونه‌های واکنشی اکسیژن (Reactive Oxygen Species یا ROS) به استرس اکسیداتیو منجر می‌شود که این استرس نقش مهمی در آسیب دیدگی عصب محیطی تروما دیده بازی می‌کند(۹). هم‌چنین استرس اکسیداتیو می‌تواند بیماری‌هایی از قبیل آلزایمر، دیابت، انسداد مزمن ریوی، آرتریت روماتویید و بسیاری از اختلالات نورولوژیک را ایجاد نماید(۱۰،۱۱).

بدن سیستم‌های آنتی‌اکسیدانت حفاظتی برعلیه تولید رادیکال‌های آزاد در اختیار دارد از جمله متالوتیونین‌ها (Metalothioneine یا MT) که نقش مهمی در سم‌زدایی و حذف رادیکال‌های آزاد ایفا می‌کنند(۱۲). متالوتیونین‌ها به خانواده‌ای از پروتئین‌های با وزن مولکولی پایین (۶ تا ۷ کیلو دالتون) متصل شونده به فلزات (Low molecular weight metal associated protein) تعلق دارند که حداقل توسط ۱۰ ژن عملکردی متالوتیونین کد می‌شوند(۱۳). خانواده متالوتیونین‌ها از چهار عضو تشکیل شده‌اند، شامل MT1 تا MT-4. MT-1 و MT-2 در تقریباً تمام بافت‌ها که CNS را هم شامل می‌شود، بیان می‌شوند در حالی که MT-3 (که فاکتور مهاری رشد یا Growth inhibitory factor (GIF) نیز نام دارد) و MT-4 به طور غالب در مغز بیان می‌شوند(۱۴). متالوتیونین‌ها پروتئین‌های با عملکرد چندگانه هستند که MT-1 و MT-2 در اکثر بافت‌ها بیان می‌شوند در حالی که MT-3 و MT-4 غالباً به ترتیب در CNS و اپی‌تلیال‌های مکعبی بیان می‌شوند(۱۵). ایزوفرم‌های MT-1 و MT-2 به صورت بارزی مشابه هستند و هم‌زمان با هم تنظیم می‌شوند و بنابراین اغلب به عنوان یک ایزوفرم واحد (MT-1/2) در نظر گرفته می‌شوند(۱۵،۱۶) و نقش پاک کردن رادیکال‌های آزاد را دارا می‌باشند(۱۳،۱۷،۱۸).

Hidalgo و همکاران گزارش کردند بیان MT-1/2 در پاسخ به آسیب بافتی افزایش می‌یابد(۱۹). متالوتیونین مواد مضر درگیر در پاتوفیزیولوژی شرایط نورودژنراتیو را پاک می‌کند(۲۲- ۲۰). عملکرد آنتی‌اکسیدانی MT-1 و MT-2 اجزای سلولی را از اثرات آسیب زننده ROS حفظ می‌کند(۲۳). موش‌های با نقص MT-1/2 نسبت به حالت نرمال در معرض مقدار بیش‌تری از ROS و استرس اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد قرار می‌گیرند و رادیکال‌های آزاد اثرات مخرب خود را بر جای می‌گذارند(۲۴).

نتایج مطالعه Ding و همکاران نشان می‌دهد که آسیب حرارتی شدید بیان متالوتیونین کبدی را هم درسطح پروتئین و هم در سطح mRNA افزایش

می‌دهد(۲۵). آسیب حرارتی شدید که باعث افزایش ترشح گلوکوکورتیکوئیدها می‌شود، قادر به القای بیان متالوتیونین می‌باشد(۲۶). در موش‌ها دیده شده است در بسیاری از اندام‌ها بعد از تابش اشعه گاما، سنتز القا شده متالوتیونین بالا می‌رود. هم‌چنین متالوتیونین‌ها در حفاظت در برابر جراحات مغزی شرکت می‌کنند و دارای تأثیر ضد آپوپتوزی نیز می‌باشند(۲۵).

MT-1/2 در سیستم اعصاب مرکزی هم مهم هستند و بیان آن‌ها در هنگام استرس، اختلالات نورودژنراتیو مثل بیماری آلزایمر، amyotrophic lateral sclerosis(ALS)، ایسکمی، آسیب‌های کرایو افزایش می‌یابد(۲۷،۱۷). مطالعات دیگر نشان می‌دهند که کاربرد MT-1/2 اختلالات نورودژنراتیو CNS را بهبود می‌دهد(۲۸)، در مقابل گزارشات کمی در مورد متالوتیونین در شرایط عصب محیطی نرمال و پاتولوژیک موجود است(۲۹) اخیراً گزارش کرده‌اند که با اضافه کردن مستقیم MT-1/2 به نورون‌های آسیب دیده در محیط کشت، جوانه زدن ترمیمی آکسون‌ها پس از آسیب افزایش می‌یابد(۳۰). در این آزمایشات هیچ سلول گلیال یا سلول سیستم ایمنی در محیط وجود نداشت و این نشان می‌دهد که MT-1/2 خارج سلولی می‌تواند مستقیماً روی نورون‌های آسیب دیده عمل نماید که در واقع خارج از سیتوپلاسم آستروسیت‌ها می‌باشد. این آزمایشات هم چنین نشان دادند که MT-1/2 اگزوژن رشد ترمیمی نورون‌های قشر مغز(۳۰)، نورون‌های دوپامینرژیک، و نورون‌های هیپوکامپ(۳۱) و سلول‌های گانگلیونی شبکیه(۱۶) را تسریع می‌بخشد و پیشنهاد می‌کند که پاسخ نورونی به MT-1/2 خارج سلولی وجود دارد(۳۲). موش‌هایی که ژن MT آن‌ها خاموش شده است و با بستن شریان مغزی، آسیب مغزی در آن‌ها ایجاد شده است، افزایش التهاب، استرس اکسیداتیو و آپوپتوز را نشان می‌دهند و در مقایسه با موش‌های وحشی (wild-type) ریکاوری آن‌ها تاخیر دارد(۳۳)، در نتیجه متالوتیونین ۱و۲ آنتی اکسیدان و فاکتورهای حفاظت کننده نورونی هستند. بدون میلین شدن و آسیب آکسونی به طور عمده در موش‌های فاقد متالوتیونین ۱و۲ در حین التهاب میلین مغزی افزایش می‌یابد. بر این اساس متالوتیونین ۱و۲ نقش‌های حفاظتی و رژنراتیو در مغز دارند(۳۴) و استرس اکسیداتیو را کاهش داده و ترمیم بافت مغزی را افزایش می‌دهند(۳۵). موش‌هایی که افزایش بیان MT-1 داشتند، علیه ایسکمی و خون‌رسانی مجدد مغزی فوکال حفاظت می‌شدند و انفارکت‌های کم‌تر و ریکاوری عملکردی بهتری از گروه کنترل نشان می‌دادند(۳۶). اخیراً کشف کرده‌اند که MT-2 A انسانی اگزوژن (مهم‌ترین ایزوفورم انسانی MT-1/2) توسط عمل مستقیم بر روی نورون‌ها توانایی افزایش ریکاوری نورونی به دنبال آسیب را داراست(۳۰). پس از آسیب فوکال به نئوکورتکس رت، سلول‌های گلیال NG2 کشت داده شدند. این سلول‌ها با بیان مولکول‌های MT-1/2 باعث تسریع ترمیم آکسونی می‌شوند(۳۷).

تغییرات در بیان mRNA مولکول‌های آنتی‌اکسیدان که پس از آسیب و ترمیم عصب محیطی به وقوع می‌پیوندد، هنوز کاملاً شناخته نشده است(۳۸). با توجه به نقش مؤثر آنتی‌اکسیدان‌ها در سم زدایی محصولات تولید شده ناشی از استرس‌های اکسیداتیوی و هم‌چنین تولید رادیکال‌های آزاد ناشی از آسیب عصب محیطی، انتظار می‌رود تا بیان بعضی از ژن‌های آنتی‌اکسیدان در قطعه دیستال عصب محیطی آسیب دیده تغییر نمایند. بر همین اساس در مطالعه حاضر بیان ژن‌های متالوتیونین ۱ و۲ و پروتئین متالوتیونین ۱ 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. با توجه به این که در ایران به این جنبه از ترمیم عصب یعنی به کارگیری روش‌های فیزیولوژی مولکولی در درمان ضایعات اعصاب محیطی کم‌تر پرداخته شده است بنابراین امید است نتایج این تحقیق در آینده بتواند در

درمان ضایعات ایجاد شده در اثر آسیب‌های لـه شـدگی اعصاب محیطی درصدمات ناشی ازجنگ، سوانح رانندگی و فعالیت‌های ورزشی، مصدومین حـوادث طبیعـی ماننـد زلزله و لـه‌شـدگی عصـب در نتیجـه اعمـال جراحـی در مناطقی نزدیک به اعصاب محیطی، موثر باشد.

مواد و روش ها

در مطالعه تجربی حاضر از موش های صـحرایی نـر نژاد ویستار با میانگین وزنـی ۲۰۰ تـا ۲۵۰ گـرم اسـتفاده شد. حیوانات از انستیتو پاستور ایران تهیه شـدند. سـیکل روشـنایی / تـاریکی ۱۲ سـاعته، دمـای ۲±۲۲ درجـه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۵ درصد و دسترسی آزاد به آب و غذا تامین گردید. ۴۰ سر رت به ۵ گروه ۸ راسی تقسـیم شد. گـروه‌هـا شـامل ۱ و ۳ روز، ۱ و۳ و ۵ هفتـه پـس از جراحی بودند. ۵ رت با عصب سیاتیک سالم به صـورت تصادفی انتخاب شده و بـه عنـوان گـروه کنتـرل در نظـر گرفته شـد. بـر اسـاس فرمـول Read & Munch در هـر گروه ۵ رت به منظور آزمایشـات مولکـولی و ۳ رت بـه منظور آزمایشات ایمونوهیستوشیمی به صورت تصـادفی انتخاب شدند.

رت‌هـا بـه وسـیله مـاده بیهوشـی کتـامین بـه مقـدار ۹۰ mg/kg و زایلازین بـه مقـدار ۱۰mg/kg بـه صـورت داخل صفاقی بیهوش شدند. پس از تراشـیدن مـوی پـای راست حیوان، پوست ناحیه توسط بتـادین و الکـل تمیـز گردید. پـس از ثابـت نگـه‌داشـتن دسـت و پـای حیـوان توسط مکـان‌هـای مشـخص شـده بـر روی تخـت عمـل جراحی، برشی در پوست خلفی خارجی ران ایجاد شـد. عضـله و فاسـیا را بـه آرامـی کنـار زده شـد و عصـب سیاتیک را در فاصله بین بریدگی سـیاتیک تـا محـل دو شـاخه شـدن اعصـاب تیبیـا و پروتئـال مشـترک نمایـان گردید. ۵ میلی‌متر پایین‌تر از بریدگی سیاتیک با استفاده از فورسپس به مدت ۶۰ ثانیه تحت فشار قـرار داده شـد، محل آسیب با بخیه زدن نزدیک‌ترین عضله به محـل لـه شدگی با استفاده از نخ بخیـه ۵ صـفر سـیلک غیـر قابـل جذب نشانه‌گذاری گردید و سـپس عضـلات کنـار هـم گذاشته و پوسـت بخیـه زده شـد. ۱ و ۳ روز و ۱ ، ۳ و ۵ هفته پس از آسیب، ۵ میلی‌متر از عصب سیاتیک پایین‌تر از محـل آسـیب خـارج گردیـد و تـا شـروع آزمایشـات مولکولی در ۸۰- نگهداری شد.

بررسـی بیـان ژن هـا بـه روش نسـخه بـرداری معکـوس واکنش زنجیره ای پلیمراز

در ابتـدا اسـتخراج RNA بـا اسـتفاده از محلـول Trepure Isolation Reagent (Roch, Germany) طبق دستورالعمل انجام شد. نمونـه‌هـای بافـت عصـب کـه در زمان‌های اشاره شده خارج شده‌اند با استفاده از دسـتگاه هوموژنـایزر یـا اولتراسـونیک، هومـوژن گردیـد. سـپس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط قرار داده شـد و سپس ۲۰۰ مـاکرولیتر کلروفـرم بـه تیـوب‌هـای محتـوی نمونـه اضـافه گردیـد و بـه خـوبی هـم زده شـد تـا فـاز بی‌رنگ برروی فاز رنگی قرار بگیـرد پـس از قـرار دادن به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، بـه مـدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و بـا دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه (rpm) سـانتریفیوژ شـدند. پـس از سـانتریفیوژ، فاز رویی توسط سمپلر عـاری از RNA (RNase free) به آرامی جدا و به میکروتیوپ‌های استریل منتقـل و هـم حجم آن ایزوپروپانول به آرامی مخلوط شد و بـه مـدت ۱۵ دقیقه بر روی یـخ قـرار گرفـت. سـپس بـه مـدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گـراد در دور rpm۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ گردیـد. رسـوب، جداسـازی شـد و بـه آن ۱ میلی‌لیتر اتـانول ۷۵ درصـد اضـافه گردیـد و بـه مـدت ۸ دقیقه در دمای ۴ درجـه سـانتی گـراد در دور rpm۷۵۰۰ سانتریفیوژ شد. در نهایـت RNA در آب تیمـار شـده بـا Diethylpyrocarbonate (DEPC) حـل شـد.پـس از اسـتخراج RNA بـه منظـور ارزیـابی کمیـت RNA استخراج شـده و تعیـین غلظـت و درجـه خلـوص آن از دستگاه اسپکتروفوتومتر نانو دراپ (NanoDrop,USA) استفاده شد. این دستگاه به طور اتوماتیک غلظـت RNA

را با استفاده از جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر محاسبه می کند. پس از آماده‌سازی نمونه و گذاردن آن در مکان قرارگیری نمونه، دستگاه غلظت نمونه مورد نظر را در طول موج مربوطه، بر حسب نانوگرم بر میکرولیتر، محاسبه می‌نماید. از طرفی نمونه RNA دارای کیفیت استاندارد می‌باشد که الگوی باند ویژه‌ای را روی ژل آگاروز نشان می دهد. حضور باند های RNA ریبوزومی S ۱۸ و S ۲۸ نشان‌دهنده 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 (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 در جه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (دمای غیر فعال سازی) انجام شد. پس از اتمام سنتز cDNA، میکروتیوپ ها به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل گردید. سپس از cDNA سنتز شده به عنوان الگو برای PCR استفاده شد. برای پی بردن به میزان بیان ژن MT از پرایمرهای جدول شماره ۱ استفاده شد و به منظور نرمال سازی بیان این ژن، بیانβ-actin به عنوان یک ژن خانه دار (House keeping gene) استفاده شد. برنامه زمانی- دمایی PCR شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۳ سیکل با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۶۴ و ۶۵ درجه سانتی‌گراد (به ترتیب برای MT-1A و MT-2A) به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و در نهایت ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد جدا و با اتیدیوم بروماید قابل مشاهده شدند و سپس با دستگاه ترانس لومینوتور (uvidoc)UV ارزیابی شدند.

جدول شماره ۱: پرایمرهای طراحی شده برای بررسی بیان ژن های مورد مطالعه

ژن ها	توالی پرایمرها	دمای اتصال (°C)	اندازه(bp)
MT-1A	Forward: 5'tgccttcttgtcgcttacac3' Reverse: 5'tcgtcacttcaggcacagc3	۶۴°C	۲۴۲
MT-2A	Forward: 5'tagaactctgcagcgatctc3' Reverse: 5'tccgaagcctctttgcagat3'	۶۵°C	۲۱۶
β-actin	Forward:5'tcatgaagatcctcaccgag3' Reverse: 5' ttgccaatggtgatgacctg3'	۵۸°C	۱۹۰

با استفاده از نرم افزار Scion Image بیان ژن‌ها از حالت کیفی به صورت کمی تبدیل می‌شود. سپس در مورد هر یک از ژن‌های MT-1 و MT-2 بیان آن ژن در هر نمونه به بیان ژن بتا اکتین در همان نمونه تقسیم می شود و میانگین بیان ژن/بتا اکتین محاسبه می گردد. برای تجزیه و تحلیل داده‌های PCR از نرم افزار SPSS 17 استفاده شد. تمام نتایج حاصلبه صورت میانگین ± خطای استاندارد (Means±SEM) ارائه شده است. از آن جا که داده ها از توزیع نرمال برخوردار بودند از آزمون آنالیز واریانس دو طرفه (Two Way ANOVA) با Post Hoc توکی (Tukey) برای مقایسه گروه‌ها استفاده گردید. اختلاف معنی دار در سطح $p<۰/۰۵$ برای تمامی موارد در نظر گرفته شد.

آزمایشات ایمونوهیستوشیمی

نمونه‌های جمع آوری شده درمحلول فیکساتیو بافر پارا فورمالدئید ۴ درصد قرار داده شدند و سپس به محلول ساکروز ۳۰ درصد منتقل گردیدند و تا انجام آزمایشات در ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. برش های یخی از عصب ها با میکروتوم کرایو استات به ضخامت ۲۰ میکرومتر تهیه و بر روی اسلاید های پوشش داده شده با سیلان قرار گرفتند. اسلاید های حاوی برش ها با آنتی بادی اولیه مونوکلونال MT-1A (شرکت Ab Cam) با غلظت ۱:۲۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی گراد و به مدت ۱۲ ساعت انکوبه شد و پس از شستشو با محلول بافر سدیم فسفات (PBS)، آنتی بادی ثانویه Anti mouse IGg Biotinilated به مدت ۱ ساعت انکوبه گردید و سپس با سیستم اویدین- بیوتین

(ABC) و دی آمینو بنزیدین(DAB) محل های حضور کمپلکس آنتی‌ژن- آنتی بادی قابل رویت شده و با میکروسکوپ نوری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

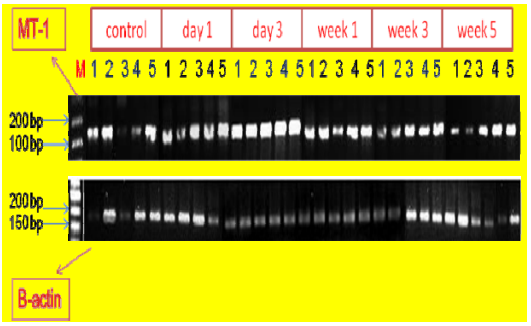
یافته ها

بیان ژن MT-1A در نمونه‌های عصب سیاتیک آسیب دیده و نمونه های عصب سیاتیک نرمال در تصویر شماره ۱ آورده شده است.

بیان ژن MT-2A در نمونه های عصب سیاتیک آسیب دیده و نمونه های عصب سیاتیک نرمال در تصویر شماره ۲ آورده شده است.

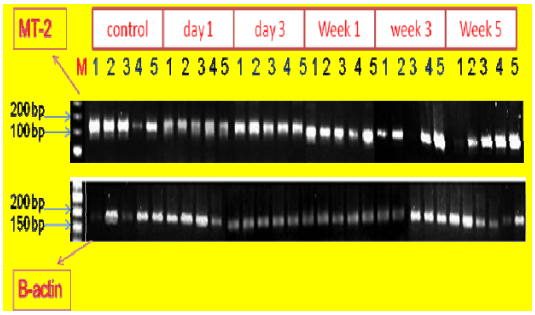
به منظور نرمال کردن شرایط بیان ژن MT-1 و MT-2 در هر نمونه به بیان ژن بتا اکتین همان نمونه تقسیم شده و سپس میانگین ۵ نمونه در هر گروه گرفته شده است (جدول شماره ۲).

نتایج به دست آمده از تحلیل آماری حاکی از این بود که بیان ژن MT-1 در گروه های دچار آسیب در روزهای اول و سوم پس از آسیب نسبت به گروه نرمال به طور معنی داری افزایش داشته است ($p<۰/۰۰۰۱$) (نمودار شماره ۱).



تصویر شماره ۱: الف) الکتروفورز نتایج RT-PCR ژن MT-1 نمونه های عصب سیاتیک آسیب دیده و نمونه‌های عصب سیاتیک نرمال: چاهک(M) شاخص اندازه مولکولی ۱۰۰ bp (غلظت ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر)، چاهک‌های پس از M به ترتیب نمونه‌های A، B، C، D، E گروه‌های نرمال، ۱ روز، ۳ روز، ۱ هفته، ۳ هفته و ۵ هفته نشان می‌دهد بیان این ژن در نمونه‌های عصب سیاتیک آسیب دیده افزایش یافته است.

ب) الکتروفورز نتایج RT-PCR ژن بتااکتین نمونه‌های مذکور: چاهک(M) شاخص اندازه ملکولی (base pair)bp ۵۰ (غلظت ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر)، چاهک‌های پس از M به ترتیب نمونه‌های A، B، C، D، E گروه‌های نرمال، ۱ روز، ۳ روز، ۱ هفته، ۳ هفته و ۵ هفته را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که میزان بیان ژن MT-1 در گروه‌های دچار آسیب در روزهای اول و سوم و هفته اول پس از آسیب نسبت به گروه نرمال افزایش داشته است.

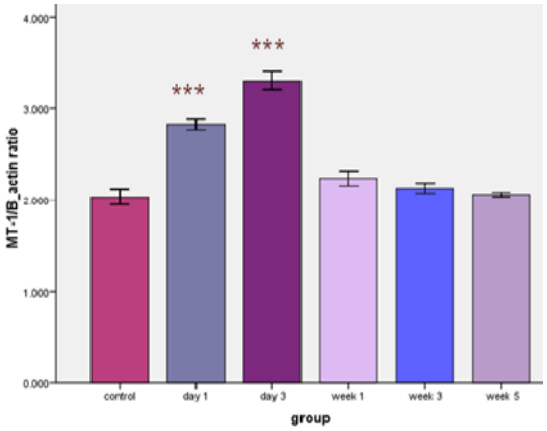


تصویر شماره ۲: الف) الکتروفورز نتایج RT-PCR ژن MT-2 نمونه‌های عصب سیاتیک آسیب دیده و نمونه‌های عصب سیاتیک نرمال: چاهک (M) شاخص اندازه مولکولیbp 100 (غلظت ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر)، چاهک‌های پس از M به ترتیب نمونه‌های A، B، C، D، Eگروه‌های نرمال، ۱ روز، ۳ روز، ۱ هفته، ۳ هفته و ۵ هفته نشان می‌دهد بیان این ژن در نمونه‌های عصب سیاتیک دچار آسیب شده افزایش یافته است.

ب) الکتروفورز نتایج RT-PCR ژن بتااکتین نمونه‌های مذکور: چاهک (M) شاخص اندازه ملکولی 50bp (غلظت ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر)، چاهک‌های پس از M به ترتیب نمونه‌هایA ، B، C، D، E گروه‌های نرمال، ۱ روز، ۳ روز، ۱ هفته، ۳ هفته و ۵ هفته را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که میزان بیان ژن MT-2 در گروه‌های دچار آسیب در روزهای اول و سوم و هفته اول پس از آسیب نسبت به گروه نرمال افزایش داشته است.

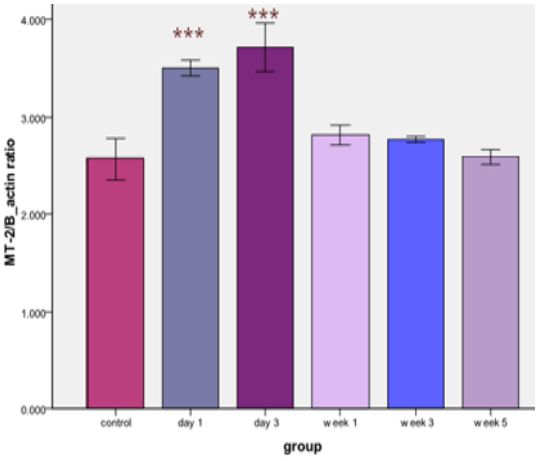
جدول شماره ۲: مقادیر میانگین ± خطای استاندارد مربوط به بیان ژن MT-1 و MT-2 در هر نمونه /بیان ژن بتا اکتین همان نمونه به تفکیک گروه ها

گروه	Mean(MT-1/B-actin)±SEM	Mean(MT-2/B-actin)±SEM
کنترل	۰/۰۴±۲/۰۳۵۶۷	۰/۱۱±۲/۵۶۵۲۸
روز اول	۰/۰۲±۲/۸۲۴۲۳	۰/۰۴±۳/۵۰۲۰۷۰
روز سوم	۰/۰۵±۲/۸۹۵/۳۰	۰/۱۲±۳/۷۱۴۴۶
هفته اول	۰/۰۳±۲/۱۳۲۶۱	۰/۰۵±۲/۸۲۱۴۲
هفته سوم	۰/۰۲±۲/۱۳۲۶۱	۰/۰۱±۲/۷۷۵۲۲
هفته پنجم	۰/۰۱±۲/۶۳۷۴	۰/۰۴±۲/۵۸۶۹۴



نمودار شماره ۱: بررسی کمی بیان ژن MT-1A در گروه های آزمایش. *** نشان دهنده معنی دار بودن گروه ها نسبت به گروه کنترل است ($p<0.0001$).

آنالیزهای آماری نشان می‌دهند بیان ژن MT-1A در روزهای اول و سوم پس از آسیب نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش داشته است. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش شده اند. نتایج به دست آمده از تحلیل آماری حاکی از این بود که بیان ژن MT-2 نیز در گروه های آسیب دیده در روز های اول و سوم پس از آسیب نسبت به گروه نرمال به طور معنی‌داری افزایش داشته است ($p <۰/۰۰۰۱$) (نمودار شماره ۲).

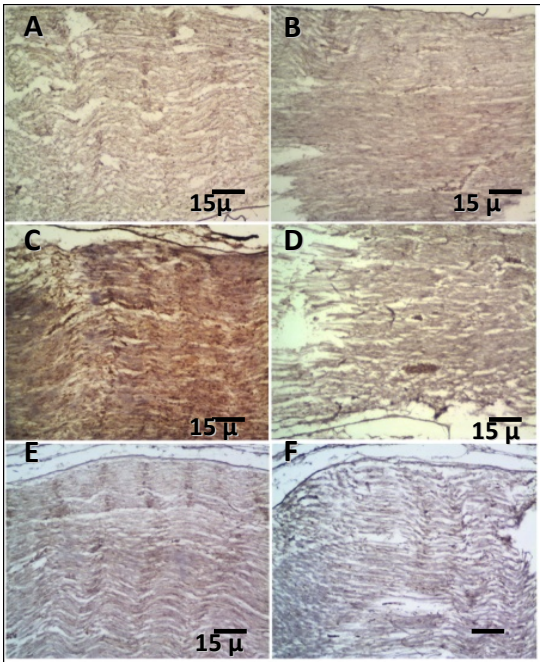


نمودار شماره ۲: بررسی کمی بیان ژن MT-2A در گروه های آزمایش. *** نشان دهنده معنی دار بودن گروه ها نسبت به گروه کنترل است ($p <۰/۰۰۰۱$).

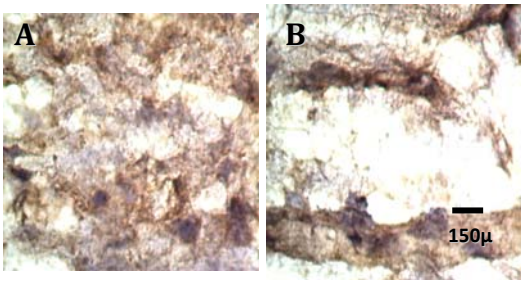
آنالیزهای آماری نشان می دهند بیان ژن MT-2A در روز های اول و سوم پس از آسیب نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش داشته است. داده ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش شده اند.

بیان پروتئین MT-1A

برش‌های طولی تهیه شده از عصب‌های سیاتیک نمونه‌های نرمال و ۱و ۳ روز و ۱، ۳ و ۵ هفته پس از ایجاد آسیب با آنتی‌بادی مونوکلونال MT-1 به روش ایمونو هیستوشیمی رنگ آمیزی شدند. برش طولی نمونه نرمال عصب (کنترل)، 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 (تصویر شماره ۳-A). مشابه مورفولوژیکی این الگو در یک روز بعداز آسیب نیز به چشم می‌خورد و عکس العمل ضعیفی به آنتی‌بادی را نشان می‌دهد (تصویر شماره ۳-B). سازمان دهی منظم فیبرهای عصبی از روز سوم پس از آسیب به صورت تصاعدی دچار بی‌نظمی شده است و عکس العمل ایمنی در روز سوم بسیار شدید است که نمایان گر بیان حداکثری در این مرحله می‌باشد (تصویر شماره ۳-C و تصویر شماره ۴-A و B). در هفته اول پس از آسیب بی‌نظمی فیبرهای عصبی به حداکثر می‌رسد و شدت بیان آنتی بادی کاهش دارد(تصویر شماره ۳-). در هفته سوم پس از آسیب نمای مورفولوژیکی عصب بازسازی شده و شدت واکنش به آنتی‌بادی MT-1 نیز کاهش می‌یابد (تصویر شماره ۳-E). در هفته پنجم فیبرهای عصبی به صورت موازی و در امتداد طولی عصب کنار یکدیگر به صورت منظم قرار می‌گیرند وبا 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 (تصویر شماره ۳-F)



تصویر شماره ۳: برش‌های طولی از نمونه‌های عصب سیاتیک (بزرگنمایی ۱۰۰ X). 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 قهوه ای نشان دهنده عکس العمل به آنتی بادی MT_1 و حضور پروتئین مورد نظر می باشد
رنگ قهوه ای نشان دهنده عکس العمل به آنتی بادی MT_1 و حضور پروتئین مورد نظر می باشد.



تصویر شماره ۴ : برش‌های طولی از نمونه‌های عصب سیاتیک (بزرگنمایی ۱۰۰۰ X). A و B) سه روز پس از آسیب
رنگ قهوه ای نشان دهنده عکس العمل به آنتی بادی MT-1 و حضور پروتئین مورد نظر می باشد.

بحث

پس از آسیب ناشی از تخریب بافت عصب محیطی، رادیکال‌های آزاد اکسیژن افزایش می‌یابند و آسیب بافتی ایجاد می‌کنند(۴، ۵). آنتی اکسیدان‌ها می‌توانند مستقیماً از طریق واکنش با رادیکال‌های آزاد یا غیر مستقیم با مهار فعالیت یا بیان آنزیم‌های تولیدکننده رادیکال آزاد و هم‌چنین افزایش فعالیت یا بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان درون سلولی، آسیب اکسیداتیو را کاهش دهند(۸).

نتایج مطالعه Lanza و همکاران نشان داد پس از آسیب عصب محیطی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در قطعه دیستال افزایش بیان دارند که این حالت به افزایش استرس اکسیداتیو در این ناحیه اشاره می‌کند(۳۸). در آسیب‌های عصب به دلیل وجود مقادیر زیاد لیپید در بافت عصبی غلظت مالون دی‌آلدئید (شاخص پراکسیداسیون لیپیدی) افزایش می‌یابد که در مدل له شدگی عصب سیاتیک در روز اول پس از آسیب غلظت آن بیش ترین افزایش را دارد و به تدریج تا پایان هفته اول به میزان نرمال بر می‌گردد(۴).

MT-1/2 پروتئین‌های آنتی‌اکسیدان قوی (potent) هستند و توسط استرس اکسیداتیو ایجاد می‌شوند(۱۴). گزارش شده است که متالوتیونین‌ها عملکرد مهمی در ترمیم عصب و در حفاظت علیه استرس اکسیداتیو در سیستم عصبی محیطی دارند(۲۹). نتایج تحقیق حاضر نشان داد میزان بیان ژن و پروتئین MT-1 و MT-2 در روز اول و سوم پس از آسیب نسبت به عصب نرمال به طور معنی‌داری ($p< ۰/۰۰۰۱$) افزایش نشان می‌دهد که این افزایش در روز سوم ماکزیمم مقدار را نشان می‌دهد و به تدریج تا پایان هفته پنجم به میزان نرمال بر می‌گردد لذا حضور این پروتیئن‌ها به عنوان تسریع‌کننده ترمیم عصب قابل توجه است. ایزوفورم‌های MT-1 و MT-2 به صورت بارزی مشابه هستند و همزمان با هم تنظیم می‌شوند و بنابراین اغلب به عنوان یک ایزوفرم واحد (MT-1/2) در نظر گرفته می‌شوند(۱۵، ۱۶) نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که میزان بیان این دو مولکول بسیار مشابه یکدیگر است.

اخیراً گزارش کرده‌اند که با اضافه کردن مستقیم MT-1/2 به نورون‌های آسیب دیده در محیط کشت،

جوانه زدن ترمیمی آکسون‌ها پس از آسیب افزایش می‌یابد(۱۶، ۳۰، ۳۱). در این آزمایشات هیچ سلول گلیال یا سلول سیستم ایمنی در محیط وجود نداشت و این نشان می‌دهد که MT-1/2 خارج سلولی می‌تواند مستقیماً روی نورون‌های آسیب دیده عمل نماید که در واقع خارج از سیتوپلاسم آستروسیت‌ها می‌باشد. Chung و همکاران نیز گزارش کردند تزریق MT-1/2 به داخل ویتره درست بلافاصله پس از قطع کامل عصب باعث ترمیم آکسونی تا ۱۰۰۰ میکرومتر بعد از محل برشمی شود(۱۵). هم‌چنین MT-1/2 خارج سلولی رشد عصبی و ترمیم آکسونی را در حالت in vivo به دنبال آسیب به مغز(۳۰) یا آسیب به عصب محیطی (سیاتیک) تسریع می‌بخشد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که MT-1/2 می‌تواند به عنوان یک تداخل دارویی برای تسریع ترمیم آکسونی باشد(۱۵). Stankovic و همکاران، موش‌هایی که ژن MT-1/2 آن‌ها خاموش شده بود را از نظر عملکرد نوروفیلامنت‌ها در عصب فرنیک بررسی کردند و مشاهده کردند که چگالی نوروفیلامنت‌ها در آکسون‌های این موش‌ها کاهش داشت و بیان کردند که این اثر به دلیل اثرات استرس اکسیداتیو روی نوروفیلامنت‌ها می‌باشد. این مشاهدات نشان می‌دهند که متالوتیونین‌ها می‌توانند در بیماری‌هایی شبیه amyotrophic lateral sclerosis (ALS) که در فازهای پایانی عصب فرنیک درگیر می‌شود و تنفس دچار اختلال می‌شود، استفاده گردد(۲۹). در یک مطالعه آسیب فوکال به نئوکورتکس وارد شد و بیان پروتئین‌های MT-1/2 به روش وسترن بلات در روزهای ۷ و ۱۴ پس از آسیب بررسی شد و مشاهده گردید که بیان این دو پروتئین مثبت بود(۱۵). نشان داده شده است که MT-1/2 خارج سلولی رشد عصبی و ترمیم آکسونی را در حالت کشت سلولی(۱۶، ۳۰، ۳۱) و در حالت in vivo به دنبال آسیب به مغز(۳۰) یا آسیب به عصب محیطی (سیاتیک)(۱۵) تسریع می‌بخشد.

Stankovic و همکاران در مطالعه خودگزارش کردند در PNS ، MT-1 و MT-2 در آکسون‌های ریشه قدامی طناب نخاعی شناسایی نمی‌شود اما در غلاف میلین احاطه کننده این آکسون‌ها یافت می‌گردد(۳۹). Stankovic در مطالعه دیگری گزارش داد آکسون‌های میلینه بزرگ در موش‌هایی که ژن‌های MT-1 و MT-2 آن‌ها خاموش شده بودند، آتروفی نشان می‌دهد(۲۴). Ceballosa و همکاران به منظور بررسی نقش فیزیولوژیک پروتئین‌های خانواده متالوتیونین در حین آسیب و ترمیم عصب محیطی، ژن‌های MT-1/2 و MT-3 موش‌ها را خاموش کردند و عصب سیاتیک راست موش‌ها را با فورسپس سه بار، هر بار به مدت ۳۰ ثانیه دچار له شدگی کردند. سپس فاصله ترمیم را با Pinch Test ۲ تا ۷ روز پس از آسیب و الکتروفیزیولوژی را ۱۴ روز پس از آسیب ارزیابی کردند. نتایج نشان دادند فاصله ترمیم درموش‌های (Knockout) mt3 KO از موش‌های MT-1/2 KO بیش‌تر بود و تعداد آکسون‌های ترمیم شده در سمت دیستال عصب در روز ۱۴ پس از آسیب در موش‌های MT3 KO نسبت به سایر گروه‌ها بیش‌تر بود. ترمیم بهبود یافته توسط پتانسیل‌های عمل مرکب عصب، ۱۴ روز پس از آسیب تنها در گروه موش‌های MT3 KO اثبات شد(۲۷).

Oki و همکاران آنالیز پروفایل پروتئین‌های اعصاب آسیب دیده در بیماران دارای CPRS-2 یا Complex syndrome(regional pain) را با استفاده از یافته‌های پروتئومیک انجام دادند و فقدان MT را در این بیماران گزارش کردند. در این بیماری اعصاب مرکزی و محیطی دچار التهاب می‌شود و از آن‌جا که ROS یکی از محرک‌های مهم افزایش بیان MT می‌باشد، پیشنهاد می‌شود که فقدان MT ممکن است حفاظت و ترمیم عصب آسیب دیده را از بین برده و به پیشرفت بیماری منجر گردد. در نتیجه MT ها می‌توانند در حفظ PNS از آسیب و در ترمیم PNS پس از آسیب مهم باشند(۱۷). Hashimoto و همکاران در مطالعه خودآسیب طناب

نخاعی (SCI) در موش‌ها ایجاد کردند و ۱، ۳و۷ روز پس از آسیب طناب نخاعی خارج شد و real time PCR و میکرواری انجام شد و MT-1 و MT-2 در هر دو این آزمایشات در روز اول افزایش بیان داشتند. البته MT-2 در روز سوم هم افزایش بیان داشت و از آنجا که بیان MT-2 در اسکار فیبروبلاستی نقش حفاظتی برای آکسون‌های آسیب دیده بازی می‌کند و MT-1 نیز نقش حفاظتی علیه استرس اکسیداتیو و آپوپتوتیک ایفا می‌کند، در نتیجه افزایش بیان این دو ژن در نورون‌های طناب نخاعی این نورون‌ها را از آسیب اکسیداتیو حفظ می‌کند(۴۰).

Chung و همکاران نشان دادند که بیان MT، چهار روز پس از آسیب کورتیکال که زمان شروع جوانه زدن ترمیمی است، افزایش می‌یابد(۳۲). افزایش آهن (Fe)در حیوانات تحت آزمایش، استرس اکسیداتیو ایجاد می‌کند. Yasutake و همکاران در مطالعه‌ای رت‌های نژاد ویستار را ۲۱ روز با رژیم ۲/۵ درصد FeII و فومارات تغذیه کردند. نتایج حاکی از آن بود که سطح MT در روز ۳ در پلاسما ماکزیمم مقدار را نشان داد(۱۸).

بر اساس نتایج Hashimoto و همکاران و نتایج Chung و همکاران و نتایج Yasutake و همکاران(۱۸، ۳۲، ۴۰) و در نهایت نتایج تحقیق حاضر می‌توان نتیجه گرفت ظاهراً بیان MT-1/2 در CNS و PNS متعاقب آسیب یکسان است و این دو مولکول در مراحل ابتدایی دژنراسیون والریان یعنی در فاصله روزهای اول تا چهارم پس از آسیب، زمانی که استرس اکسیداتیو ایجاد شده بیش‌ترین peak را دارد، بیان می‌شوند تا با این استرس مقابله کنند.

به طور کلی و با توجه به نتایج حاصل از این بررسی، افزایش بیان ژن و پروتئین متالوتیونین می تواند به دلیل ایجاد استرس اکسیداتیو ناشی از آسیب له شدگی عصب سیاتیک باشد. در نهایت نتایج تحقیق حاضر به یک یافته متدولوژیک اشاره می کند که می تواند در افزایش دانش ما از مکانیسم های 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 مولکول های آنتی اکسیدان سودمند واقع گردد.

References

1. Yu WH, Lukiw LW, Bergeron C, Niznik HB, Fraser PE, Metallothionein III is reduced in Alzheimer's disease. Brain Res 2001; 894(1): 37-45.
2. 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.
3. Senoglu M, Nacitarhan V, Kurutas EB, Senoglu N, Altun I, Atli Y, Ozbag D. Intraperitoneal Alpha-Lipoic Acid to prevent neural damage after crush injury to the rat sciatic nerve. J Brachial Plex Peripher Nerve Inj 2009; 4: 22.
4. Bagdatoglu C, Saray A, Surucu HS, Ozturk H, Tamer L. Effect of trapidil in ischemia/ reperfusion injury of peripheral nerves. Neurosurgery 2002; 51(1): 212-20.
5. 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): 221-227.
6. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol 2007; 39(1): 44-84.
7. Halliwell B and Gutteridge JMC, Free

Radicals in Biology and Medicine 3rd edition. Oxford: Oxford Science; 1998.

8. LÃ 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): 840-860.
9. Shokouhi G, Hadidchi S, Ghorbanihaghjo A, Rahbani-Noubar M, Panahi S, Forouzanfar M, et al. Neuroprotective Effect Of Ascorbic Acid In Experimental Blunt Sciatic Nerve Injury In Rats. The Internet Journal of Nutrition and Wellness 2005; 1(2).
10. Zhu YJ, Zeng T, Zhu YB, Yu SF, Wang QS, Zhang LP, Guo X, Xie KQ. Effects of Acrylamide on the Nervous Tissue Antioxidant System and Sciatic Nerve Electrophysiology in the Rat. Neurochem Res 2008; 33(11): 2310-2317.
11. Mate´s JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. Clin Biochem 1999; 32(8): 595-603.
12. Urban T, Hurbain I, Urban M, Clément A, Housset B. Oxidants and antioxidants. Biological effects and therapeutic perspectives. Ann Chir 1995; 49(5): 427-434.
13. Santos CR, Martinho A, Quintela T, Gonçalves I. Neuroprotective and Neuroregenerative Properties of Metallothioneins. IUBMB Life 2012; 64(2): 126-135.
14. Hidalgo J. Metallothioneins and Brain Injury: What Transgenic Mice Tell Us. Environ Health Prev Med 2004; 9(3): 87-94.
15. Chung RS, Penkowa M, Dittmann J, King CE, Bartlett C, Asmussen JW, et al. Redefining the role of metallothionein within the injured brain: extracellular metallothioneins play an important role in the astrocyte-neuron response to injury. J Biol Chem 2008; 283(22): 15349-1558.
16. Fitzgerald M, Nairn P, Bartlett CA, Chung RS, West AK, Beazley LD. Metallothionein-IIA promotes neurite growth via the megalin receptor. Exp Brain Res 2007; 183(2): 171-180.
17. Oki G, Wada T, Iba K, Aiki H, Sasaki K, Imai S, et al. Metallothionein deficiency in the injured peripheral nerves of complex regional pain syndrome as revealed by proteomics. PAIN 2012; 153(3): 532-539.
18. Yasutake A, Hirayama K. Effects of iron overload on hepatic and renal metallothionein levels in rats. Journal of Health Science 2004; 50(4): 327-378.
19. Hidalgo J, Aschner M, Zatta P, Vasák M. Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system. Brain Res Bull 2001; 55(2): 133-1345.
20. Ebadi M, Sharma S. Metallothioneins 1 and 2 attenuate peroxynitrite-induced oxidative stress in Parkinson disease. Exp Biol Med 2006; 231(9): 1576-1583.
21. Eibl JK, Abdallah Z, Ross GM. Zinc-metallothionein: a potential mediator of antioxidant defence mechanisms in response to dopamine-induced stress. Can J Physiol Pharmacol 2010; 88(3): 305-312.
22. Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM, The role of inflammation in CNS injury and disease. Br J Pharmacol 2006; 147(sup 1): 232-240.
23. Kumari MV, Hiramatsu M, Ebadi M. Free radical scavenging actions of metallothionein isoforms I and II. Free Rad Res 1998; 29(2): 93-101.
24. Stankovic RK, Atrophy of Large Myelinated Axons in Metallothionein-I, II Knockout Mice. Cell Mol Neurobiol 2005; 25(5): 943-953.
25. Ding HO, et al. Oxidative stress and metallothionein expression in the liver of rats

with severe thermal injury. Burns 2002; 28(3): 215-221.

26. Haq F, Mahoney M, Koropatnic kJ. Signaling events for metallothionein induction. Mutat Res 2003; 533(1-2): 211-226.
27. Ceballos D, Lago N, Verdú E, Penkowa M, Carrasco J, Navarro X, et al. Role of metallothioneins in peripheral nerve function and regeneration. Cell Mol Life Sci 2003; 60(6): 1209-1216.
28. Penkowa M, Hidalgo J. Treatment with metallothionein prevents demyelination and axonal damage and increases oligodendrocyte precursors and tissue repair during experimental autoimmune encephalomyelitis. J Neurosci Res 2003; 72: (5): 574-586.
29. Stankovic RK, Li Z. Decreased neurofilament density in large myelinated axons of metallothionein-I, II knockout mice. Neurosci Lett 2006; 402(1-2): 1-6.
30. Chung RS, Vickers MI, JC, Chuah West AK. Metallothionein-IIA promotes initial neurite elongation and postinjury reactive neurite growth and facilitates healing after focal cortical brain injury. J Neurosci 2003; 23(8): 3336-3342.
31. Kohler LB, Berezin V, Bock E, Penkowa M. The role of metallothionein II in neuronal differentiation and survival. Brain Res 2003; 992(1): 128-136.
32. Chung RS, West AK. A role for extracellular metallothioneins in CNS injury and repair. Neuroscience 2004; 123(3): 595-599.
33. Penkowa M, Carrasco J, Giralt M, Molinero A, Hernandes J, Campbell IL, et al. Altered central nervous system cytokine-growth factor expression profiles and angiogenesis in metallothionein-I+II deficient mice. J Cerebr Blood F Met 2000; 20: 1174-189.
34. Penkowa M, Espejo C, Martínez-Cáceres EM, Montalban X, Hidalgo J. Increased demyelination and axonal damage in metallothionein I+II-deficient mice during experimental autoimmune encephalomyelitis. Cell Mol Life Sci 2003; 60(1): 185-197.
35. Penkowa M, Camats J, Giralt M, Molinero A, Hernández J, Carrasco J, et al. Metallothionein-I overexpression alters brain inflammation and stimulates brain repair in transgenic mice with astrocyte-targeted interleukin-6 expression. Glia 2003; 42(3): 287-306.
36. van Lookeren Campagne M, Thibodeaux H, van Bruggen N, Cairns B, Gerlai R, Palmer JT, et al. Evidence for a protective role of metallothionein-1 in focal cerebral ischemia. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96(22): 12870-12875.
37. Chung RS, Fung SJ, Leung YK, Walker AK, McCormack GH, Chuah MI, et al. Metallothionein expression by NG2 glial cells following CNS injury. Cell Mol Life Sci 2007; 64(19-20): 2716-2722.
38. Lanza C, et al. Expression of Antioxidant Molecules After Peripheral Nerve Injury and Regeneration. J Neurosci Res 2012; 90(4): 842-848.
39. Stankovic RK, Lee V, Kekic M, Harper C. The expression and significance of metallothioneins inmurine organs and tissues following mercury vapour exposure. Toxicol Pathol 2003; 31(5): 514-523.
40. Hashimoto M, Koda M, Ino H, Yoshinaga K, Murata A, Yamazaki M, et al. Gene expression profiling of cathepsin D, metallothioneins-1 and -2, osteopontin, and tenascin-C in a mouse spinal cord injury model by cDNA microarray analysis. Acta Neuropathol 2005; 109: 165-180.