

اثر امواج اولتراسوند تشخیصی بر سلول های پورکینز مخچه در مدل موش صحرایی الکلیک

هیوا محمدی بلبان آباد^۱، محمد رضا کفاشیان^{۲*}، محمد جعفر رضایی^۳، اردشیر معیری^۱، ایوب رستم زاده^۳

(۱) گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران

(۲) گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران

(۳) گروه آناتومی و علوم اعصاب، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۱/۱۶

تاریخ پذیرش: ۹۴/۴/۱

چکیده

مقدمه: سونوگرافی یک روش تصویربرداری پزشکی است که برای ارزیابی و بررسی بافت های عمقی بدن مانند طحال، کبد، عضلات، تاندون ها، عروق خونی و ضایعات آن ها پی ریزی شده که در حاملگی نیز کاربرد دارد. سلول های پورکینز مخچه بزرگ ترین سلول های سیستم عصبی هستند که در طی مراحل رشد و تمایز حساسیت بسیار بالایی به عوامل مختلفی از جمله عوامل محیطی، شیمیایی و ژنتیکی دارند. الکل یکی از متداول ترین و اثرگذارترین توکسین ها است که بر این سلول ها تاثیر منفی داشته و باعث کاهش تعداد آن ها می شود. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر امواج اولتراسوند تشخیصی، بر روی تعداد سلول های پورکینز در مخچه حیوان رت الکلیک می باشد.

مواد و روش ها: تعداد ۶ رت ماده نژاد ویستار جهت جفت گیری انتخاب شده و بعد از زایمان، نوزاد آن ها به طور تصادفی به ۶ گروه شامل یک گروه کنترل و پنج گروه آزمایش تقسیم شدند که شامل گروه الکی، دو گروه سونوگرافی با فرکانس ۳ و ۵ مگاهرتز و دو گروه الکل+سونوگرافی با فرکانس متفاوت بودند. پس از کشتن حیوانات و تهیه مقاطع بافتی، با استفاده از نرم افزار موتیک سلول های پورکینز مخچه شمارش شدند. آنالیزهای آماری با استفاده از تست Tukey و محاسبه آنالیز واریانس ANOVA انجام شد.

یافته های پژوهش: نتایج نشان داد که الکل به صورت معنی دار باعث کاهش تعداد سلول های پورکینز می شود و امواج اولتراسوند تشخیصی از این کاهش به صورت معنی دار جلوگیری به عمل می آورد.

بحث و نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد که امواج اولتراسوند می تواند به عنوان یک روش غیر تهاجمی، کاهش به وجود آمده در تعداد سلول های پورکینز مخچه ناشی از الکل را جبران کند.

واژه های کلیدی: الکلیک، سلول های پورکینز، امواج اولتراسوند تشخیصی

*نویسنده مسئول: گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران

Email: m_r_kaffashian@yahoo.com

مقدمه

از دیدگاه رویان شناختی و تکاملی، مخچه یکی از مهم ترین نواحی سیستم عصبی از لحاظ رشد و تمایز در دوران زندگی دخل رحمی و بعد از تولد است که نقش حیاتی در زمان بندی فعالیت های حرکتی، کنترل واکنش های متقابل لحظه ای بین عضلات آگونیست و آنتاگونیست، برخی از اشکال یادگیری حرکتی و هم چنین وظایف شناختی دخیل در انجام حرکات پی در پی دارد (۱،۲). اگر چه ساختار مخچه به هنگام تولد کامل است، اما درجه ای از انعطاف پذیری (پلاستیسیتی) شامل فرآیند تشکیل آکسونی، ارتباط سیناپسی، تولید نورون جدید و تمایز، بعد از تولد نیز ادامه دارد (۳). مطالعات نشان می دهد که اکثر نورون ها در اواسط دوره بارداری ساخته شده و پس از تولد تمایز اصلی خود را به سلول های عملکردی ادامه می دهند (۴).

مخچه به تنهایی بیش از نیمی از نورون های مغز را شامل می شود که این نورون ها به صورت یک مدار واحد عمل می کنند. در مرکز این مدار، نورون های پورکینز با شاخه های دندریتی گسترده قرار دارند که ورودی های خود را از رشته های بالارونده و موازی و هم چنین برخی سلول های بینابینی دریافت می کنند و خروجی اصلی و ارتباط بین قشر مخچه و سلول های هسته های عمقی مخچه می باشند. اختلال در عملکرد این نورون ها موجب ناهنجاری های حرکتی مانند آتاکسی می گردد (۲،۵،۶). سلول های پورکینز بزرگ ترین سلول های سیستم عصبی و هم چنین مخچه هستند که در طی مراحل رشد و تمایز خود حساسیت بسیار بالایی به عوامل مختلفی از جمله عوامل ژنتیکی، محیطی و شیمیایی دارند. الکل یکی از رایج ترین و اثرگذارترین این عوامل است (۷). گزارشات اولیه مبنی بر اثر تراژونیک الکل در سال ۱۹۶۸ و ۱۹۷۲ صورت پذیرفت که حاکی از اختلالاتی مانند عقب ماندگی ذهنی، کاهش وزن هنگام تولد، و تاخیر رشد در فرزندان مادران الکلی بود (۸). در سال ۱۹۷۲، Jones و همکاران گزارش کردند که فرزندان مادران الکلی دارای الگوی خاصی از اختلالات از جمله ناهنجاری های مغزی مانند میکروسفالی، اسپینال بیفیدا و

منگومیلوسل، نارسایی های قلبی-عروقی و ناهنجاری های تکاملی اندام مانند فوکوملیا هستند (۹). امروزه به این مجموعه از ناهنجاری های نورولوژیکی و مورفولوژیکی سندرم الکلی جنینی (FAS) می گویند (۱۰). مطالعه بر روی حیوانات آزمایشگاهی نشان می دهد که مصرف حاد الکل باعث آپوپتوز سلول های عصبی و تاخیر در رشد مغز می شود (۱۱). در این راستا Hamre و همکاران در سال ۱۹۹۳ گزارش کردند که مصرف الکل به مدت دو روز متوالی از روز هفتم بعد از تولد، باعث کاهش ویژگی های عملکردی سلول های پورکینز در ناحیه ورمیس مخچه می شود (۱۲). هم چنین Bedi و همکاران در سال ۱۹۹۵ گزارش کردند تزریق الکل در روز پنجم بعد از تولد می تواند باعث کاهش تعداد سلول های پورکینز شود (۱۳). مطالعه بر روی امواج اولتراسوند به عنوان یک روش درمانی در سال های اخیر به طور قابل ملاحظه ای افزایش یافته است. سونوگرافی تکنیکی است که در آن از امواج صوتی بافرکانس بالا و خارج از محدوده شنوایی انسان جهت تصویربرداری از اعضای داخل بدن استفاده می شود. اولتراسوند با شدت پایین و با فرکانس ۳ تا ۷ مگاهرتز کاربرد قابل توجهی در درمان بیماری های مختلف از طریق اثرات گرمایی و غیرگرمایی و هم چنین افزایش میزان پاسخ فیزیولوژیک ناحیه آسیب دیده دارد (۱۴). این امواج باعث افزایش نفوذ داروها به ناحیه هدف شده که به آن سونوفورز (Sonophoresis) می گویند (۱۵). اولتراسوند هم چنین دارای اثر سونوپوریشن (Sonoporation) است که باعث تغییرات ساختاری در غشای سلولی شده که در نتیجه آن مولکول های با وزن مولکولی پایین و بالا می توانند وارد سلول شوند. از دیگر کاربردهای اولتراسوند انتقال ژن به داخل بافت ها و ارگان های آسیب دیده است که در آن میزان بیان ژن نیز به طور قابل توجهی افزایش می یابد (۱۶). افزایش سرعت ترمیم استخوان و کاهش حجم ناحیه آسیب دیده نیز هنگام استفاده از اولتراسوند با شدت پایین مشاهده شده است که آن را به اثرات غیرگرمایی اولتراسوند نسبت می دهند (۱۷). بهبود نواحی کال استخوانی در شکستگی ها مورد

گروه III: رت هایی که در روزهای ۱۰، ۱۱ و ۱۲ بعد از تولد به مدت ۵ دقیقه در معرض اولتراسوند با فرکانس ۳ MHz قرار گرفتند.

گروه IV: رت هایی که در روز ۱۰ بعد از تولد ۵ g/kg الکل به صورت داخل صفاقی تزریق شد و در روزهای ۱۰، ۱۱ و ۱۲ بعد از تولد به مدت ۵ دقیقه در معرض اولتراسوند با فرکانس ۳ MHz قرار گرفتند.

گروه V: رت هایی که در روزهای ۱۰، ۱۱ و ۱۲ بعد از تولد در معرض اولتراسوند با فرکانس ۵ MHz قرار گرفتند.

گروه VI: رت هایی که در روز ۱۰ بعد از تولد ۵ g/kg الکل به صورت داخل صفاقی تزریق شد و در روزهای ۱۰، ۱۱ و ۱۲ بعد از تولد به مدت ۵ دقیقه در معرض اولتراسوند با فرکانس ۵ MHz قرار گرفتند.

الکل مطلق به صورت ۲۰ درصد با استفاده از نرمال سالین رقیق و به صورت داخل صفاقی تزریق گردید و شدت امواج اولتراسوند 65 W/cm^2 بود. در پایان روز ۱۳ بعد از تولد، حیوانات با دوز مناسب اتر، بی هوش شده و مخچه آن ها جدا گردید. جهت جلوگیری از اتولیز بافت ها و پایدار شدن هر چه بیشتر آن ها در حالت طبیعی و فیکس شدن برای مطالعات هیستوپاتولوژیکی، نمونه ها در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شده و طبق روش های معمول بافت شناسی مورد آماده سازی بافتی قرار گرفت. جهت بررسی و شمارش سلول های پورکینز، برش های ۶ میکرونی سریالی در جهت سائیتال از ناحیه ورمیس مخچه تهیه شد به طوری که بین مقاطع تنها برش هایی که نزدیک خط وسط ورمیس بودند و در آن ها هسته های مخچه قابل رویت نبودند، انتخاب و مورد رنگ آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین (H&E) قرار گرفتند. تصاویر با استفاده از میکروسکوپ نوری گرفته شد و با استفاده از نرم افزار موتیک شمارش سلولی انجام شد. جهت آنالیزهای آماری از تست Tukey، و محاسبه آنالیز واریانس ANOVA استفاده گردید.

یافته های پژوهش

بررسی مقاطع بافتی مخچه از طریق

استفاده قرار می گیرد (۱۸). اولتراسوند به مدت ۳۰ دقیقه و با فرکانس ۱ MHz باعث افزایش رشد سلول های اندوتلیال و افزایش آنژیوژنس شده است (۱۹). مطالعات انجام شده بر سیستم عصبی مرکزی و محیطی نشان داده که انرژی امواج اولتراسوند فاکتور ارزشمندی در ایجاد تغییرات غیرتهاجمی در بافت های سلولی و بیماری های عصبی هم چون پارکینسون است (۲۰). به نظر می رسد اولتراسوند با ایجاد ویراسیون و اثر بر ویسکوزیته مایعات خارج سلولی باعث تغییر در خصوصیات رفتاری سلول ها شود (۲۱). با توجه به اثرات امواج اولتراسوند و اهمیت پاتوفیزیولوژیکی الکل و هم چنین نقش مهم سلول های پورکینز در حفظ ارتباطات عصبی طبیعی موجود زنده، هدف مطالعه حاضر بررسی اثرات امواج اولتراسوند تشخیصی بر سلول های پورکینز مخچه در نوزاد موش صحرائی الکلیک بود.

مواد و روش ها

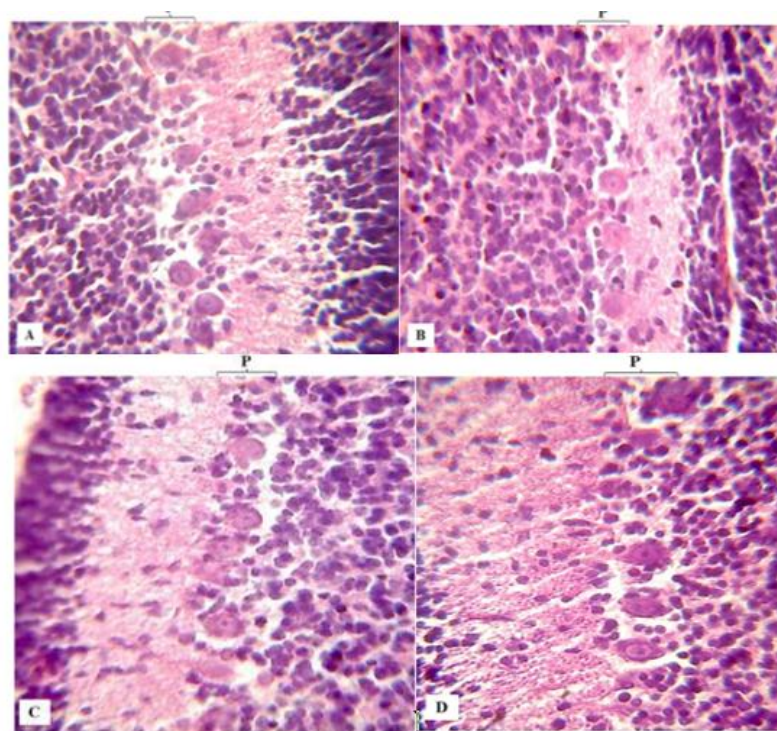
این مطالعه بر روی رت نژاد ویستار با سن ۶ تا ۸ هفته و وزن $200 \pm 53 \text{ gr}$ انجام گرفت که از انستیتوی پاستور تهیه گردید و ابتدا به مدت یک هفته در شرایط استاندارد حیوان خانه شامل حرارت ۲۳ تا ۲۵ درجه سانتی گراد، رطوبت ۵۰ تا ۵۵ درصد و سیکل نوری ۱۲ ساعته در داخل قفس های جداگانه قرار گرفتند. سپس تعداد ۶ سر موش ماده و ۳ سر موش نر را به صورت (۲ موش ماده و ۱ موش نر) جداگانه جهت جفت گیری شبانه در قفس های جفت گیری قرار داده و بعد از مشاهده پلاک واژینال، موش ها را از هم جدا نموده و در شرایط یکسان نگهداری شدند. بعد از زایمان نوزاد موش ها به ۶ گروه ($n=6$) تقسیم شدند که شامل:

گروه I: گروه کنترل که در روز ۱۰ بعد از تولد مقدار ۵ g/kg نرمال سالین به صورت داخل صفاقی به آن ها تزریق شد.

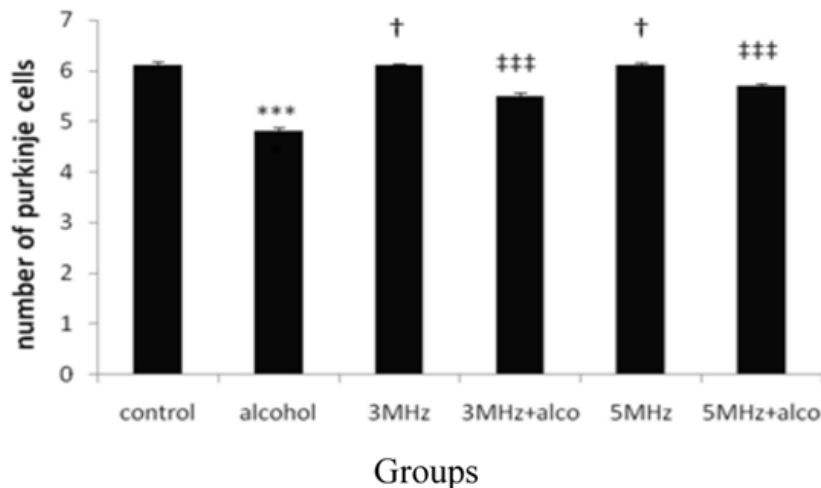
گروه II: گروه الکلیک که در روز ۱۰ بعد از تولد ۵ g/kg الکل به صورت داخل صفاقی به آن ها تزریق شد.

۱ C). در گروه سونوگرافی با فرکانس 3 MHz تعداد سلول ها به $6/12 \pm 0/40$ سلول و در گروه سونوگرافی 5 MHz به $6/15 \pm 0/49$ سلول افزایش یافت ($P < 0.05$). در استفاده هم زمان امواج اولتراسوند و الکل، امواج اولتراسوند کاهش سلولی ناشی از الکل را جبران کرد که این افزایش نیز وابسته به فرکانس امواج بود به طوری که تعداد سلول ها از $4/81 \pm 0/67$ سلول در گروه الکی به $5/50 \pm 0/5$ در گروه الکل+ سونوگرافی 3 MHz و $5/70 \pm 0/45$ سلول در گروه الکل+ سونوگرافی 5 MHz افزایش یافت ($P < 0.05$) (نمودار شماره ۱) (شکل شماره ۱ D).

میکروسکوپ نوری و نرم افزار موتیک نشان داد که مصرف الکل باعث کاهش تعداد سلول های پورکینژ در گروه الکی نسبت به گروه کنترل شد (شکل شماره ۱ B). تعداد سلول ها در گروه کنترل برابر $0/81 \pm 5/80$ بود اما در گروه الکی تعداد این سلول ها به $4/8 \pm 0/67$ کاهش یافت که این کاهش از نظر آماری معنی دار بود ($P < 0.05$) (نمودار شماره ۱). سونوگرافی تشفیصی تعداد سلول های پورکینژ را نسبت به گروه کنترل به صورت معنی دار افزایش داد که این افزایش وابسته به فرکانس امواج بود به گونه ای که با افزایش فرکانس امواج تعداد سلول ها بیشتر شد (شکل شماره



شکل شماره ۱. تصویر میکروسکوپی مخچه با رنگ آمیزی H&E در گروه های مختلف. A: گروه کنترل، B: گروه الکی، C: گروه سونوگرافی 5 MHz، D: گروه الکل+ سونوگرافی 5 MHz (بزرگ نمایی $\times 400$)



نمودار شماره ۱. مقایسه میانگین سلول های پورکینژ بین گروه های کنترل، الکلی، اولتراسوند ۳ MHz، اولتراسوند ۳ MHz همراه با الکلی، اولتراسوند ۵ MHz و اولتراسوند ۵ MHz همراه با الکلی (n=6)، *** مقایسه بین گروه های الکلی و کنترل، † مقایسه بین گروه های اولتراسوند و گروه کنترل (P<0.05)، ††† مقایسه بین گروه های اولتراسوند+الکلی و گروه الکلی (P<0.001).

بحث و نتیجه گیری

الکلی، مغز مصرف استات را به عنوان منبع انرژی جایگزین گلوکز می کند (۲۶) و استالیدی انباشته شده اثرات سمی خود را با واکنش بر عملکرد میتوکندری اعمال می کند، از آن جایی که میتوکندری نقش حیاتی در متابولیسم الکلی و پروتئین هایی مانند سیستمین دارد تخریب میتوکندری ها منجر به پراکسیداسیون لیپید، اکسیداسیون اسید نوکلئیک و تخریب فسفولیپید غشای سلولی می گردد (۲۳، ۲۷، ۲۸). هم چنین شواهد نشان دهنده نقش الکلی در مرگ برنامه ریزی شده سلول ها (آپوپتوز) می باشد (۲۳).

Ming و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش کردند که الکلی با اثر بر روی گیرنده های مهاری GABA باعث کاهش تعداد سلول های پورکینژ می شود (۲۹). Walker و همکاران نیز نشان دادند که مصرف الکلی به میزان ۱۰-۶ gr/kg در روزهای ۴ و ۵ بعد از تولد موش، سلول های پورکینژ را به میزان ۲۵ درصد و در روزهای ۸ و ۹ به میزان ۱۵ درصد کاهش می دهد (۳۰) در تحقیق حاضر نیز کاهش ۲۰/۸ درصد تعداد سلول های پورکینژ در اثر مصرف الکلی مشاهده گردید. سونوترایی برای کاهش درد و ترمیم بافت های مختلف و به طور عمده در سیستم عضلانی-عصبی

مطالعه حاضر نشان داد که مصرف الکلی باعث کاهش سلول های پورکینژ مخچه در نوزادان حیوان رت می شود. در همین راستا مطالعات نشان می دهد که الکلی با تاثیر بر سطح آنتی اکسیدان ها و افزایش رادیکال های آزاد در جنین در حال تکامل باعث آسیب به DNA سلول های در حال تقسیم عصبی شده و موجب تغییر پروتئین های آپوپتوتیک مانند BAX و Bcl2 می گردد که نهایتاً از طریق فعال سازی مسیر آپوپتوز موجب مرگ سلولی و کاهش حجم مغز می شود (۲۲). هم چنین استالیدی ناشی از مصرف الکلی با آمین های بیوزنیک مانند هیستامین و سروتونین واکنش داده و به صورت ترکیبات کربولین و ایزوکوئینولین در آمده که با جایگزینی نوروترانسمیترهای عصبی باعث اختلال در پیام رسانی و عملکرد سیستم عصبی می شود (۲۳). آسیب ایجاد شده در سیستم عصبی به فاکتورهای مختلفی از جمله دوز، مدت زمان و نحوه تجویز الکلی و هم چنین ژنوم حیوان بستگی دارد (۲۴).

اتانول می تواند با اختلال در عملکرد پروتئین ها و لیپیدهای غشای سلولی باعث آسیب های نورونی شود (۲۵). به نظر می رسد پس از مصرف طولانی مدت

مورد استفاده قرار می گیرد (۳۱). Karnes و همکاران در سال ۲۰۰۲ گزارش کردند که امواج اولتراسوند در عضلات آسیب دیده روند ترمیم را تسریع می کند (۳۲). هم چنین پژوهشگران نشان داده اند که امواج اولتراسوند باعث کاهش تعداد سلول های التهابی در عضله می گردد (۳۳). امواج اولتراسوند با اثر بر روی الیاف کلاژن و تسریع بازآرایی مجدد آن ها و هم چنین افزایش انعطاف پذیری فیلامان های عضلانی و کاهش اسپاسم عضله منجر به ترمیم عضله شده است (۳۴). این امواج قادرند که از طریق مکانیسم حفره سازی (cavitation) در مایعات بدن باعث ترمیم بافت های نرم شود (۳۱). هم چنین گزارشاتی در ارتباط با اثر سونوتراپی در بهبود استحکام کششی، افزایش بار (Load) و الاستیسیته، افزایش سرعت رشد عضلات و هم چنین افزایش سنتز استئوبلاست ها و ترمیم صدمات استخوانی در حیوانات موجود می باشد (۳۴). Hu و همکاران در سال ۲۰۱۲ گزارش کردند که تابش امواج اولتراسوند با شدت ۱ مگاهرتز به مدت ۱۰ دقیقه در *in vitro* موجب تغییر خصوصیات مورفولوژیکی عصب مانند انقباض زوائد نورونی و مچاله شدن و جا به جایی جسم سلولی گردد. مکانیسم بالقوه انقباض زوائد نورونی می تواند ناشی از بهم ریختگی تعادل نیروهای دخیل در مهاجرت جسم سلول باشد. اثرات زیستی مفیدی مخرب امواج اولتراسوند به طور کلی به مدت زمان تابش و شدت پالس اعمال شده باز می گردد (۳۵). امواج اولتراسوند هم چنین توانسته است باعث تحریک رشد نورو و طویل شدن زوائد نورونی در طی تکامل سلول های عصبی شود (۳۶). مکانیسم بیوفیزیکی مسئول در القای تغییرات مورفولوژیکی توسط

اولتراسوند مشخص نشده است اما می تواند ناشی از اثر این امواج بر روی کانال های یونی در غشاء سلول باشد در این راستا Ca^{2+} به عنوان مهم ترین یون پیام رسان در فرآیند داخل سلولی نقش حیاتی را در رفتار سلول و بقاء آن ایفا می کند (۳۷). در مطالعه دیگری نیز که در همین گروه انجام شد (داده ها منتشر نشده است) مشخص گردید که امواج اولتراسوند تشفیعی قادر به افزایش کلسیم داخل سلولی در سلول های هیپوکامپ می باشند. امواج صوتی هنگام برخورد با بافت کاملاً برگشت داده نمی شود بلکه مقداری از آن جذب بافت شده و گرمای بافتی ایجاد می کند مطالعات نشان می دهند که اولتراسوند در سطح مولکولی از طریق شوک گرمایی و تحریک و تولید پروتئین $Hsp70$ ، همراه با افزایش تولید پروتئین $FGF-\beta$ باعث مهار پیشرفت آتروفی عضلانی می شود (۳۸). به طور کلی در مطالعه حاضر نشان داده شد که امواج اولتراسوند باعث افزایش تعداد سلول های پورکنژ مخچه در موش های الکلیک می شود. از آن جایی که اولتراسوند به طور روتین در بیمارستان ها و درمانگاه ها به کار گرفته می شود احتمالاً می تواند راهکار مناسبی برای درمان اختلالات عصبی و مخچه ای باشد. بنا بر این پیشنهاد می شود که مطالعات بیشتری در راستای تشخیص مکانیسم اثرات این امواج در سطح سلولی مولکولی انجام شود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی ایلام، به خاطر حمایت های مالی و فراهم نمودن شرایط انجام این طرح قدردانی می شود.

References

1. Bauermoffett C, Altman J. Ethanol-induced reductions in cerebellar growth of infant rats. *Exp Neurol* 1975; 48:378-82.
2. Edgerton JR, Reinhart PH. Distinct contributions of small and large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels to rat Purkinje neuron function. *J Physiol* 2003; 548: 53-69
3. Cayre M, Canoll P, Goldman JE. Cell migration in the normal and pathological postnatal mammalian brain. *Prog Neurobiol* 2009; 88: 41-63.
4. Levitt P. Prenatal effects of drugs of abuse on brain development. *Drug Alcohol Depend* 1998; 51: 109-25.
5. Higley MJ, Sabatini BL. Calcium signaling in dendrites and spines: practical and functional considerations. *Neuron* 2008; 59: 902-13.
6. Kano M, Schneggenburger R, Verkhratsky A, Konnerth A. Depolarization-induced calcium signals in the somata of cerebellar Purkinje neurons. *Neurosci Res* 1995; 24: 87-95.
7. Fonnum F, Lock E. Cerebellum as a target for toxic substances. *Toxicology letters* 2000; 112: 9-16.
8. Ulleland CN. The offspring of alcoholic mothers. *Ann NY Acad Sci* 1972; 197: 167-9.
9. Jones K, Smith D. Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet* 1973; 302: 999-1001.
10. Driscoll CD, Streissguth AP, Riley EP. Prenatal alcohol exposure: comparability of effects in humans and animal models. *Neurotoxicol Teratol* 1990; 12: 231-7.
11. Zhang H, Lin X, Wan H et al. Effect of low-intensity pulsed ultrasound on the expression of neurotrophin-3 and brain-derived neurotrophic factor in cultured Schwann cells. *Microsurgery* 2009; 29: 479-85.
12. Hamre KM, West JR. The effects of the timing of ethanol exposure during the brain growth spurt on the number of cerebellar Purkinje and granule cell nuclear profiles. *Alcohol Clin Exp Res* 1993; 17: 610-22.
13. Pauli J, Wilce P, Bedi K. Acute exposure to alcohol during early postnatal life causes a deficit in the total number of cerebellar Purkinje cells in the rat. *J Comp Neurol* 1995; 360: 506-12.
14. O'Brien WD. Ultrasound-biophysics mechanisms. *Prog Biophysic Molecul Biol* 2007; 93: 212-55.
15. Pitt WG. Defining the role of ultrasound in drug delivery. *American J Drug Deliv* 2003; 1: 27-42.
16. Mitragotri S. Healing sound the use of ultrasound in drug delivery and other therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 255-60.
17. Heybeli N, Yeşildağ A, Oyar O et al. Diagnostic ultrasound treatment increases the bone fracture-healing rate in an internally fixed rat femoral osteotomy model. *J Ultrasound Med* 2002; 21: 1357-63.
18. Ciejka E, Wiechna K. [The influence of ultrasound therapy on patient's blood pressure subjected to activity ultrasound]. *Pol Merkur lekarski* 2009; 27:26-9.
19. Mizrahi N, Seliktar D, Kimmel E. Ultrasound-induced angiogenic response in endothelial cells. *Ultrasound Med Biol* 2007; 33: 1818-29.
20. Colucci V, Strichartz G, Jolesz F, et al. Focused ultrasound effects on nerve action potential in vitro. *Ultrasound Med Biol* 2009; 35:1737-47.
21. Tyler WJ. Noninvasive neuromodulation with ultrasound? A continuum mechanics hypothesis. *Neuroscientist* 2011; 17: 25-36.
22. Gray SP, Cullenmcewen LA, Bertram JF, Moritz KM. Mechanism of alcohol-induced impairment in renal development: Could it be reduced by retinoic acid? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2012; 39: 807-13.
23. Manzoavalos S, Saavedramolina A. Cellular and mitochondrial effects of alcohol consumption. *Int J Environ Res Public Health* 2010; 7:4281-304.
24. Phillips D. Effects of limited postnatal ethanol exposure on the development of myelin and nerve fibers in rat optic nerve. *Exp Neurol* 1989; 103:90-100.
25. Agarwal D. Genetic polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes. *Pathol Biol* 2001; 49:703-9.
26. Ming Z, Criswell HE, Yu G, Breese GR. Competing presynaptic and postsynaptic effects of ethanol on cerebellar purkinje neurons. *Alcohol Clin Exp Res* 2006; 30: 1400-7.
27. Kerai MD, Waterfield CJ, Kenyon SH, et al. Reversal of ethanol-induced hepatic

- steatosis and lipid peroxidation by taurine: a study in rats. *Alcohol* 1999; 34: 529-41.
28. Thomas JD, Goodlett CR, West JR. Alcohol-induced Purkinje cell loss depends on developmental timing of alcohol exposure and correlates with motor performance. *Brain Res Dev Brain Res* 1998; 105: 159-66.
29. Barnes DE, Walker DW. Prenatal ethanol exposure permanently reduces the number of pyramidal neurons in rat hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res* 1981; 1: 333-40.
30. Speed C. Therapeutic ultrasound in soft tissue lesions. *Rheumatology* 2001; 40: 1331-6.
31. Karnes JL, Burton HW. Continuous therapeutic ultrasound accelerates repair of contraction-induced skeletal muscle damage in rats. *Arc physic Med Rehabi* 2002; 83: 1-4.
32. Nagata K, Nakamura T, Fujihara S, Tanaka E. Ultrasound modulates the inflammatory response and promotes muscle regeneration in injured muscles. *Ann Biomed Eng* 2013; 41: 1095-105.
33. Artifon EL, Ferrari D, Cunha DM et al. Effects of therapeutic ultrasound associated with static stretching on longitudinal histomorphometric parameters of immobilized soleus of rats. *Rev Brasileir Med Spote* 2012; 18: 341-4.
34. Padilla F, Puts R, Vico L, Raum K. Stimulation of bone repair with ultrasound: a review of the possible mechanic effects. *Ultrasonics* 2014; 54: 1125-45.
35. Hu Y, Zhong W, Wan JM, Alfred C. Ultrasound can modulate neuronal development: impact on neurite growth and cell body morphology. *Ultrasound Med Biol* 2013; 39: 915-25.
36. Lee HJ, Choi BH, Min B-H, Park SR. Low-intensity ultrasound inhibits apoptosis and enhances viability of human mesenchymal stem cells in three-dimensional alginate culture during chondrogenic differentiation. *Tissue Eng* 2007; 13: 1049-57.
37. Fan Z, Kumon RE, Park J, Deng C. Intracellular delivery and calcium transients generated in sonoporation facilitated by microbubbles. *J Control Release* 2010; 142: 31-9.
38. Vasquez B, Navarrete J, Farfan E, Cantin M. Effect of pulsed and continuous therapeutic ultrasound on healthy skeletal muscle in rats. *Int J Clini Exp Pathol* 2014; 7: 779.

Effect of ultrasound waves on cerebellum purkinje cells in alcoholic rat model

Mohammadibolbanabad H¹, Kaffashian M², Rezaie M³, Moayeri A¹, Rostamzadeh A³

(Received: April 5, 2015

Accepted: June 22, 2015)

Abstract

Introduction: Ultrasound is a medical imaging technique for evaluation and assessment of body deep tissues such as spleen, liver, muscles, tendons, blood vessels, and their lesions. In addition, it is used in pregnancy. Purkinje cells of cerebellum are largest cells in central nervous system which during growth and differentiation have high sensitivity to various factors, including environmental, genetic and chemical factors. Alcohol is one of the most common and most effective toxins that affect purkinje cells and reducing their number. The purpose of the present study is to investigate the effect of the diagnostic ultrasound waves on number of cerebellar purkinje cells in the alcoholic rat cerebellum.

Materials & methods: Six female Wistar rats were selected for mating. After childbirth, the newborn were divided into six groups including one control group and five experimental groups (Alcoholic group and two groups with 3 and 5 MHz ultrasound-exposed, and two groups with alcohol+ ultrasound-exposed groups that

were exposed to 3 and 5 MHz ultrasound waves). After animals scarification and preparation of tissue slices, purkinje cells of cerebellum were counted using Motic software. Statistical analysis performed using Tukey test and ANOVA variance analysis.

Findings: The data showed that consumption of alcohol significantly decreased the number of purkinje cells of cerebellum and diagnostic ultrasound waves compensate this reduction and significantly increased the number of purkinje cells.

Discussion & Conclusion: according to results ultrasound waves as noninvasive method can compensate number of cerebellar purkinje cells that have been decreased by alcohol, and can be a new strategy for the treatment of cerebellar disorders during the development.

Keywords: Alcoholic, Purkinje cells, Diagnostic ultrasound waves

1. Dept of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran.

2. Dept of Physiology, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

3. Dept of Anatomy and Neuroscience, Faculty of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

Corresponding address Email: m_r_kaffashian@yahoo.com