

بررسی اثر تاکرولیموس بر روی سلول‌های هرمی قشر مخ موش صحرائی مدل ایسکمی مغزی تجربی

غزل انصاریان^۱، شب‌نم موثقی^۲، حامد شفارودی^۳، نوشین پناهی خضری^۱، زهرا نادیا شریفی^۲

^۱ دانشجوی، گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی
^۲ استادیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران
^۳ دانشیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی

چکیده

سابقه و هدف: ایسکمی مغزی از مهم‌ترین عوامل مرگ و معلولیت در جهان است و تاکنون درمان مؤثری برای آن پیدا نشده است. ایسکمی فراگیر و رپرفیوژن متعاقب آن به صورت چشمگیری باعث از بین رفتن سلول‌های هرمی ناحیه کورتکس مغز می‌شود. اخیراً استفاده از ایمونوفیلین لیگاندها یک استراتژی مناسب و جدید به عنوان یک عامل نوروپروتکتور مورد ملاحظه قرار گرفته است. از آنجایی که تاکرولیموس به عنوان یکی از ایمونوفیلین لیگاندها باعث محافظت از نورون‌ها در برابر آسیب‌های مغزی می‌شود، در این تحقیق اثر نوروتروفیک این دارو را روی ناحیه کورتکس موش صحرائی ویستار نر مورد بررسی قرار دادیم.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ۲۵ موش به ۵ گروه کنترل، ایسکمی، و ۳ گروه دارو (تاکرولیموس یا FK506) گرفته (به میزان‌های ۱،۳،۶ mg/kg) تقسیم شدند. مدل ایسکمی فراگیر مغزی با روش انسداد دو شریان کاروتید به مدت ۲۰ دقیقه القا شد و رپرفیوژن متعاقب آن صورت گرفت. تزریق دارو در زمان رپرفیوژن و مجدداً به فاصله ۴۸ ساعت بعد انجام شد.

یافته‌ها: ایسکمی به مدت ۲۰ دقیقه باعث کاهش شدید در تعداد سلول‌های هرمی کورتکس مغز گردید، ولی بین گروه ایسکمی و گروهی که دارو با دوز ۶ mg/kg به فاصله ۴۸ ساعت گرفته بودند، تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. در واقع، ۶ mg/kg مناسب‌ترین دوز برای تزریق دارو بود.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد تاکرولیموس دارای اثر نوروتروفیک بر روی سلول‌های هرمی کورتکس است و می‌تواند برای درمان ایسکمی ناشی از آسیب‌های مغزی مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: ایسکمی، تاکرولیموس، کورتکس مخ، سلول‌های هرمی.

مقدمه

ضایعات رپرفیوژن به آسیب‌هایی گفته می‌شود که در اثر بازگشت جریان خون به بافت بعد از مدتی ایسکمی ایجاد می‌شود. فقدان اکسیژن و مواد غذایی وضعیتی را ایجاد می‌کند که در نتیجه آن بازگشت دوباره گردش خون می‌تواند منجر به بروز التهاب و ضایعات اکسیداتیو در اثر ایجاد استرس اکسیداتیو گردد. آسیب‌هایی که در اثر رپرفیوژن ایجاد می‌شود، در نتیجه عملکرد التهابی بافت ضایعه دیده است. گلبول‌های سفید خون با برقراری مجدد خون باعث آزادسازی فاکتورهای التهابی مانند اینترلوکین و رادیکال‌های آزاد در بافت ضایعه دیده می‌گردند.

توقف دائمی یا موقت جریان خون در اثر انسداد شریانی سبب بروز سکنه مغزی می‌شود. سکنه مغزی سومین عامل مرگ و معلولیت در کشورهای صنعتی است و تاکنون درمان مؤثری برای آن پیدا نشده است (۲،۱).

- گروه ایسکمی: بعد از بیهوش کردن موش‌ها، شریان‌های کاروتید مشترک دو طرف به مدت ۲۰ دقیقه بسته شدند.

- گروه آزمایشی ۱: بعد از بیهوشی و ۲۰ دقیقه ایسکمی مغزی، تزریق تاکرولیموس با دوز ۱ mg/kg به صورت داخل وریدی در ابتدای مرحله بازگشت مجدد خون صورت گرفت. ۴۸ ساعت بعد، تزریق همان دوز دارو (۱ mg/kg) به صورت داخل صفاقی صورت گرفت.

- گروه آزمایشی ۲: بعد از بیهوشی و ۲۰ دقیقه ایسکمی مغزی، تزریق تاکرولیموس با دوز ۳ mg/kg به صورت داخل وریدی در ابتدای مرحله بازگشت مجدد خون صورت گرفت. ۴۸ ساعت بعد، تزریق همان دوز دارو بصورت داخل صفاقی صورت گرفت.

- گروه آزمایشی ۳: بعد از بیهوشی و ۲۰ دقیقه ایسکمی مغزی، تزریق تاکرولیموس با دوز ۶ mg/kg به صورت داخل وریدی در ابتدای مرحله بازگشت مجدد خون صورت گرفت. ۴۸ ساعت بعد، همان دوز دارو به صورت داخل صفاقی تزریق شد. تمامی حیوانات ۹۶ ساعت بعد ذبح و مغز آنها پس از ثبوت، به منظور رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین و نیسل آماده گشت.

حیوانات توسط کتامین (۸۷mg/kg) و زایلازین (۱۳ mg/kg) بیهوش شدند. یک برش عمودی در ناحیه قدامی گردن حیوان (کمی پایین‌تر از آرواره تحتانی تا بالای جناغ) ایجاد شد و با کنار زدن عضله جناغی-چنبری-پستانی، شریان‌های کاروتید مشترک در هر دو سمت در معرض دید قرار گرفت و پس از جدا کردن عصب واگ از آن، شریان‌ها توسط کلامپ میکروسرجری به مدت ۲۰ دقیقه بسته شدند. سپس کلامپ‌ها برداشته شده و گردش خون مجدداً برقرار گردید. در طول مدت جراحی درجه حرارت مقعدی حیوان مرتباً توسط ترمومتر اندازه‌گیری و با استفاده از لامپ گرمایی درجه حرارت در 37 ± 0.5 درجه سانتی‌گراد تثبیت شد. برش ایجاد شده توسط نخ بخیه دوخته شد و حیوانات تا موقع به هوش آمدن و تثبیت وضعیت، تحت نظر قرار گرفته و بعد از جراحی به مدت ۲۴ ساعت در قفس‌های جداگانه نگهداری شدند. تمامی حیوانات ۴ روز بعد از ایسکمی مجدداً بیهوش شده و مغز آنها با روش پرفیوژن توسط پارافرمالدئید ۴٪ فیکس و سپس از جمجمه خارج شد و برای ثبوت بهتر در محلول پارافرمالدئید ۴٪ قرار داده شد.

پس از ثبوت و آماده سازی، مقاطع کرونال با استفاده از دستگاه میکروتوم روتاری به ضخامت ۵ و ۱۰ μ از یک سوم

جریان خون بازگشتی موجب برگشت اکسیژن به سلول‌ها و آسیب‌های ناشی از آزاد شدن رادیکال‌های آزاد می‌گردد. نواحی مشخصی از مغز و انواع خاصی از نورون‌ها نسبت به ایسکمی مغزی حساس‌تر هستند که سلول‌های پیرامیدال ناحیه کورتکس از آن جمله می‌باشند (۳).

در ارزیابی عوامل حفاظتی نورون‌ها، استفاده از لیگاندهای ایمونوفیلین به عنوان یک راهکار مفید به صورت موادی که از نورون‌ها در برابر آسیب‌ها محافظت می‌کنند، مورد توجه قرار گرفته است. بررسی اثرات مهم ایمونوفیلین‌ها به عنوان حفاظت‌کننده‌های عصب از آنجایی منشا می‌گیرد که تاکرولیموس (FK506)، یک سرکوبگر سیستم ایمنی در پیوند اعضا، در سمیت عصبی ناشی از گلوتامات نقش حفاظتی نشان داده است (۲). نقش‌های عملکردی وسیعی در ارتباط با تاکرولیموس (FK506) شناخته شده است که مرتبط با مکانیزم‌های وابسته و غیر وابسته به کلسی‌نورین می‌باشد. در این بررسی‌ها اثر حفاظتی تاکرولیموس را در ارتباط با مکانیزم وابسته به کلسی‌نورین و از طریق کاهش تولید نیتریک اکسید و اثر نورون‌زایی آن را مرتبط با عملکردهای غیر وابسته به کلسی‌نورین ذکر می‌کنند (۴). تاکرولیموس (FK506) به راحتی از سد خونی-مغزی عبور می‌کند (۵) و برای استفاده انسان در دسترس است. یافته‌ها حاکی از این است که آزمایش این دارو در مورد ایسکمی مغزی می‌تواند مفید باشد (۶). در مطالعه حاضر، ما به بررسی اثر نوروتروفیک دوزهای مختلف تزریق تاکرولیموس (FK506) بر روی سلول‌های هرمی ناحیه کورتکس مغز موش صحرایی ویستار به دنبال ایسکمی/رپرفیوژن فراگیر پرداختیم.

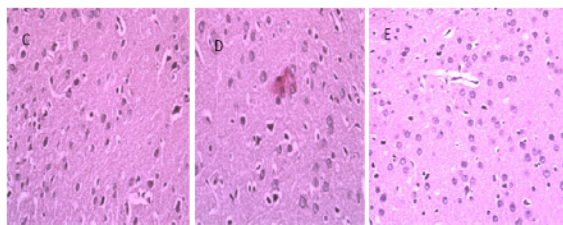
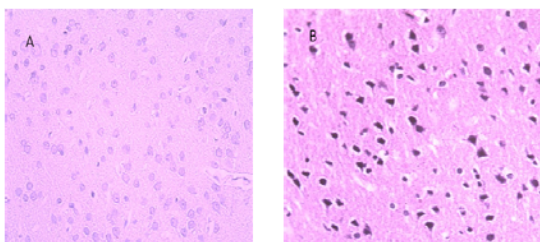
مواد و روشها

این مطالعه تجربی بر روی ۲۵ رأس موش صحرایی نر نژاد ویستار به وزن ۲۵۰-۳۰۰ گرم انجام شد. حیوانات به ۵ گروه تقسیم شدند. حیوانات از گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه تهران تهیه شده و در شرایط استاندارد آزمایشگاهی (۱۲ ساعت روشنایی- ۱۲ ساعت تاریکی) با درجه حرارت ۲۴ - ۲۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. آب و غذا به مقدار کافی در دسترس حیوان قرار گرفت.

رت‌ها به طور تصادفی به ۵ گروه زیر تقسیم شدند:

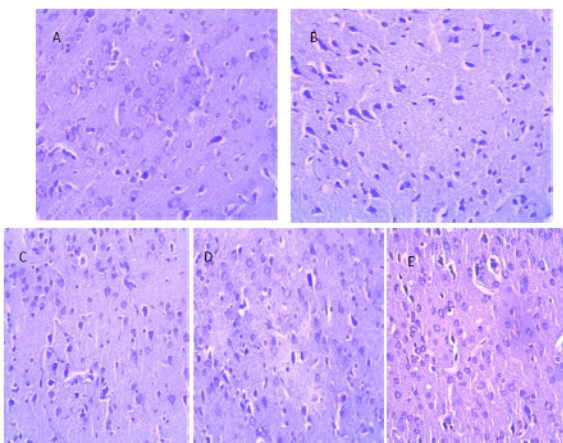
- گروه کنترل: موش‌ها توسط کتامین (۸۷mg/kg) و زایلازین (۱۳ mg/kg) بیهوش شدند.

کاهش شدید تعداد سلول‌های هرمی سالم ناحیه کورتکس گردیده است، به این ترتیب که میانگین تعداد سلول‌های سالم و زنده از ۹۳/۸ عدد به ۳۵/۶ عدد تنزل پیدا کرده بود. اختلاف آماری بین گروه کنترل و گروه ایسکمی، معنی دار بود. اما بین گروه ایسکمی و گروه‌های آزمایشی ۱ و ۲ اختلاف آماری معنی‌داری وجود نداشت. ولی این اختلاف با گروه آزمایشی ۳ که دارو با دوز ۶ mg/kg گرفته بود، معنی‌دار بود ($p < 0.001$) (شکل ۲ و نمودار ۱).



شکل ۱. فتومیکروگراف ناحیه کورتکس موش صحرايي. A: گروه کنترل، B: گروه ایسکمی، C: گروه آزمایشی ۱، D: گروه آزمایشی ۲، E: گروه آزمایشی ۳. رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انئوزین، بزرگنمایی $\times 400$

این نتایج نشان داد که تزریق دو دوز ۶ mg/kg تاکرولیموس به فاصله ۴۸ ساعت، مناسب‌ترین دوز برای به دست آوردن بیشترین تعداد سلول‌های هرمی زنده و سالم با میانگین ۷۶/۱ عدد است.



شکل ۲. فتومیکروگراف ناحیه کورتکس موش صحرايي. A: گروه کنترل، B: گروه ایسکمی، C: گروه آزمایشی ۱، D: گروه آزمایشی ۲، E: گروه آزمایشی ۳. رنگ آمیزی نیسل، بزرگنمایی $\times 400$

قدامی مغز حیوان تهیه و بر روی لام‌های زلاتینه منتقل گردیدند و توسط روش‌های هماتوکسیلین-انئوزین و نیسل رنگ آمیزی شدند.

نمونه‌ها توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی $\times 400$ بررسی شدند. در رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انئوزین به بررسی کیفی نمونه‌ها پرداخته شد و در روش نیسل تعداد سلول‌های زنده و سالم شمارش گردید و فقط سلول‌هایی که هسته و هستک واضح و مشخص داشتند به عنوان سلول‌های زنده و سالم در نظر گرفته شدند. از هر نمونه، ۸ فتومیکروگراف تهیه شد که سه فتومیکروگراف با حداقل فاصله ۴۰ میکرون به طور تصادفی انتخاب و سلول‌های هرمی ناحیه کورتکس آنها توسط نرم افزار image tools 2 شمارش شدند و میانگین آنها منظور گردید.

تمامی روش‌های مورد استفاده در این مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق برای استفاده از حیوانات آزمایشگاهی در دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران بود و همچنین حیوانات در بیهوشی کامل و بدون درد ذبح شدند.

داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS-ver15 و توسط آزمون آماری ANOVA یک طرفه و تست Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و سطح معنی‌داری $P \leq 0.05$ در نظر گرفته شد. تمامی داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای معیار گزارش شد. نمودارها توسط برنامه نرم افزاری Sigma Plot 11 رسم گردید.

یافته‌ها

ما اثر دوزهای متفاوت تاکرولیموس را بعد از ایسکمی بر روی سلول‌های هرمی ناحیه کورتکس توسط رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انئوزین و نیسل بررسی کردیم.

بررسی مقاطع با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انئوزین نشان داد که در گروه کنترل سلول‌های پررنگ و پیکنوتیک به ندرت در لابه‌لای نورون‌ها دیده می‌شود. به علاوه، بافت حالت یکنواخت و نرمال داشت و ضایعه خاصی مشاهده نشد. اما در گروه ایسکمی و گروه‌های آزمایشی ۱ و ۲ سلول‌های تیره و فشرده به وفور در لابه‌لای نورون‌های سالم کورتکس وجود داشت. در گروه آزمایشی ۳ (تاکرولیموس با دوز ۶ mg/kg) مشاهدات تقریباً نظیر گروه کنترل بود، با این تفاوت که در بعضی نقاط سلول‌های باریک و تیره رنگ با هسته‌های فشرده و تیره در لابه‌لای سلول‌های بافت کورتکس دیده شد (شکل ۱).

داده‌های به دست آمده از رنگ آمیزی نیسل نشان داد که بستن شریان‌های کاروتید مشترک به مدت ۲۰ دقیقه باعث

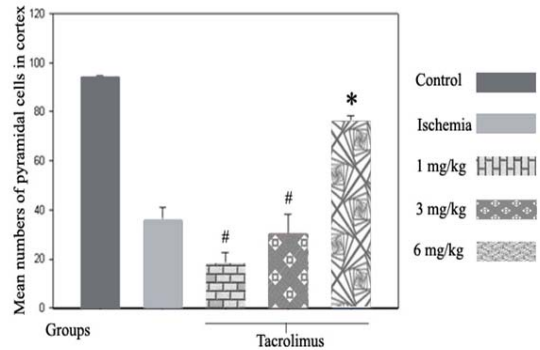
می‌باشد (۱۲). کلسی نورین یکی از مهم‌ترین آنزیم‌هایی است که در تنظیم فسفوریلاسیون بسیاری از پروتئین‌ها نقش مهمی را ایفا می‌کند. از طرفی غلظت آن در مغز ۳ تا ۱۰ برابر بیشتر از بافت‌های دیگر گزارش شده است (۱۵-۱۳). در تحقیق حاضر به نظر می‌رسد عملکردی مشابه با آنچه که شرح داده شد می‌تواند باعث حفاظت سلول‌های هرمی ناحیه کورتکس گردد.

مطالعات ما نشان داد که تزریق داخل وریدی تاکرولیموس به میزان ۶ mg/kg و تزریق مجدد دارو به صورت داخل صفاقی پس از ۴۸ ساعت با همان دوز، باعث افزایش تعداد سلول‌های هرمی ناحیه کورتکس می‌شود. تاکرولیموس به عنوان یک داروی حفاظت کننده سلول عصبی می‌تواند مرگ تأخیری نورون‌ها را کاهش دهد. این امر نشان دهنده اثر نوروتروفیک این دارو است. یافته‌های ما با مطالعات قبلی که مؤید اثر حفاظتی داروی تاکرولیموس می‌باشد مطابقت می‌کند (۱۴، ۱۳، ۱۶). تحقیقات زیادی در ارتباط با اثر حفاظتی این دارو در مدل‌های مختلف ایسکمی روی چند مورد از پستانداران دیگر انجام شده است (۱۷، ۱۵، ۱۱). این مطالعات نشان می‌دهد که تاکرولیموس اثر حفاظتی خود را بر روی مرگ تأخیری نورون‌ها از طریق مهار کردن تولید NO انجام می‌دهد (۱۸). هم چنین تحقیقات نشان داده‌اند که تاکرولیموس می‌تواند موجب افزایش بازسازی اعصاب محیطی پس از آسیب گشته و نیز باعث افزایش بازسازی آکسون‌های سلول عصبی متعاقب آسیب ستون فقرات گردد (۱۹، ۲۰). تزریق تاکرولیموس موجب افزایش جوانه‌های آکسونی سلول‌های عصبی مرکزی نظیر سلول‌های گانگلیونی شبکه پس از ضایعه عصب بینایی نیز می‌گردد (۲۱).

با توجه به موارد مورد بحث به نظر می‌رسد، تاکرولیموس به علت داشتن خواص نوروتروفیک می‌تواند به عنوان یک گزینه درمانی برای ضایعات ایسکمی مغزی در نظر گرفته شود، گرچه مطالعات بیشتری برای تأیید این فرضیه مورد نیاز است.

تشکر و قدردانی

تمامی آزمایشات در مرکز تحقیقات علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران انجام شد. همچنین از شرکت داروسازی Astellas به منظور اهدای آمپول تاکرولیموس تقدیر و تشکر می‌شود.



نمودار ۱. ارتباط بین اثر دوزهای متفاوت تزریق تاکرولیموس بر تعداد سلول‌های هرمی ناحیه کورتکس موش صحرائی. علامت * نمایانگر اختلاف معنی‌دار با گروه ایسکمی است ($p < 0.001$). علامت # نشان می‌دهد که اختلاف با گروه ایسکمی معنی‌دار نیست.

بحث

یافته‌های ما در این بررسی نشان داد که ایسکمی/رپرفیوژن فراگیر در مغز به مدت ۲۰ دقیقه باعث مرگ تأخیری سلول‌های هرمی ناحیه کورتکس گردیده و کاهش قابل توجهی در تعداد این سلول‌ها مشاهده شد.

گزارشات مختلف حاکی از این است که ایسکمی حاد و رپرفیوژن متعاقب آن باعث مرگ سلولی قابل ملاحظه‌ای در پستانداران می‌شود (۷-۹).

ضایعات بافتی که در اثر ایسکمی به وقوع می‌پیوندند، نتیجه دسته‌ای از وقایع پاتوفیزیولوژی است که افزایش غلظت گلوتامات را به همراه داشته و باعث تحریک گیرنده‌های گلوتامات به خصوص NMDA می‌شود. این امر می‌تواند منجر به افزایش کلسیم داخل سلولی و در نهایت مرگ سلولی گردد (۱۰). بررسی‌های بی‌شماری در ارتباط با علت مرگ سلول‌ها در اثر ایسکمی انجام شده است، ولی تاکنون عملکرد قطعی که باعث مرگ تأخیری نورون بعد از ایسکمی گردد، یافت نشده است. در یافته‌های ما به نظر می‌رسد عملکردی مشابه با آنچه شرح داده شد می‌تواند باعث مرگ سلول‌های هرمی ناحیه کورتکس گردد.

تاکرولیموس که یکی از داروهای تضعیف کننده ایمنی است قادر است از سد خونی مغزی بگذرد. این دارو به طور انتخابی و با تمایل بسیار بالا به پروتئین محلول دیگری که آن را FKBP12 می‌نامند، متصل می‌گردد. این ترکیب یعنی FKBP- FK506 قادر است کلسی نورین را مهار نماید (۱۱). در واقع می‌توان گفت که مهار کلسی نورین مهم‌ترین هدف این ترکیب

REFERENCES

1. Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the Hippocampus. *J Neurosci* 1986;6: 2950–67.
2. Dawson TM, Steiner JP, Dawson VL, Dinerman JL, Uhl GR, Snyder SH. Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:9808-12.
3. Hara H, Friedlander R M, Gagliardini V. Inhibition of interleukin 1 beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2007–12.
4. Gold BG, Zeleny- Pooley M, Wang MS, Chaturvedi P and Armisted DM .A none immunosuppressant FKBP-12 ligand increases nerve regeneration .*Exp Neurol* 1997; 147:269-78.
5. Yoshimoto T, Siesjo BK. Posttreatment with the immunosuppressant cyclosporinA in transient focal ischemia. *Brain Res* 1999;839:283– 91.
6. Dumont FJ. FK506, an immunosuppressant targeting calcineurinefunction. *Curr Med Chem* 2000; 7:731-48.
7. Volpe BT, Wessel TC, Mukherjee B, Federoff HJ. Temporal pattern of internucleosomal DNA fragmentation in the striatum and hippocampus after transient forebrain ischemia. *Neurosci Lett* 1995 17; 186:157-60.
8. MacManus JP, Hill IE, Preston E, Rasquinha I, Walker T, Buchan AM. Differences in DNA fragmentation following transient cerebral or decapitation ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995; 15:728-37.
9. Mori T, Wakabayashi T, Takamori Y, Kitaya K, Yamada H. Phenotype analysis and quantification of proliferating cells in the cortical gray matter of the adult rat. *Acta Histochem. Cytochem* 2009; 42: 1–8.
10. CHoi DW. Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 1992; 23:1261-76.
11. Yagita Y, Kitagawa K, Matsushita K, Taguchi A, Mabuchi T, Ohtsuki T, et al. Effect of immunosuppressant FK506 on ischemia- induced degeneration of hippocampal neurons in gerbils. *Life Sci* 1996; 59: 1643- 50.
12. Liu J, Farmer JD Jr , Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 1991; 66:807-15.
13. Pardo R, Colin E, Régulier E, Aebischer P, Déglon N, Humbert S, et al. Inhibition of calcineurin by FK506 protects against polyglutamine-huntingtin toxicity through an increase of huntingtin phosphorylation at S421. *J Neurosci* 2006; 26:1635-45.
14. Yanagihara T. Neuroprotective effect of tacrolimus (FK506) on ischemic brain damage following permanent focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 2004; 128: 30-38.
15. Sharkey J, Butcher SP. Immunophilines mediate the neuroprotective effects of FK506in focal cerebral ischemia. *Nature* 1994; 371:336-39.
16. Maeda M, Furuchi Y, Ueyama N, Moriguchi A, Satoh N, Matsuoka N, et al. A combined treatment with tacrolimus (FK506) and recombinant tissue plasminogen activator for thrombotic focal cerebral ischemia in rats: increased neuroprotective efficacy and extended therapeutic time window. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22:1205-11.
17. Takamatsu H, Tsukada H, Noda A, et al. FK506 attenuates early ischemic neuronal death in a monkey model *J Nucl Med* 2001 ;42:1833- 40.
18. Sasaki T, Hamada J, Shibata M, Gotoh J, Araki N, Fukuuchi Y. FK506 abrogates delayed neuronal death via suppression of nitric oxide production in rats. *Brain Res* 2004; 1009:34-39.
19. Li X, Wang W, Wei G, Wang G, Zhang W, Ma X. Immunophilin FK506 loaded in chitosan guide promotes peripheral nerve regeneration. *Biotechnol Lett* 2010; 32:1333-37.
20. Wang MS, Gold BG. FK506 increases the regeneration of spinal cord axons in a predegenerated peripheral nerve autograft. *Spinal Cord Med* 1999; 22(4):287-96.
21. Grosskreutz CL, Hänninen VA, Pantcheva MB, Huang W, Poulin NR, Dobberfuhr AP. FK506 blocks activation of the intrinsic caspase cascade after optic nerve crush. *Exp Eye Res* 2005; 80:681-86.