تعیین دوز مناسب و موٴثر دپرنیل بر نورون های حرکتی نخاع نوزادان موش صحرایی بعد از قطع عصب سیاتیک

مرضیه پناهی* دکتر تقی الطریحی** دکتر مجتبی رضازاده*** دکتر مجید صادقی زاده**

The dose determination of deprenyl on the spinal cords motoneurons after sciatic nerve transection

M.Panahi T.Altarihi M.Rezazadeh M.Sadeghizadeh

⊥**Abstract**

Background: Deprenyl has a neuroprotective effect on the spinal cords motoneurons.

Objective: The purpose of this research was to determine the anti-apoptotic effect of deprenyl on weight, death and number of motoneurons of axotomized newborn rats.

Methods: In the present study 100 newborns of spragus-Dawley rats were anesthetized with hypothermia and then their left sciatic nerve was cut in the middle of the thigh. In the experimental groups, neonatal rat were injected intraperitoneally with 0.25, 10, 30, 45, 60, 75, 90, 100, 110 mg/kg of deprenyl respectively and control group received an equal volume of distilled-water. For each dose, 10 animals were used. The first injection was performed one hour after axotomy and the injection was lasted for 3 weeks, daily. Then the axotomized animals were sacrified. The normality of the data was confirmed by K-S test.

Findings: Linear regression by animal survival rate, Boby weight, and percentage of survival motoneurons according to the correlation coffecient were r = -0.922, r = -0.879 and r = 0.605 respectively. Varience analysis also showed that there were significant difference between doses.

Conclusion: The morphological data also indicated that deprenyl has an anti-apoptotic on the spinal motoneurons in the axotomized neonatal rat.

Keywords: Deprenyl, Axotomy, Sciatic Nerve, Newborn Rat

⊥ **چکیده**

زمینه : دپرنیل دارای اثر محافظتی بر روی نورون های حرکتی نخاع است.

هـدف : مطالعـه بـه منظور تعیین دوز موٴثر داروی دپرنیل بر وزن، مرگ و میر و تعداد نورون های حرکتی نخاع نوزادان موش صحرایی اکسوتومی انجام شد.

مـواد و روش هـا : در این پژوهش از ۱۰۰ سر نوزاد موش نژاد اسپراگ داولی استفاده شد. ابتدا موش ها به وسیله هیپوترمی بـی هـوش و عصـب سیاتیک پای چپ در وسط ران قطع شد. یک ساعت بعد از اکسوتومی، نوزادان به ده گروه ده تایی تقسیم شـدند و روزانـه به ترتیب ۰/۱ میلی لیتر مقادیر ۰/۲۵ ، ۱۰ ، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۷۰، ۹۰، ۱۰۰و۱۱۰ میلی گرم برکیلوگرم دارو برای نه گـروه و بـرای گروه دهم (شاهد) آب مقطر به روش داخل صفاقی تزریق شد. اولین تزریق یک ساعت بعد از آکسوتومی انجام و ۲۱ روز طـول کشـید. در مقادیـر ۹۰ بـه بعـد هیچ نمونه ای جمع آوری نشد. سپس حیوان های آکسوتومی شده قربانی شدند و نخـاع تمـام نمونـه هـا در ناحـیه L_1 مهـره کمـری که معادل L_4-L_6 سگمان نخاعی است، برداشت شد. بعد از پردازش بافتی، رنـگ آمـیزی اختصاصـی کرسـیل فست ویولت انجام و با استفاده از میکروسکوپ نوری تعداد نورون های شاخ قدامی دو طرف نخاع شمارش شد. طبیعی بودن داده ها با آزمون K-S تاٴیید شد.

یافته ها : ضـریب همبستگی میزان بقای حیوان ها، وزن و درصد بقای نورون های حرکتی به ترتیب r=-۰/۹۲۲ ، r=-۰/۸۷۹ و r=-۰/۶۰۵ بود. آنالیز واریانس اختلاف معنی داری را بین دوزهای مختلف نشان داد.

نتـیجه گیری : دوز موٴثر دپرنیل ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم بود و این دارو یک اثر آنتی آپوپتوتیک بر روی نورون های حرکتی نخاع نوزادان آکسوتومی شده داشت.

کلید واژه ها : دپرنیل، اکسوتومی، عصب سیاتیک، موش صحرایی

* مربی و عضو هیأت علمی گروه بافت شناسی دانشگاه علوم پزشکی اهواز

** دانشیار دانشگاه علوم پزشکی تربیت مدرس

*** استاد دانشگاه علوم پزشکی تربیت مدرس

⊥ مقدمه :

بررسی پدیده مرگ یاخته های عصبی طی تکامل طبیعی، بیماری ها و آسیب های بافتی تاریخچه ای نسبتاًطولانی دارد. اکسوتومی به عنوان الگوی القایی مرگ نورون ها در سال های۱۹۴۰ تا ۵۰ معرفی و تحقیق های فراوانی بر روی پاسخ نورون به دنبال اکسوتومی انجام شد. فارل در سال ۱۹۸۹ نشان داد که قطع عصب سیاتیک در نوزادان موش صحرایی باعث کاهش نورون های حرکتی نخاع می شود.[۵] اسنایدر با انجام اکسوتومی باعث مرگ یاخته های عصبی شد و بیان نمود که این فرآیند شبیه به مرگ طبیعی نورون ها طی تکامل است و یاخته های جوان تر نسبت به نورون های بالغ به مرگ حساس ترند.[۱۷] اکسوتومی عصب چهره ای در نوزادان موش، مرگ یاخته ای از نوع آپوپتوز را القاء می کند و اوج مرگ نورون های حرکتی عصب چهره ای ۲۸ ساعت بعد از ضایعه دیده می شود.[۴]

تحقیقات تانگ نشان داد که نورون های حرکتی صورت موش صحرایی نابالغ نسبت به آسیب بسیار حساس است و تقریباً ۸۰ درصد نورون های حرکتی در اولین هفته بعد از اکسوتومی می میرند.[۱۹] همچنین عده ای میزان مرگ یاخته های عصبی در حیوان های بالغ و نوزاد را به عوامل مختلفی از جمله سن، نوع عصب (محیطی یا مرکزی) و محل قطع عصب ربط می دهند.[۱۴]

تحقیقات فراوان نشان داده است که احتمالاً یکی از مهم ترین علل مرگ نورون های حرکتی فقدان عوامل نوروتروفیک از جمله CNTF ، BDNF ، LIF ، GDNF است و استفاده از این عوامل نوروتروفیک در درمان نورون های حرکتی نوزادان بعد از اکسوتومی موٴثر است.[۸] محققین در صدد هستند به طریقی، حذف عوامل تروفیکی که منتهی به مرگ سلول های عصبی می شود را جبران نمایند، لذا یکی از داروهایی که امروزه خاصیت آنتی آپوپتوزی آن ثابت شده داروی دپرنیل است. این دارو برای درمان بیماری پارکینسون نیز استفاده می شود. دپرنیل یا Selegiline پودر سفید رنگ بی بویی است که به راحتی در آب حل شده و از طریق دستگاه گوارش به خوبی جذب می شود. تحقیقات ژانگ و همکاران نشان داد که استفاده از دپرنیل به طور معنی داری بقای نورون های حرکتی اکسوتومی شده عصب چهره ای را افزایش می دهد و استفاده از این ماده روزانه دو بار با مقدار۰/۰۱ میلی گرم بر کیلوگرم در افزایش بقای نورون های حرکتی صورت موش صحرایی به میزان قابل توجهی موٴثرتر از CNTF است.[۲۰]

ایواساکی نشان داد استفاده از دپرنیل در محیط کشت محتوی نورون های حرکتی نخاع موش صحرایی، باعث رشد این یاخته ها می شود و این ماده را به عنوان یکی از عوامل نوروتروفیک موٴثر بر نورون های حرکتی نخاع در شرایط خارج از بدن معرفی کرد.[۷]

نول در تحقیق های خود نشان داد دپرنیل اولین ماده افزایش دهنده فعالیت کاتکول آمین و یک مهار کننده غیر قابل برگشت آمین اکسیداز B است که اثر محافظتی نورون و کاهش دهنده آپوپتوز دارد.[۱۱]

به عقیده مارویاما دپرنیل ممکن است آغازگر وقایع داخل سلولی منجر به سرکوب مرگ آپوپتوتیک نورون ها باشد و نورون ها را از آپوپتوز محافظت نماید. تحقیق های وی نشان داد که دپرنیل و ترکیب های وابسته آن ممکن است وخامت آپوپتوز نورون ها را در دوره سالمندی و بیماری های نورودژنراتیو به تاٴخیر بیندازد.[۱۲]

این تحقیق با هدف تعیین دوز موثر داروی دپرنیل بر وزن، مرگ و میر و تعداد نورون های حرکتی نخاع نوزادان موش صحرایی آکسوتومی انجام شد.

⊥ مواد و روش ها :

در این تحقیق ۱۰۰ سر نوزاد پنج روزه موش صحرایی نژاد اسپراگ داولی از هر دو جنس استفاده شد. نوزادان که حدود ۷ تا ۸ گرم وزن داشتند بعد از قطع عصب سیاتیک

پـای چـپ بـه ده گـروه ده تایی تقسیم شدند. گروه های ۱ تـا ۹ به ترتیب یکی از مقادیر ۰/۲۵ ، ۱۰، ۳۰، ۴۵، ۶۰ ، ۷۵، ۹۰، ۱۰۰و ۱۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم داروی دپرنیل را بـه عـنوان گروه های آزمایش به مدت ۲۱ روز و گروه دهـم فقـط آب مقطـر بـه عـنوان شاهد دریافت نمودند. جهـت انجـام عمـل اکسـوتومی، نـوزادان بـا استفاده از هیپوترمـی بیهوش شدند و در ناحیه پشت ران پای چپ، مـوازی بـا استخوان ران پوست برش داده شد. با نمایان شـدن عضـله، دو سـر عصب سیاتیک که در زیر آن قرار دارد در ناحـیه وسط ران بین زانو و ستون مهره قطع شد. بـرای جلوگـیری از رشد مجدد (reinnervation) حدود ۲ تـا ۳ میلـی مـتر از عصـب در محـل قطع آن حذف و پوسـت ناحـیه بخـیه شـد. یک ساعت بعد از اکسوتومی (روزانـه طـی مـدت ۲۱ روز) ابـتدا نـوزادان در هر گروه توزیـن و به ترتیب ۰/۱ سی سی از مقادیر مذکور دارو بر اسـاس وزن آنهـا تـزریق مـی شـد. در هفـته اول بعد از اکسوتومی به علت مرگ نوزادان هیچ نمونه ای از مقادیر ۹۰، ۱۰۰، ۱۱۰ میلـی گـرم بر کیلوگرم جمع آوری نشد. بعـد از۲۱ روز تمـام نمونـه هـای باقی مانده با اتر کشته شـده و بعـد از خـارج نمودن احشاء از طریق برش شکم نخاع بین تحتانی ترین قسمت مهره T_{13} و دیسک L_1 و L_2 (کـه معـادل با سگمان نخاعی L_4-L_6 و محل جسم سـلولی عصـب سـیاتیک اسـت) قطع شد و در فیکساتیو بوئـن قـرار گرفـت. بعـد از پـردازش بافتـی، بلوک های پارافینی تهیه و با استفاده از میکروتوم روتاری برش های ۸ میکرونـی تهـیه شد. در نمونه های جمع آوری شده با استفاده از رنگ آمیزی اختصاصی کرسیل فست ویولت و بـا میکروسـکوپ نوری، نورون های حرکتی شاخ قدامی هـر دو طـرف نخـاع شـمارش شـد. اسـاس شـمارش سـلول هـای هسـتک دار بـا انـدازه هسـته بـیش از ۱۰ مـیکرون و سیتوپلاسـم کـاملاً رنـگ شده از اجسام نیسـل بود که در ناحیهL_1 نخاع در قسمت قدامی-جانبی شـاخ قدامی نخاع قرار داشت. توزیع طبیعی اطلاعات به دسـت آمـده بـا اسـتفاده از آزمون K-S تأیید شد. برای بررسـی مـیزان همبسـتگی بیـن متغـیرها از آزمـون همبسـتگی و بـرای مقایسـه مقادیر مختلف دارو از آنالیز واریـانس یک طرفه استفاده شد. نتایج حاصل به صورت میانگیـن انحراف معیار بیان شده است. اختلاف در سطح $P<۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

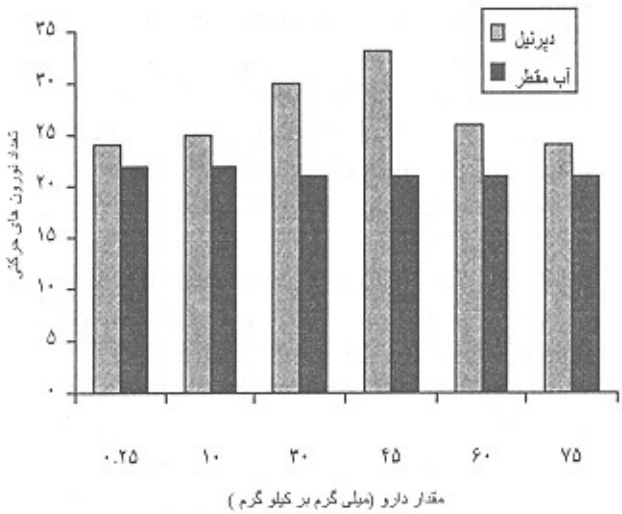
⊥ یافته ها :

از نظـر تـأثیر مقادیر مختلف دارو بر وزن حیوان ها، با افزایش مقدار دارو، وزن کاهش یافت($P<۰/۰۱$ و ۰/۸۷۹ $r=-$).

اثر مقادیر مختلف دارو بر میزان مرگ و میر حیوان ها بـه ایـن صـورت بـود کـه در مقادیر ۰/۲۵ ،۱۰، ۳۰، ۴۵ میلـی گـرم بر کیلوگرم همه حیوان ها زنده ماندند، اما با مقادیـر ۶۰ میلـی گـرم بـر کـیلوگرم ۵۳ درصـد و ۷۵ میلـی گـرم بـر کـیلوگرم ۶۰ درصـد حیوان ها مردند. با مقادیـر ۹۰، ۱۰۰، و ۱۱۰ میلـی گـرم بـر کـیلوگرم همه حـیوان هـا مردند. نتایج حاصل از آزمون همبستگی بین مقادیـر مخـتلف داروی تـزریق شـده و مـرگ و مـیر حیوان ها نشان داد که با افزایش مقدار دارو، میزان بقای حیوان ها کاهش یافته است($P<۰/۰۵$ و $r=-۰/۹۲۲$).

از نظـر اثـر مقادیـر مخـتلف دارو بر تعداد نورون های حرکتـی (تعییـن دوز مـؤثـر)، نـتایج حاصـل از آزمـون همبسـتگی بیـن مقادیـر تزریق شده و تعداد نورون های حرکتی نخاع نیز نشان داد که با افزایش مقدار دارو تعداد نورون های حرکتی کاهش یافته است($P<۰/۰۵$ و ۶۰۵/ $r=-۰$). همچنیـن مقایسـه آمـاری بـا اسـتفاده از آنالـیز واریـانس متغـیر تصـادفی نشـان داد که تفاوت کلی بین مقادیـر مختلف معنی دار است($P<۰/۰۰۰۱$). آزمون HSD توکـی، دال بـر آن است که اختلاف گروه های ۳۰، ۴۵، ۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم با گروه شاهد معنی دار است و از طرفی بین این مقادیر اختلاف معنی داری وجود ندارد. لـذا مقـدار کمـتر دارو یعنی ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم به عـنوان مقـدار مناسـب در تحقـیقات بعـدی اسـتفاده شد(نمودار شماره ۱).

نمودار ۱- مقایسه میانگین تعداد نورون های حرکتی حیوان های آکسوتومی شده در مقادیر مختلف دارو($P<۰/۰۵$)



✡ بحث و نتیجه گیری :

این مطالعه نشان داد داروی دپرنیل در جلوگیری از مرگ نورون های حرکتی نخاع کمری در نوزادان موش صحرایی موٴثر است.

ترکیب های متنوع و شرایط گوناگون آزمایشگاهی می تواند باعث ایجاد آپوپتوز در سلول های عصبی شود، به عنوان مثال کمبود عوامل نوروتروفیک، حذف سرم از محیط کشت، اشعه، هیپوکسی، ایسکمی و غیره به مرگ سلول ها منجر می گردد.[۱۵] عده ای معتقدند که مرگ نورون های حرکتی به دنبال آکسوتومی در نوزادان موش صحرایی به دلیل حذف عوامل تروفیک از عضله هایی است که آنها را عصب دهی می نمایند.[۶]

سالو و همکاران نشان دادند که بعد از آکسوتومی در حیوان ۱۴ روزه ای که بعد از عمل داروی دپرنیل به مدت ۲۱ روز دریافت نموده بود، تعداد نورون های حرکتی باقی مانده ۲/۲ مرتبه بیش از گروه شاهد بود و درمان با این دارو توانست بخشی از کاهش عامل نوروتروفیکی مشتق شده از بافت هدف را که در اثر اکسوتومی ایجاد شده جبران نماید. این بدان معنی نیست که دپرنیل به عنوان یک عامل تروفیکی عمل می کند، بلکه این دارو به طریقی اثر کمبود عامل تروفیک بر نورون های حرکتی را جبران می کند.[۱۶]

مطالعه ها نشان می دهند دپرنیل یک داروی شناخته شده به عنوان مهارکننده غیر قابل برگشت منوآمین اکسیدازهای B است و می تواند سلول های عصبی را هم در محیط کشت و هم در مدل های حیوانی از آپوپتوز محافظت نماید. اگرچه مکانیسم محافظت عصبی القا شده به وسیله دپرنیل هنوز کاملاً مشخص نیست، ولی برخی تحقیق ها نشان می دهند که اثر محافظتی این دارو مستقل از مهار منوآمین اکسیداز B است.[۱۸] عده ای از محققین معتقدند دپرنیل باعث افزایش فنیل اتیل آمین اجسام مخطط عقده های پایه ای مغز می شود و فنیل اتیل آمین افزایش یافته، فعالیت گیرنده های دوپامین را به وسیله دوپامین تسهیل می کند.[۱۳] عده ای دیگر معتقدند که دپرنیل باعث افزایش فعالیت آنزیم های حذف کننده همانند Cu/Zn سوپراکسیداز دیسموتاز (SOD1) و Mn سوپراکسیداز دیسموتاز (SOD2) می شود و فعالیت این نوع آنزیم ها، سلول های عصبی را از آسیب رادیکال اکسیداتیو و مرگ محافظت می نماید.[۲و۱۰] به نظر کوهن و اسپینا دپرنیل باعث کاهش رادیکال های آزاد می شود و بدین ترتیب مرگ ناشی از رادیکال های آزاد در نورون های دوپامینرژیک (حاصل تولید هیدروژن پراکسید ناشی از کاتابولیسم دوپامین به وسیله MAO-B) را به تأخیر می اندازد.[۳] تحقیق های فراوان نشان داده است که دپرنیل از طریق القای نسخه برداری، سنتز پروتئین و بیان ژن در سلول ها باعث کاهش آپوپتوز می شود تا بتواند عمل میتوکندری را حفظ نماید و سطح رادیکال های آزاد سیتوپلاسمی را کاهش دهد. از متابولیت های مهم دپرنیل، متامفتامین و آمفتامین است که با غلظت های بالا باعث آپوپتوز می شوند.[۱و۱۶] با توجه به مطالب فوق و نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر شاید بتوان چنین نتیجه گیری نمود که اثر سمی غلظت بالای این دارو یا متابولیت های آن،[۱۲] باعث کاهش وزن نوزادان

موش صحرایی، کاهش بقای حیوان ها و کاهش تعداد نورون های حرکتی می شود و علت مرگ با مقادیر زیاد دارو نیز بدین علت است و مقدار انتخاب شده ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم در مقایسه با نورون های حرکتی که دپرنیل دریافت نداشته اند، اثر تروفیکی بارزتری را نشان می دهد و این دوز توانسته است تعداد نورون های بیش تری را از مرگ ناشی از آکسوتومی نسبت به گروه شاهد حفظ نماید.

⊥ مراجع :

1.Barber A J, paterson I A, Gelowitz D L, Voll CL. Deprenyl protects rat hippocampal pyramidal cells from ischemic insult. Soc Abster 1993; 19: 1646

2.Carrillo M, Kanai M, Nokubo M, Kitani K. Deprenyl induces activities of both superoxide dismutase and catalase but not of glutathione peroxidase in the striatum of young male rats. Life Sci 1990; 48: 517-21

3.Cohen G, Spina M B. Deprenyl suppresses the oxidant stress associated with increased dopamine turnover. Ann Neurol 1989; 26: 689-90

4.De Billbao F, Dubois Dauphin M. Time course of axotomy-induced apoptotic cell death in facial motoneuron of neonatal wild type and bc1-2 transgenic mice. Neuroscience 1996; 71(4): 111-9

5.Farel P B. Naturally occurring cell death and differentiation of developing spinal motoneurpns following axotomy. J Neurosci 1989; 9: 2103-13

6.Grews L L, wigston DJ. The dependence of motoneurons on their target muscle during postnatal development of the mouse. J Neurosci 1990; 10(5): 1643-53

7.Iwasaki Y, Ikeda K, Shiojima T, Kinoshita T. Deprenyl enhances neurite outgrowth in cultured rat ventral horn neurons. J Neurol Sci 1994; 125(1): 11-3

8.Iwasaki M. CNQX prevents spinal motoneuron death following sciatic nerve transection in newborn rats. J Neuro Sci 1995; 134(1-2): 21-5

9.Ju W J H Holland D P, Tatton W G. Deprenyl alters the time course of death of axotomized facial motoneurons and the hypertrophy of neighboring astrocytes in immature rats. Exp Neurol 1994;126:233-46

10.Knoll J. The pharmacological profile of Deprenyl (selegiline) and its relevance for humans, a personal view. Pharmacol Toxicol 1992; 70: 317-321

11.Knoll J. History of Deprenyl the first selection inhibitor of monoamine oxidase type B. Vop Med Khim 1997; 43(6):482-93

12.Maruyama W, Naoi M. Neuroprotection by deprenyl and related compounds. Mech Ageing Dev 1999; 111(2-3): 189-200

13.Paterson I A, Jurorio A V, Boulton AA. Possible mechanism of action of deprenyl in parkinsonism. Lancet 1990; 336: 183-7

14.Polin M M. The effect of age on motoneuron death following axotomy in the mouse. Development 1991; 112:83-9

15.Sastry P S. Kalluri S R. Apoptosis and the nervous system. J Neurochem 2000;74:1-20

16.Salo P T. Tatton W G. Deprenyl reduces the death of motoneurons caused by axotomy. J Neurosci Res 1992;31:394-400

17.Sinder W D, Jeffrey L E. Axotomy-induced neuronal death during development. J Neurobiol 1992; 23(9): 1231-46

18.Tatton WG, Ghalmers Redman RM. Modulation of gene expression rather than monoamine oxidase inhibition: Deprenyl – related compounds in controlling neurodegeneration. Neurology 1996; 47: 71-83

19.Tong JX , RichK M. Diphenylpipreraz ines enhance regeneration after facial nerve injury. J Neurocytol 1997; 26(5): 339-47

20.Zhang F, Richardson P M , Holland D P, Guo Q. CNTF or deprenyl in immature rats: survival of axotomized faciacl motoneurons and weight loss. J Neurosci Res 1995; 40(4): 564-70