

Effect of the Polyamine Component, tdmtn, on Apoptosis of Motor Neurons in Adult Mouse Spinal Cord Slices

Hamid Reza Momeni, Ph.D.^{1*}, Malek Soleimani Mehranjani, Ph.D.¹,
Hamid Khanmohamadi, Ph.D.²

1. Biology Department, Faculty of Sciences, Arak University, Arak, Iran
2. Chemistry Department, Faculty of Sciences, Arak University, Arak, Iran

* Corresponding Address: P.O.Box: 879, Biology Department, Faculty of Sciences, Arak University, Arak, Iran
Email: h-momeni@araku.ac.ir

Received: 24/Jun/2009, Accepted: 30/Nov/2009

Abstract

Objective: The aim of this study was to investigate the preventive effect of the polyamine component N, N, N', N'-tetrakis(2-aminoethyl)2,2-dimethylpropane-1,3-diamine (tdmtn) on apoptotic motor neurons in adult mouse spinal cord slices.

Materials and Methods: Thoracic region of adult mouse spinal cords was sliced by a tissue chopper into 400 μm slices and cultured in medium in the presence or absence of tdmtn for 6 hours. Morphological features of apoptosis were evaluated using fluorescent staining with propidium iodide and Hoechst 33342. The appearance of nucleosomal DNA fragmentation was studied using agarose gel electrophoresis. Our results were analyzed using the one-way ANOVA and Tukey's tests.

Results: After 6 hours in culture, motor neurons displayed morphological signs of apoptosis including cell shrinkage, as well as nuclear and chromatin condensation. DNA extracted from slices cultured for 24 hours revealed nucleosomal DNA fragmentation on agarose gel electrophoresis. Tdmtn reduced the occurrence of apoptosis in motor neurons and significantly ($p < 0.01$) increased the viability of these neurons after 6 hours of culturing.

Conclusion: Tdmtn, as a polyamine component, could probably prevent the occurrence of motor neuron apoptosis through calcium chelation.

Keywords: Apoptosis, Motor Neuron, Spinal Cord, Mouse, tdmtn

Yakhteh Medical Journal, Vol 12, No 2, Summer 2010, Pages: 159-164

اثر ترکیب پلی آمینی tdmtn بر آپوپتوزیس نورون‌های حرکتی در قطعات کشت شده نخاع موش بالغ

حمیدرضا مؤمنی Ph.D.*، ملک سلیمانی مهرنجانی Ph.D.، حمید خانمحمدی Ph.D.^۱

۱. دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، اراک، ایران

۲. دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه، گروه شیمی، اراک، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: ایران، اراک، صندوق پستی: ۸۷۹، دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی
پست الکترونیک: Email: h-momeni@araku.ac.ir

دریافت مقاله: ۸۸/۳/۳، پذیرش مقاله: ۸۸/۹/۹

چکیده

* **هدف:** بررسی اثرات (tdmtn) N, N', N'-tetrakis (2-aminoethyl)2, 2-dimethylpropane-1, 3-diamine به عنوان یک ترکیب پلی آمینی بر آپوپتوزیس نورون‌های حرکتی قطعات نخاع موش بالغ

* **مواد و روش‌ها:** بخش سینه‌ای نخاع موش بالغ به وسیله دستگاه قطعه‌کننده بافت به قطعات ۴۰۰ میکرونی بریده و برای ۶ ساعت در حضور و عدم حضور tdmtn کشت شد. برای ارزیابی جنبه‌های مورفولوژیکی آپوپتوزیس در نورون‌های حرکتی، رنگ آمیزی فلوروسنت با استفاده از پروپیدیوم آیدواید و هوست ۳۳۳۴۲ انجام شد و جهت تشخیص ظهور فراگمت‌های نوکلئوزومی DNA در قطعات کشت شده، الکتروفورز ژل آگارز مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز آماری داده‌ها از طریق آنالیز واریانس (ANOVA) یک طرفه و آزمون Tukey برای تجزیه و تحلیل داده‌ها به کار برده شد.

* **یافته‌ها:** پس از گذشت ۶ ساعت از کشت قطعات نخاع، نورون‌های حرکتی نشانه‌های مورفولوژیکی مشخص آپوپتوزیس شامل چروکیدگی سلول، متراکم شدن هسته و کروماتین را به نمایش گذاشتند. همچنین DNA استخراج شده از قطعات کشت شده برای ۲۴ ساعت، فراگمت‌های نوکلئوزومی DNA را بر روی ژل آگارز نشان داد. بعد از ۶ ساعت در محیط کشت، tdmtn توانست آپوپتوزیس را در نورون‌های حرکتی مهار و قابلیت حیات این نورون‌ها را در شاخ‌های شکمی به طور معنی داری ($p < 0.01$) افزایش دهد.

* **نتیجه‌گیری:** ترکیب پلی آمینی tdmtn به احتمال با خاصیت کلیت‌کنندگی کلسیم خارج سلولی توانست آپوپتوزیس را در نورون‌های حرکتی مهار و قابلیت حیات آنها را افزایش دهد.

* **کلیدواژگان:** آپوپتوزیس، نورون حرکتی، نخاع، موش، tdmtn

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دوازدهم، شماره ۲، تابستان ۸۹، صفحات: ۱۶۴-۱۵۹

مقدمه

کلسیم به عنوان یک پیامبر ثانویه، اعمال مختلف سلولی از جمله تقسیم، تمایز و حرکت سلولی را کنترل می‌نماید. تحت شرایط فیزیولوژیک غلظت کلسیم سیتوزول در سطح بسیار پایین است، در حالی که این غلظت در شرایط پاتولوژیک افزایش یافته و موجب شروع سیگنال‌هایی می‌گردد که منجر به مرگ سلولی می‌شود (۱).

شواهد نشان می‌دهد که افزایش یون کلسیم داخل سلولی منجر به مرگ سلولی می‌شود (۲). همچنین مرگ سلولی القا شده توسط افزایش غلظت کلسیم داخل سلولی در سلول‌های تیمار شده با یونفورهای کلسیم (Calcium Ionophores) (۳) و یا مهار پمپ کلسیم موجود بر روی غشا سیتوپلاسمی (۴) به اثبات رسیده است. مهم‌ترین ارتباط بین افزایش غیرطبیعی کلسیم و مرگ سلولی آپوپتوزیس، فعال شدن آنزیم‌های حساس به کلسیم از جمله کالپین (Calpain) (۵) و نوکلئازهای داخل سلولی (Endonucleases) (۶) می‌باشد که این امر مسیرهای دخیل در آپوپتوزیس را آغاز می‌نماید. از طرف دیگر افزایش بیش از حد کلسیم داخل سلولی موجب عملکرد غیرطبیعی ارگانل‌های سلولی از جمله میتوکندری می‌شود. بدین ترتیب که با افزایش غیرطبیعی غلظت کلسیم سیتوزولی، جذب کلسیم توسط میتوکندری‌ها افزایش و منجر به تجمع بیش از اندازه کلسیم در این ارگانل می‌گردد. این امر موجب تغییر ولتاژ غشا میتوکندری‌ها و باز شدن منافذ این ارگانل شده که به واسطه آن منجر به آزاد شدن پروتئین‌های آپوپتوزیک همچون سیتوکروم C، فاکتور القا کننده آپوپتوزیس

کلسیم (۷). ارگانل می‌شود (۷). فرضیه مرگ نورونی القا شده توسط کلسیم بر اساس مشاهداتی است که فرم‌های مختلف استرس اعمال شده بر سلول موجب افزایش بیش از اندازه کلسیم داخل سلولی می‌شود. شواهدی وجود دارد که یکی از دلایل مهم مرگ نورون‌ها در طی ایسکمی (۸) و همچنین در بیماری‌های ناشی از دژنره شدن نورون‌ها Neurodegenerative diseases مثل Amyotrophic Lateral Sclerosis (بیماری که طی آن نورون‌های حرکتی در نخاع، ساقه مغز و قشر حرکتی می‌میرند)، آلزایمر (Alzheimer) و پارکینسون (Parkinson) ناشی از افزایش بیش از اندازه کلسیم داخل سلولی می‌باشد (۹). همچنین اعتقاد بر این است که طی آسیب‌های نخاعی، افزایش سطح کلسیم داخل سلولی آبخاری از وقایع بیوشیمیایی از جمله فعال شدن کلپین را آغاز می‌نماید که منجر به مرگ نورون‌ها می‌شود (۱۰).

از آنجایی که افزایش بیش از حد سطح کلسیم سیتوزولی برای سلول‌ها و به خصوص نورون‌ها مرگ‌آور است، می‌توان این گونه فرض نمود که با جلوگیری از افزایش بیش از حد این یون در داخل سلول بتوان از مرگ نورون‌ها جلوگیری و یا حداقل مرگ این سلول‌ها را به تاخیر انداخت. بدین منظور، یکی از این روش‌ها می‌تواند استفاده از کلیت‌کننده‌های کلسیم (Calcium Chelators) باشد که قادر است کلسیم را در خارج سلول کلیت‌نماید. در این خصوص مطالعاتی

سنجش آپوپتوزیس

آپوپتوزیس در نورون‌های حرکتی (با تاکید بر جنبه‌های مورفولوژیکی)، توسط رنگ آمیزی هسته و سیتوپلاسم سنجش شد. بدین منظور برش‌های نخاع با ترکیبی از دو رنگ فلوروسنت یعنی پروپیدیوم آیوداید (Propidium Iodide، ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در PBS به مدت ۱۵ دقیقه) و هوخست ۳۳۳۴۲ (Hoechst 33342)، ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در PBS به مدت ۱ دقیقه) رنگ آمیزی شدند. اتصال رنگ هوخست ۳۳۳۴۲ به DNA به محققین این اجازه را می‌دهد تا متراکم شدن هسته و کروماتین را برای تعیین کیفی آپوپتوزیس در سلول‌ها مورد مطالعه قرار دهند (۱۴). سپس برش‌ها با PBS شست‌وشو (۳ بار و هر بار ۵ دقیقه) و با اضافه نمودن مخلوط PBS-گلیسرول (۱:۱) توسط لامل پوشیده شدند. در برش‌های نخاع، نورون‌های حرکتی توسط مشخصات مورفولوژیکی (جسم سلولی و هسته بزرگ) و موقعیت (شاخ شکمی) مورد شناسایی قرار گرفتند. نورون‌های حرکتی آپوپتوتیک، چروکیدگی سلولی، تراکم هسته و کروماتین را به نمایش گذاشتند. عکس‌های دیجیتال با دوربین متصل به میکروسکوپ فلوروسنس (المپوس، ژاپن) با بزرگ‌نمایی $\times 400$ گرفته شدند. درصد قابلیت حیات نورون‌های حرکتی به وسیله شمارش تصادفی این نورون‌ها در ۱۲ شاخ شکمی نخاع و مقایسه آن با گروه کنترل تعیین گردید.

الکتروفورز ژل آگارز جهت شناسایی ظهور فراگمنت‌های نوکلئوزومی DNA (Nucleosomal DNA Fragmentation) مورد استفاده قرار گرفت. DNA از قطعات تازه تهیه شده (لحظه صفر) و قطعات کشت شده برای ۲۴ ساعت توسط کیت استخراج DNA (پرومگا، آمریکا) و بر اساس دستورالعمل این کیت استخراج شد. مقادیر مساوی DNA استخراج شده از هر نمونه در ژل آگارز ۲ درصد که توسط اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شده بود، الکتروفورز و سپس تحت اشعه ماورا بنفش توسط دستگاه ژل داکومنتیشن (سین جین، انگلستان) عکس گرفته شد.

مواد

ترکیب

(tdmtn) N, N, N', N'-tetrakis (2-aminoethyl)2, 2-dimethyl-propane-1, 3-diamine

از واکنش ۲، ۲-دی‌آمینو پروپان با توسیل ازیریدین در بنزن و سپس هیدرولیز محصول به دست آمده با اسید هیدروبرومیک بر اساس روش ارائه شده توسط خانمحمدی و همکاران (۱۲) سنتز گردید. این ترکیب ($C_{13}H_{34}N_6$) با وزن مولکولی ۲۷۴/۴۵ و محلول در آب دارای ۴ گروه آمینی آزاد می‌باشد که به عنوان یک پلی‌آمین مطرح است.

آنالیز آماری

داده‌ها به صورت $Mean \pm SD$ بیان شدند. آنالیز واریانس (ANOVA) همراه با آزمون Tukey برای سنجش آماری داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت. $p < 0.05$ به عنوان سطح معنی دار بودن داده‌ها در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

آپوپتوزیس در نورون‌های حرکتی

در برش‌های نخاع گرفته شده از قطعات تازه تهیه شده (لحظه صفر)، نورون‌های حرکتی جسم سلولی و هسته بزرگ و توزیع طبیعی کروماتین هسته‌ای و بدون هیچ‌گونه علائم آپوپتوزیس را نشان دادند (شکل ۱A).

نیز وجود دارد که EGTA (به عنوان کلیت کننده قوی کلسیم) توانسته است آپوپتوزیس را در نورون‌های حرکتی قطع کند. کشت شده نخاع (۱۱) و سلول‌های HL-60 (۳) مهار نماید. بنابراین در تحقیق حاضر، ترکیب پلی‌آمینی tdmtn با قابلیت کلیت‌کنندگی کلسیم که توسط خانمحمدی و همکاران (۱۲) سنتز و معرفی شده است مورد استفاده قرار گرفت تا اثر آن بر روی آپوپتوزیس نورون‌های حرکتی قطع کند کشت شده نخاع موش بالغ مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

حیوانات

در این تحقیق موش‌های ماده بالغ Balb/c با میانگین وزنی 22 ± 3 گرم، از انستیتو پاستور ایران خریداری شده و مورد استفاده قرار گرفتند. حیوانات در قفس‌های پلاستیکی در اتاق حیوانات با درجه حرارت 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد و نور کنترل شده ۱۲ ساعت تاریکی ۱۲ ساعت روشنایی با دسترسی به آب و غذای کافی نگهداری شدند. در این پژوهش اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شده است. این طرح مصوبه کمیته اخلاق زیستی دانشگاه اراک می‌باشد.

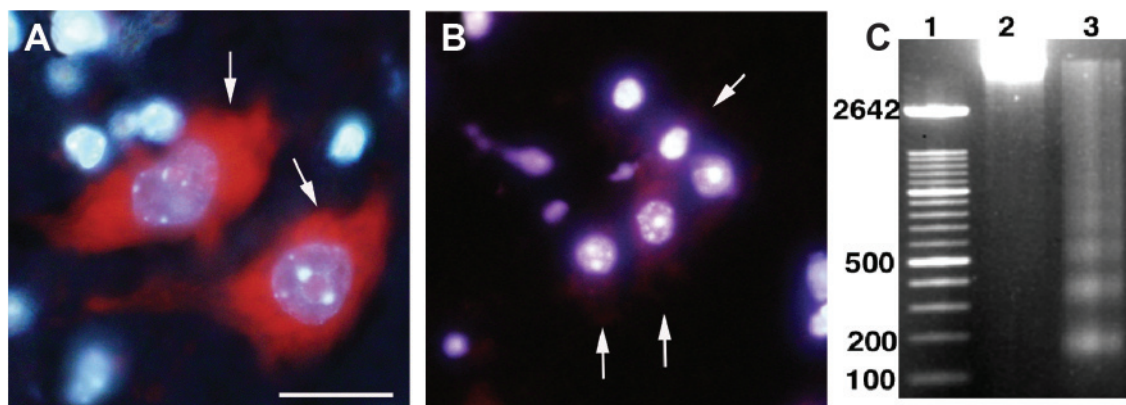
تهیه قطعات نخاع

ابتدا موش‌ها توسط تزریق سدیم پنتوباریتال (۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش و سرانجام توسط شکافتگی قلب کشته شدند. پس از باز نمودن ناحیه پشت حیوان، نخاع خارج و در Phosphate-Buffered Saline (PBS) $(pH = 7.4)$ قرار گرفت سپس ناحیه سینه‌ای نخاع (۱۳) توسط دستگاه قطعه‌کننده بافت Tissue Chopper (استولتینگ، آمریکا) به طور عرضی به قطعات ۴۰۰ میکرونی بریده شده و این قطعات در پلیت‌های پلاستیکی چهارخانه استریل که حاوی ۴۵۰ میکرولیتر محیط کشت بود قرار گرفتند (در هر خانه ۴ قطعه). محیط کشت متشکل از ترکیبی شامل ۵۰ درصد Minimum Essential Medium (MEM) ۲۵ درصد Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) ۲۵ درصد، سرم اسب، ۲۵ میلی‌مولار

N-2-hydroxyethyl piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) ۶ گرم در لیتر گلوکز و یک درصد پنی‌سیلین-استرپتومایسین با $pH = 7.3 - 7.4$ بود. سپس قطعات نخاع در یک انکوباتور CO_2 دار (ممرت، آلمان) در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای ۶ ساعت انکوبه شدند.

فیکس و برش‌گیری قطعات

قطعات تازه تهیه شده (لحظه صفر) و قطعات کشت شده برای ۶ ساعت در فیکساتور استفانینی (۲ درصد پارافورمالدهاید، ۰/۲ درصد اسید پیکریک در ۰/۱ مولار فسفات بافر، $pH = 7.2$) برای حداقل ۲ ساعت فیکس شدند. این قطعات در PBS شست‌وشو (۳ بار و هر بار ۵ دقیقه) و سپس در محلول ۲۰ درصد ساکارز در PBS به مدت ۲۴ ساعت در درجه حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. قطعات توسط دستگاه کرایوست (لایکا، آلمان) با ضخامت ۱۰ میکرون برش‌گیری و بر روی لام‌هایی که توسط پلی-ال-لازین (Poly-L-Lysine) پوشیده شده بودند قرار گرفته و سپس در ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند.

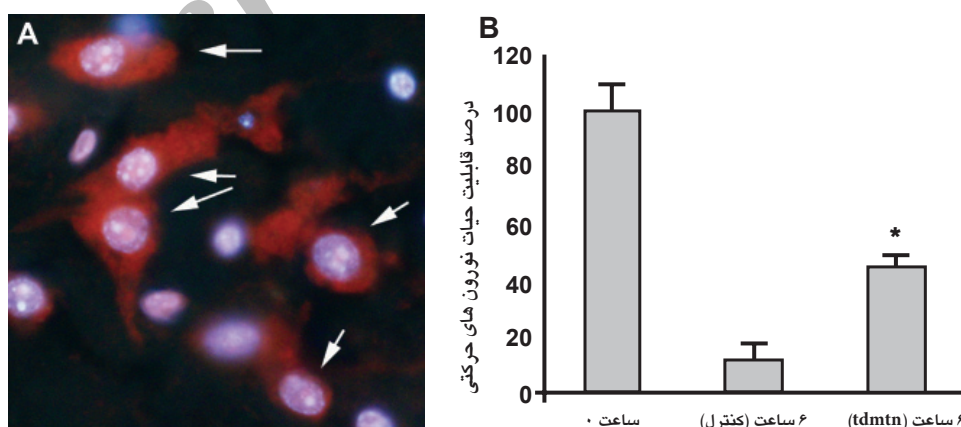


شکل ۱: (A-B) رنگ‌آمیزی برش‌های تهیه شده از قطعات نخاع با پروپیدیوم آیوداید (قرمز) و هوخست ۳۳۳۴۲ (آبی) تغییرات مورفولوژیکی آپوپتوزیس را در نورون‌های حرکتی نشان داد. (A) نورون‌های حرکتی طبیعی از قطعات تازه تهیه شده (لحظه صفر) با جسم سلولی و هسته بزرگ. (B) نورون‌های حرکتی سبب آپوپتوزیس با چروکیدگی سلول و متراکم شدن هسته و کروماتین از قطعات کشت شده بعد از ۶ ساعت شده است. فلش‌ها نورون‌های حرکتی را نشان می‌دهند. (۲۵ میکرون: Scale bar). (C) الکتروفورز ژل آگارز از DNA مربوط به قطعات کشت شده برای ۲۴ ساعت نشان دهنده ظهور فراگمنت‌های نوکلئوزومی DNA به صورت طرح نردبانی (DNA ladder) بود. ستون ۱: مارکر (اعداد به صورت Base Pairs بیان شده‌اند). ستون ۲: DNA از قطعات تازه تهیه شده (لحظه صفر). ستون ۳: DNA از قطعات کشت شده برای ۲۴ ساعت.

مهار آپوپتوزیس و افزایش قابلیت حیات نورون‌های حرکتی کاربرد ترکیب *tdmtn* (۵ میلی‌مولار) به عنوان ماده‌ای که سلول‌ها به آن نفوذپذیر می‌باشند، توانست به طور موثری متراکم شدن هسته و کروماتین را در نورون‌های حرکتی قطعات کشت شده برای ۶ ساعت در مقایسه با گروه کنترل (شکل ۱B) مهار نماید (شکل ۲A). در این لحظه زمانی، این ماده همچنین توانست درصد قابلیت حیات نورون‌های حرکتی را در شاخ‌های شکمی نخاع به طور معنی‌داری ($p < 0.01$) در مقایسه با گروه کنترل افزایش دهد (شکل ۲B). با این وجود این ترکیب از مهار ظهور فراگمنت‌های نوکلئوزومی DNA در قطعات کشت شده برای ۲۴ ساعت (به عنوان اولین زمانی که این فراگمنت‌ها مشاهده شد) عاجز ماند (داده‌ها نشان داده نشده است).

برعکس بیشتر نورون‌های حرکتی از قطعات کشت شده برای ۶ ساعت، نشانه‌های مورفولوژیکی مشخص آپوپتوزیس شامل چروکیدگی سلول Cell Shrinkage و همچنین متراکم شدن هسته و کروماتین (Nuclear and Chromatin Condensation) را به نمایش گذاشتند (شکل ۱B).

برای تایید بیشتر آپوپتوزیس در سلول‌های قطعات نخاع، ظهور فراگمنت‌های نوکلئوزومی DNA بر روی ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت. DNA استخراج شده از قطعات کشت شده برای ۲۴ ساعت طرح نردبانی (DNA ladder) را نشان داد (شکل ۱C، ستون ۳)، در حالی که DNA از قطعات کنترل بیانگر DNA دست نخورده با وزن مولکولی بالا بود (شکل ۱C، ستون ۲).



شکل ۲: (A) نورون‌های حرکتی از برش‌های قطعات نخاع رنگ‌آمیزی شده با پروپیدیوم آیوداید (قرمز) و هوخست ۳۳۳۴۲ (آبی). نورون‌های حرکتی از قطعات تیمار شده با ترکیب *tdmtn* (۵ میلی‌مولار) برای ۶ ساعت، مهار تغییرات مورفولوژیکی آپوپتوزیس را در مقایسه با گروه کنترل (شکل ۱B) به خوبی نشان می‌دهد. فلش‌ها بیانگر نورون‌های حرکتی می‌باشند. (B) درصد قابلیت حیات نورون‌های حرکتی در قطعات تازه تهیه شده (لحظه صفر) و قطعات کشت شده برای ۶ ساعت در حضور و عدم حضور (کنترل) ترکیب *tdmtn* (۵ میلی‌مولار). *Tdmtn* توانست به طور معنی‌داری ($p < 0.01$) درصد قابلیت حیات نورون‌های حرکتی را افزایش دهد.

بحث

در تحقیق حاضر کشت قطعات نخاع موش بالغ مورد استفاده قرار گرفت تا یکی از مکانیسم‌های احتمالی دخیل در مرگ نورون‌های حرکتی این قطعات مورد مطالعه قرار گیرد. این بررسی نشان داد که نورون‌های حرکتی به وسیله آپوپتوزیس مردند و ترکیب پلی‌آمینی tdmtn توانست آپوپتوزیس را در این نورون‌ها مهار نماید.

مرگ نورون‌های حرکتی در سیستم اعصاب مرکزی یکی از وقایع مورد بحث در آسیب‌های نخاعی و همچنین در بیماری‌های ناشی از دژنره شدن نورون‌ها می‌باشد که تا کنون درمان مشخصی برای آنها ارایه نشده است. بدون شک بررسی مکانیسم‌های دخیل در مرگ این نورون‌ها می‌تواند در افزایش دانش پایه‌ای در خصوص این مشکل سهم عمده‌ای ایفا نماید. بدین منظور، استفاده از کشت قطعات نخاع گرفته شده از پستانداران بالغ می‌تواند به عنوان یک مدل مناسب *in vitro* مورد توجه قرار گیرد. در این اواخر چنین مدلی در پستانداران بالغ همچون موش (۱۳، ۱۵) و رت (۱۶) مورد استفاده قرار گرفته است.

در مطالعه حاضر با استفاده از رنگ آمیزی فلوئورسنت نشان داده شد که اکثر نورون‌های حرکتی در قطعات نخاع کشت شده برای ۶ ساعت مشخصه‌های مورفولوژیکی مشخص آپوپتوزیس از جمله چروکیدگی سیتوپلاسم، متراکم شدن هسته و کروماتین را نشان دادند. از طرفی ظهور فراگمت‌های نوکلئوزومی DNA که به عنوان یکی از نشانه‌های بیوشیمیایی مشخص آپوپتوزیس مطرح می‌باشد (۱۷)، در DNA قطعات کشت شده برای ۲۴ ساعت مشاهده شد که می‌توانست بیانگر این مطلب باشد که علاوه بر نورون‌های حرکتی، سایر سلول‌های موجود در این قطعات از جمله نورون‌های حسی، نورون‌های واسطه و سلول‌های گلیا نیز سبب آپوپتوزیس شده‌اند.

از آنجا که افزایش بیش از اندازه غلظت داخل سلولی کلسیم در مرگ نورون‌ها در طی آسیب‌های نخاع به اثبات رسیده است (۱۰)، این طور می‌توان فرض کرد که استرس‌های ناشناخته وارد شده به نورون‌های حرکتی در قطعات کشت شده نخاع به احتمال توانسته است منجر به افزایش بیش از اندازه کلسیم داخل سلولی در این نورون‌ها شود که به نوبه خود در ساعت‌های اولیه کشت، آپوپتوزیس را در این سلول‌ها القا کرده باشد. در صورتی که این فرضیه درست باشد، جلوگیری از کلسیم داخل سلولی به عنوان مثال با استفاده از کلیت‌کننده‌های کلسیم می‌تواند از آپوپتوزیس در این نورون‌ها جلوگیری نماید. در این خصوص گزارش‌هایی مبنی بر مهار آپوپتوزیس در نورون‌های حرکتی نخاع (۱۱) و سلول‌های HL-60 (۳) توسط EGTA (با قابلیت کلیت‌کنندگی قوی کلسیم) وجود دارد. در مطالعه حاضر، tdmtn توانست پس از گذشت ۶ ساعت در محیط کشت به طور قابل توجهی آپوپتوزیس را در نورون‌های حرکتی در مقایسه با گروه کنترل مهار نماید. این ترکیب با دارا بودن چهار گروه آمینی می‌تواند به عنوان ماده‌ای با قابلیت کلیت‌کنندگی یون‌های کلسیم خارج سلولی مطرح باشد (۱۲). در تایید این مطلب، با توجه به نقش یون کلسیم در انعقاد خون، در نتایج چاپ نشده نشان دادیم که این ترکیب قادر بوده به عنوان یک ماده موثر ضد انعقاد خون عمل نماید. بنابر این مهار آپوپتوزیس در نورون‌های حرکتی توسط tdmtn به احتمال می‌تواند فرضیه آپوپتوزیس القا شده توسط کلسیم را در این نورون‌ها توجیه نماید.

فعال شدن پروتئازهای وابسته به کلسیم مثل کلپین در طی آپوپتوزیس نورون‌های حرکتی (۱۵) و همچنین مرگ نورونی در طی آسیب‌های نخاعی (۱۰) گزارش شده است. طی آپوپتوزیس، فرم فعال این آنزیم قادر است پروتئین‌های غشایی و اسکلت سلولی (که تمامیت غشا و سلول را تضمین می‌نمایند) را در نورون‌ها تخریب نماید (۱۸). همچنین مشخص شده است که این پروتئاز قادر است پروتئین‌های ماتریکس هسته (که تمامیت هسته را تضمین می‌کنند) را مورد حمله قرار داده و منجر به فرو پاشی ساختار هسته‌ای و تغییراتی از جمله متراکم شدن هسته و کروماتین گردد (۱۹). علاوه بر آن در طی آپوپتوزیس نقش فعالیت نوکلئازهای داخلی فعال شده به وسیله کلسیم که با شکستن DNA از نواحی بین نوکلئوزوم‌ها منجر به تشکیل فراگمت‌های نوکلئوزومی DNA بر روی ژل آگارز می‌گردد به اثبات رسیده است (۶). بنابراین این احتمال وجود دارد که تغییرات مورفولوژیکی (سیتوپلاسمی و هسته‌ای) مشاهده شده در نورون‌های حرکتی سبب آپوپتوزیس و همچنین ظهور فراگمت‌های نوکلئوزومی DNA در قطعات کشت شده نخاع به ترتیب ناشی از فعالیت پروتئازها و نوکلئازهای داخلی وابسته به کلسیم و در اثر افزایش غیرطبیعی یون‌های کلسیم داخل سلولی باشد.

ترکیب tdmtn با دارا بودن گروه‌های آمینی از گروه ترکیبات پلی‌آمین محسوب می‌شود (۱۲). اگر چه نقش پلی‌آمین‌ها در القا آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی پستان گزارش شده است (۲۰)، نقش آنها در تراید و تمایز سلولی Proliferation and Differentiation (۲۱) و همچنین مهار آپوپتوزیس (۲۲) مطرح می‌باشد. اثر محافظتی پلی‌آمین‌ها بر روی سلول‌های منجر به آپوپتوزیس می‌تواند ناشی از قابلیت این ترکیبات در مختل کردن وقایع میانجی شده توسط Caspase-3 (یکی از القاکننده‌های آپوپتوزیس) باشد (۲۳). همچنین اعتقاد بر این است که اثر مهارتی پلی‌آمین‌هایی همچون اسپرمین و اسپرمیدین بر روی آپوپتوزیس سلول‌های تیموس می‌تواند از مهار فعالیت نوکلئازهای داخلی ناشی شده باشد (۲۴). بنابراین این احتمال نیز وجود دارد که مهار آپوپتوزیس در نورون‌های حرکتی از خاصیت پلی‌آمین این ترکیب ناشی شده باشد.

ذکر این نکته که مکانیسم مهار آپوپتوزیس توسط tdmtn از طریق کلیت کردن کلسیم صورت گرفته یا ناشی از خصوصیت پلی‌آمین آن و یا هر دو است، به خوبی معلوم نیست و نیازمند مطالعه بیشتر در این زمینه است.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از کشت قطعات نخاع موش بالغ نشان می‌دهد که پس از ۶ ساعت در محیط کشت، نورون‌های حرکتی به وسیله آپوپتوزیس می‌میرند. کاربرد tdmtn به عنوان یک ترکیب پلی‌آمین با قابلیت کلیت‌کنندگی کلسیم، توانست آپوپتوزیس را در این نورون‌ها مهار نماید. بنابراین این ترکیب با دارا بودن خصوصیات ذکر شده احتمالاً می‌تواند به عنوان یک عامل ضد آپوپتوزیس (حداقل در نورون‌های حرکتی نخاع) پیشنهاد گردد.

تقدیر و تشکر

این پژوهش تحت حمایت مالی دانشگاه اراک صورت گرفته و نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از این دانشگاه اعلام می‌نمایند.

References

- Bennett MR, Huxlin KR. Neuronal cell death in the mammalian nervous system: the calmodulin hypothesis. *Gen Pharmacol* 1996; 27(3): 407-419.
- Mattson MP, Chan SL. Calcium orchestrates apoptosis. *Nat Cell Biol*. 2003; 5(12): 1041-1043.
- Kajitani N, Kobuchi H, Fujita H, Yano H, Fujiwara T, Yasuda T, et al. Mechanism of A23187-induced apoptosis in HL-60 cells: dependency on mitochondrial permeability transition but not on NADPH oxidase. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2007; 71(11): 2701-2711.
- Sasamura S, Furukawa K, Shiratori M, Motomura S, Ohizumi Y. Antisense-inhibition of plasma membrane Ca^{2+} pump induces apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Jpn J Pharmacol*. 2002; 90(2): 164-172.
- Rizzuto R, Pinton P, Ferrari D, Chami M, Szabadkai G, Magalhaes PJ, et al. Calcium and apoptosis: facts and hypotheses. *Oncogene*. 2003; 22(53):8619-8627.
- Nagata S. DNA degradation in development and programmed cell death. *Annu Rev Immunol*. 2005; 23: 853-875.
- Jeong SY, Seol DW. The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Rep*. 2008; 41(1): 11-22.
- Ransom BR, Brown AM. Intracellular Ca^{2+} release and ischemic axon injury: the Trojan horse is back. *Neuron*. 2003; 40(1): 2-4.
- Vosler PS, Brennan CS, Chen J. Calpain-mediated signaling mechanisms in neuronal injury and neurodegeneration. *Mol Neurobiol*. 2008; 38(1): 78-100.
- Ray SK, Hogan EL, Banik NL. Calpain in the pathophysiology of spinal cord injury: neuroprotection with calpain inhibitors. *Brain Res Rev*. 2003; 42(2): 169-185.
- Momeni HR, Kanje M. The calpain inhibitor VI prevents apoptosis of adult motor neurons. *Neuroreport*. 2005; 16(10): 1065-1068.
- Khanmohamadi H, Amani S, Lang H, Tobias R. Synthesis and characterization of Mg(II), Mn(II), Zn(II) and Cd(II) complexes with a new heptaaza schiff base pendant-armed macrocycle: X-ray crystal structure, NMR and computational study. *Inorganic Chimica Acta*. 2007; 360: 579-587.
- Momeni HR, Kanje M. Calpain inhibitors delay injury-induced apoptosis in adult mouse spinal cord motor neurons. *Neuroreport*. 2006; 17(8): 761-765.
- Sgonc R, Gruber J. Apoptosis detection: an overview. *Exp Gerontol*. 1998; 33(6): 525-533.
- Momeni HR, Azadi S, Kanje M. Calpain activation and apoptosis in motor neurons of cultured adult mouse spinal cord. *Funct Neurol*. 2007; 22(2):105-110.
- Pizzi M, Benarese M, Boroni F, Goffi F, Valerio A, Spano PF. Neuroprotection by metabotropic glutamate receptor agonists on kainate-induced degeneration of motor neurons in spinal cord slices from adult rat. *Neuropharmacology*. 2000; 39(5): 903-910.
- Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. 1980; 284(5756): 555-556.
- Ray SK, Matzelle DC, Wilford GG, Hogan EL, Banik NL. E-64-d prevents both calpain upregulation and apoptosis in the lesion and penumbra following spinal cord injury in rats. *Brain Res*. 2000; 867(1-2):80-89.
- Mellgren RL. Proteolysis of nuclear proteins by mu-calpain and m-calpain. *J Biol Chem*. 1991; 266(21): 13920-13924.
- Holst CM, Frydman B, Marton LJ, Oredsson SM. Differential polyamine analogue effects in four human breast cancer cell lines. *Toxicology*. 2006; 223(1-2): 71-81.
- Pegg AE. Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and a target for chemotherapy. *Cancer Res*. 1988; 48(4): 759-774.
- Harada J, Sugimoto M. Polyamines prevent apoptotic cell death in cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res*. 1997; 753(2): 251-259.
- Moffatt J, Hashimoto M, Kojima A, Kennedy DO, Murakami A, Koshimizu K, et al. Apoptosis induced by 1'-acetoxychavicol acetate in Ehrlich ascites tumor cells is associated with modulation of polyamine metabolism and caspase-3 activation. *Carcinogenesis*. 2000; 21(12): 2151-2157.
- Brune B, Hartzell P, Nicotera P, Orrenius S. Spermine prevents endonuclease activation and apoptosis in thymocytes. *Exp Cell Res*. 1991; 195(2): 323-329.