Archive of SID

دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی - پژوهشی

اثر داروی دپرنیل بر سطح سیناپتوفیزین و استیل کولین ترانسفراز پس از انجام آکسوتومی عصب سیاتیک در موش صحرایی

نویسندگان: مرجان حشمتی[1]، دکتر تقی طریحی[2] و دکترسیدجواد مولی[3]

۱. دانش‌آموخته دکتری علوم تشریح دانشگاه تربیت مدرس
۲. استاد گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۳. استادیار گروه ژنتیک دانشکده علوم پایه دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

تأثیر نروپروتکتیوی داروی دپرنیل (Deprenyl) به‌عنوان یک مهارکننده منوآمینواکسیداز نوع «ب» (Type B) و نقش ضدآپوپتوزی آن در حفظ ساختمان موتونرون بعداز آکسوتومی عصب محیطی، مانند عصب سیاتیک، مشخص شده است. عملکرد نرون وابسته به حضور واسطه‌های شیمیایی، مانند استیل‌کولین و گیرنده‌های خاص آن است. استیل‌کولین توسط آنزیم استیل‌کولین ترانسفراز ساخته شده، در درون وزیکول پیش سیناپسی تجمع می‌کند سپس به‌دنبال تحریک به فضای سیناپسی تخلیه می‌گردد. همچنین غشای وزیکول‌های سیناپسی، حاوی پروتئین‌هایی از قبیل سیناپتوفیزین است که بررسی آن‌ها می‌تواند به‌عنوان شاخص برای عملکرد نرون مورد استفاده قرار گیرد.

در این تحقیق برای اولین بار تأثیر داروی دپرنیل در حفظ عملکرد موتونرون‌های شاخ قدامی نخاع با توجه به میزان بیان آنزیم استیل‌کولین ترانسفراز و سیناپتوفیزین بررسی گردید.

جهت انجام تحقیق، نوزادان موش صحرایی به ۲ گروه مطالعه و کنترل تقسیم شدند و پس از انجام عمل آکسوتومی (قطع) عصب سیاتیک در روز سوم به مدت ۲۱ روز تزریق داخل صفاقی محلول سرم فیزیولوژی (۰/۹ درصد) در گروه کنترل و دپرنیل (۲/۵ mg/kg) در گروه مطالعه انجام شد. در مرحله بعد، پس از پرفیوژن حیوانات با پارافرمالدئید ۴ درصد، نخاع در سگمان L4-L6 خارج و پس از انجام مراحل پروسه بافتی و تهیه برش ۸ میکرومتری بررسی به روش ایمنوهیستوشیمی انجام شد.

نتایج نشان می‌دهد که در گروهی که دپرنیل دریافت کرده‌اند میزان حضور آنزیم استیل‌کولین ترانسفراز و پروتئین سیناپتوفیزین افزایش یافته است.

واژه‌های کلیدی: دپرنیل - آکسوتومی - سیناپتوفیزین - استیل‌کولین ترانسفراز

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

مرگ برنامه‌ریزی شده سلول یا آپوپتوز تقریباً در نیمی از سلول‌های عصبی سیستم اعصاب مرکزی و محیطی در طی دوران تکوین به‌وقوع می‌پیوندد [۱و۲] و پس از تولد به‌دنبال ضایعات عصبی، نظیر قطع عصب، بیماری آلزایمر و پارکینسون مجدداً به طور گسترده و چشمگیر رخ می‌دهد.

ادامه حیات سلول‌های عصبی به فاکتورهای نوروتروفیکی که از بافت هدف ترشح می‌شود و روی سلول خاص اثر می‌کند وابسته است. از جمله این فاکتورها می‌توان نوروتروفین‌ها را نام برد، مانند فاکتور رشدعصبی brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (NGF)، نوروتروفین ۳ (NT-3) و نوروتروفین ۴/۵ (NT-4/5).

در کسب این نتایج به تأثیر داروهایی که اثر نوروتروفیکی دارند، مانند دپرنیل توجه فراوانی شده است. این دارو تحت نام تجاری Selegiline، Anipryl و یا Eldepryl عرضه می‌شود [۳و۴] که به‌عنوان یک محافظت‌کننده عصبی، باعث رهاشدن مواد نوروتروفیکی از انتهای رشته‌های عصبی و نتیجتاً کاهش مرگ و میر سلول‌های عصبی و مهار آپوپتوز می‌گردد [۵] و امروزه در درمان آلزایمر و پارکینسون از آن استفاده می‌شود [۶] که به‌علت خاصیت مهارکنندگی فعالیت آنزیم MAO-B است [۷]. همچنین دپرنیل بر کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن از طریق افزایش آنزیم سوپراکسید دیس موتاز (SOD) تأثیر دارد [۸و۹].

حضور واسطه‌های شیمیایی، شاخصی در بیان میزان و چگونگی عملکرد نرون است که از میان این واسطه‌ها می‌توان استیل‌کولین، هیستامین، نوراپی‌نفرین و ... را نام برد [۱۰،۱۱و۱۲]. این مواد در وزیکول سیناپسی نرون پیش‌سیناپسی جمع و بعد از تحریک به فضای بین سیناپسی تخلیه می‌گردد که اثر تحریکی یا مهاری آن وابسته به نوع گیرنده موجود در نرون پس سیناپسی است.

در بررسی این مکانیسم از آنزیم استیل‌کولین ترانسفراز (ChAT) که سبب ساخته شدن نوروترنسمیتر استیل‌کولین می‌گردد به‌عنوان یک مارکر استفاده می‌شود [۱۳،۱۴و۱۵] که می‌توان با کمک آنتی‌بادی علیه آنزیم ChAT عملکرد نرون را در انتقال پیام عصبی بررسی کرد. همچنین در غشای وزیکول سیناپسی پروتئین‌هایی وجود دارد که ردیابی آن‌ها می‌تواند چگونگی حضور و توزیع وزیکول‌های حاوی واسطه‌های شیمیایی را مشخص کند. یکی از این پروتئین‌ها سیناپتوفیزین است که با کمک آنتی‌بادی علیه آن قابل تشخیص است [۱۶،۱۷،۱۸و۱۹].

مطالعات نشان می‌دهد بیماران دارای ضایعات عصبی، نظیر آلزایمر و پارکینسون، کاهش چشم‌گیری در پروتئین سیناپتوفیزین و آنزیم استیل‌کولین ترانسفراز دارند [۲۰،۲۱و۲۲].

با توجه به نتایج به‌دست آمده در تحقیقات گذشته، قطع عصب یا آکسوتومی افزایش مرگ آپوپتوزی درنرون رشته‌های مربوطه را باعث می‌شود [۲۳]. در این تحقیق با هدف بررسی اثر داروی دپرنیل در حفظ نرون و جلوگیری از مرگ آپوپتوزی به همراه حفظ عملکرد آن، بررسی کیفی چگونگی حضور آنزیم ChAT و پروتئین سیناپتوفیزین و نقش دپرنیل در این حضور به کمک روش ایمنوهیستوشیمی در موش صحرایی نژاد اسپراگو داولی (Sprague Dawley) پس از آکسوتومی عصب سیاتیک برای اولین بار صورت گرفت تا با تجزیه و تحلیل نتایج، راهکاری علمی برای جلوگیری از مرگ نرون‌های باقیمانده نخاع و حفظ عملکرد آن‌ها در نقل و انتقال پیام عصبی ارائه گردد.

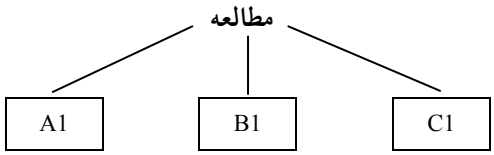
مواد و روش انجام تحقیق

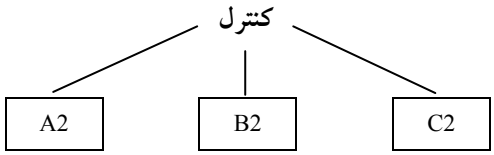
دراین تحقیق از موش صحرایی نژاد اسپراگو داولی – تهیه شده از انستیتو تحقیقات و سرم سازی رازی حصارک – استفاده گردید. تعداد موش‌های بارداری ۱۸ عدد بود که در ۲ گروه ۱) مطالعه، ۲) کنترل به‌طور تصادفی قرار گرفتند. سپس هر کدام جداگانه در داخل

www.SID.ir

Archive of SID

یک قفس طبق شرایط استاندارد مراقبت نگهداری شد. بعد از زایمان و ثبت تاریخ زایمان E=o تمام نوزادان متولد شده متعلق به یک مادر در یک زیرگروه قرار گرفت. تعداد زیر گروه‌ها به‌صورت زیر مشخص شد:





زمان و نوع تزریق در زیرگروه‌های مورد بررسی

A1= تزریق دپرنیل یک ساعت قبل از آکسوتومی

A2 = تزریق سرم فیزیولوژی یک ساعت قبل از آکسوتومی

B1= تزریق دپرنیل همزمان با آکسوتومی

B2= تزریق سرم فیزیولوژی همزمان با آکسوتومی

C1 = تزریق دپرنیل یک ساعت بعد از آکسوتومی

C2 = تزریق سرم فیزیولوژی یک ساعت بعد از آکسوتومی

در تمام زیرگروه‌ها، تزریق داخل صفاقی دپرنیل ۲/۵mg/kg (مطالعه) یا سرم فیزیولوژی (کنترل) صورت گرفت و حجم تزریق شده در هر بار ۱ دهم سی‌سی بود که به‌مدت ۲۱ روز، یعنی‌تا پایان دوره شیرخوارگی ادامه یافت.

تقسیم‌بندی زیر گروه‌های A1، B1، C1 و A2، B2 ، C2 بر حسب انجام تزریق نسبت به عمل آکسوتومی بود و این زمان براساس مطالعات تاتون (Tatton) [۵] و میزوتا (Mizuta) [۲۴] که به ترتیب ۴ و ۲ ساعت را گزارش کرده‌اند انتخاب شد.

پودر خالص دپرنیل وارداتی از شرکت اهران تهیه و جهت تزریق، محلول آن در سرم فیزیولوژی ۹ دهم درصد تهیه گردید. دوز تزریقی ۲/۵mg/kg براساس مطالعات کروز (Cruz) به‌دست آمد [۲۵و۲۶].

طبق گزارش‌های منتشر شده توسط محققین، آکسوتومی عصب سیاتیک در نوزادان ۳ روزه موش بیش‌ترین میزان مرگ آپوپتوزی نرون‌های شاخ قدامی نخاع را موجب می‌شود [۲۳]. در این تحقیق، نوزادان ۳ روزه با توجه به زیرگروه، به‌وسیله هیپوتومی بر روی یخ بیهوش و پس از شستشوی محل عمل با بتادین تحت شرایط استریل در ناحیه وسط ران سمت چپ برش پوستی زده شد. آنگاه با کنار زدن عضله دوسررانی و مشاهده عصب سیاتیک در ناحیه وسط ران، یعنی بین زانو و ستون مهره با کمک قیچی برش داده شد و حدود ۳-۲ میلی‌متر آن برای جلوگیری از رشد مجدد عصب خارج و بلافاصله محل برش پوستی با نخ جراحی 06 بخیه گردید. پس از شستشوی مجدد محل عمل و بهوش آمدن، نوزادان نزد مادران خود بازگردانده شدند و رسیدگی روزانه جهت دادن آب و غذای حبه (Pellet) و تزریق انجام شد.

پس از گذشت ۲۱ روز، از هر زیر گروه ۶ نمونه به‌طور تصادفی انتخاب و جهت مطالعه ایمنوهیستوشیمی و شمارش سلولی در نظر گرفته شدند. آن‌ها ابتدا با کلروفورم ۶۰mg/kg بیهوش شدند و سپس ترنس کاردیاک پرفیوژن با محلول سالین هپارینه شده ۱ در ۵ هزار و پارافرم آلدئید ۴ درصد در بافر فسفات ۰/۱ مولار انجام گرفت. پس از اتمام مرحله پرفیوژن سریعاً سگمان‌های نخاعی L4-L6 هم سطح با دیسک بین مهره‌ای T13-L1 و L1-L2 جدا و به فیکساتیو بافر فرمالین منتقل گردید.

در تمام نمونه‌های فیکس شده، مراحل آبگیری، شفاف‌سازی، آغشتگی و قالبگیری با پارافین انجام شد. سپس با میکروتوم روتاری مدل 820Leica از بلوک‌های پارافینی، برش‌های عرضی نخاع به صورت سریال به ضخامت ۸ میکرومتر تهیه شد. با توجه به انتهای پروکسیمال و دیستال قطعه نخاع هنگام قالب گیری و قراردادن مقاطع در حمام آب گرم و انتقال آن بر روی لام نیمه راست و چپ قابل تشخیص است.

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعه ایمنوهیستوشیمی

در این مرحله برای بررسی عملکرد سیناپس‌ها از آنتی‌بادی سیناپتوفیزین و استیل‌کولین ترانسفراز استفاده گردید، بدین‌ترتیب که بعداز خشک شدن نمونه‌ها بر روی لام در ۲ مرحله گزیلول، پارافین از مقاطع بافتی حذف و با استفاده از مراحل متوالی الکل نمونه‌ها به آب رسانده شد. آنگاه از تکنیک ایمنوهیستوشیمی غیرمستقیم دو مرحله‌ای استفاده گردید.

برای بررسی پروتئین سیناپتوفیزین مهار واکنش پراکسیداز اندوژن با محلول آب‌اکسیژنه ۳ درصد در بافر فسفات سالین (PBS) ۰/۰۱ مولار به مدت ۳۰ دقیقه و مهار واکنش زمینه با سرم نرمال بز ۵ درصد (منبع آنتی‌بادی ثانویه) به مدت ۱۵ دقیقه و سپس با آنتی‌بادی اولیه علیه سیناپتوفیزین (mouse anti-synaptophysin) (شرکت Serotec آلمان) ۱/۵۰۰ به مدت یک روز در دمای ۴ درجه انکوبه شد. پس از شستشو با بافر فسفات سالین، نمونه‌ها با آنتی‌بادی ثانویه کونجوگه با پراکسیداز علیه آنتی‌بادی اولیه (peroxidase conjugated goat anti-mouse) (شرکت DAKO آلمان) ۱/۱۰۰ به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. از محلول دی آمینوبنزیدین بافر فسفات سالین DAB ۰/۱ درصد در بافر فسفات سالین به همراه آب‌اکسیژنه ۰/۰۲ درصد جهت رسوب ذرات قهوه‌ای به‌دنبال تشکیل کمپلکس DAB/peroxidase استفاده شد. پس ازاین مرحله با غلظت‌های مختلف الکل، آبگیری، شفاف‌سازی، و چسباندن لامل انجام شد. سپس با توجه به گزارش سانچز (Sanchez) [۲۷] در ارائه الگوی واکنش سیناپتوفیزین (جدول ۲) نرون‌های حرکتی ۱۰ برش با در نظر گرفتن نوع الگو شمارش شدند.

برای رؤیت آنزیم استیل‌کولین ترانسفراز مهار واکنش پراکسیداز اندوژن با محلول آب‌اکسیژنه ۰/۶ درصد در بافر فسفات سالین ۰/۰۱ مولار به مدت ۳۰ دقیقه و مهار واکنش زمینه با سرم نرمال بز ۵ درصد به همراه تریتون X–100 ، ۳ درصد در بافر فسفات سالین به مدت یک ساعت و سپس با آنتی‌بادی اولیه علیه آنزیم استیل‌کولین ترانسفراز (mouse anti choline Acetyltransferase) (شرکت Chemicon آمریکا) ۱/۳۰۰ به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۴ درجه انکوبه شد [۱۵و۸]. پس از شستشو با بافر فسفات سالین، نمونه‌ها با آنتی‌بادی‌ثانویه کونجوگه پراکسیداز علیه آنتی‌بادی اولیه (peroxidase conjugated goat anti-mouse) (شرکت DAKO آلمان) ۱/۱۰۰ به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. پس از شستشو با بافر فسفات سالین، از محلول دی‌آمینو بنزیدین (DAB) ۰/۰۲ درصد به همراه آب آکسیژنه ۰/۰۱۵ درصد و نیکل سولفات ۰/۴ درصد در بافر فسفات سالین به‌منظور تشکیل رسوب قهوه‌ای ناشی از کمپلکس DAB/peroxidase استفاده شد و پس از آن، آبگیری، شفاف‌سازی و چسباندن لامل انجام گردید. با توجه به تقسیم‌بندی باربر (Barber) موتونرون‌ها براساس شدت واکنش [۲۸] در ۱۰ برش شمارش شدند. گروه کنترل نیز در نظر گرفته شد که مرحله انکوبه با آنتی‌بادی اولیه علیه سیناپتوفیزین و استیل‌کولین ترانسفراز دراین بررسی حذف گردید.

مطالعه شمارش سلولی

در این مرحله برای شمارش نرون‌های حرکتی نخاع از رنگ‌آمیزی اختصاصی اجسام نیسل «کرسیل فست ویولت» استفاده شد به‌طوری که پس از مراحل آبدهی، رنگ‌آمیزی، آبگیری، شفاف کردن با گزیلل و مانت کردن لام‌ها، شمارش سلولی نرون‌های حرکتی در قسمت ونترولترال هر دو نیمه نخاع با بزرگنمایی 400× میکروسکوپ نوری انجام شد. از هر ۵ برش سریال، یکی انتخاب گردید و نرون‌هایی که دارای هسته بزرگ‌تر از ۱۰mm و حداقل یک هستک مشخص بودند شمرده شدند. در خاتمه، عکس‌ها با کمک دوربین پاناسونیک مدل CP220 گرفته شد.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

در بررسی مقاطع عرضی نخاع موش صحرایی در سگمان‌های L4-L6 ، کاهش تعداد نرون‌های حرکتی شاخ قدامی نخاع به‌دنبال عمل آکسوتومی عصب سیاتیک نسبت به طرف سالم (سمتی که هیچ‌گونه جراحی نشده) مشاهده گردید که این کاهش تعداد نرون‌ها نشانگر آپوپتوز (apoptosis) یا همان مرگ برنامه‌ریزی شده است [۲۹] (شکل ۱). کاهش تعداد نرون‌ها در گروهی که داروی دپرنیل دریافت کرده بودند کم‌تر از گروهی بود که سرم فیزیولوژی دریافت کردند (جدول ۱).

بررسی ایمنوهیستوشیمیایی پروتئین سیناپتوفیزین با توجه به انواع شکل تظاهر این پروتئین (جدول ۲) در اطراف جسم سلولی و ابتدای دندریت و آکسون در زیر گروه‌های A1 ، B1 و C1 نسبت به زیرگروه‌های A2، B2 و C2 نشانگر تغییراتی در نحوه تظاهر سیناپتوفیزین در سمت آکسوتومی شده است؛ به‌طوری که در زیر گروه‌هایی که دپرنیل دریافت کرده‌اند سیناپتوفیزین بیش‌تر به‌صورت الگویی کامل و متراکم در حاشیه سلول «a» است (شکل 2A) (از بین زیرگروه‌ها، در زیر گروه A1 این ویژگی مشخص‌تر است)؛ اما در گروهی که سرم فیزیولوژی دریافت کرده تظاهر سیناپتوفیزین بیش‌تر به‌صورت نقاط تیره رنگ پراکنده در سلول «b» است (شکل 2B).

بررسی ایمنوهیستوشیمیایی آنزیم استیل‌کولین ترانسفراز در اطراف جسم سلولی و زوایه دندریتی و آکسونی در مقاطع عرضی نخاع موش صحرایی در سمتی که آکسوتومی شده نشانگر این یافته است که دپرنیل سبب افزایش سطح این آنزیم گردیده، به‌طوری که در زیرگروه‌هایی که دپرنیل دریافت کرده‌اند (A1 ، B1 و C1) نسبت به زیرگروه‌هایی که سرم فیزیولوژی دریافت کرده‌اند (A2 ، B2 و C2) اختلاف قابل توجهی در شدت واکنش دیده شد. برپایه گروه‌بندی باربر در گروه‌هایی که

جدول ۱ میانگین و انحراف‌معیار موتونرون‌های شاخ‌قدامی‌نخاع در طرف آکسوتومی‌شده و سالم‌در زیرگروه‌های A1، B1، C1، A2، B2 و C2

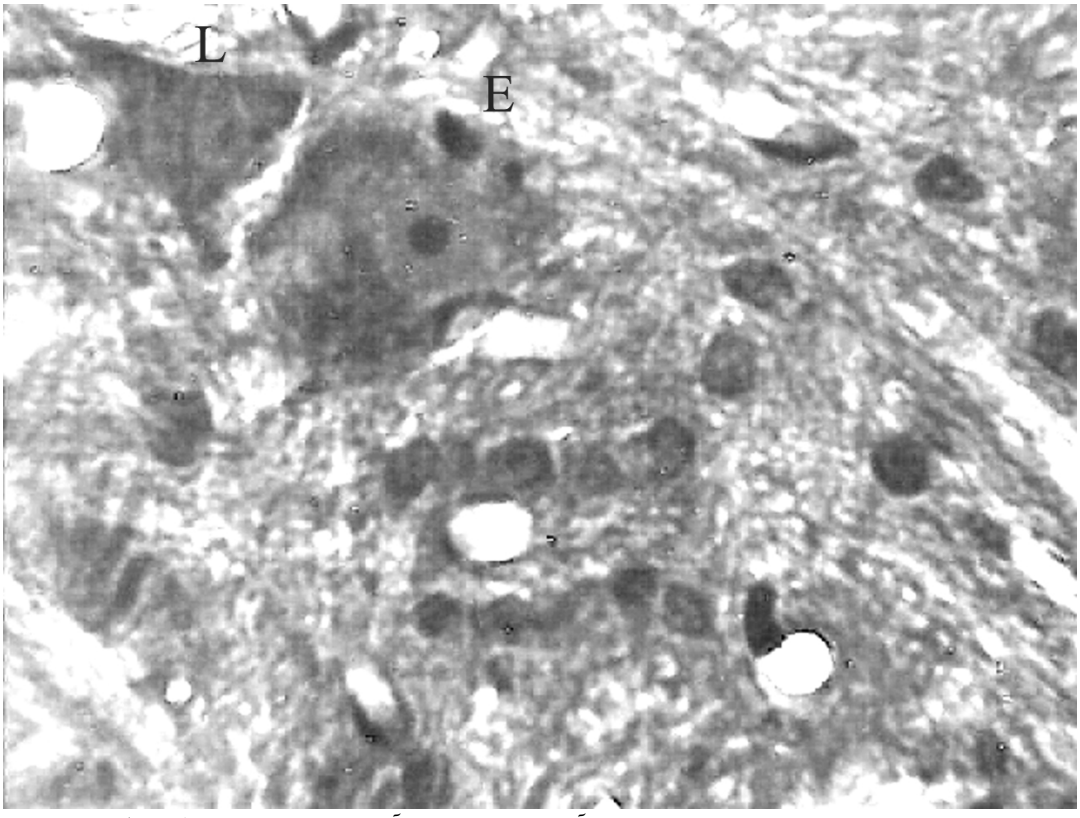
میانگین و انحراف معیار / زیرگروه‌ها	طرف آکسوتومی شده	طرف سالم	T-test
A1	4.301204±1.7278	6.36546±2.10197	P<0.0000
B1	3.90877±1.4062	6.01754±1.8046	P<0.0000
C1	3.88501±1.4761	6.45644±2.0080	P<0.0000
A2	2.83687±1.15135	6.209219±1.8908	P<0.0000
B2	2.84423±1.2829	6.32225±1.9729	P<0.0000
C2	2.84676±1.2393	6.40845±1.78194	P<0.0000

جدول ۲ انواع الگوی تظاهر سیناپتوفیزین براساس مطالعات سانچز

الگویی کامل در حاشیه سلول و ابتدای دندریت	a
چند سلول کروماتولیز حاوی تعداد زیادی سیناپتوفیزین نقطه‌ای شکل یا متراکم در سلول	b
واکنشی نسبتاً شدید با الگویی پراکنده	c
نرون کروماتولیز بدون هرگونه واکنش سیناپتوفیزین	d
نرون سالم بدون هرگونه واکنش سیناپتوفیزین	e

www.SID.ir

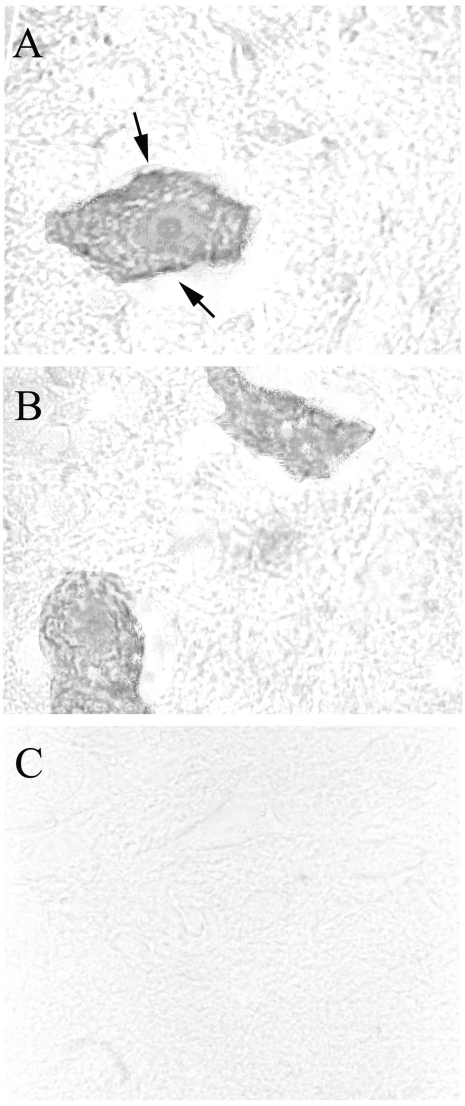
Archive of SID



شکل ۱ تصویر دو نرون در شاخ قدامی نخاع موش صحرایی آکسوتومی شده که آپوپتوز را در دو مرحله اولیه و نهایی نشان می‌دهد که اجسام نیسل در اطراف هسته کاهش یافته و در نهایت هسته و سیتوپلاسم از یکدیگر قابل تشخیص نیست (بزرگنمایی ۱۰۰۰ با رنگ‌آمیز کرسیل فست ویولت).

www.SID.ir

Archive of SID

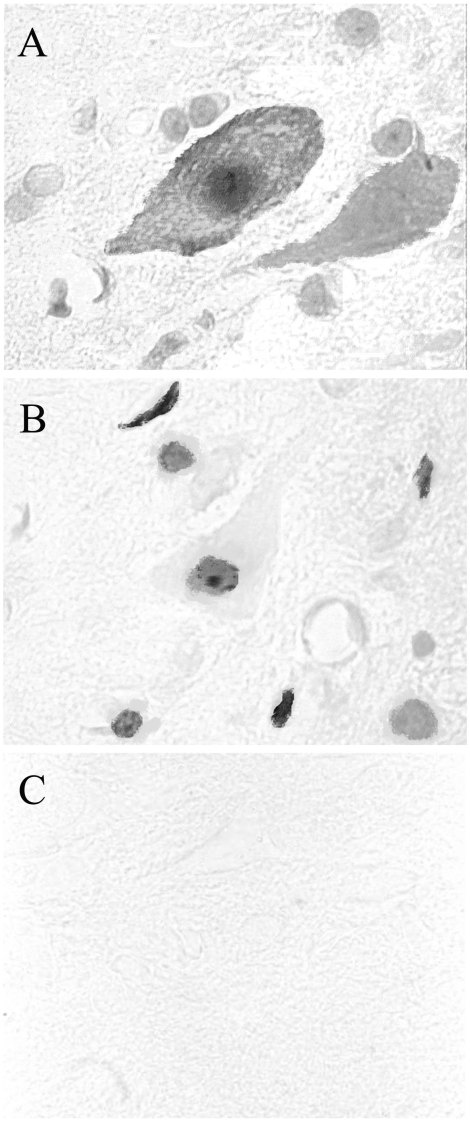


شکل ۲

A) در این تصویر یک نرون حرکتی با الگوی سیناپتوفیزین کامل دیده می‌شود (بزرگنمایی ۱۰۰۰).

B) در این تصویر دو نرون حرکتی با الگوی سیناپتوفیزین ناکامل دیده می‌شود (بزرگنمایی ۱۰۰۰).

C) در این تصویر شاخ قدامی نخاع موش صحرایی آکسوتومی شده را نشان می‌دهد که مراحل پروسه بافتی مشابه با نمونه‌های تصویر 2A و 2B است و تنها مرحله انکوبه با آنتی‌بادی اولیه سیناپتوفیزین حذف گردید جهت کنترل میزان حساسیت و دقت آنتی‌بادی است (بزرگنمایی ۱۰۰۰).



شکل۳

A) در این تصویر دو نرون حرکتی با واکنش شدید مثبت آنتی‌بادی علیه آنزیم استیل‌کولین ترانسفراز را نشان می‌دهد (بزرگنمایی ۱۰۰۰).

B) در این تصویر چند نرون حرکتی با واکنش ضعیف آنتی‌بادی علیه آنزیم استیل‌کولین ترانسفراز را نشان می‌دهد (بزرگنمایی ۱۰۰۰).

C) در این تصویر شاخ قدامی نخاع موش صحرایی آکسوتومی شده را نشان می‌دهد که مراحل پورسه بافیت مشابه با نمونه‌های تصویر 3A و 3B است جهت کنترل میزان حساسیت و دقت آنتی‌بادی است (بزرگنمایی ۱۰۰۰).

دپرنیل دریافت کرده‌اند نرون‌های حرکتی بزرگ و متوسط دارای واکنش‌متوسط تا شدید هستند و

www.SID.ir

Archive of SID

نرون‌های کوچک، واکنش شدید و تیره‌تری را نشان می‌دهند (شکل 3A) (از بین زیرگروه‌ها، A1 این ویژگی مشخص‌تر است). در گروهی که سرم فیزیولوژی دریافت کرده‌اند علاوه به کاهش تعداد نرون‌های حرکتی، شدت واکنش ضعیف‌تری در موتونرون‌ها مشاهده گردید (شکل 3B). مقایسه این نتایج با نمونه‌های کنترل که در آن‌ها آنتی‌بادی اولیه حذف شده، حساسیت و دقت این آنتی‌بادی را تأیید می‌کند (شکل C).

بحث و نتیجه‌گیری

تحقیقات فراوان نشان داده که در طی تکوین سیستم عصبی، نرون‌ها به تعداد زیادتر از آنچه مورد نیاز است تولید می‌شوند و برای رسیدن به بافت هدف و به‌دست آوردن فاکتورهای نوروتروفیکی مشتق از آن‌ها به رقابت می‌پردازند. طی این رقابت، تعداد کثیری از سلول‌های عصبی دچار مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (آپوپتوز) می‌شوند. مکانیسم‌های درگیر مرگ سلولی ناشی از آکسوتومی به خوبی شناخته نشده‌اند اما شواهد فراوان بیانگر این است که مرگ از نوع آپوپتوز است [۱۲و۷و۱]. برای توجیه این مرگ لیبرمن (Liberman) در سال ۱۹۷۴ یک گزارش مبنی بر این‌که پاسخ نرون‌های نابالغ متفاوت از بالغ است و این تفاوت از عدم تکامل سیستم ساخت پروتئین ناشی می‌شود ارائه کر[۳۰]. طبق گزارش وجسادا (Vejsada) و همکارانش در سال ۱۹۹۵ با قطع عصب سیاتیک نوزادان ۳ روزه موش صحرایی ۶۵ درصد نرون‌های حرکتی بعداز گذشت ۱ هفته و ۵۲ درصد بعداز گذشت ۲ هفته، زنده باقی می‌مانند [۳۱].

همچنین در تحقیقات اپنهایم (Oppenheim) مرگ سلولی ناشی از آکسوتومی در نوزادان موش صحرایی بعد از گذشت یک هفته ۵۰ درصد است [۳۲].

در این تحقیق بررسی مورفومتری شمارش سلولی با کمک میکروسکوپ نوری به‌عمل آمد که نتایج به‌دست آمده مشابه با تحقیقات گذشته است.

مرگ موتونرون‌های نابالغ در پی محروم شدن آن‌ها از بافت‌های هدف مربوط، مدل مناسبی برای دستیابی به خاصیت تروفیکی داروی دپرنیل فراهم می‌کند. این دارو دارای خاصیت آنتی‌آپوپتوزی است و طبق تحقیقات نول (Knoll) خاصیت مهارکنندگی فعالیت MAO-B را نیز دارد [۳]. لذا دراین تحقیق سعی شد با استفاده ازداروی دپرنیل اثر محافظتی آن بعد از قطع عصب در نوزادان موش صحرایی به آزمایش گذاشته شود. سالو (Salo) و همکاران او در سال ۱۹۹۲ در خصوص اثر دپرنیل گزارشی دال بر زنده باقی ماندن ۲/۲ درصد موتونرون‌ها پس از گذشت ۲۱ روز از آکسوتومی ارائه کردند [۳۳].

همچنین زین – مین لی (Xin-Min Li) و همکاران او اثر دپرنیل را به‌صورت افزایش فاکتور رشد عصبی (N.G.F) که خود عامل جلوگیری از وقوع آپوپتوز است ارائه کردند [۹]. همراستا بودن نتایج حاصل از این تحقیق با تحقیقات قبلی، به‌گونه‌ای نشانه تأیید یافته‌ها است. پس از شناسایی سیناپتوفیزین به عنوان نشانه‌ای برای تشخیص وزیکول‌های سیناپسی و تکمه‌های پیش سیناپسی [۱۱]، در طول دهه گذشته، مطالعات ایمنوهیستوشیمیایی این پروتئین به‌عنوان روش مطمئنی در تعیین الگوی تغییرات دژنراتیو سیناپس‌ها عنوان شده است [۱۹و۲۲]. در چنین مطالعاتی، کاهش واکنش سیناپتوفیزین می‌تواند نشانه کاهش سیناپتوفیزین موجود در وزیکول سیناپسی یا کاهش خود وزیکول سیناپسی و تکمه‌های سیناپسی باشد [۲۱].

سانچز در سال ۱۹۹۶ به‌منظور مطالعه ایمنوهیستوشیمیایی نرون‌های حرکتی افراد کهنسال و بیماران مبتلا به ALS الگوی واکنشی را ارائه کرد که نتایج حاصل از این تحقیق برای استفاده از الگو همخوانی دارد و سیناپتوفیزین به‌عنوان یکی از پروتئین‌های غشای وزیکول سیناپسی در موتونرون‌های شاخ قدامی نخاع به کمک روش ایمنوهیستوشیمی در طرفی که آکسوتومی شده و طرف سالم شناسایی شد که در بررسی به‌عمل آمده در تمام زیرگروه‌ها (B1، A1

www.SID.ir

Archive of SID

، C1، A2 ، B2 وC2) حضور بیش‌تر این پروتئین در زیرگروه‌های A1 ، B1 و C1 که دپرنیل دریافت کرده‌اند، است و بیش‌ترین میزان مربوط به زیرگروه A1 که دپرنیل ۲/۵mg/kg را یک ساعت قبل از عمل آکسوتومی عصب سیاتیک دریافت کرده است می‌باشد. بدین‌ترتیب، نتایج فوق برای اولین بار تأثیر داروی دپرنیل را با دوز ۲/۵ mg/kg در افزایش حضور سیناپتوفیزین نشان می‌دهد که تظاهر آن در الگویی کامل و متراکم در حاشیه سلول «a» است.

در زیرگروه‌هایی که سرم فیزیولوژی دریافت کرده‌اند علاوه برکاهش نرون‌های حرکتی و افزایش مرگ آپوپتوزی، کاهش سیناپتوفیزین نیز مشاهده شد و تظاهر این پروتئین به‌صورت نقاط متراکم در سلول «b» رؤیت گردید که این امر، مشابه با نتایج تحقیقات سانچز در بیماران مبتلا به ALS است، مبنی بر این که در این بیماران سیناپتوفیزین کاهش دارد و تظاهر، بیش‌تر در الگوی «b» است [۲۷]. همچنین نتایج این تحقیق، هماهنگ با یافته‌های هانس (Hansen) و همکاران او [۲۱] و یافته‌های سوکولوفسکی (Sokolowski) [۱۷] در رابطه با کاهش سیناپتوفیزین در مرگ آپوپتوزی نرون در بیماری‌های عصبی نظیر آلزایمر است.

برای شناسایی فعالیت انتقال پیام عصبی درمحل سیناپس از واسطه‌های شیمیایی استفاده می‌شود که یکی از آن‌ها استیل‌کولین است. حضور این واسطه، بیانگر چگونگی انتقال پیام عصبی است. معمولاً برای بررسی این واسطه از آنزیمی بنام استیل‌کولین ترانسفراز استفاده می‌شود تا با ردیابی این آنزیم به کمک آنتی‌بادی، چگونگی حضور استیل‌کولین مشخص گردد [۸و۱۵].

در تحقیقات آرمسترانگ (Armstrong) و همکاران او در سال ۱۹۹۱ کاهش آنزیم استیل‌کولین ترانسفراز همراه با کاهش و تغییر اندازه موتونرون‌ها بعد از قطع عصب هیپوگلوسال ارائه شد[۳۴]. بدین‌ترتیب با توجه به اثر دپرنیل در افزایش نروتروفیک فاکتور و نقش دارو در تغییرات بیان استیل‌کولین ترانسفراز، در این تحقیق آنزیم استیل‌کولین ترانسفراز به‌عنوان نشانگری برای میزان حضور واسطه شیمیایی استیل‌کولین در موتونرون‌های شاخ قدامی نخاع هر دو طرف به کمک روش ایمنوهیستوشیمی در تمام زیرگروه‌ها بررسی شد. حضور بیش‌تر این آنزیم در زیر گروه A1 است. این یافته هماهنگ با نتایج به‌دست آمده برای پروتئین سیناپتوفیزین است؛ یعنی دپرنیل ۲/۵ mg/kg تواماً سبب افزایش پروتئین غشای وزیکول پیش سیناپسی سیناپتوفیزین و همچنین فعالیت آنزیم استیل‌کولین ترانسفراز می‌گردد.

نتایج به‌دست آمده در خصوص افزایش آنزیم استیل‌کولین ترانسفراز در زیرگروه‌هایی که دپرنیل دریافت کرده‌اند مشابه با تحقیقات نول در خصوص تأثیر دپرنیل در نروترنسمیتر استیل‌کولین و مآلاً افزایش آنزیم استیل‌کولین ترانسفراز [۱۶] و نیز بررسی کوتسیلری (Koutsilieri) در رابطه با اثر این دارو در حفظ فعالیت آنزیم استیل‌کولین ترانسفراز در بیماران مبتلا به دمانس پیشرفته مغزی [۲۵] است. حضور بیش‌تر آنزیم استیل‌کولین ترانسفراز در زیرگروه A1 به نوعی است که در نرون‌های حرکتی بزرگ و متوسط، واکنش متوسط تا شدید و در نرون‌های حرکتی کوچک، واکنشی شدید و تیره تر دارند که این یافته شبیه با یافته‌های تحقیق باربر در گزارش چگونگی حضور این آنزیم با توجه به مورفولوژی سلول‌های عصبی نخاع موش صحرایی است [۲۸].

در زیرگروه‌هایی که سرم فیزیولوژی دریافت کرده‌اند آنزیم استیل‌کولین ترانسفراز کاهش داشته که این یافته هماهنگ با بررسی باچر (Becher) در بیماران مبتلا به آلزایمر و پارکینسون [۲۰] است.

بدین‌ترتیب با مشخص شدن اثر ضدآپوپتوزی داروی دپرنیل و تأثیرآن در افزایش آنزیم استیل‌کولین ترانسفراز به‌عنوان عاملی در جهت افزایش واسطه‌های شیمیایی و هدایت پیام عصبی و حفظ عملکرد نرون و همچنین اثر دارو بر افزایش پروتئین سیناپتوفیزین

www.SID.ir

Archive of SID

به‌عنوان شاخصی جهت انتقال پیام عصبی از طریق وزیکول سیناپسی به نرون بعدی می‌توان نوید داد که در مورد بیماران عصبی و نورودژنراتیو نظیر ALS، و مبتلایان به آلزایمر، پارکینسون، و ضایعات نخاعی ناشی از ضربه و تومور و ... پنجره‌ای تازه در درمان گشوده شود به‌طوری که حیات نرون‌های حرکتی باقیمانده حفظ شده، از مرگ آپوپتوزی آن‌ها جلوگیری شود و همچنین عملکرد نرون در انتقال و دریافت پیام عصبی و انجام فعالیت‌های حیاتی سلول عصبی که پیامد آن، نظم و هماهنگی بین فرامین صادره مغزی و عمل‌کننده است حفظ گردد.

منابع

1. Martin, L.J., Neuronal cell death in the nervous system development, disease , and injury (Review). Int. J. of Molecular Medicine. 2001, 7:455-478.
2. Albert C., Lo., Houenou Lucien J., Oppenheim R.W., Apoptosis in the nervous system, morphological features methods, pathology and prevention. Arch. Histol. Cytol. 1995, 58(2):139-149.
3. Knoll J., History of deprenyl: the first selective inhibitor of monoamine axidase type B. Vopr. Med. khim, 1997, 43(6):482-493.
4. Sastry P.S., Kalluri S.R., Short review apoptosis and the nervous system. J.Neuro chemistry., 2000, 74(1):1-20.
5. Tatton W.G., Wadia J.S., Ju W.Y.H., Chalmers-Redman R.M.E., (-)- Deprenyl reduce neuronal apoptosis and facilitates neuronal out growth by altering protein synthesis without inhibitory monoamine-oxidase. J.N. Transm, 1996, 48:45-59.
6. Suuronen T. Kolehmainen P., Salminen A., protective effect of L-Deprenyl against apoptosis induced by okadaic acid in cultured neuronal cell; Biochemical Pharmacology 2000, 59:1589-1595.
7. Martin L. J., Neuronal death in A.L.S. is apoptosis, possible contribution of a programmed cell death mechanism. J. of Neuropathology & Experimental Neurology, 1999, 58(5):459-471.
8. Knoll J, R - (-) - deprenyl facilitates the activity of the nigrostriatal dopamininergic neuron. J.Neural Transm Suppl, 1987, 25:45-66.
9. Xin-Min Li, Augusto U. Juorio, Jin Qi, Boulton Alan, L-Deprenyl potentiates NGF-induced changes in S.O.D mRNA in PC12 cells. J. of Neurosciense Research, 1998, 53:235-238.
10. Schmalbruch. H., Fiber compostition of the rat sciatic nerve. The Anatomical Record, 1986, 215:71-81.
11. Fernandez R., Chacon, sudhof T., Genetics of synaptic vesicle function. Ann, Rev, Physiol, 1999, 61:753-776.
12. Lauri SE, Lamsa K., pavlov I., Riekki R., Johnson BE, Molnar E., Rauvala H., Taira T., Activity blockade increases the number of functional synapses in the hipocampus of new born rats. Mol Cell Neurosci. 2003; 22(1):107-117.
13. Magyar K., Szende B., Lengyel J. Tekes K., The paharmacology of B-type selective monoamine oxidase inhibitors: milestones in(-)-Deprenyl research. J. Neural Transm[suppl], 1996, 48:29-43.
14. Eric R. Kandel, Principles of neural Science. fourth edition, Mcgraw-Hill 2000.
15. Gonzalez A., Lopez JM., Sanchez-Camacho C., Marin a, Localization of choline acetyltransferase (ChAT) immunoreactivity in the brain of a caecilian amphibian, J comp Neurol, 2002, 448(3):249-267.
16. Roghani A., Shirzadi A., Butcher L., Edwards R.H. Distribution of the vesicular transporter for acetylcholine in the rat central nervous system. Neuroscience 1998; 82(4):1195-1212.
17. Sokolowski B.H.A., Cunningham Annm., Patterns of synaptophysin expression during development of the inner ear in the chick, J. Neurobiol, 1999, 38:46-64.
18. Anderson H. R. , Tylstedt S., kinnefors A., Illing R.B., Synapses on human spiral ganglion cells: a transmission electron microscopy & immunohistochemical study. J.Hearing Res., 2000, 141:1-11.
19. Harvey B., Donald E. Born, Synaptophysin immunocytochemistry with thermal intesification: a marker of terminal axonal maturation in the human fetal nervous system. Brain and Development, 1999, 21:41-50.
20. Becher A., Drenckhahn A., Pahner Ingvid, Margittai Martin, Jahn Reinhard, Ahnert H.G., The synaptophysin - synaptobrevin complex: Hall mark of synaptic vesicle Maturation. J. of neuro science, 1999, 19(6):1922-1931.
21. Hansen L.A., Danial SE., Wilcock GK., Love S., Frontal cortical synaptohysin in lewy body diseases. J. Neurol Neurosurg psychiatry, 1988, 64(5):653-656.
22. Bendiske J., Bahr BA., Lysosomal activation is a compensatory response against protein accumulation and associated synaptopathogenesis an approach for slowing Alzheimer disease? J Neuropathol Exp Neurol. 2003; 62(5):451-463.
23. Macimiento W., Sappok T., Brook G., Toth L., Schoen S., Noth J., Kreutzberg G., Structural changes of anterior horn neurons and their synaptic input caudal to a low thoracic spinal cord hemisection in the asult rat: a light and electron microscopic study. Acta Neuropathol, 1995, 90:552-564.
24. Mizuta I., Ohta M., Ohta K., Nishimura M., Mizuta E., Hayashi K., Selegiline and desmethylselegiline stimulate NGF, BDNF, GDNF synthesis in cultured mouse astrocytes. J Biochem Biophys Res., 2000, 3:751-755.
25. Koutsilieri E., Scheller C., Sopper S., Gotz ME., Gerlach M., Meulen V., Riederer P., Selegiline completely restores choline acetyltransferase activity deficits in simian immunodeficiency infection. Eur J pharmacol 2001 Jan 5; 411(1-2):R1-R2.

www.SID.ir

Archive of SID

26. Dela Cruz C., Revilla E., Rodrigue Z-Gomez J., Vizute M., Cano J., Machado A., (-)- Deprenyl treatment restores serum insulin-like growth factor-I (IGF-I) levels in aged rats to young rat level. European J. of pharmacology, 1997, 327:215-220.
27. Cruz-Sanchez F.F., Moral A., Rossi. M.L., Quinto L., castejon C., Tolosa E., Belleroche J., Synptophysin in spinal anterior horn in aging and ALS: an immunohistological study. J Neural Trans. 1996; 103:1317-1329.
28. Barber R.P., Phelps P.E., Houser C.R., Crawford G.D., Salvaterra P.M. Vaughn J.E. The morphology and distribution of neurons containing choline acetyltransferase in the adult rat spinal cord: an immunocytochemical study. J. of Comparative Neurology 1984; 229:329-346.
29. Meier P., Finch A., Evan G., Apoptosis in development. Nature , 2000,407:769-801.
30. Liberman A.R., Some factors affecting retrograde neuronal responses to axonal lesion. In essays on the neruous system. Oxford claredon press, 1974, P:71-105.
31. Vejsada R., Sagot Y., Kato C., Qunatitative comparison of the transient rescue effects of neurotrophic factor on axotomized motoneurons in vivo. Eur. J. Neurosci. 1995, 7:108-115.
32. Li Li, Oppenheim RW., Ler M., Houenou LJ., Neurotrophic agents prevent motoneuron death following sciatic nerve section the neonatal mouse. J Neurobiol. 1994; 7:759-766.
33. Salo PT., Tatton WG., Deprenyl reduces the death of motoneurons caused by axotomy. J Neurosci Res. 1992; 31(3):394-400.
34. Armstrong D.M., Bady R., Hersh L.B., Hayes R.C., Willey R.G., Expression of choline acetyltransferase and nerve growth factor receptor within hypoglossal motoneurons following nerve injury. J. of comparative neurology, 1991, 304:596-607.

www.SID.ir