دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمي – پژوهشي
دانشگاه شاهد
سال شانزدهم – شماره ۷۷
آبان ۱۳۸۷

مقایسه اثر داروی سلژیلین و فرآورده گیاهی SIM2 در حفظ سلول‌های عصبی

نویسندگان: دکتر مرجان حشمتی*[۱]، حسام امینی[۲] و دکتر علیرضا عزیززاده دلشاد[۱]

۱. استادیار گروه علوم تشریح و پاتولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد
۲. دانش‌آموخته رشته پزشکی دانشگاه شاهد
* نویسنده مسئول: Email: marjanheshmaty @ hotmail.com

وصول: ۸۶/۳/۷
ارسال اصلاحات: ۸۶/۷/۲۹
دریافت اصلاحات: ۸۶/۸/۱۸
ارسال اصلاحات: ۸۶/۹/۱۸
دریافت اصلاحات: ۸۶/۱۰/۲۳
پذیرش: ۸۷/۲/۱۰

چکیده

هدف: مقایسه‌ای بین اثر ضد آپوپتوزی داروی سلژیلین(selegiline) و فرآورده گیاهی SIM2

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، ابتدا عصب سیاتیک نوزادان سه روزه موش صحرایی از نژاد اسپراگوداولی در ناحیه میانی ران در سمت چپ قطع گردید و حیوانات در سه گروه: ۱) درمان شده با داروی سلژیلین، ۲) درمان شده با فرآورده گیاهی SIM2، و ۳) کنترل یا بدون درمان قرار گرفتند. سپس سعی شد تا اثر درمانی ضد آپوپتوزی داروی تجویز شده سلژیلین و فرآورده گیاهیSIM2 در حفظ و بقای سلول‌های حرکتی اعصاب محیطی (سیاتیک) قطع شده مورد بررسی و ارزیابی قرار گیرد. پس از گذشت ۲۱ روز از قطع عصب و تجویز روزانه داخل صفاقی سلژیلین mg/kg ۲/۵، فرآورده گیاهیSIM2 در گروه‌های تحت‌درمان و سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد در گروه کنترل، حیوانات به روش ترنس کاردیاک پرفیوژن کشته شدند و شمارش کلی سلول‌های عصبی حرکتی در شاخ‌های شکمی نخاع در سمتی که عصب حرکتی سیاتیک قطع شده و سمتی که عصب سیاتیک سالم است، در تمام نمونه‌ها انجام گرفت. درصد کاهش سلول‌های عصبی حرکتی نخاع در سمتی که عصب محیطی سیاتیک قطع شده نسبت به سمت سالم محاسبه شد و در بررسی فرا ساختاری سلول‌های عصبی حرکتی نخاع، تغییراتی حاکی از آپوپتوز سلول مشخص شد.

یافته‌ها: از نتایج تحقیق چنین به نظر می‌رسد که کم‌ترین درصد کاهش سلول‌های عصبی حرکتی پس از انجام آکسوتومی در گروهی است که فرآورده گیاهی SIM2 را دریافت کرده و بیش‌ترین کاهش سلول‌های عصبی حرکتی در گروهی است که سرم فیزیولوژی دریافت کرده‌است. تغییرات فرا ساختمانی میتوکندری‌های سلول عصبی حرکتی در هنگام مرگ سلولی، مشابه با تغییرات این ارگانل در هنگام واکنش کروماتولیتیک است و این تغییرات در گروهی که فرآورده گیاهی SIM2 را دریافت کرده‌اند کم‌تر است. همچنین کاهش این تغییرات در گروه‌هایی که فرآورده گیاهی SIM2 را دریافت کرده‌اند نسبت به گروهی که داروی سلژیلین دریافت کرده مشخص شد.

نتیجه‌گیری: تأثیر فرآورده گیاهی SIM2 در حفظ و نگهداری سلول عصبی حرکتی به دنبال قطع عصب سیاتیک بیش‌تر از داروی سلژیلین است و این تفاوت، معنادار است. از آن‌جا که تا کنون از جنبه بالینی مطالعات مشخصی جهت روشن شدن سازوکارهای مرتبط به دنبال استفاده از فرآورده گیاهی SIM2 و داروی سلژیلین انجام نشده‌است، بررسی آثار درازمدت این مواد در دوزهای مختلف پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: سلژیلین، قطع عصب سیاتیک، آپوپتوز

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

داروی سلژیلین یا دپرنیل، اولین بار توسط پروفسور نول (۱۹۶۰) در مجارستان ساخته شد که ابتدا به‌عنوان داروی ضدافسردگی معرفی شد[۱]. با مشخص شدن آثار دیگر دارو در درمان بیماری نورودژنراتیو پارکینسون امروزه به‌عنوان یک داروی ضد پیری نیز استفاده می‌شود[۲]. تحقیقات اخیر، خاصیت نوپروتکتیوی دارو را مطرح می‌کند که در مرگ برنامه‌ریزی شده سلول عصبی نقش کنترلی دارد[۳]. جهت القای مرگ برنامه‌ریزی شده در روش آزمایشگاهی از قطع عصب محیطی یا آکسوتومی استفاده می‌گردد[٤]. فاکتورهای تروفیک عصبی، گروه متنوعی از نوروتروفینی‌ها محسوب می‌شوند که حفظ و بقای سلول‌های عصبی و از جمله سلول‌های عصبی حرکتی به وجود آن‌ها وابسته است. همچنین در این رابطه سایر تحقیقات نشان داده که برخی فاکتورها می‌توانند از طریق حمایت و تحریک سلول‌های آسیب‌دیده، منجر به رشد آکسونی در الیاف ضایعه‌دیده مربوط به آنان شود[۵].

چنین فرایندی ممکن است وابسته به عوامل تروفیک متعدد باشد که در بافت عصبی نابالغ نیز وجود دارد و از سوی دیگر، حفظ و بقای نرون‌های بالغ در شرایط معمولی، متکی به این گونه فاکتورها است که از اندام هدف با استفاده از حمل آکسونی رو به عقب به جسم سلولی سلول‌های عصبی می‌رسد.

در شرایط قطع عصب، چنانچه بتوان از فاکتورهای تروفیک استفاده کرد می‌توان انتظار داشت که نرون‌های ضایعه‌دیده با برخورداری از این حمایت تروفیکی، زنده بمانند و به پدیده ترمیم آکسونی خود ادامه دهند [٦].

لذا در این تحقیق سعی گردیده مقایسه‌ای بین اثر ماده شیمیایی با یک فرآورده گیاهی در حفظ و نگهداری سلول‌ها عصبی بعد از قطع عصب محیطی سیاتیک در موش صحرایی به دو روش بررسی مورفومتری و فراساختاری، انجام شد. جهت تعیین فرایند وقوع آپوپتوز از ارگانل‌های درون سلولی، مانند هسته و میتوکندری استفاده می‌شود که در این تحقیق، بررسی تغییرات میتوکندری‌ها به‌عنوان یکی از مهم‌ترین ارگانلی که در فرایند آپوپتوز دستخوش تغییر است انجام گردید.

مواد و روش‌ها

جهت انجام این تحقیق از نوزادان سه روزه موش صحرایی نژاد اسپراگوداولی تولید شده توسط مؤسسه رازی کرج استفاده شد.

موش‌های آبستن خریداری شده تا زمان زایمان در حیوانخانه دانشکده پزشکی شاهد در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی، دمای ۲۲-۲۳ درجه سانتی‌گراد، غذای مخصوص به‌صورت پلت و دسترسی آزاد به آب نگهداری شدند.

پس از زایمان، نوزادان سه روزه تحت عمل جراحی قطع عصب سیاتیک سمت چپ قرار گرفتند. روش جراحی بدین صورت بود که ابتدا نوزادان با استفاده از سرما بیهوش می‌شدند و پس از ضد عفونی ناحیه پشت ران سمت چپ حیوان، یک شکاف طولی در پوست ناحیه ایجاد شده، در ادامه، عضله دو سر رانی به خارج رانده و عصب سیاتیک از داخل شکاف خارج می‌شد. پس از قطع عصب برای جلوگیری از هم دهانی احتمالی، قطعه‌ای کوچک از عصب جدا و محل بخیه شد و پس از به هوش آمدن، موش‌ها نزد مادران برگردانده شدند. با توجه به گروه‌ها، تاریخ انجام عمل جراحی و تارخ کشته‌شدن بر روی هر قفس مشخص‌شد.

گروه‌های مورد مطالعه، سه گروه بودند که بر حسب نوع ماده تزریقی تقسیم گردیدند؛ بدین‌ترتیب که در گروه اول، تزریق داخل صفاقی ۲/۵mg/kg سلژیلین انجام شد. پودر خالص سلژیلین به فرمول C13H17N,HCL و وزن مولکولی ۲۲۳/۷ توسط شرکت سیپلا سفارش و محلول ۲/۵mg/kg آن در سرم فیزیولوژی تهیه گردید.

در گروه دوم، تزریق داخل صفاقی SIM2 که یک فرآورده گیاهی برگرفته شده از یک گیاه دارویی مورد استفاده در طب سنتی ایران است، انجام شد. این فرآورده گیاهی در گروه ایمنولوژی دانشگاه شاهد بر

Archive of SID

www.SID.ir

اساس مطالعات موجود انتخاب و بررسی‌هایی در مورد آثار ایمنومدولاتوری آن انجام شده‌است.

از آن‌جا که این فرآورده، مراحل مجوز دارو را طی می‌کند به صورت SIM2 معرفی گردیده‌است.

مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که این دارو بر سلول‌های سرطانی اثر کشندگی داشته، بر رده سلولی سرطان کولون در دوزهای مختلف تا هفتاد درصد تأثیر کشندگی دارد [۷].

همچنین مطالعات دیگر در این راستا نشان می‌دهد که عصاره این ماده دارای خواص تحریک‌کنندگی سلول‌های طحال و ماکروفاژهای صفاقی در موش Balb/c است (طرح‌های در دست انجام).

در گروه سوم، تزریق داخل صفاقی سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد انجام شد. تزریقات روزانه در هر سه گروه به مدت ۲۱ روز ادامه یافت. پس از این مدت، موش‌ها به‌روش پرفیوژن از طریق بطن چپ قلب کشته شدند.

در این روش، ابتدا حیوانات بیهوش شده، قفسه سینه باز گردید و از طریق بطن چپ، محلول سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد هپارینه ۱/۵۰۰۰ و در ادامه، محلول پارافرمالدیید ٤ درصد در داخل گردش خون جریان یافت.

به‌طور همزمان، دهلیز راست برای خارج شدن خون شکاف داده شد و پس از کشته شدن موش، قطعات نخاعی مورد نیاز (L4–L6) که معادل مهره‌های T13 تا L1 است [۸] از بدن حیوان جدا و خارج گردیدند و با توجه به روش بررسی، نمونه‌های نخاعی در داخل محلول تثبیت بافت قرار گرفتند. برای بررسی مورفومتری، ابتدا نمونه‌ها در داخل محلول فرمالین بافر ۱۰ درصد گذاشته شدند و پس از تثبیت کامل بافت، قطعه نخاع از داخل مهره‌ها جدا گردیده، فرآوری شد و از آن‌ها بلوک‌های پارافینی تهیه شد.

در ادامه از بلوک‌ها برش‌های سریالی ۸ میکرونی تهیه گردید. در این بخش برای تمام موارد سمت راست، یعنی سمت سالم نخاع به‌عنوان شاهد و سمت چپ نخاع که عمل آکسوتومی عصب محیطی سیاتیک در همان سمت انجام شده به‌عنوان آزمایش، بررسی شمارش سلولی انجام گرفت که در هر گروه ٦ حیوان و جمعاً ۱۸ حیوان در نظر گرفته شد.

برش‌های متوالی، توسط رنگ کرزیل فست ویولت رنگ‌آمیزی شدند. سلول‌های عصبی حرکتی در سمت سالم و سمت چپ که مربوط به طرف آکسوتومی شده نخاع است در هر نمونه شمارش شدند. به منظور شمارش از هر پنج برش، یکی مورد شمارش قرار می‌گرفت و در انتها تعداد به دست آمده، ضرب در عدد پنج می‌شد.

برای شمارش سلول‌های عصبی حرکتی، سلول‌هایی که هسته روشن کاملاً گرد و بزرگ‌تر از ۱۰ میکرون با هستک تیره رنگ و مشخص و سیتوپلاسم انباشته از اجسام نیسل داشتند مورد شمارش قرار گرفتند[۸]. در انتها از ارقام به‌دست آمده مربوط به سمت سالم و سمت آکسوتومی شده نخاع در هر گروه میانگین تهیه می‌شد و درصد کاهش سلول‌های عصبی حرکتی در سمت آکسوتومی شده نسبت به سمت سالم نخاع با استفاده از فرمول زیر محاسبه می‌شد:

PMR (the Percentage of Motoneuron Reduction) = TMC (IS)-TMC(AS)/ TMC(IS)×100

در این فرمول PMR درصد کاهش سلول‌های عصبی حرکتی، TMC(AS) نشان‌دهنده مجموع سلول‌های عصبی شمارش شده در سمت آکسوتومی شده و TMC(IS) مجموع سلول‌های عصبی حرکتی در سمت سالم نخاع است[۹]. همچنین در تمام گروه‌ها با استفاده از روش‌های آماری تی‌تست (T-Test) و آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA)، میانگین سلول‌های عصبی حرکتی سمت عمل شده و سالم در هر یک از گروه‌ها با یکدیگر و میانگین نرون‌های حرکتی در سمت چپ نخاع در هر یک از گروه‌ها با یکدیگر مقایسه شد.

برای بررسی تغییرات فرا ساختاری سلول‌های عصبی حرکتی بعد از انجام ترنس کاردیاک پرفیوژن و کشتن حیوان سریعاً قطعه نخاعی L4 – L6 که معادل مهره‌های T13 تا L1 است خارج و به مدت ٢٤ ساعت در داخل محلول پرفیوژن، حاوی پارافرمالدیید ٤ درصد در بافر فسفات ۱ دهم مولار و گلوتارآلدیید نیم درصد، قرار گرفت. بعد از طی این مدت، نخاع از داخل مهره‌ها

Archive of SID

www.SID.ir

خارج و به دو نیمه راست و چپ تشریح و در هر گروه، بخش قدامی طرفی قطعات تشریح شده نخاع خارج و سریعاً به محلول گلوتارآلدیید ۲/۵ درصد در بافر فسفات ۰/۱ مولار منتقل گردید و در زیر استریومیکروسکوپ با یک تیغ تیز به قطعات کوچک ۱×۱mm تقسیم شد. در تمام نمونه‌ها، نیمه چپ به‌عنوان نمونه مدل آزمایشی و نیمه مقابل به‌عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شد و مشخصات هر نمونه، نظیر تاریخ نمونه‌برداری، گروه و مورد مدل آزمایش یا شاهد بر روی ظرف حاوی نمونه در محلول فیکساتیو گلوتارآلدیید ۲/۵ درصد نوشته شد.

پس از گذشت سه ساعت، نمونه‌ها در چهار مرحله هر کدام ۱۵ دقیقه با بافر فسفات ۰/۱ مولار شسته شد. بعد از شستشو، نمونه‌ها در فیکساتیو تترا اکسیداسمیوم ۱ درصد در جای تاریک به مدت ۱ ساعت قرار داده شد که در انتهای این مرحله، نمونه‌ها سیاه شدند.

سپس در چهار مرحله، شستشو انجام و سپس آبگیری با استون و آغشتگی با رزین (اپون ۸۱۲) و قالب‌گیری انجام شد. پس از اتمام مراحل پلی‌مریزاسیون و سخت شدن کامل رزین، برش‌هایی به صورت نیمه نازک و سپس نازک تهیه شد. از برش‌های نازک به ضخامت ۵۰-۳۰ نانومتر پس از رنگ‌آمیزی با استات اورانیل وسیترات سرب به وسیله میکروسکوپ الکترونی زایس EM900 فرا ساختمان سلول‌ها مشاهده شد.

یافته‌ها

نتایج شمارش سلول‌های عصبی حرکتی حاکی از این است که در نیمه آکسوتومی شده تعدادی از سلول‌های عصبی حرکتی دستخوش کروماتولیز شده، یعنی اجسام نیسل در اطراف هسته به مقدار زیادی از بین رفته و سیتوپلاسم اطراف هسته روشن دیده می‌شود.

این نوع نرون‌های کروماتولیتیک عمدتاً در گروهی که سرم فیزیولوژی دریافت کرده بودند دیده شد. با پیشرفت تغییرات، سلول‌های عصبی آپوپتوتیک با سیتوپلاسم و هسته کاملاً متراکم حاوی کروماتین متراکم شده در طول و زیر غشای هسته به صورت هلالی شکل و یا حاوی اجسام آپوپتو تیک دیده شد (شکل ۱).

نتایج شمارش کل سلول‌های عصبی حرکتی نخاع در هر دو نیمه آکسوتومی شده و سالم مربوط به هر حیوان در تمام ۳ گروه، میانگین و انحراف معیار تعداد کل سلول‌های عصبی حرکتی در سمت سالم (شاهد) و آکسوتومی شده (مدل آزمایشی)، و همچنین درصد کاهش در هر گروه محاسبه شد (جدول ۱). بدین‌ترتیب با استفاده از روش‌های آماری تی تست (T- test) و آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) مقایسه بین میانگین تعداد سلول‌های عصبی حرکتی دو نیمه راست و چپ نخاع در هر گروه با یکدیگر و همچنین مقایسه نیمه راست و چپ در هر ۳ گروه با یکدیگر انجام شد.

نتایج حاصل از مقایسه بین شمارش سلولی کل سلول‌های عصبی حرکتی در نیمه آکسوتومی شده (مدل آزمایشی) و نیمه‌سالم (شاهد) در ۳ گروه، نشانگر کاهش سلول‌ها در سمت آکسوتومی شده است. این کاهش، تفاوت آماری معناداری دارد($p<۰/۰۵$)؛ به‌طوری که درصد کاهش در گروهی که فرآورده گیاهی SIM2 را دریافت کرده کم‌تر از ۲ گروه دیگر است ($p<۰/۰۵$).

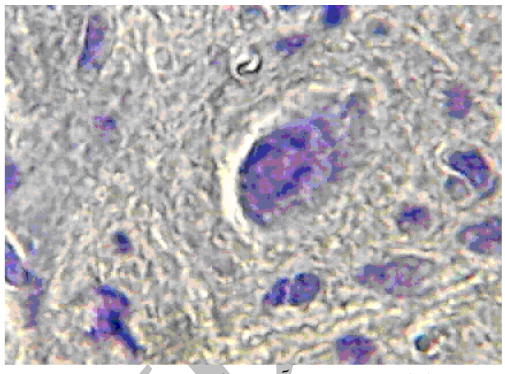
میزان درصد کاهش در گروه کنترل که سرم فیزیولوژی دریافت کرده بیش‌تر است ($p<۰/۰۵$).

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار تعداد کل سلول‌های عصبی حرکتی شاخ قدامی نخاع سمت راست (شاهد) و سمت چپ (مدل آزمایشی) و درصد کاهش در ۳ گروه درمان شده با داروی سلژیلین، فرآورده گیاهی SIM2 و سرم فیزیولوژی ۹دهم درصد

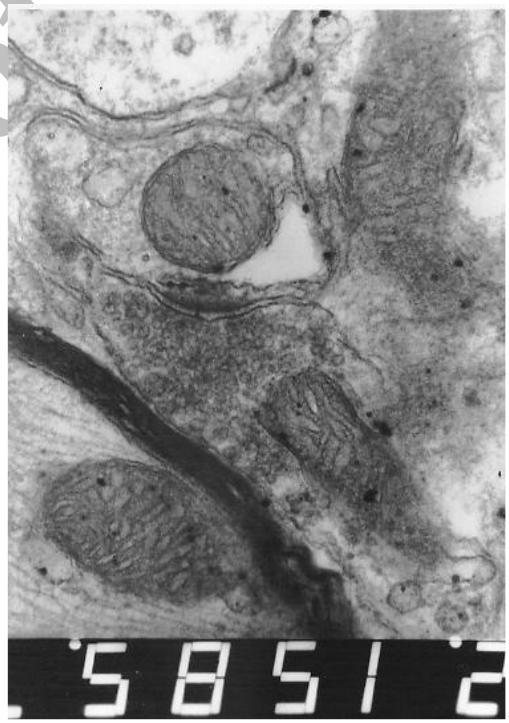
گروه‌ها	میانگین و انحراف معیار نرون‌های حرکتی نخاع در نیمه سالم (سمت راست)	میانگین و انحراف معیار نرون‌های حرکتی نخاع در سمت آکسوتومی‌شده (سمت‌چپ)	درصد کاهش	تحلیل آماری
داروی سلژیلین	۸۸۸/۳۳±۵۸/۷	۶۲۵±۳۲/۸۶	۲۹/۶۵	p<۰/۰۵
فرآورده گیاهی SIM 2	۸۹۶/۶۶±۴۹/۱۵	۷۱۸/۱۶±۳۴/۸۶	۱۹/۹۲	p<۰/۰۵
سرم فیزیولوژی ۰/۹٪	۷۸۸/۸۳±۶۵/۱۶	۱۸۹/۱۶±۴۴/۰۹	۷۶/۱۰۰۲	p<۰/۰۵

Archive of SID

www.SID.ir

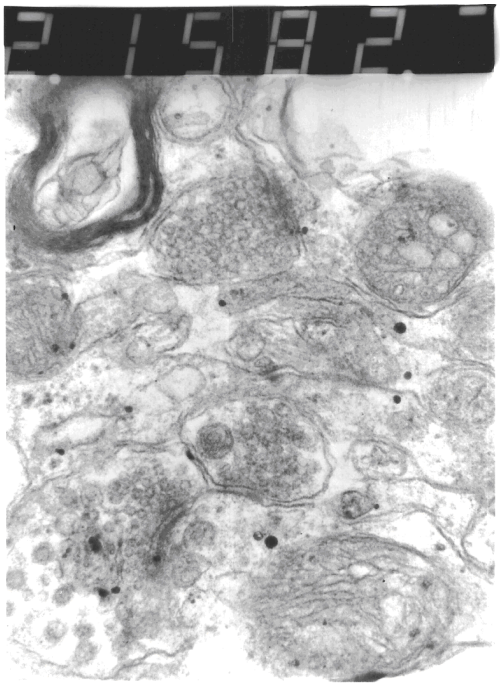


شکل ۱- سلول‌های عصبی آپوپتوتیک با سیتوپلاسم و هسته کاملاً متراکم حاوی کروماتین متراکم شده در طول و زیر غشای هسته به صورت هلالی شکل رنگ‌آمیزی با روش کرزیل فست ویولت در گروهی که سرم فیزیولوژی دریافت کرده‌است (بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰×).



شکل ۲- تصویر الکترون میکروسکوپی سلول عصبی حرکتی با میتوکندری سالم و نرمال در گروهی که فرآورده گیاهی SIM2 دریافت کرده‌است (بزرگ‌نمایی ۵۰۰۰۰×).

مقایسه بین تعداد کل سلول‌ها عصبی حرکتی نخاع در سمت سالم (شاهد) ۳ گروه، نمایانگر این است که مقایسه بین نیمه سالم (شاهد) گروهی که سلژیلین دریافت کرده‌اند با نیمه سالم گروهی که فرآورده گیاهی SIM2 دریافت داشته‌اند تفاوت آماری معناداری نشان



شکل۳- تصویر الکترون میکروسکپی تغییرات در تعداد و ساختمان میتوکندری‌ها، تراکم ماتریکس، توزیع یکنواخت میتوکندری‌های اطراف هسته و سطح سلول‌ها به‌ویژه در محل سیناپس‌ها در گروهی که سرم فیزیولوژی دریافت کرده‌است (بزرگ‌نمایی ۵۰۰۰۰×).

نمی‌دهد؛ در صورتی که تفاوت گروه کنترل با ۲ گروه دیگر در این نیمه معنادار است ($p<0/05$).

تعداد کل سلول‌های عصبی حرکتی در سمت آکسوتومی شده (مدل آزمایشی) ۳ گروه، تفاوت آماری معناداری دارد($p<0/05$). همچنین مقایسه نیمه چپ گروهی که فرآورده گیاهی SIM2 را دریافت کرده با نیمه سالم گروه کنترل که سرم فیزیولوژی دریافت داشته، تفاوت آماری معناداری نشان نمی‌دهد.

نتایج مطالعات میکروسکوپ الکترونی به منظور بررسی چگونگی تغییرات فرا ساختمانی میتوکندری‌های سلول عصبی حرکتی در هنگام مرگ سلولی در سلول‌های حرکتی شاخ قدامی نخاع، حاکی از این است که تغییراتی مشابه با تغییرات این ارگانل در هنگام واکنش کروماتولیتیک روی می‌دهد که بر اساس شدت ضایعه به صورت خفیف، متوسط یا شدید است. این تغییرات همراه با کاهش نسبی تعداد میتوکندری‌ها است. نتایج نشان می‌دهد در گروهی که سرم فیزیولوژی

Archive of SID

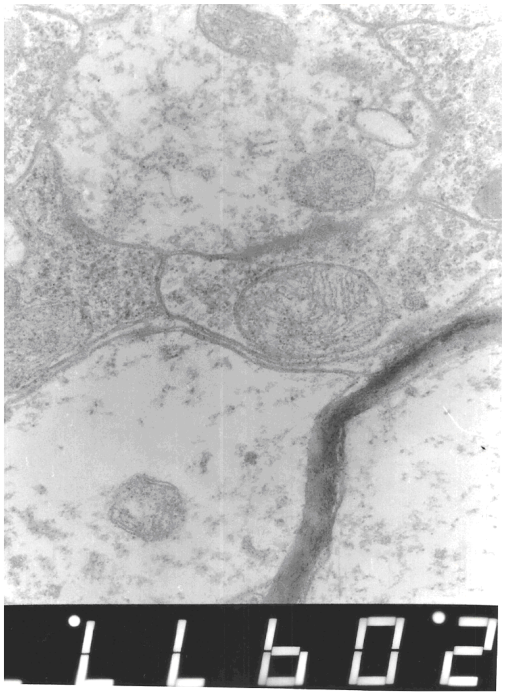
www.SID.ir

دریافت کرده‌اند تغییرات میتوکندری و کاهش نسبی آن‌ها بیش‌تر از دو گروه دیگر است. همچنین این تغییرات در گروهی که فرآورده گیاهی SIM2 را دریافت کرده‌اند از گروهی که داروی سلژیلین دریافت کرده، کم‌تر و مشابه با سمت شاهد است.

بدین‌منظور تغییرات میتوکندری در سلول‌های دژنراتیو در مقایسه با میتوکندری سالم و نرمال، گروهی که فرآورده گیاهی SIM2 را دریافت کرده‌اند مقایسه شد (شکل ۲). این تغییرات در تعداد و ساختمان میتوکندری‌ها، تغییر در تراکم ماتریکس، توزیع یکنواخت میتوکندری‌های اطراف هسته و سطح سلول‌ها به‌ویژه در محل سیناپس‌ها است (شکل ۳). تغییر در ساختمان کریستای درونی و کاهش تعداد آن‌ها به صورت واکوئوله شدن کریستاها، کروی شکل شدن، به شکل وزیکول خالی (Swollen) درآمده و یا تظاهر آن به صورت شبکه اندوپلاسمی خشن و ماکرو واکوئول‌های باد کرده‌است (شکل ٤).

بحث و نتیجه‌گیری

روش شمارش سلولی از متداول‌ترین روش‌ها جهت بررسی درصد بقای نرون‌های حرکتی است و توسط اکثر محققین، مانند اپنهایم[۱۰] وجزادا [۱۱] پذیرفته شده‌است. بهادری و همکارانش (۲۰۰۱) نشان دادند که قطع عصب سیاتیک، منجر به مرگ نرون‌ها در گانگلیون ریشه پشتی نخاع می‌گردد. به‌علاوه ویژگی‌های فرا ساختمانی در نرون‌های از بین رفته، نشان‌دهنده وقوع آپوپتوز در آن‌ها بود [۱۲]. بررسی دوره کوتاه‌مدت ضایعه نخاع پس از آکسوتومی، کاهش تعداد نرون‌های حرکتی شاخ قدامی نخاع تا یک ماه پس از آکسوتومی را نشان می‌دهد[٦]. لی و همکاران او (۱۹۹۳) نشان داده‌اند که آپوپتوز متداول‌ترین مسیر مرگ نرون متعاقب آکسوتومی در موش صحرایی است[٥]. محققین دیگر نیز مرگ نرون‌های حرکتی نخاع را پس از آکسوتومی عصب سیاتیک گزارش کرده‌اند[۱۳]. با توجه به تحقیقات انجام شده روی داروی سلژیلین و اثر تحریکی آن در افزایش فاکتورهای نوتروفیکی در محیط کشت سلول‌های آستروسیت [١٤] و مشخص شدن خاصیت



شکل ٤- تصویر الکترون میکروسکپی تغییرات در ساختمان کریستای درونی و کاهش تعداد آن‌ها به صورت‌های واکوئوله شدن کریستاها، کروی شکل شدن، وزیکول خالی (Swollen) درآمده و یا تظاهر آن به صورت شبکه اندوپلاسمی خشن و ماکرو واکوئول‌های باد کرده در گروهی که سرم فیزیولوژی دریافت کرده‌است (بزرگ‌نمایی ٥٠٠٠٠×).

آنتی‌اکسیدانت و آنتی‌آپوپتوتیک آن به دنبال تأثیر بر مولکول‌های ضد آپوپتوز و رادیکال‌های آزاد [۱٥]، طیف گسترده این دارو فرضیه‌های تغییر بیان ژن نیز مطرح می‌باشد[١٦]. در تأیید این یافته‌ها، در تحقیقات دیگر به تأثیر داروی سلژیلین در کاهش مرگ آپوپتوتیک و تسریع رشد عصبی از طریق افزایش تعدادی پروتیین با بیان ژن‌های مربوط اشاره شده و نشان داده شده که دارو بدون تأثیر بر مهار آنزیم منو آمینو اکسیداز B سبب بیان ژن و سنتز پروتیین می‌شود [۱]. در خصوص تأثیر فرآورده گیاهی SIM2 نیز مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که این فرآورده بر روی رده سلولی کولون، HT-29 اثر سایتوتوکسیک داشته، باعث مهار رشد این سلول‌ها تا میزان هفتاد درصد با توجه به دوز و زمان شده‌است[۷]. این فرآورده همچنین باعث مهار رشد سلول‌های سرطانی اپی‌تلیالی ریه شده‌است[۱۷]، در

Archive of SID

www.SID.ir

حالی که بر روی سلول‌های استاندارد L-929 تأثیر چندانی نداشته‌است. این فرآورده باعث افزایش پاسخ ایمنی سلول‌ها و افزایش تکثیر لنفوسیت‌ها در مقابل میتوژن شده‌است (نتایج چاپ نشده). همچنین مطالعات دیگری بر روی این فرآورده انجام شده که حاکی از تأثیر آن بر روی سلول‌های کبدی است [۱۸و۱۹].

نتایج تحقیق حاضر نشان‌می‌دهد که پس‌از آکسوتومی، نرون‌های حرکتی در سمت آکسوتومی شده کاهش می‌یابند که این یافته، مشابه با یافته محققین قبلی است.

آسیب به سیستم اعصاب مرکزی، سبب تغییر در تولید انواع فاکتورهای تغذیه‌کننده سلول عصبی و سایتوکاین‌ها می‌گردد [۷]. بنابراین با توجه به این افزایش در سطح فاکتورهای تغذیه‌کننده عصبی و سایتوکاین‌ها، رشد آکسون‌ها تسریع می‌شود [۵] و این احتمال وجود دارد که کاهش سطح فاکتورهای تغذیه‌کننده عصبی و برخی از سایتوکاین‌ها در بروز ضایعات ثانویه که مسئول کاهش سلول‌های عصبی حرکتی و تشکیل بافت گلیوز است نقش داشته باشند.

نتایج تحقیق نشان می‌دهد درصد کاهش نرون‌های حرکتی در گروهی که فرآورده گیاهی SIM2 را دریافت کرده کم‌تر از دو گروه دیگر است. پس بدین‌ترتیب تأثیر این فرآورده در جلوگیری از مرگ آپوپتوتیک نرون‌های حرکتی سمت آکسوتومی شده نشان می‌دهد که در مقایسه با داروی سلژیلین، نقش مؤثرتری داشته‌است.

همچنین در این تحقیق، مقایسه بین تعداد کل سلول‌های عصبی حرکتی در سمت سالم، نمایانگر این است که آکسوتومی سبب کاهش سلول‌های عصبی سمت سالم نیز می‌گردد؛ بدین‌ترتیب که سمت سالم گروهی که داروی شیمیایی سلژیلین را دریافت کرده با گروهی که این فرآورده گیاهی SIM2 را دریافت کرده تفاوتی ندارد، در صورتی که با سمت سالم گروهی که سرم فیزیولوژی در یافت کرده، تفاوت معنادار دارد. این‌گونه به نظر می‌رسد که به دنبال قطع عصب سیاتیک، دو نوع ضایعه رخ می‌دهد. یکی ضایعه اولیه که در اثر قطع عصب رخ داده، منجر به از بین رفتن نرون‌های حرکتی در دوره حاد ضایعه می‌گردد. این ضایعه در ادامه فرایند منجر به فعال شدن موجی از واکنش‌های مضر ثانویه می‌گردد که پس از فعال شدن با گذشت زمان بر شدتشان افزوده شده، در دوره مزمن منجر به ضایعات ثانویه می‌گردند که شدیدتر از ضایعات اولیه هستند و سبب کاهش نرون‌های حرکتی در سمتی که آکسوتومی انجام نشده‌است می‌گردد. میلز و همکارانش گزارشی مبنی بر این که ضایعات نخاعی منجر به افزایش خارج سلولی غلظت آمینواسیدهای تحریکی می‌گردد ارائه کردند. این آمینواسیدها گیرنده‌های گلوتامیت را فعال می‌کنند که نهایتاً باعث افزایش تحریک‌پذیری سلول‌های عصبی و تعدیل انتقال عصبی می‌گردد. به نظر می‌رسد فاکتورها یا عواملی دخیل در فرایند مرگ آپوپتوتیک از طریق ارتباطات نرونی بین دو نیمه راست و چپ نخاع به‌عنوان نرون‌های رابط یا از طریق گردش سیستمیک بدن به سمت سالم می‌رسد و سبب کاهش سلول‌های عصبی سمت سالم می‌گردد [۲۰]؛ در حالی که داروی سلژیلین و فرآورده گیاهی سبب کاهش این فرایند می‌گردند. همچنین مقایسه سمت چپ، یعنی سمت آکسوتومی شده در این سه گروه، حاکی از اختلاف معنادار بین گروه‌ها است. این بدین‌معنا است که تأثیر داروی شیمیایی در جلوگیری از مرگ آپوپتوتیک سلول‌های عصبی، کم‌تر از فرآورده گیاهی SIM2 است و این دارو تأثیر بیش‌تری در حفظ سلول‌های عصبی دارد و نتایج آماری نشان می‌دهد مقایسه بین سمت سالم گروهی که سرم فیزیولوژی در یافت کرده با سمت چپ گروهی که تحت عمل آکسوتومی بوده و این فرآورده را دریافت کرده، تفاوت معناداری ندارد. بنابراین پیشنهاد می‌گردد بررسی این فرآورده در بیان ژن‌های دخیل در فرایند کاهش مرگ آپوپتوتیک سلول‌های عصبی انجام شود تا با درصد اطمینان بیش‌تر بتوان نقش این فرآورده را مشخص کرد.

بر اساس شواهد به‌دست آمده میتوکندری‌ها به‌عنوان ارگانل‌های درون سلولی‌اند که موتورخانه سلول محسوب می‌شوند و امروزه مشخص شده نقش کلیدی در مرگ آپوپتوتیک و نکروزی سلول‌های عصبی را پس از ضایعات وارد به سلول عصبی یا ایسکمی حاد عروق

Archive of SID

www.SID.ir

خونی دارند و امروزه اهمیت این ارگانل در حفظ و حیات سلول مطرح است [۲۱و۲۲].

اختلالات عملکرد میتوکندری‌ها فاکتوری است که در بررسی پاتوفیزیولوژی مرگ سلول‌های عضله قلب و کبد مورد توجه و بررسی است [۲۳و۲٤].

مشابه این نتیجه در مرگ آپوپتوتیک سلول‌های عصبی نخاع پس از ایسکمی عروق دیده می‌شود [۲۲].

بنابراین با توجه به اهمیت این ارگانل در این تحقیق، بررسی میتوکندری‌های سلول عصبی با روش استفاده از میکروسکوپ الکترونی انجام شد. نتایج این بخش حاکی از تغییراتی است که در سلول‌های دژنره شده دیده می‌شود، به‌طوری که این تغییرات، همگی حاکی از فرایند مرگ آپوپتوتیک سلول‌های عصبی حرکتی به دنبال قطع عصب سیاتیک است. تغییرات میتوکندری سلول‌های عصبی شاخ قدامی طرفی نخاع در گروهی که فرآورده گیاهی SIM2 دریافت کرده‌اند کم‌تر از دو گروه دیگر است. به عبارتی می‌توان گفت فرآورده گیاهی SIM2 بر ارگانل میتوکندری که به‌عنوان مهم‌ترین عامل تهیه انرژی و موتورخانه سلول و عامل کلیدی در مرگ آپوپتوتیک و نکروزی سلول‌های عصبی حرکتی نخاع است، نقش دارد.

منابع

1. Knoll J. R- (-)deprenyl facilitates the activity of the nigrostriatal dopamininergic neuron. J Neural Transm 1987 Suppl: 25: 45-66.
2. Mizuta I, Ohta M, Ohta K, Nishimura M, Mizuta E. Selegiline and desmethyl selegiline stimulate NGF,BDNF, GDNF synthesis in cultured mouse astrocytes. J Biochem Biophys Res 2000: 3: 751-755.
3. Kontkanen Q, Castren E. Trophic effects of selegiline on cultured dopaminergic neuron. Brain Res 1999: 829:190-200.
4. Aldskogius H, Risling M. Effect of sciatic neurectomy on neuronal number and size distribution in L7 of kittens. Experimental Neurology 1981: 74: 597-604.
5. Li L, Oppenheim Rw, Ler M, Houenou L. Neurotrophic agents prevent motoneuron death following sciatic nerve section the neonatal mouse. J Neurobiol 1994:7: 759-766.
6. Schalbruch H. Motoneuron death after sciatic nerve section in new born rats Journal of comparative Neurology 1984: 224: 252-258.

۷. مومنی اکرم، بررسی اثر سیتوتوکسیک و ضدتوموری داروی SIM-2 بر روی رده سلولی سرطان کولون (29-HT) در مقایسه با رده سلولی فیبروبلاست، پایان‌نامه دکترای عمومی، تهران، دانشگاه شاهد، دانشکده پزشکی، شهریور ۸۵

8. Gelderd JB, Chopin SF. The vertebral level of orgin of spinal nerves in the rat. Anat Rec 1977: 188: 45-48.
9. Heshmati M,Tiraihi T. Delayed synaptic changes in axotomized spinal motoneurons of newborn rats associated with progressive neuronal loss: immunohistochemical, ultrastructural, and quantitative study. Iranian journal of pathology 2006:4: 162-168.
10. Oppenhim RW, Albert C.Apoptosis in the nervous system,morphological features methods,pathology and prevention.Arch Histol Cytol 1995:58:139-149.
11. 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.
12. Bahadori MH, Taghi Tiraihi TM. Sciatic nerve transection in neonatal rats induces apoptotic neuronal death in L5 dorsal root ganglion. Journal of Neurocytology 2001: 30: 125-130.
13. Aldskogius H., Risling M. Effect of sciatic neurectomy on neuronal number and size distribution in L7 of kittens. Experimental Neurology 1981: 74: 597-604.
14. Soppet D,Escandon E, Maragos J, Middlemas D, Reid S, Blair J. The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the Trk-B tyrosine kinase receptor. Cell 1991:65: 895-903.
15. Shimazu S, Katsuki H, Akaike A. " Selegiline rescues dopaminergic neurons in organotypic slice cultures of neonatal rat mesencephalon from N-methyl-D-aspartate toxicity ". European Journal of Pharmacology 1999: 377: 29-34.
16. Tatton WG. Selegiline can mediate neuronal rescue rather than neuronal protection. Mov Disord 1993: 8: 20-30.

۱۷. دلاوری زهراالسادات، بررسی اثر ضدتومور و سایتو توکسیک داروهای SIM-1 و SIM-2 بر روی رده سلولی سرطان ریه، پایان‌نامه دکترای عمومی، تهران، دانشگاه شاهد، دانشکده پزشکی، شهریور ۸۵

18. Rocio B.P, David Sequra C.Invitro antibradykinin activity of Aloebarba densis Gel. J of Ethnopharmacology 2004:93:89-92.
19. Chandan B. K, Saxena A. K.Hepatoprotective potential of Aloe barbadensis Mill. Against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity. J of Ethnopharmacology 2007:111:560-566.
20. Beattie MS, Hermann GE, Rogers RC, Bresnahan JC. Cell death in models of spinal cord injury. Brain Res 2002: 137: 37-47.
21. Nicholls DG, Budd SL. Mitochondria and neuronal survival. Physiol Rev 2000:80: 315-360.
22. Solenski NJ, diPierro CG, Trimmer PA, Kwan AL, Helms GA. Ultrastructural changes of Neuronal Mitochondria After Transient and Permanent Cerebral Ischemia. Stroke 2002: 33: 816- 823.
23. He A,Wang JA, Gui C. Changes of mitochondrial pathway in hypoxia/ reoxy-genation induced cardiomyocytes apoptosis.Folia histochem cytobiol.2007:45:397-400.
24. Wang Y, Zhang B, Peng X. Bcl-X(L) prevents staurosporine-induced hepatocyte Apoptosis by restoring protein kinase B/mitogen-activated protein kinase activity And mitochondria integrity. J. Cell Physiol. 2007:59: 1325-1332.

Archive of SID

www.SID.ir