

## تعیین دوز مناسب و موثر دپرنیل بر نورون های حرکتی نخاع نوزادان موش صحرائی 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.Sadeghzadeh

#### 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 sacrificed. 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 coefficient were  $r = -0.922$ ,  $r = -0.879$  and  $r = 0.605$  respectively. Variance 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.

**هدف:** مطالعه به منظور تعیین دوز موثر داروی دپرنیل بر وزن، مرگ و میر و تعداد نورون های حرکتی نخاع نوزادان موش صحرائی اکسوتومی انجام شد.

**مواد و روش ها:** در این پژوهش از ۱۰۰ سر نوزاد موش نژاد اسپراگ داوولی استفاده شد. ابتدا موش ها به وسیله هیپوترمی بی هوش و عصب سیاتیک پای چپ در وسط ران قطع شد. یک ساعت بعد از اکسوتومی، نوزادان به ده گروه ده تایی تقسیم شدند و روزانه به ترتیب ۰/۱ میلی لیتر مقادیر ۰/۲۵، ۱۰، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۷۰، ۹۰، ۱۰۰ و ۱۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم دارو برای نه گروه و برای گروه دهم (شاهد) آب مقطر به روش داخل صفاقی تزریق شد. اولین تزریق یک ساعت بعد از اکسوتومی انجام و ۲۱ روز طول کشید. در مقادیر ۹۰ به بعد هیچ نمونه ای جمع آوری نشد. سپس حیوان های اکسوتومی شده قربانی شدند و نخاع تمام نمونه ها در ناحیه L<sub>1</sub> مهره کمری که معادل L<sub>4</sub>-L<sub>6</sub> سگمان نخاعی است، برداشت شد. بعد از پردازش بافتی، رنگ آمیزی اختصاصی کرسیل 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 تأیید شد.

**یافته ها:** ضریب همبستگی میزان بقای حیوان ها، وزن و درصد بقای نورون های حرکتی به ترتیب  $r = -0/879$ ،  $r = -0/922$  و  $r = 0/605$  بود. آنالیز واریانس اختلاف معنی داری را بین دوزهای مختلف نشان داد.

**نتیجه گیری:** دوز موثر دپرنیل ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم بود و این دارو یک اثر آنتی آپوپتوتیک بر روی نورون های حرکتی نخاع نوزادان اکسوتومی شده داشت.

**کلید واژه ها:** دپرنیل، اکسوتومی، عصب سیاتیک، موش صحرائی

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

\*\* دانشیار دانشگاه علوم پزشکی تربیت مدرس

\*\*\* استاد دانشگاه علوم پزشکی تربیت مدرس

## ۱. مقدمه :

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 مقدار ۰/۰۱ میلی گرم بر کیلوگرم در افزایش بقای نورون های حرکتی صورت موش صحرایی به میزان قابل توجهی موثرتر از CNTF است.<sup>(۲۰)</sup>

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 موثر بر نورون های حرکتی نخاع در شرایط خارج از بدن معرفی کرد.<sup>(۷)</sup>

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.<sup>(۱۱)</sup>

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 تأخیر بیندازد.<sup>(۱۲)</sup>

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

## ۱. مواد و روش ها :

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

بررسی پدیده مرگ یاخته های عصبی طی تکامل طبیعی، بیماری ها و آسیب های بافتی تاریخچه ای نسبتاً طولانی دارد. اکسوتومی به عنوان الگوی القایی مرگ نورون ها در سال های ۱۹۴۰ 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 سیپاتیک در نوزادان موش صحرایی باعث کاهش نورون های حرکتی نخاع می شود.<sup>(۸)</sup> 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.<sup>(۱۷)</sup> 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.<sup>(۴)</sup>

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.<sup>(۱۹)</sup> 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.<sup>(۱۴)</sup>

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 موثر است.<sup>(۸)</sup> 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

بررسی میزان همبستگی بین متغیرها از آزمون همبستگی و برای مقایسه مقادیر مختلف دارو از آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد. نتایج حاصل به صورت میانگین انحراف معیار بیان شده است. اختلاف در سطح  $P < 0.05$  معنی دار در نظر گرفته شد.

#### ۱. یافته ها :

از نظر تأثیر مقادیر مختلف دارو بر وزن حیوان ها، با افزایش مقدار دارو، وزن کاهش یافت ( $P < 0.01$  و  $0.879/r = -$ ).

اثر مقادیر مختلف دارو بر میزان مرگ و میر حیوان ها به این صورت بود که در مقادیر  $0.25$ ،  $1.0$ ،  $3.0$ ،  $45$  میلی گرم بر کیلوگرم همه حیوان ها زنده ماندند، اما با مقادیر  $60$  میلی گرم بر کیلوگرم  $53$  درصد و  $75$  میلی گرم بر کیلوگرم  $60$  درصد حیوان ها مردند. با مقادیر  $90$ ،  $100$ ، و  $110$  میلی گرم بر کیلوگرم همه حیوان ها مردند. نتایج حاصل از آزمون همبستگی بین مقادیر مختلف داروی تزریق شده و مرگ و میر حیوان ها نشان داد که با افزایش مقدار دارو، میزان بقای حیوان ها کاهش یافته است ( $P < 0.05$  و  $0.922/r = -$ ).

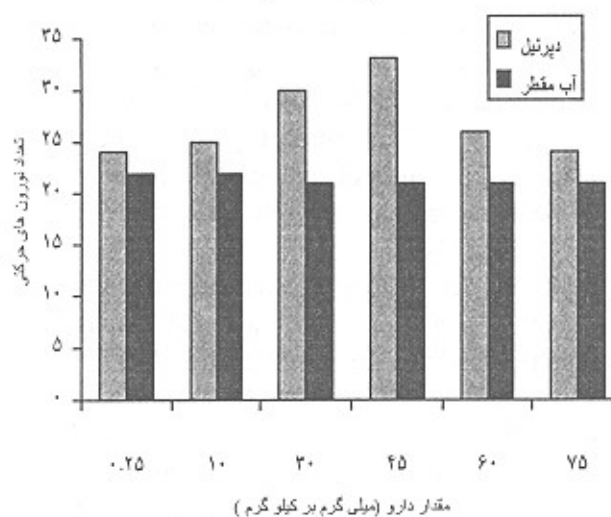
از نظر اثر مقادیر مختلف دارو بر تعداد نوروں های حرکتی (تعیین دوز مؤثر)، نتایج حاصل از آزمون همبستگی بین مقادیر تزریق شده و تعداد نوروں های حرکتی نخاع نیز نشان داد که با افزایش مقدار دارو تعداد نوروں های حرکتی کاهش یافته است ( $P < 0.05$  و  $0.605/r = -$ ). همچنین مقایسه آماری با استفاده از آنالیز واریانس متغیر تصادفی نشان داد که تفاوت کلی بین مقادیر مختلف معنی دار است ( $P < 0.001$ ). آزمون HSD توکی، دال بر آن است که اختلاف گروه های  $3.0$ ،  $45$ ،  $60$  میلی گرم بر کیلوگرم با گروه شاهد معنی دار است و از طرفی بین این مقادیر اختلاف معنی داری وجود ندارد. لذا مقدار کمتر دارو یعنی  $30$  میلی گرم بر کیلوگرم به عنوان مقدار مناسب در تحقیقات بعدی استفاده شد (نمودار شماره ۱).

پای چپ به ده گروه ده تایی تقسیم شدند. گروه های ۱ تا ۹ به ترتیب یکی از مقادیر  $0.25$ ،  $1.0$ ،  $3.0$ ،  $45$ ،  $60$ ،  $75$ ،  $90$ ،  $100$  و  $110$  میلی گرم بر کیلوگرم داروی دپرنیل را به عنوان گروه های آزمایش به مدت  $21$  روز و گروه دهم فقط آب مقطر به عنوان شاهد دریافت نمودند. جهت انجام عمل اکسوتومی، نوزادان با استفاده از هیپوترمی بیهوش شدند و در ناحیه پشت ران پای چپ، موازی با استخوان ران پوست برش داده شد. با نمایان شدن عضله، دو سر عصب سیاتیک که در زیر آن قرار دارد در ناحیه وسط ران بین زانو و ستون مهره قطع شد. برای جلوگیری از رشد مجدد (reinnervation) حدود  $2$  تا  $3$  میلی متر از عصب در محل قطع آن حذف و پوست ناحیه بخیه شد. یک ساعت بعد از اکسوتومی (روزانه طی مدت  $21$  روز) ابتدا نوزادان در هر گروه توزین و به ترتیب  $1/0$  سی سی از مقادیر مذکور دارو بر اساس وزن آنها تزریق می شد. در هفته اول بعد از اکسوتومی به علت مرگ نوزادان هیچ نمونه ای از مقادیر  $90$ ،  $100$ ،  $110$  میلی گرم بر کیلوگرم جمع آوری نشد. بعد از  $21$  روز تمام نمونه های باقی مانده با اتر کشته شده و بعد از خارج نمودن احشاء از طریق برش شکم نخاع بین تحتانی ترین قسمت مهره  $T_{13}$  و دیسک  $L_1$  و  $L_2$  (که معادل با سگمان نخاعی  $L_4-L_6$  و محل جسم سلولی عصب سیاتیک است) قطع شد و در فیکساتیو بوئن قرار گرفت. بعد از پردازش بافتی، بلوک های پارافینی تهیه و با استفاده از میکروتوم روتاری برش های  $8$  میکرونی تهیه شد. در نمونه های جمع آوری شده با استفاده از رنگ آمیزی اختصاصی کرسیل فست ویولت و با میکروسکوپ نوری، نوروں های حرکتی شاخ قدامی هر دو طرف نخاع شمارش شد. اساس شمارش سلول های هستک دار با اندازه هسته بیش از  $10$  میکرون و سیتوپلاسم کاملاً رنگ شده از اجسام نیسل بود که در ناحیه  $L_1$  نخاع در قسمت قدامی-جانبی شاخ قدامی نخاع قرار داشت. توزیع طبیعی اطلاعات به دست آمده با استفاده از آزمون K-S تأیید شد. برای

بلکه این دارو به طریقی اثر کمبود عامل تروفیک بر نورون های حرکتی را جبران می کند.<sup>(۱۶)</sup>

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.<sup>(۱۸)</sup> 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.<sup>(۱۷)</sup> 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.<sup>(۱۰،۱۲)</sup> 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 تاخیر می اندازد.<sup>(۳)</sup> 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.<sup>(۱۶،۱۷)</sup> 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،<sup>(۱۷)</sup> باعث کاهش وزن نوزادان

نمودار ۱- مقایسه میانگین تعداد نورون های حرکتی حیوان های آکسوتومی شده در مقادیر مختلف دارو ( $P < 0.05$ )



### بحث و نتیجه گیری :

این مطالعه نشان داد داروی دپرنیل در جلوگیری از مرگ نورون های حرکتی نخاع کمری در نوزادان موش صحرایی موثر 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.<sup>(۱۵)</sup> 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.<sup>(۴)</sup>

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 آکسوتومی ایجاد شده جبران نماید. این بدان معنی نیست که دپرنیل به عنوان یک عامل تروفیکی عمل می کند،

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, Rich K M. Diphenylpiperazines 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 facial motoneurons and weight loss. *J Neurosci Res* 1995; 40(4): 564-70

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 Bilbao 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 motoneurons 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