Archive of SID

فیزیولوژی و فارماکولوژی
جلد ۱۰، شماره ۱، بهار ۱۳۸۵

بررسی اثر دپرنیل در تغییرات mRNA گیرنده نروتروفینی P75 پس از آکسوتومی عصب سیاتیک در نوزادان موش صحرایی

تقی طریحی[۱]، حسام امینی[۲]، سیدجواد مولی[۲] و مرجان حشمتی[۳*]
۱- دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس ۲- دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد ۳- دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس

دریافت: اسفند ۱۳۸۳ بازبینی: آذر ۱۳۸۴ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۸۵

چکیده

هدف: نروتروفینها خانواده ای از فاکتورهای رشد هستند که نقش آنها با توجه به نوع گیرنده ی متصل شده مشخص می شود وسبب حفظ یا مرگ سلولهای مربوطه میگردند. با توجه به مشخص شدن نقش نرو تروفینها، از داروهایی با این خاصیت دپرنیل یا سلژیلین را میتوان نام برد که به عنوان یک داروی کاهش دهنده مرگ نرونهای حرکتی شاخ قدامی نخاع پس از آکسوتومی عصب محیطی شناخته شده است. در این تحقیق با بررسی چگونگی تغییرات mRNA گیرنده‌های نروتروفینی Trk-B و P75 به مطالعه مولکولی خاصیت آنتی آپوپتوتیک داروی دپرنیل بر مرگ نرونهای حرکتی پس از آکسوتومی عصب سیاتیک در نوزادان موش صحرایی پرداخته شد.

روش کار: حیوانات به دو گروه درمان شده (تزریق داخل صفاقی دپرنیل ۲/۵mg/kg) و درمان نشده (تزریق داخل صفاقی سرم فیزیولوژی) تقسیم شدند. سپس هر گروه به سه زیر گروه براساس زمان تزریق نسبت به عمل آکسوتومی تقسیم شد. بدین ترتیب که یکساعت قبل از آکسوتومی، همزمان با آکسوتومی و یکساعت بعداز آکسوتومی تزریق دپرنیل یا سرم فیزیولوژی انجام شد. بررسی مولکولی گیرنده‌ها به روش RT-PCR انجام شد و حیوانات در دو سری (الف و ب) در روزهای سوم و چهارم پس از تولد کشته شدند.

یافته ها: نتایج نشان می‌دهد دپرنیل سبب کاهش mRNA گیرنده P75 پس از گذشت ۲۴ ساعت از تزریق می‌شود.

نتیجه گیری: بدین ترتیب می توان نتیجه گرفت دپرنیل با اثر تغییر بیان ژن/سنتز پروتئین سبب کاهش mRNA گیرنده P75 پس از انجام اکسوتومی عصب سیاتیک می شود که خود موجب کاهش مرگ آپوپتوتیک نرونهای حرکتی مربوطه می گردد.

واژه‌های کلیدی: نروتروفین، دپرنیل، آکسوتومی، آپوپتوز، نرونهای حرکتی، گیرنده P75 .

مقدمه

نروتروفینها خانواده‌ای از فاکتورهای رشد هستند. این مواد با اتصال به گیرنده‌های خاص خود در طی دوران تکوین در دو طیف مختلف نقش خود را ایفا می‌کنند به طوری که از یک طرف سبب تکثیر، مهاجرت، تمایز، رشد و ادامهٔ روند چرخه سلولی و حفظ حیات سلولها می‌شوند و از سویی دیگر با جلوگیری از موارد فوق سبب آپوپتوز و از بین رفتن سلول خاص می‌شوند[۶ و۱۱].

ازاین مواد نروتروفینی می‌توان NGF، BDNF، NT-4/5 و NT-3 را نام برد با توجه به گیرنده‌هایی که با نروتروفین به صورت اختصاصی متصل می‌شوند نقش نروتروفین‌ها مشخص می‌گردد[۲۰].

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبات:
marjanheshmaty@hotmail.com

یکی از انواع گیرنده‌ها $P75^{NTR}$ است که تمایل یکسانی برای اتصال با نروتروفین‌های NT-3 ، BDNF . NGF و NT4/5 دارد این گیرنده در غشای سلول پستانداران واقع شده و از اعضای خانوادهٔ تومور نکروز فاکتور محسوب می‌شود[۲۴].

گروه دیگری از گیرنده‌های موجود در غشاء سلول خانوادهٔ تیروزین کیناز است که اتصال گیرنده تیروزین کیناز با نروتروفین‌ها اختصاصی بوده بطوری که گیرنده تیروزین کیناز B با BDNF و NT4/5 متصل می‌شود[۱۴].

مطالعات نشان می‌دهد عملکرد گیرنده دارای طیف وسیعی است بطوری که در دوران تکوین و بعداز تولد، با توجه به نوع سلول و نروتروفین متصل شده عملکردگیرنده تغییر می‌کند. بطور مثال افزایش بیان گیرنده P75 در دو مرحله زمانی است که یکی مربوط به قبل از تولد تا یک روز بعد از تولد و دیگری در دوران پیری است [۲۴] و در پاره‌ای از اختلالات عصبی نظیر بیماری آلزایمر، پارکینسون، قطع عصب محیطی و

www.SID.ir

Archive of SID

ضایعات نخاعی نیز نقش این گیرنده گزارش شده است[۱۵].

بیان گیرنده تیروزین کیناز B از روز اول بعداز تولد شروع و افزایش آن در حدود هفته دوم که مصادف با باز شدن پلکهای موش صحرایی است گزارش شده است [۱۹].

یکی از روشهای معمول آزمایشگاهی القاء مرگ آپوپتوزی سلولهای عصبی، آکسوتومی است [۱۳].میزان آپوپتوز به عواملی مانند سن و شدت ضایعه وابسته است[۱و۱۰].

با توجه به نقش مؤثر نوروتروفین‌ها در کاهش مرگ آپوپتوتیک توجه محققین به ساخت مواد شیمیایی که خاصیت نوروتروفیکی دارند جلب شد . از بین این مواد، داروی دپرنیل یا Selegiline است که اولین بار توسط پروفسور Knoll (۱۹۶۰) در مجارستان ساخته شد این دارو ابتدا به عنوان داروی ضدافسردگی معرفی شد ولی بعداً با مشخص شدن اثرات دیگر، دردرمان بیماری نورودژنراتیو پارکینسون استفاده شد. تحقیقات نشان می‌دهد که اثرات دارو در طیف وسیعی قابل بررسی است به طوری که به دنبال متابولیسم دارو در کبد دیس متیل سلژیلین ، آمفتامین و متآمفتامین ایجاد می‌شود[۸ و۲۳].

دیس متیل سلژیلین باعث مهار آنزیم منوآمینواکسیداز نوع B (MAO-B) می‌شود[۹]. امروزه علاوه بر اثر مهاری آنزیم، اثر دپرنیل از طریق تغییر بیان ژن / سنتز پروتئین عنوان می گردد مثلاً با افزایش بیان Bcl-2، SOD1 و SOD2 از اثرات مخرب رادیکالهای اکسیداتیو و مرگ نرون جلوگیری می‌کند[۲۳].

حال با توجه به پاره ای از مطالعات انجام شده در خصوص آکسوتومی و القاء آپوپتوز در سلولهای عصبی مربوطه، بررسی مولکولهای دخیل در این فرایند مورد توجه محققین قرار گرفته و فرضیه هایی مطرح شده که بوسیله آن بتوان تا حدی رویداد فوق را کنترل پذیر نمود. بدین ترتیب برای نیل به این اهداف بررسی تغییرات گیرنده های نوروتروفینی دخیل در آپوپتوز حائز اهمیت میگردد. پس تحقیقی طراحی شد که مکانیسم آپوپتوز را پس از آکسوتومی عصب سیاتیک در جنین موش صحرایی ۳ روزه با توجه به تغییرات mRNA ژن گیرنده‌های نوروتروفینی P75 و Trk-B در دو زمان ۴ و ۲۴ ساعت پس از تزریق داخل صفاقی دپرنیل یا سرم فیزیولوژی ارزیابی کرده و تاثیر داروی دپرنیل در چگونگی این تغییر وتعیین نقش احتمالی دارو در حفظ عملکرد نرونهای حرکتی بعداز آکسوتومی عصب سیاتیک را با استفاده از روش RT-PCR بررسی می کند.

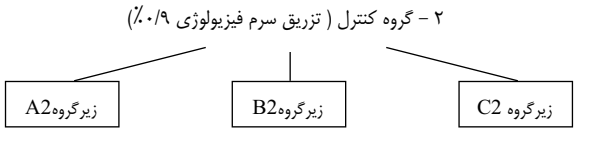
مواد و روشها

جهت مطالعات آزمایشگاهی از نوزادان ۳ روزه موش صحرایی نژاد Sprague Dawley انستیتو رازی حصارک کرج استفاده شد. بدین منظور ابتدا موش های باردار به تعداد ۲۴ عدد خریداری شدند. سپس در دو گروه ۱۲عددی در داخل قفس‌های جداگانه به طور تصادفی قرار گرفتند. شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای ۲۳-۲۲ درجه سانتی‌گراد و غذای مخصوص از شرکت خوراک دام پارس به همراه آب کافی در نظر گرفته شد. بر روی هر قفس بر چسبی جهت مشخص کردن گروه، زیر گروه، روز زایمان (E=0)، تعداد، وزن نوزادان، تاریخ آکسوتومی و کشتن نوزادان نصب شد.

پس از تولد نوزادان تقسیم‌بندی آنها در زیر گروههای: ۱) مطالعه و ۲) کنترل بطور تصادفی انجام شد. بدین صورت که هرگروه به سه زیر گروه تقسیم و تعداد ۱۲ حیوان برای هر زیرگروه در نظر گرفته شد (کلا ۷۲ حیوان). تقسیم بندی زیر گروهها بر اساس مطالعات انجام شده بر حسب زمان انجام تزریق نسبت به عمل اکسوتومی عصب محیطی بود [۱۲و۲۲]. در زیر گروه A تزریق یک ساعت قبل از انجام آکسوتومی، در زیر گروه B تزریق همزمان با انجام آکسوتومی و در زیر گروه C تزریق یک ساعت بعد از آکسوتومی انجام‌شد(شکل‌شماره۱).

پودر خالص دپرنیل وارداتی از شرکت اهران تهیه و جهت تزریق محلول در سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد تهیه گردید.

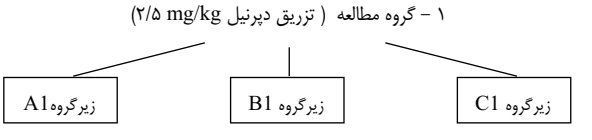
نوزادان متولد شده در روز سوم بعداز تولد تحت عمل آکسوتومی عصب سیاتیک چپ قرار گرفتند. بدین منظور ابتدا بوسیله هیپوترمی یخ بیهوش شدند در حالی که پوست ناحیهٔ مورد نظر با بتادین ضدعفونی گردید با استفاده از اسکالپل و پنس نوک تیز و ظریف استریل برش پوستی به موازات استخوان ران داده شد و پس از کنار زدن پوست و عضله دوسررانی عصب رؤیت و به آرامی به کمک پنس ظریف و نوک تیز بلند شد بطوری که عصب از عناصر همراه (شریان و ورید) جدا گردید. با کمک قیچی عصب را قبل از محل دوشاخه شدن قطع و برای جلوگیری از رشد مجدد و ترمیم عصب قطعه‌ای حدود ۳-۲ میلیمتر جدا و سپس پوست را با نخ 0-6 بخیه و محل جراحی با بتادین شسته



A2= تزریق سرم فیزیولوژی (۰/۹٪) یک ساعت قبل از عمل آکسوتومی عصب سیاتیک سمت چپ

B2= تزریق سرم فیزیولوژی (۰/۹٪) همزمان با عمل آکسوتومی عصب سیاتیک سمت چپ

C2= تزریق سرم فیزیولوژی (۰/۹٪) یک ساعت بعد از عمل آکسوتومی عصب سیاتیک سمت چپ



A1= تزریق دپرنیل (۲/۵ mg/kg) یک ساعت قبل از عمل آکسوتومی عصب سیاتیک سمت چپ

B1= تزریق دپرنیل (۲/۵ mg/kg) همزمان با عمل آکسوتومی عصب سیاتیک سمت چپ

C1= تزریق دپرنیل (۲/۵ mg/kg) یک ساعت بعد از عمل آکسوتومی عصب سیاتیک سمت چپ

شکل ۱

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- دما، زمان دناتوراسیون، اتصال (annealing) و پلیمریزاسیون (extension)

نام ژن	دناتوراسیون	Annealing	Extension	تعداد سیکل
P75	۳۰ ثانیه در ºC ۹۴	۴۵ ثانیه در ºC ۵۵	۹۰ ثانیه	۳۰
Trk-B	۳۰ ثانیه در ºC ۹۴	۴۵ ثانیه در ºC ۶۰	۶۰ ثانیه	۳۵
B2M	۳۰ ثانیه در ºC ۹۴	۴۵ ثانیه در ºC ۵۵	۶۰ ثانیه	۳۵

و ضدعفونی گردید. با توجه به زیرگروه‌ها تزریق انجام شد. بعداز گرم کردن نوزادان، آنها مجدداً به داخل قفس نزد مادران برگردانده شدند. جهت بررسی تغییرات mRNA ژن گیرنده‌های P75 و Trk-B به روش RT-PCR، جمع‌آوری نمونه‌ها در تمام زیر گروهها در دو زمان مختلف ۴ ساعت پس از تزریق (الف) و ۲۴ ساعت پس از تزریق (ب) انجام شد. کلاً ۷۲ حیوان براساس گروه‌های مورد بررسی آماده شد به طوری که در هر زیر گروه (B2، A1 C2، B1، C1، A2) ۱۲ حیوان قرار گرفت که این تعداد بین دو قسمت الف و ب تقسیم شد یعنی برای هر زیر گروه قسمت الف: (۶ حیوان) و برای هر زیرگروه قسمت ب: (۶ حیوان) جهت انجام تکنیک RT-PCR در نظر گرفته شد (شکل‌شماره۲).

پس از برش طولی پوست شکم، حفره شکم باز و با کنار زدن احشاء ستون فقرات نمایان شد. سپس سگمان نخاعی L4-L6 خارج و بعد از خروج نخاع سریعاً به داخل اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری با ذکر مشخصات به صورت جداگانه منتقل و در داخل فریزر ۸۰ – درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج RNA نگهداری شد.

جهت بررسی تغییرات mRNA گیرنده‌ها در تمام زیرگروههای مورد بررسی total RNA از نمونه‌های مورد نظر استخراج گردید. نکته حائز اهمیت در این مرحله ممانعت از آلودگی با آنزیم Rnase است. سپس سنتز cDNA و تزاید DNA به کمک تکنیک PCR انجام شد و محصول نهایی توسط ژل آگارز موردارزیابی‌قرارگرفت.

تمام موارد مورد نیاز برای تکنیک RT-PCR از شرکت سیناژن تهیه گردید و مراحل انجام پروسه طبق پروتکل همراه مواد اجرا شد.

مراحل استخراج RNA و PCR محصول RT

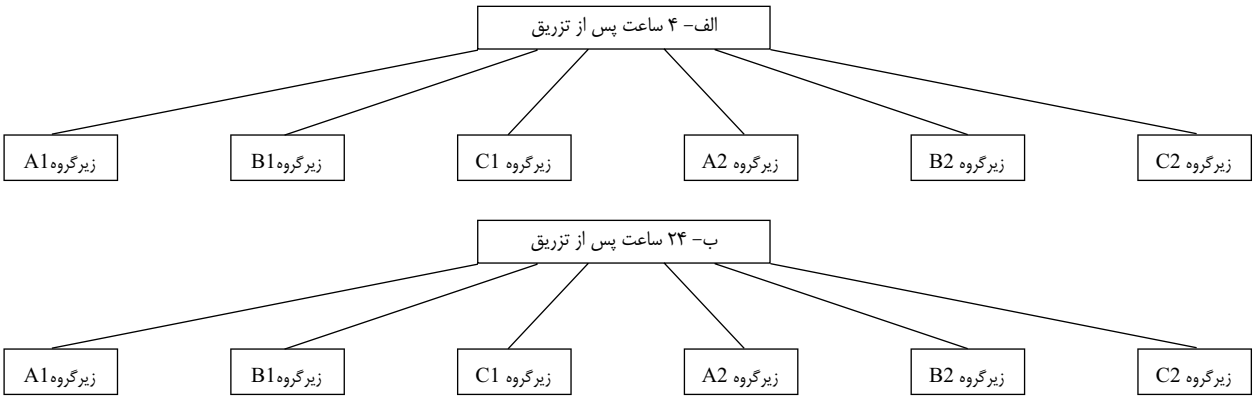
ابتدا بافت نخاع مورد نظر در سگمان L4-L6 در درون اپندورف به کمک آسیاب کننده مخصوص بخوبی له و خردگردید و جهت هرچه بهتر انجام این کار چندین مرتبه به تناوب داخل نیتروژن مایع فرو برده شد تا سلولها بخوبی لیز شده و سپس بقیه مراحل کار طبق پروتکل همراه مواد انجام گرفت.

سپس RNA برای مصارف ژل گذاری، تعیین غلظت با اسپکتروفتومتری و تهیه cDNA در سه اپندورف تقسیم و در دمای ۸۰– درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

برای بررسی کیفیت RNA استخراج شده از الکتروفورز ژل آگارزو برای بررسی غلظت RNA از نظر کمی از روش UV اسپکتروفتومتری استفاده شد و برای تعیین غلظت نمونه، جذب نوری در طول موجهای ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتری خوانده شد. همچنین برای تبدیل RNA به cDNA نیاز به پرایمری است که با mRNA هیبرید شود و توسط آنزیم DNA پلی مراز وابسته به RNA دنباله آن ساخته شود تا کپی cDNA ایجاد گردد. پرایمرهای اختصاصی با کمک برنامه نرم‌افزار primer 3 و مقالات معتبر سفارش و تهیه گردید.

به همین منظوربا استفاده از سایت NCBI با شماره دستیابی Trk-B →m 55291 و P75 →X05137، پرایمر بالا دست و پایین دست گیرنده‌ها مشخص شد. جهت بررسی کنترل داخلی از ژن B2M استفاده شد. در هر بار PCR با دستگاه ترموسایکلر ارزیابی B2M انجام گرفت و بدین منظور با شماره دستیابی Y00441 از سایت NCBI پرایمرها طراحی شدند.

پرایمرهای مورد نظر از کمپانی MWGG-Biotech AG آلمان



شکل ۲

www.SID.ir

Archive of SID

بـا درجـه خلـوص high purified salt free (HPSF) به صورت لیوفیلیزه تهیه شد.

سـپس واکنش PCR برای هر ژن روی محصول RT انجام شد که طبق پروتکل سیناژن بود.

با اسـتفاده از دما، زمان دناتوراسـیون، اتصال و پلیمریزاسـیون طبق (جدول ۲) واکنش تکثیر انجام شد.

درنهایت یک سـیکل بعنـوان extension نهایی ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس میکروتیوپ‌ها از دستگاه خارج و در دمای ۲۰- درجه سـانتی‌گراد نگهداری و برای تشخیص قطعه تکثیر شده از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد.

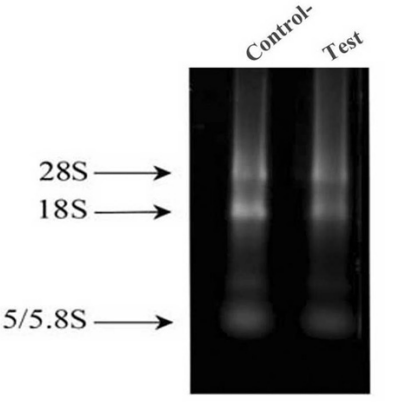
نتایج

اگر نمونه های RNA اسـتخراج شده از نظر شیمیایی دست نخورده باشـند از کیفیت بالایی برخوردارند. بدین ترتیب الگوی باندینگ ویژه‌ای را بر روی ژل آگارز نشـان می‌دهند که حضور باندهای RNA ریبوزومی 18S و 28S نشـان دهندهٔ سـالم بودن و دسـت نخورده بودن RNA اسـتخراجی اسـت و با این کیفیت بـالا باندهـای S۸/۵ و S۵ نیز قابل مشاهده است (شکل ۳).

بررسـی کمی RNA استخراج شـده با خواندن جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر و ۲۸۰ نانومتر و نسبت بین آن دو در تمام نمونه‌ها انجام شدکه نتایج بین ۲-۱/۸ بود.

بررس تغییرات بیانmRNA گیرنده‌های P75 و Trk-B همراه با نمونه‌هـای کنترل منفی، مثبت و داخلی برای تمـام نمونه‌ها در تمام زیر گروههـا در هر بار واکنش PCR انجام شـد. بدین ترتیب که در نمونه کنترل منفـی با حذف مرحله افزودن آنزیـم RT ، در تمام نمونه‌ها هیچ گونه باندی مشاهده نشد. جهت بررسی کنترل مثبت برای گیرنده P75 از بافت نخاع موش صحرایی ۱ روزه که میزان mRNA ژن P75 آن بالا است استفاده شد (شکل ۴) و برای گیرنده Trk-B از بافت مخچه موش صحرایی بالغ که میزان mRNA بالا است استفاده شد(شکل ۵).

الکتروفـورز محصـول PCR گیرنـده P75 روی ژل آگارز یک باند



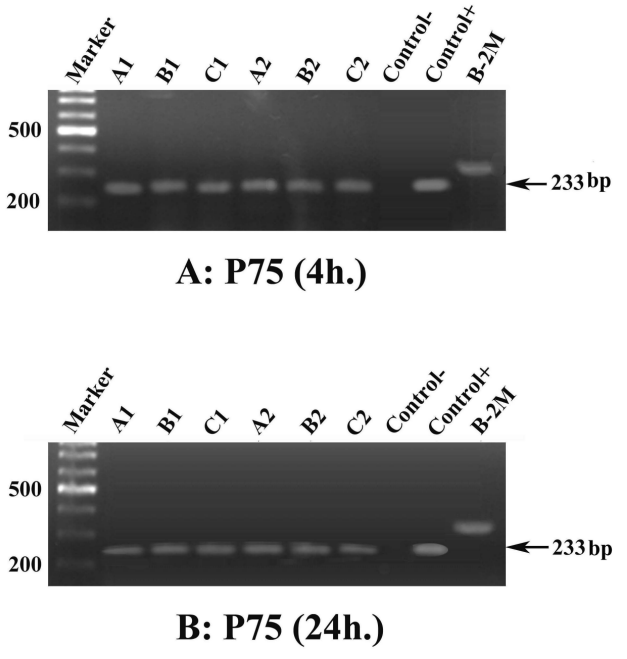
شکل ۳ – الگوی باندینگ RNA سالم و دست نخورده

را نشـان داد کـه اندازه آن معـادل با اندازه قطعه طراحی شـده pb۲۳۳ بـود و برای گیرنده Trk-B معادل با اندازه قطعه طراحی شـده bp۲۴۵ در سـایت NCBI بـود. کنترل داخلی نیز باندی بـه اندازه قطعه طراحی شـده bp۳۱۸ در سـایت NCBI بود. نتایج نشـان می‌دهد که در تمام زیرگروههـا در نمونه‌بـرداری مربوط به ۴ سـاعت پـس از تزریق داروی دپرنیل یا سرم فیزیولوژی (الف) و ۲۴ ساعت پس از تزریق داروی دپرنیل یا سـرم فیزیولوژی (ب) m R NA ژن P75 نمایان اسـت (شکل ۴). جهـت تعیین هرگونـه اختلاف احتمالی در بیـان ژن P75 از روش نیمه آماری semi quantitative اسـتفاده شد. بدین منظور شدت باندهای حاصـل از الکتروفـورز محصول PCR روی ژل آگارز بـا کمک نرم‌افزار total lab-phoretix به آدرس info@totallab.com بدست آمد و محاسـبه نسبت شـدت باند P75 به شدت باند B2M در هر نمونه نخاع خارج شـده، در هر مرتبه ژل گذاری محاسـبه و میانگین و انحراف معیار این نسبت در تمام زیرگروهها محاسبه شد (شکل ۶ و ۷).

نتایج نشان می‌دهد داروی دپرنیل پس از گذشت ۲۴ ساعت از تزریق سبب کاهش بیان ژن P75 می‌شود.

الکتروفورز محصول PCR بروی ژل آگارز برای گیرنده Trk-B در تمام زیرگروهها قابل ردیابی نبود (شکل ۵).

درنمونه کنترل مثبت ژن Trk-B مخچه موش صحرایی بالغ باندی بـه اندازهٔ bp ۲۴۵ نمایان اسـت. از ژن B2M بـه عنوان کنترل داخلی اسـتفاده می شـود که این ژن در تمام سـلولها بیان می گردد و درنمونه کنترل منفی با حذف آنزیم RT صحت و دقت مراحل انجام تکنیکPCR تایید شد (شکل ۵).



شکل ۴- باندهای حاصل از الکتروفورز DNA نمونه‌های نخاع حاکی از بیان ژن P75 در زیر گروه‌های A1، B1، C1، A2، B2 و C2 نمونه‌برداری مربوط به ۴ ساعت پس از تزریق (A) و ۲۴ ساعت پس از تزریق (B). باندهای مارکر، نمونه کنترل منفی، باند کنترل مثبت (نخاع موش صحرایی ۱ روزه) و باند B2M در هر دو شکل A و B نشان داده می‌شود.

www.SID.ir

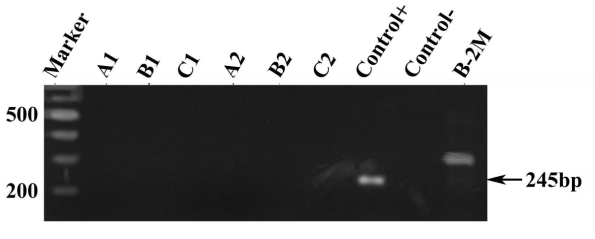
Archive of SID

بحث

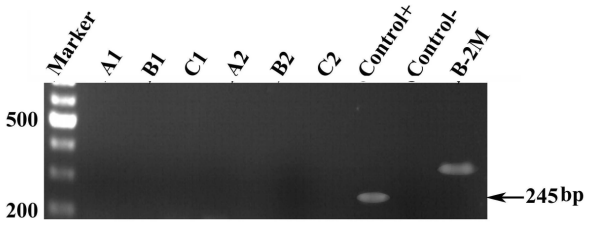
مـرگ نرونهای حرکتی نابالغ در پی محروم شـدن آنها از بافت‌های هدف مربوط در اثر آکسـوتومی مدل مناسبی برای دست‌یابی به خاصیت نروتروفیکـی داروی دپرنیـل فراهـم می‌کند. بطوری کـه خاصیت آنتی اکسـیدانت و آنتی آپوپتوتیک آن به دنبال تأثیر بر مولکول‌های ضدآپوپتوز و رادیکالها مشخص شده است که با افزایش بیان مولکول‌های ضدآپوپتوز مانند Bcl-2 و آنتی‌اکسیدانت‌ها مرگ آپوپتوتیک را کاهش می‌دهد.

بدین ترتیب برای طیف گسـترده اثـرات داروی دپرنیل فرضیه‌هایی مطرح شـد مبنی بر این که دپرنیل روی سـلولهای عصبی نیز تأثیر دارد. بطوری که تحقیقات دراین زمینه نشـان می‌دهد که این دارو سبب حفظ سـلولهای عصبی حسـی درضایعات عقده خلفی نخاع [۲۲] و سلولهای حسـی شبکیه چشم موش صحرایی [۲۳] و حفظ نرونهای عصب بینایی موش صحرایی پس از ضایعه می شود[۴].

با مشخص شدن اثر نرون حفاظتی دارو بر روی سلولهای عصبی حسی توجه پاره‌ای از محققیـن به مطالعه اثر دارو بر نرون‌های حرکتی متمرکز شد و تحقیقات زیادی در این مورد صورت گرفت. که طبق گزارش Salo دپرنیل در آکسـوتومی عصب فاسـیال (صورتی) موش صحرایی کاهش مرگ را نشـان می‌دهد[۱۷] . در همین راسـتا گزارش دیگری وجود دارد که اثر دپرنیل را در بقاء نرونهای حرکتی آکسـوتومی شده حیوانات بالغ یا نابالغ نشـان می‌دهد [۳]. این اثر مشابه با اثر فاکتورهای تروفیکی بافت هدف یعنی BDNF اسـت بعبارتی نقش نرون حفاظتی دپرنیل از طریق



A: Trk-B (4h.)



B: Trk-B (24h.)

شکل ۵- فقدان باند حاصل از الکتروفورز DNA نمونه‌های نخاع برای ژن Trk-B در زیر گروه‌های A1، B1، C1، A2، B2 و C2 نمونه‌برداری مربوط به ۴ ساعت پس از تزریق (A) و ۲۴ ساعت پس از تزریق (B) باندهای مارکر، باند حاصل از بیان ژن B2M ، نمونه کنترل منفی و باند کنترل مثبت (مخچه موش صحرایی بالغ) در هر دو شکل A و B نشان داده می‌شود.

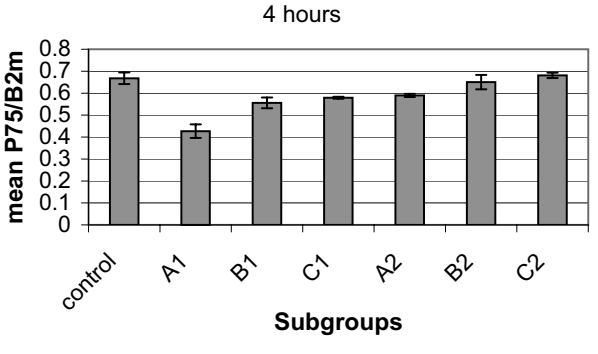
القاء فاکتورهای نروتروفیکی اسـت[۱۲]. در بررسـی اثرات دارو نقش آن در تغییر mRNA پاره‌ای از ژنها نیز مطرح اسـت که می‌توان GDNF و BDNF را در سلولهای آستروسیت نام برد[۲۳].

نقش گیرنده P75 در تنظیم مکانیسـم مرگ آپوپتوتیک سـلولهای عصبـی و افزایش mRNA ایـن گیرنده در بیمـاری نورودژنراتیو نظیر آلزایمر، پیری و ضایعات قطع عصب محیطی تا حدی مشخص شده است. بدنبال آکسـوتومی عصب سیاتیک نوزادان موش صحرایی ۸۰٪ نرونهای حرکتی بدنبـال افزایش mRNA گیرنده P75 دچـار مرگ آپوپتوتیک می‌شوند[۱۸].

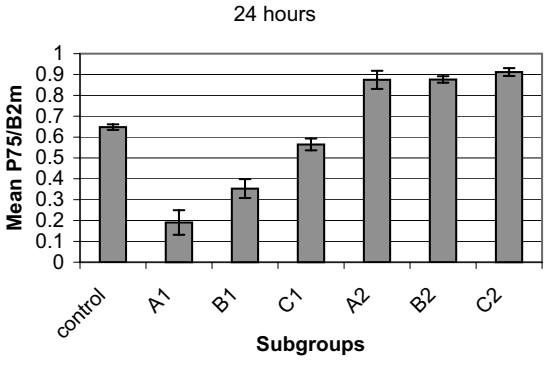
همچنین گزارش دیگری مرگ سـلولهای اولیگودندروگلیال‌ها پس از ضایعـه طناب نخاعی و دژنره شـدن عصب محیطی بواسـطه mRNA گیرنده P75 را ذکر می‌کند[۱۴].

گـزارش Syroid علی‌رغـم افزایـش NGF و BDNF پـس از آکسـوتومی نوزادان موش صحرایی مرگ آپوپتوتیک سـلولهای عصبی و شوان را ناشی ازگیرنده P75 می داند [۲۱]. در موشهای فاقد گیرنده P75 مرگ سـلولهای شوان و عصبی پس از صدمه به عصب محیطی مشاهده نمی‌شود[۷].

نتایج بدسـت آمده دراین تحقیـق نیز تا حدودی همراسـتا با نتایج



شکل ۶- نمودار ستونی از میانگین نسبت شدت باند P75NTR به شدت B2M در هر زیر گروه با نمونه‌برداری ۴ ساعت پس از تزریق و در نمونه کنترل مثبت که مربوط به نمونه نخاع موش صحرایی ۱ روزه است.



شکل ۷- نمودار ستونی از میانگین نسبت شدت باند P75NTR به شدت باند B2M در هر زیر گروه با نمونه‌برداری ۲۴ ساعت پس از تزریق و در نمونه کنترل مثبت که مربوط به نمونه نخاع موش صحرایی ۱ روزه است.

www.SID.ir

Archive of SID

قبلی است که پس از آکسوتومی عصب سیاتیک mRNA P75 افزایش می یابد و بررسی نیمه آماری نشان می‌دهد بعد از گذشت ۲۴ ساعت میزان mRNA گیرنده P75 در تمام زیرگروه‌های مورد نظر افزایش نسبتا محسوسی دارد. تأثیر داروی دپرنیل در زیر گروههایی که داروی دپرنیل را دریافت کرده اند برای اولین بار نشان می‌دهد که mRNA گیرنده P75 کاهش می‌یابد که این کاهش mRNA بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تزریق مشخص تر است. به عبارتی بنظر میرسد که دپرنیل دارویی با نقش آنتی آپوپتوتیک و نرون حفاظتی است که این اثر بصورت کاهش mRNA گیرنده P75 می‌باشد و این تغییر بیان ژن / سنتز پروتئین همراستا با نتایج بدست آمده از اثر دپرنیل در تغییر mRNA بعضی از ژنها مانند GDNF، BDNF و Bcl-2 به عنوان عوامل مهاری آپوپتوز است [۱۲ و ۲۳]. همچنین بنظر می رسد نقش داروی دپرنیل در کاهش mRNA گیرنده P75 بعداز گذشت ۲۴ ساعت از تزریق در زیرگروهی که یکساعت قبل از آکسوتومی دارو را دریافت کرده بود (زیر گروه A1) مشخص‌تر شده است.

مطالعات انجام شده در مورد گیرنده Trk-B نشان می‌دهد که این گیرنده در دوران پس از تولد موش صحرایی در بخشهایی مانند هیپوکامپ، مخچه، کورتکس رینال افزایش چشمگیری دارد و همزمان با بازشدن چشم و پلک به حداکثر خود می‌رسد[۱۹]. در بالغین نیز پس از ضایعه اعصاب محیطی پس از گذشت سه روز از ضایعه میزان بیان آن افزایش می‌یابد[۱ و ۱۳]. در بیماری‌های نرودژنراتیو مانند آلزایمر بیان گیرنده Trk-B کاهش دارد[۱۶] و نقش گیرنده Trk-B در حفظ حیات نرون و ترمیم عصب محیطی عنوان شده است[۲].

نتایج بدست آمده دراین تحقیق مبنی بر عدم ردیابی گیرنده Trk-B در نوزادان سه یا چهار روزه موش صحرایی احتمالا بدلیل عدم حضور mRNA واضح ژن در این دوره و یا به دلیل کاهش گیرنده Trk-B پس از انجام آکسوتومی عصب محیطی در دو روز اول بعداز آکسوتومی می باشد. بدین ترتیب نتایج حاصله از این گیرنده همراستا با نتایج بدست آمده از تحقیقات قبلی است [۱و ۱۳و ۱۹]. در یک جمع بندی نیز این احتمال وجود دارد که داروی دپرنیل بکار برده شده در این تحقیق بر mRNA گیرنده T rk-B اثر نداشته باشد. بدین ترتیب با مشخص شدن اثر ضدآپوپتوزی داروی دپرنیل و تاثیر احتمالی آن در mRNA گیرنده p75 در حفظ نرون و عملکرد آنها این نوید را داد که در بیماران عصبی و نورودژنراتیو نظیر آمیوتروفیک لترال اسکلروزیس - الزایمر پارکینسون و ضایعات طناب نخاعی ناشی از ضربه و تومور و... پنجره ای تازه در درمان گشوده شود و سبب حفظ نرونهای باقی مانده گردد.

منابع

[1] Alcantara S, Frise′n J, Antoniodel RS, Soriano E, Barbacid M, Silos-Santiago I, Trk B signaling is required for postnatal survival of CNS neurons and protects hippocampal and motor neurons from axotomy-induced cell death. ***Neurosci*** 17 (1997) 3623-3633.

[2] Al-Majed AA, Brushart TM, Gordon T, Electrical Stimulation accelerates and in creases expression of BDNF and Trk-B mRNA in regenerating rat femoral motoneurons. ***Eur J Neurosci*** 12 (2000) 4381-4390.

[3] Ansari KS, Yu PH, Kruck TP, Tatton WG, Rescue of axotomized immature rat facial motoneurons by R(-)-deprenyl: stereospecificity and independence from monoamine oxidase inhibition. ***Neurosci*** 13 (1993) 4042-4053.

[4] Buys YM, Trope GE, Tatton WG, (-)-Deprenyl increase the survival of rat retinal ganglion cells after optic nerve crush. ***J Current Eye Res*** 14 (1995) 119-126.

[5] Casha S, Yu WR, Fehlings MG, Oligodendroglial apoptosis occurs along degenerating axons and is associated with fas and P75 expression following spinal cord injury in the rat**.** ***Neurosci*** 103 (2001) 203-218.

[6] Chao M V, Bothwell M, Neurotrophins: To cleave or not to cleave. ***Neuron*** 33 (2003) 9-12.

[7] Ferri CC, Improved survival of injured sciatic nerve schwann cells in mice laking the P75 receptor. ***Neurosci Lett*** 272 (1999) 191-194.

[8] Knoll J, History of deprenyl: the first selective inhibitor of monoamine axidase type B. ***Vopr Med Khim*** 43 (1997) 482-493.

[9] Magyar K, Szende B, Lengyel J, Tekes K, The pharmacology of B-type selective monoamine oxidase inhibitors: milestones in(-)-deprenyl research. ***J Neural Transm*** 48 (1996) Suppl 1: 29-43.

[10] Martin LJ, Neuronal cell death in the nervous system development, disease , and injury (Review). ***Int J Mol Medic*** 7 (2001) 455-478.

[11] McAllister AK, Katz LC, Lo DC, Neurotrophins and synaptic plasticity. ***Ann Rev Neurosci*** 22 (1999) 295-318.

[12] Mizuta I, Ohta M, Ohta K, Nishimura M, Mizuta E, Hayashi K, Selegiline and desmethylselegiline

www.SID.ir

Archive of SID

stimulate NGF, BDNF, GDNF synthesis in cultured mouse astrocytes. ***J Biochem Biophys Res*** 3 (2000) 751-755.

[13] Piehl F, Frisen J, Risling M, Increased Trk-B mRNA expression by axotomized motoneurons. ***Neuroreport*** 5 (1994) 697-700.

[14] Rabin SJ, Bachis A, Mocchetti I, Gangliosides activate Trk receptors by inducing the release of neurotrophins. ***J Biol Chem*** 277 (2002) 49466-49472.

[15] Salehi A, Ocampo M, Verhaagen J, Swaab DF, P75 neurotrophin receptor in the nucleus basalis of meynert in relation to age, sex, and alzheimer's disease. ***Exp Neurol*** 161(2000) 245-258.

[16] Salehi A, Verhaagen J, Dijkhuizen PA, Swaab DF, Co-Localization of high-affinity neurotrophin receptors in nucleus basalis of meynert neurons and their differential reduction in alzheimer's disease. ***Neurosci*** 75 (1996) 373-378.

[17] Salo P, Tatton WG, Deprenyl reduces the death of motoneurons caused by axotomy. ***J Neurosci Res*** 31 (1992) 394-400.

[18] Sendtner M, Holtmann B, Kolbeck T, Thoenen H, Barde YA, Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in new born rats after nerve section. ***Nature*** 360 (1992) 757-759.

[19] Sermasi E, Margotti E, Cattaneo A, Demenici L, TrkB signalling controls LTP but not LTD expression in the developing rat visual cortex. ***Eur J Neurosci*** 12 (2000) 1411-1419.

[20] Soppet D, Escandon E, Maragos J, Middlemas DS, Reid SW, Blair J, Burton LE, Stanton BR, Kaplan DR, Hunter T, Nikolics K, Parada LF, The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the TrkB tyrosine kinase receptor. ***Cell*** 65 (1991) 895-903.

[21] Syroid DE, Maycox PJ, Hanninen MS, Petratos S, Bucci T, Burrola P, Murray S, Cheema S, Lee K, Lemke G, kilpatrick T, Induction of post natal schwann cell death by the low-affinity neurotrophin receptor in vitro and after axotomy. ***J Neurosci*** 20 (2000) 5741-5747.

[22] Tatton WG, Wadia JS, Ju WYH, Chalmers-Redman RM, (-)- Deprenyl reduce neuronal apoptosis and facilitates neuronal out growth by altering protein synthesis without inhibitory monoamine-oxidase***. J N Transm*** 48 (1996) 45-59.

[23] UL X, Ma J, Seigel GM, Deprenyl blocking apoptosis and regulating gene expression in cultured retinal neurons. ***Biochem Pharmacol*** 58 (1990) 1183-1190.

[24] Xie Y, Yao Z, Chai H, Wong WM, Wu W, Expression and role of low-affinity nerve growth factor receptor (p75) in spinal motor neurons of aged rats following axonol injury. ***Dev Neurosci*** 25 (2003) 65-71.

متن کامل این مقاله از طریق وب سایت مجله قابل دسترسی است www.phypha.ir/ppj

www.SID.ir