جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

اثر ضد آپوپتوز دپرنیل در نورونهای حسی گانگلیون ریشه پشتی نخاع رت بعد از قطع عصب سیاتیک

دکتر رحیم حب نقی[1]* دکتر تقی طریحی[2]

دریافت مقاله :۲۷ بهمن ۱۳۸۱
پذیرش نهایی:۱۵ تیرماه ۱۳۸۳

هدف: بررسی اثرات ضد آپوپتوز دپرنیل در اعصاب حسی ریشه‌های پشتی نخاع.

حیوانات: موش رت سفید نژاد Sprague-Dawley، **محل عمل:** عصب سیاتیک وگانگلیون‌های ریشه های پنجم پشتی نخاع.

روش: عصب سیاتیک موشهای صحرایی نوزاد (سه روزه) در ناحیه پشتی ران قطع گردیده و اثرات ضد آپوپتوز دپرنیل در مقادیر ۰/۰۰۰۱، ۱، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میلیگرم در کیلوگرم در ۵ گروه شش تایی از موشهای عمل شده با حیوانات گروه کنترل مورد مقایسه و ارزیابی قرارگرفت.

نتایج: دپرنیل باعث جلوگیری از کاهش آپوپتوتیک نورونها به‌صورت معنی‌داری ($P<0/05$) گردیده و در بین گروههای آزمایشی، در گروه ۲۵میلیگرم در کیلوگرم بیشترین اثر را داشته‌است.

تجزیه و تحلیل آماری: مقایسه نتایج حاصل از گروههای آزمایشی با نتایج گروه کنترل وآنالیزآنها با استفاده ازآزمون تی وآزمون آنالیز واریانس یکطرفه.

نتیجه‌گیری: دپرنیل، اثرات ضدآپوپتوتیک خود را با جلوگیری ازآپوپتوز حاصل ازآکسوتومی وآپوپتوز خود به‌خودی بعد از تولد در نورونهای حسی ریشه‌های پشتی نخاع اعمال نموده است. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۴، دوره ۶۰، شماره ۱، ۶۹-۶۵.

واژه های کلیدی: آپوپتوز، آکسوتومی، ریشه پشتی نخاع، دپرنیل.

Antiapoptotic effect of deprenyl in sensory neurons of rat dorsal root ganglion after sciatic nerve transection

Hobbenaghi, R.,[1] Tiraihi, T.[2]

[1]Department of pathobiology, Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia- Iran. [2]Department of Anatomical Tarbiat Modarres University of Medical, Tehran-Iran.

Objective: Study on antiapoptotic effect of Deprenyl in sensory neurons of dorsal root ganglion of rat.

Animals: White Sprague-Dawley rats. The regions of operation were sciatic nerve in midthigh and L_5 dorsal root ganglion.

Procedure: New born rats (3rd days) were divided into five groups and their left side sciatic nerves were transected at midthigh region.Five test groups were administered by deprenyl in different doses of: 0.1, 1, 10, 25 and50 mg/Kg and the antiapoptotic effect of drug were compared with control group.

Statistical analysis: The values obtained from each test groups were compared with control group by t-test and oneway ANOVA.

Results: The results showed that treatment of animal with deprenyl prevented reduction in neurons number, in dose dependent manner.The group treated with dose 25mg/Kg showed the better results.

Conclusion: Deprenyl is able to prevent the induction of apoptosis in axotomized and nonaxotomized neurons.*J.Fac.Vet.Med.Univ.Tehran. 60,1:65-69,2005.*

Key words: Apoptosis, Axotomy, Dorsal Root Ganglion, Deprenyl.

Corresponding author's email: hobbenaghi@yahoo.com

براساس مطالعات انجام گرفته، قطع عصب سیاتیک موجب کاهش تعداد نورونهای موجود درگانگلیون‌ها (عقده‌های) ریشه پشتی یا Root Ganglion Dorsal، (DRG) نخاع از طریق مرگ آپوپتوتیک می‌شود(۹،۱۱).

مرگ آپوپتوتیک یا برنامه ریزی شده سلولهای عصبی در روندهای فیزیولوژیک نیز وجود داشته و تقریباً نیمی از سلولهای تولید شده زمان جنینی دستگاه عصبی قبل از تکامل نهایی، با این روش از بین می‌روند (۵،۷). روند آپوپتوز در نورونهای DRG رت تا یک هفته بعد از تولد نیز ادامه دارد(۱۷).

سلولهای عصبی، بعضی از عوامل رشد و بقای خود را از بافت هدف و به‌صورت انتقال معکوس دریافت می کنند. لذا در صورت قطع ارتباط آکسونی و عدم دریافت فاکتورهای تروفیک محیطی، جسم نورونی دچار آپوپتوز می شود(۱۴،۱۶).

اثر آپوپتوتیک حاصل از قطع آکسون در نورونهای نوزادان شدیدتر از بالغین می باشد(۶). به‌طوری‌که مطابق یک گزارش، ۷۰درصد نورونهای ریشه پشتی نخاع موش رت نوزاد بعد از عمل آکسوتومی مردند(۴).

دپرنیل[Deprenyl-(-)]، به‌عنوان یک مهارکننده منوآمین اکسید از-B باعث کاهش مرگ نورونها، حتی بعد ازقرارگرفتن آنها درمعرض آسیب مرگبار می‌شود(۱۸). مطابق گزارش Unal و همکاران درسال ۲۰۰۱ دپرنیل در سلولهای آسیب دیده ناشی از انفارکسیون مغز توانست ۵۱درصد سلولهای آسیب دیده را از مرگ نجات دهد(۱۹). این دارو سلولهای عصبی را از طریق اثر مستقیم بر انتقال الکترون و ممانعت از تأثیر سموم بر میتوکندری‌ها محافظت می‌نماید(۸). دپرنیل با عمل بر روی بیان ژن‌های مربوط به نگهداری فونکسیون میتوکندری‌ها و پایدار نمودن پتانسیل دیواره میتوکندری و تولید سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز زیاد، رادیکالهای آزاد

۱) گروه آموزشی پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه - ایران.
۲) گروه آموزشی علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران - ایران.
*) نویسنده مسئول: hobbenaghi@yahoo.com

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

جدول۱- نمایش میانگین (درصد) کاهش نورون‌های سمت چپ آکسوتومی شده همه گروهها (AxL) نسبت به نورونهای سمت راست آکسوتومی‌نشده همان گروهها (NaxR). میانگین تعداد نورونهای سمت راست ۱۰۰درصد در نظر گرفته شده است.

گروهها (میلیگرم در کیلوگرم)	Mean±SEM درصد کاهش نورونهای AxL نسبت به NaxR
۰/۱	۳۲*±۴/۵
۱	۳۱*±۵/۱
۱۰	۳۳*±۸/۶
۲۵	۱۹*±۱/۲
۵۰	۴۳*±۱۰/۱
کنترل	۴۸*±۷/۵

*= P<۰/۰۵ ، SEM = Standard Error Mean

سیتوپلاسمی را کاهش داده، اثرات حاصله از قطع فاکتورهای رشد و بقای عصب را از بافت هدف جبران نموده و در نتیجه آپوپتوز را مهار می‌نماید (۱،۱۰،۱۳،۱۸،۲۰). دپرنیل علاوه بر اثرات فوق الذکر باعث رشد جمعیت سلولهای عصبی و نوروگلیال نیزمی شود(۱۸).

آثار آپوپتوز در سطح میکروسکوپ نوری به‌صورت چروکیدگی سلول، تراکم کروماتین در محیط هسته و تشکیل هلال کروماتینی و تشکیل اجسام آپوپتوتیک قابل مشاهده می‌باشد (۲،۱۵). از آنجائی‌که DRG بخشی از دستگاه اعصاب محیطی و حاوی اجسام نورونهای حسی بوده، در تحقیقات انجام‌گرفته قبلی اثرات محافظتی دپرنیل بر نورونهای موجود در بافت مغز و نیز نورون‌های شاخ حرکتی نخاع اثبات گردیده است(۱۲)، این تحقیق با هدف بررسی اثرات ضد آپوپتوز دپرنیل در نورونهای حسی DRGبعد از عمل آکسوتومی انجام‌گرفته است.

مواد و روش کار

الف)حیوانات مورد استفاده و روش نگهداری آنها: در این تحقیق موشهای صحرایی نوزاد نژاد سفید Sprague - Dawley مورد استفاده قرار گرفتند. حیوانات مورد آزمایش در قفسهای مخصوص بهمراه مادران خود نگهداری شده و به‌صورت آزاد از شیر مادر و بعداً از آب و مواد غذایی استفاده می‌کردند. چرخه روشنایی - تاریکی آنها ۱۲/۱۲ ساعت بود.

ب) نحوه جراحی: نوزادان مورد نظر در روز سوم بعد از تولد بمدت ۱۰-۵ دقیقه بر روی بالشتک یخ قرارگرفته و بیهوش شدند. سپس عصب سیاتیک پای چپ آنها پس از برش پوست و عضلات ناحیه میانی - پشتی ران قطع گردید. به منظور جلوگیری از ترمیم مجدد عصب، در محل برش، قطعه کوچکی از عصب جداگردید. بعد از قطع عصب، عضلات و پوست ناحیه مورد عمل با نخ شماره ۰۶ بخیه زده شده و بعد ازگرم شدن بدن حیوان به

جدول۲- نمایش میانگین (درصد) افزایش نورونهای سمت چپ آکسوتومی شده گروههای آزمایشی(AxL) نسبت به نورونهای آکسوتومی شده همان سمت گروه کنترل (AxLc). میانگین تعداد نورونهای سمت چپ گروه کنترل ۱۰۰درصد در نظر گرفته شده است.

گروهها (میلیگرم در کیلوگرم)	Mean±SEM درصد افزایش نورونهای AxL نسبت به AxLc
۰/۱	۶۹*±۱۲
۱	۷۵*±۳/۹
۱۰	۸۰*±۸/۲
۲۵	۱۴۸*±۱۲
۵۰	۵۹*±۱۶

*= P<۰/۰۵

کنار مادرانشان منتقل گردیدند. دارو ساخت شرکت CITLA و به‌صورت پودر بوده، مطابق دستور از سرم نمکی (فیزیولوژیک) به‌عنوان حلال استفاده‌شد. اولین تزریق بلافاصله بعد از قطع عصب انجام شده، تزریقات بعدی در فواصل ۲۴ ساعت تا ۲۱ روز بعد از عمل انجام‌گردید.

ج) گروههای آزمایشی: حیوانات مورد آزمایش در ۶گروه ۶ تایی تقسیم گردیدند.۵گروه از این موشها مقادیر مختلفی از شکل تزریقی دپرنیل را به‌صورت داخل صفاقی (ip) دریافت نمودند. حیوانات‌گروه ششم به‌عنوان گروه کنترل بعد از انجام آکسوتومی، بجای دارو، سرم فیزیولوژی را از همان مسیر و همان مقدار دریافت نمودند. گروه‌بندی حیوانات که براساس مقدار داروی دریافتی انجام گردید بشرح زیر بود: گروههای ۰/۱، ۱، ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میلیگرم در کیلوگرم؛ حیوانات مقادیر مذکور دارو را در حجم های۰.۱ - ۰/۲ سانتیمتر مکعب از روز عمل تا روز ۲۱ دریافت نموده، در روز ۲۲، بعد از انجام بیهوشی کامل کشته شدند. مطابق نظر Gelderd و chopin درسال۱۹۷۷، گانگلیون ریشه پشتی L_5 نخاع که عصب سیاتیک عمدتاً ازآن ریشه منشاء می‌گیرد در موش رت در محل L_4ستون فقرات واقع شده‌است. لذا جهت برداشت آن مطابق روش عمل مقاله مذکور سگمان نخاعی به‌همراه ریشه پشتی و گانگلیون مربوطه واقع در ناحیه L_4ستون فقرات برداشت گردید. نمونه‌ها در فرمالین ۱۰درصد بافر فیکس شده، مطابق روشهای روتین آزمایشگاهی، بلوکهای پارافینه تهیه و سپس مقاطع ۵ میکرونی به‌صورت پی‌درپی (سریال) تهیه گردیده و با تکنیک هماتوکسیلین- ائوزین رنگ آمیزی شدند. مقاطع مورد نظر با میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی ۲۰۰ مورد مطالعه قرارگرفتند.

روش آماری

برای تعیین تعداد نورونهای DRG از روش شمارش سریال استفاده گردید. در این روش از هر ۵ مقطع یک برش (برش اول) انتخاب شده و نورونهای حاوی هسته و هستک هربرش با استفاده از دستگاه Drawing tube شمارش شده و مجموع نورونهای مورد شمارش در عدد ۵ ضرب گردید.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

...گانگلیون (درصد) افزایش نورون‌های سمت راست آکسوتومی‌نشده ...ی ازمایشی(NaxR) نسبت به نورونهای آکسوتومی‌نشده همان سمت گروه کنترل(NaxRc). میانگین تعداد نورونهای سمت راست گروه کنترل ۱۰۰درصد در نظر گرفته شده است.

گروهها (میلیگرم در کیلوگرم)	Mean±SEM درصد افزایش نورون‌های NaxR نسبت به NaxRc
۰/۱	۳۰*±۳/۸
۱	۳۷*±۶/۹
۱۰	۴۰*±۲/۱
۲۵	۶۰*±۹/۶
۵۰	۴۳*±۸/۸

*= P<۰/۰۵

میانگین تعداد نورونهای شمارش‌شده در گانگلیون‌های (سمت راست وچپ)گروه شاهد ونیز میانگین تعداد نورونهای شمارش‌شده در عقده‌های سمت آکسوتومی نشده (راست) گروههای آزمایش به‌عنوان مبنا و ۱۰۰درصد در نظرگرفته شدند. آنگاه میانگین تعداد نورونهای شمارش‌شده عقده‌های آکسوتومی‌شده (سمت چپ) هر یک از گروههای آزمایشی به‌عنوان در صدی از نورون‌های مبنا، محاسبه گردیدند. برای مقایسه میانگین درصد نورونهای سمت راست وچپ در هرگروه و آنالیز آماری آنها ازآزمون تی و برای مقایسه نورونهای گروههای آزمایشی باگروه کنترل از آنالیز یکطرفه واریانس و در ادامه آن از آزمون Dunnet استفاده گردید.

نتایج

مقایسه تعداد نورونهای گانگلیون سمت چپ آکسوتومی شده (AxL) با نورونهای سمت راست آکسوتومی نشده (NaxR) در هر یک ازگروههای مورد آزمایش (از ۰/۱ الی ۵۰میلیگرم در کیلوگرم) نشان‌داد که عمل آکسوتومی باعث کاهش معنی‌داری(P<۰/۰۵) در تعداد نورونها و به عبارت دیگر کاهش در صد آنها در گروههای آزمایشی شده‌است. این کاهش بترتیب ۳۲درصد،۳۱درصد، ۳۳درصد، ۱۹درصد و ۴۸درصد بود(جدول ۱). همچنین مشخص گردید که نورونهای عقده سمت چپ هر یک ازگروههای آزمایشی نسبت به نورونهای همان سمت گروه کنترل (AxL/AxL)بترتیب به میزان ۶۹درصد، ۷۵درصد، ۸۰درصد، ۱۴۸درصد و ۵۹درصد افزایش پیداکرده‌است(P<۰/۰۵)(جدول۲). مقایسه تعداد نورونهای سمت (راست)گروههای مورد آزمایش با تعداد نورنهای همان سمت گروه کنترل (NaxR/NaxRC) نشان داد که میانگین نورونهای سمت راست گروههای پنجگانه مورد آزمایش بترتیب ۳۰درصد، ۳۷درصد، ۴۰درصد، ۶۰درصد و ۴۳درصد افزایش پیدا کرده است (P<۰/۰۵) (جدول ۳).

مشاهدات ریزبینی مقاطع نورون‌های آکسوتومی شده وقوع آپوپتوز را تایید می‌نمود. در نورونهای مذکور، علایم میکروسکوپیک آپوپتوز شامل چروکیده شدن نورونها، تجمع کروماتین در زیر غشا هسته و یا فشرده‌شدن آن در یک سمت هسته و تشکیل هلال کروماتینی (Nuclear Cap) و نیز حضور اجسام آپوپتوتیک (Apoptotic body) که نشان دهنده بقایای سلولهای یاد شده است، بوضوح دیده می‌شد(تصویر ۲).

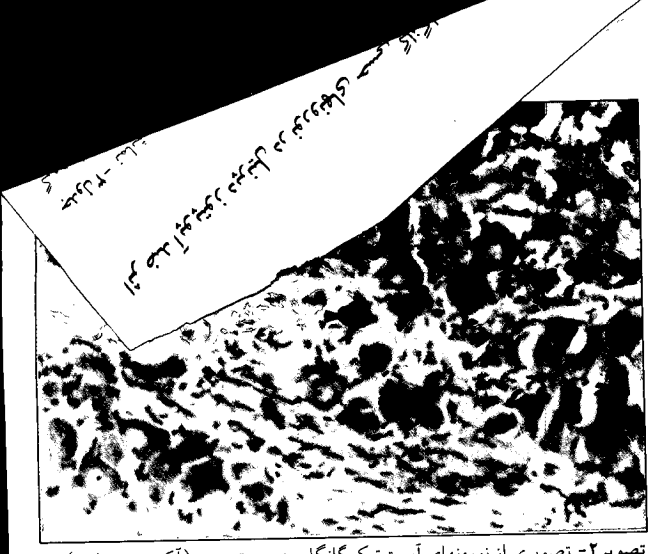
بحث

بررسی نتایج حاصل از این پژوهش حاکی از این می‌باشد که عمل آکسوتومی باعث کاهش معنی‌داری (P<۰/۰۵) در تعداد نورونهای گانگلیون‌های ریشه پشتی مربوطه شده و این کاهش بر اثر آپوپتوز به وقوع پیوسته‌است. درگروههای آزمایشی، تیمار با دپرنیل موجبات جلوگیری از آپوپتوز و کاهش نورونها را فراهم نموده، در مجموع باعث افزایش آنها شده‌است. به‌طوری‌که از نتایج جدول۱ مشخص می‌گردد در عقده‌های سمت آکسوتومی شده گروه کنترل، ۴۸درصد نورونها نسبت به نورونهای سمت راست خود کاهش نشان می دهند. به عبارت دیگر ۴۸درصد نورون ها در اثر آکسوتومی از بین رفته‌اند. این در حالی است که در عقده های گروههای آزمایش این کاهش بالنسبه کمتر بوده و مخصوصا در گروه ۲۵میلیگرم در کیلوگرم به کمترین میزان یعنی به ۱۹درصد رسیده و این نتیجه، در مقایسه سایرگروهها معنی‌دار بود(P<۰/۰۵). در ضمن درگروه ۵۰ میلیگرم در کیلوگرم بر خلاف روند مورد انتظار، یک آشفتگی در نتایج دیده می‌شود که در نتایج هر سه جدول مشهودبوده وبا توجه به اینکه Panahi و Takiدر سال ۲۰۰۲ همین آشفتگی را در دوز ۶۰میلیگرم در کیلوگرم به بالای دپرنیل مشاهده نموده و آنرا به دوز سمیت دارو نسبت داده‌اند(۱۲)، احتمالاً این آشفتگی نیز به همان دلیل می‌باشد.

نتایج جدول ۲ تاثیر دپرنیل را در جلوگیری از آپوپتوز به‌صورتی دیگر توضیح می‌دهد؛ چنانچه مشاهده می‌گردد مقایسه میانگین درصد نورونهای ریشه پشتی نخاع سمت چپ گروههای مورد آزمایش (AxL) با میزان نورونهای همان سمت درگروه کنترل (AxLc) نشان می دهد که با افزایش دوز دارو در صد نورونهای گروههای آزمایش نسبت به گروه کنترل افزایش پیدا کرده است؛ به‌طوری‌که نورونهای سمت چپ گروه ۰.۱ میلیگرم در کیلوگرم، به میزان ۶۹درصد نسبت به عقده مشابه گروه کنترل افزایش را نشان می‌دهد. رقم مذکور برای گروههای بعدی بترتیب افزایش مقدار داروی تجویز شده، ۷۵درصد، ۸۰درصد، ۱۴۸درصد و ۵۹درصد می‌باشد. چنانچه مشخص است بیشترین افزایش (۱۴۸درصد) متعلق به گروه ۲۵ میلیگرم در کیلوگرم بوده‌است و این نتیجه باگزارش Paterson و همکاران در سال ۱۹۹۸ که با مقدار ۲۵میلیگرم در کیلوگرم دپرنیل بهترین نتایج حفاظتی نورونها راگزارش کرده است(۱۳) مطابقت دارد.

مقایسه میانگین درصد نورونهای سمت آکسوتومی‌نشده (راست) گروههای مورد آزمایش (NaxR) که صرفا از دارو تاثیر پذیرفته‌اند با نورونهای گانگلیون سمت راست گروه کنترل (NaxRc) که از هیچ‌گونه تأثیر دارویی و جراحی متأثر نبوده‌اند (جدول۳)، نشان‌می‌دهد که متناسب با افزایش دوز دپرنیل، نسبت مذکور افزایش پیدا کرده است. این نسبت در گروه ۰/۱میلیگرم در کیلوگرم به ۳۰درصد و در گروههای بعدی به ترتیب به

تصویر۱- منظره‌ای از نورونهای گانگلیون سمت راست(آکسوتومی نشده) درگروهی که با ۲۵میلیگرم در کلیوگرم دپرنیل تحت درمان قرار گرفته است.(به هسته‌های روشن حاوی هستک و ابعاد نورونها توجه شود. H&Eو بزرگنمایی: ۲۰۰).



تصویر۲- تصویری از نورونهای آپوپتوتیک گانگلیون سمت چپ (آکسوتومی شده) در گروه کنترل. به نورونهای چروک خورده و فشرده شدن کروماتین در یکطرف هسته (پیکان ضخیم) و اجسام آپوپتوتیک (پیکان نازک) و نیز ابعاد نورونها، توجه شود. H&Eو بزرگنمایی: ۲۰۰.

۳۷درصد، ۴۰درصد، ۶۰درصد و ۴۳درصد رسیده است. مطابق نظر Sugimoto و همکاران درسال ۱۹۹۸ نورونهای موجود در DRG و ریشه حسی عصب سه قلو (Trigeminal) رت بترتیب ۱۶درصد و ۲۴-۱۲درصد در هفته اول بعد از تولد از بین می روند و این از بین رفتن نورونها به‌صورت آپوپتوز و ناشی از رقابت آنها جهت دریافت فاکتورهای رشد و بقا نظیر فاکتور رشد عصبی (nerve)growth factor از بافت هدف می‌باشد(۱۷). لذا این افزایش درصد نورونهای سمت راست را می‌توان چنین توجیه نمود که داروی دپرنیل از انجام آپوپتوز خودبه‌خودی بعد از تولد در آنها جلوگیری نموده است. بنابراین نورونهایی که قرار بود بمیرند زنده باقی مانده و جمعیت نورونی در گانگلیون ریشه نخاعی در مجموع افزایش پیدا کرده است. این نتیجه‌گیری با نتایج کار Tatton و همکاران درسال ۱۹۹۶ که یک نقش افزایش دهنده را در جمعیت نورونی برای دپرنیل شرح داده‌اند مطابقت دارد(۹).

چنانچه مشاهده می‌شود دپرنیل، هم در ریشه‌هایی که دچار آکسوتومی شده‌اند توانسته است از آپوپتوز ناشی از قطع ارتباط آکسونی جلوگیری نماید و هم در ریشه های سمت سالم از آپوپتوز خودبه‌خودی بعد از تولد جلوگیری نماید.

نقش حفاظتی دپرنیل در سیستم اعصاب مرکزی (CNS) و اعصاب حرکتی توسط محققین زیادی مورد مطالعه قرارگرفته است (۱،۱۲،۱۳،۱۸). پژوهش حاضر اثرات ضدآپوپتوز دپرنیل را بر روی نورونهای حسی ریشه‌های پشتی نخاع که بخشی از دستگاه اعصاب محیطی (Peripheral Nervous System) می‌باشد به نمایش گذاشته، در مجموع نشان می‌دهد که دپرنیل با مکانیسم های مشترکی هم در CNS و هم در PNS از ورود نورونها به فاز مرگ سلولی و آپوپتوز جلوگیری می‌کند.

تشکر و قدردانی

از همکاران محترم ، آقای دکتر دلشاد عضو هیئت علمی دانشگاه شاهد، آقای کهربا و آقای بیرانوند کارشناسان آزمایشگاههای پاتولوژی و بافت شناسی دانشگاههای ارومیه و تربیت مدرس که در انجام این پژوهش نقش سازنده ای را ایفاء نموده‌اند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Ebadi, M., Sharma, S., Shavali, S., ElRefaey, H.(2002): Neuroprotective actions of selegiline. J, Neurosci Res; 67(3):285-9.
2. Gaffney, EP.,Oneill, AS., Staunton, MJ. (1995): Insitu end-labelling, light microscopic assessment and ultrastructure of apoptosis in lung. J, Clin Pathol; 48(11): 1017-21.
3. Gelderd, JB., Chopin, SF.(1977): The Vertebral Level of origin of Spinal Nerves in the Rat. Anat Rec; 188:45-48.
4. Himes, BT., Tessler, A.(1989): Death of some dorsal root ganglion neurons and Plasticity of others following sciatic nerve section in adult and neonatal rats. J Comp Neurol; 284(2):215-30.
5. Lee, L., Rubin.(1973): Neuronal cell death: when, why and how. British Medical Bulletin; 53(3):617-631.
6. Li, L., Oppenheim, RW., Lei M., Houenou, LJ(1994): Neurotrophic agents prevent Motoneuron Death following sciatic nerve section in the neonatal mouse. Journal of Neurobiology;25(7):759-766.
7. Liu, DX., Greene. LA'(2001): Neuronal apoptosis at the G1/s cell cycle check point. Cell Tissue Res; 305(2):217-28.

تصویر۱- منظره‌ای از نورونهای گانگلیون سمت راست(آکسوتومی نشده) درگروهی که با ۲۵میلیگرم در کلیوگرم دپرنیل تحت درمان قرار گرفته است.(به هسته‌های روشن حاوی هستک و ابعاد نورونها توجه شود. H&Eو بزرگنمایی: ۲۰۰).

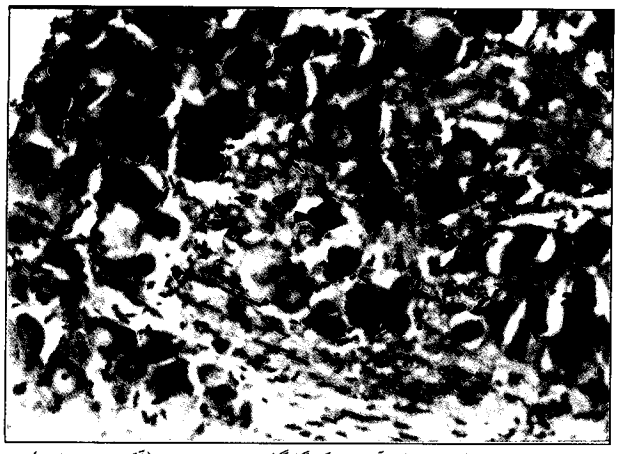
۳۷درصد، ۴۰درصد، ۶۰درصد و ۴۳درصد رسیده است. مطابق نظر Sugimoto و همکاران درسال۱۹۹۸ نورونهای موجود در DRG و ریشه حسی عصب سه قلو (Trigeminal) رت بترتیب ۱۶درصد و۲۴-۱۲درصد در هفته اول بعد از تولد از بین می روند و این از بین رفتن نورونها به‌صورت آپوپتوز و ناشی از رقابت آنها جهت دریافت فاکتورهای رشد و بقا نظیر فاکتور رشد عصبی (nerve)growth factor از بافت هدف می‌باشد(۱۷). لذا این افزایش درصد نورونهای سمت راست را می‌توان چنین توجیه نمود که داروی دپرنیل از انجام آپوپتوز خودبه‌خودی بعد از تولد در آنها جلوگیری نموده است. بنابراین نورونهایی که قرار بود بمیرند زنده باقی مانده و جمعیت نورونی در گانگلیون ریشه نخاعی در مجموع افزایش پیدا کرده است. این نتیجه‌گیری با نتایج کار Tatton و همکاران درسال۱۹۹۶ که یک نقش افزایش دهنده را در جمعیت نورونی برای دپرنیل شرح داده‌اند مطابقت دارد(۹).

چنانچه مشاهده می‌شود دپرنیل، هم در ریشه‌هایی که دچار آکسوتومی شده‌اند توانسته است از آپوپتوز ناشی از قطع ارتباط آکسونی جلوگیری نماید و هم در ریشه های سمت سالم از آپوپتوز خودبه‌خودی بعد از تولد جلوگیری نماید.

نقش حفاظتی دپرنیل در سیستم اعصاب مرکزی (CNS) و اعصاب حرکتی توسط محققین زیادی مورد مطالعه قرارگرفته است (۱،۱۲،۱۳،۱۸). پژوهش حاضر اثرات ضدآپوپتوز دپرنیل را بر روی نورونهای حسی ریشه‌های پشتی نخاع که بخشی از دستگاه اعصاب محیطی (Peripheral Nervous System) می‌باشد به نمایش گذاشته، در مجموع نشان می‌دهد که دپرنیل با مکانیسم های مشترکی هم در CNS و هم در PNS از ورود نورونها به فاز مرگ سلولی و آپوپتوز جلوگیری می‌کند.

تشکر و قدردانی

از همکاران محترم ، آقای دکتر دلشاد عضو هیئت علمی دانشگاه شاهد، آقای کهربا و آقای بیرانوند کارشناسان آزمایشگاههای پاتولوژی و بافت شناسی دانشگاههای ارومیه و تربیت مدرس که در انجام این پژوهش نقش سازنده ای را ایفاء نموده‌اند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.



تصویر۲- تصویری از نورونهای آپوپتوتیک گانگلیون سمت چپ (آکسوتومی شده) در گروه کنترل. به نورونهای چروک خورده و فشرده شدن کروماتین در یکطرف هسته (پیکان ضخیم) و اجسام آپوپتوتیک (پیکان نازک) و نیز ابعاد نورونها، توجه شود. H&Eو بزرگنمایی: ۲۰۰.

References

1. Ebadi, M., Sharma, S., Shavali, S., ElRefaey, H.(2002): Neuroprotective actions of selegiline. J, Neurosci Res; 67(3):285-9.
2. Gaffney, EP.,Oneill, AS., Staunton, MJ. (1995): Insitu end-labelling, light microscopic assessment and ultrastructure of apoptosis in lung. J, Clin Pathol; 48(11): 1017-21.
3. Gelderd, JB., Chopin, SF.(1977): The Vertebral Level of origin of Spinal Nerves in the Rat. Anat Rec; 188:45-48.
4. Himes, BT., Tessler, A.(1989): Death of some dorsal root ganglion neurons and Plasticity of others following sciatic nerve section in adult and neonatal rats. J Comp Neurol; 284(2):215-30.
5. Lee, L., Rubin.(1973): Neuronal cell death: when, why and how. British Medical Bulletin; 53(3):617-631.
6. Li, L., Oppenheim, RW., Lei M., Houenou, LJ(1994): Neurotrophic agents prevent Motoneuron Death following sciatic nerve section in the neonatal mouse. Journal of Neurobiology;25(7):759-766.
7. Liu, DX., Greene. LA'(2001): Neuronal apoptosis at the G1/s cell cycle check point. Cell Tissue Res; 305(2):217-28.

جدول۳- نمایش میانگین (درصد) افزایش نورون‌های سمت راست آکسوتومی‌نشده گروههای آزمایشی(NaxR) نسبت به نورونهای آکسوتومی‌نشده همان سمت گروه کنترل(NaxRc). میانگین تعداد نورونهای سمت راست گروه کنترل ۱۰۰درصد در نظر گرفته شده است.

گروهها (میلیگرم در کیلوگرم)	Mean±SEM درصد افزایش نورون‌های NaxR نسبت به NaxRc
۰/۱	۳۰*±۳/۸
۱	۳۷*±۶/۹
۱۰	۴۰*±۲/۱
۲۵	۶۰*±۹/۶
۵۰	۴۳*±۸/۸

*= P<۰/۰۵

میانگین تعداد نورونهای شمارش‌شده در گانگلیون‌های (سمت راست وچپ)گروه شاهد ونیز میانگین تعداد نورونهای شمارش‌شده در عقده‌های سمت آکسوتومی نشده (راست) گروههای آزمایش به‌عنوان مبنا و ۱۰۰درصد در نظرگرفته شدند. آنگاه میانگین تعداد نورونهای شمارش‌شده عقده‌های آکسوتومی‌شده (سمت چپ) هر یک از گروههای آزمایشی به‌عنوان در صدی از نورون‌های مبنا، محاسبه گردیدند. برای مقایسه میانگین درصد نورونهای سمت راست وچپ در هرگروه و آنالیز آماری آنها ازآزمون تی و برای مقایسه نورونهای گروههای آزمایشی باگروه کنترل از آنالیز یکطرفه واریانس و در ادامه آن از آزمون Dunnet استفاده گردید.

نتایج

مقایسه تعداد نورونهای گانگلیون سمت چپ آکسوتومی شده (AxL) با نورونهای سمت راست آکسوتومی نشده (NaxR) در هر یک ازگروههای مورد آزمایش (از ۰/۱ الی ۵۰میلیگرم در کیلوگرم) نشان‌داد که عمل آکسوتومی باعث کاهش معنی‌داری(P<۰/۰۵) در تعداد نورونها و به عبارت دیگر کاهش در صد آنها در گروههای آزمایشی شده‌است. این کاهش بترتیب ۳۲درصد،۳۱درصد، ۳۳درصد، ۱۹درصد و ۴۸درصد بود(جدول ۱). همچنین مشخص گردید که نورونهای عقده سمت چپ هر یک ازگروههای آزمایشی نسبت به نورونهای همان سمت گروه کنترل (AxL/AxL)بترتیب به میزان ۶۹درصد، ۷۵درصد، ۸۰درصد، ۱۴۸درصد و ۵۹درصد افزایش پیداکرده‌است(P<۰/۰۵)(جدول۲). مقایسه تعداد نورونهای سمت (راست)گروههای مورد آزمایش با تعداد نورنهای همان سمت گروه کنترل (NaxR/NaxRC) نشان داد که میانگین نورونهای سمت راست گروههای پنجگانه مورد آزمایش بترتیب ۳۰درصد، ۳۷درصد، ۴۰درصد، ۶۰درصد و ۴۳درصد افزایش پیدا کرده است (P<۰/۰۵) (جدول ۳).

مشاهدات ریزبینی مقاطع نورون‌های آکسوتومی شده وقوع آپوپتوز را تایید می‌نمود. در نورونهای مذکور، علایم میکروسکوپیک آپوپتوز شامل چروکیده شدن نورونها، تجمع کروماتین در زیر غشا هسته و یا فشرده‌شدن آن در یک سمت هسته و تشکیل هلال کروماتینی (Nuclear Cap) و نیز حضور اجسام آپوپتوتیک (Apoptotic body) که نشان دهنده بقایای سلولهای یاد شده است، بوضوح دیده می‌شد(تصویر ۲).

بحث

بررسی نتایج حاصل از این پژوهش حاکی از این می‌باشد که عمل آکسوتومی باعث کاهش معنی‌داری (P<۰/۰۵) در تعداد نورونهای گانگلیون‌های ریشه پشتی مربوطه شده و این کاهش بر اثر آپوپتوز به وقوع پیوسته‌است. درگروههای آزمایشی، تیمار با دپرنیل موجبات جلوگیری از آپوپتوز و کاهش نورونها را فراهم نموده، در مجموع باعث افزایش آنها شده‌است. به‌طوری‌که از نتایج جدول۱ مشخص می‌گردد در عقده‌های سمت آکسوتومی شده گروه کنترل، ۴۸درصد نورونها نسبت به نورونهای سمت راست خود کاهش نشان می دهند. به عبارت دیگر ۴۸درصد نورون ها در اثر آکسوتومی از بین رفته‌اند. این در حالی است که در عقده های گروههای آزمایش این کاهش بالنسبه کمتر بوده و مخصوصا در گروه ۲۵میلیگرم در کیلوگرم به کمترین میزان یعنی به ۱۹درصد رسیده و این نتیجه، در مقایسه سایرگروهها معنی‌دار بود(P<۰/۰۵). در ضمن درگروه ۵۰ میلیگرم در کیلوگرم بر خلاف روند مورد انتظار، یک آشفتگی در نتایج دیده می‌شود که در نتایج هر سه جدول مشهودبوده وبا توجه به اینکه Panahi و Taki در سال ۲۰۰۲ همین آشفتگی را در دوز ۶۰میلیگرم در کیلوگرم به بالای دپرنیل مشاهده نموده و آنرا به دوز سمیت دارو نسبت داده‌اند(۱۲)، احتمالاً این آشفتگی نیز به همان دلیل می‌باشد.

نتایج جدول ۲ تاثیر دپرنیل را در جلوگیری از آپوپتوز به‌صورتی دیگر توضیح می‌دهد؛ چنانچه مشاهده می‌گردد مقایسه میانگین درصد نورونهای ریشه پشتی نخاع سمت چپ گروههای مورد آزمایش (AxL) با میزان نورونهای همان سمت درگروه کنترل (AxLc) نشان می دهد که با افزایش دوز دارو در صد نورونهای گروههای آزمایش نسبت به گروه کنترل افزایش پیدا کرده است؛ به‌طوری‌که نورونهای سمت چپ گروه ۰.۱ میلیگرم در کیلوگرم، به میزان ۶۹درصد نسبت به عقده مشابه گروه کنترل افزایش را نشان می‌دهد. رقم مذکور برای گروههای بعدی بترتیب افزایش مقدار داروی تجویز شده، ۷۵درصد، ۸۰درصد، ۱۴۸درصد و ۵۹درصد می‌باشد. چنانچه مشخص است بیشترین افزایش (۱۴۸درصد) متعلق به گروه ۲۵ میلیگرم در کیلوگرم بوده‌است و این نتیجه باگزارش Paterson و همکاران در سال ۱۹۹۸ که با مقدار ۲۵میلیگرم در کیلوگرم دپرنیل بهترین نتایج حفاظتی نورونها راگزارش کرده است(۱۳) مطابقت دارد.

مقایسه میانگین درصد نورونهای سمت آکسوتومی‌نشده (راست) گروههای مورد آزمایش (NaxR) که صرفا از دارو تاثیر پذیرفته‌اند با نورونهای گانگلیون سمت راست گروه کنترل (NaxRc) که از هیچ‌گونه تأثیر دارویی و جراحی متأثر نبوده‌اند (جدول۳)، نشان‌می‌دهد که متناسب با افزایش دوز دپرنیل، نسبت مذکور افزایش پیدا کرده است. این نسبت در گروه ۰/۱میلیگرم در کیلوگرم به ۳۰درصد و در گروههای بعدی به ترتیب به

8. Matsubara, k., Senda, T., Uezono, T., Awaya, T., Ogawa, S., Chiba, k., Shimizu, K., Hayase, N., Kimura, K(2001): L-Deprenyl Prevents the cell hypoxia induced by dopaminergic neurotoxins, MPP(+) and beta - Carbolinium: a microdialysis study in rats. Neurosci lett; 302(2-3):65-8.
9. Mohamed Hadi, Bahadori; Taki, AL - Tiraihi, Mujtaba Rezazadeh(2001): Sciatic nerve Transection in neonatal rats induces apoptotic neuronal death in L5 dorsal root ganglion. Journal of Neurocytology; 30:125-130.
10. Naoi, M., Maruyama, W., Takahashi, T., Akao, y., Nakagawa, y(2000): Involvement of endogenous N-methyl(R) Salsolinol in Parkinson's disease: induction of apoptosis and protection by (-)deprenyl. J Neural Transm suppl; 58:111-21.
11. Oliveira, Al., Risling, M., Negro, A., Langone, f., Cullheims'(2002): Apoptosis of Spinal interneurons induced by sciatic nerve axotomy in the neonatal rat is counteracted by nerve growth factor and ciliary neurotrophic factor. J, Comp, Neurol; 447(4):381-93.
12. Panahi, M., Al-Tiraihi, T.(2002): Morphometric evaluation of the Neuroprotective effect of deprenyl on postaxotomic motor neuron losses. Clin Neuropharmacol; 25(2):75-8.
13. Paterson, IA., Zhang, D., Warrington, RC., Boulton, AA.(1998): R-deprenyl and R-2-hepty1-N-methyl propargylamine prevent apoptosis in cerebellar granule neurons induced by cytosine arabinoside but not low extracellular potassium. J, Neuro Chem; 70(2):515-23.
14. Red Show, JD., Bisby, MA (1985): Comparison of the effects of sciatic nerve crush or resection on the proteins of fast axonal transport in rat. EXP Neurol; 88(2): 437-46.
15. Shah, KA., Shurey, S., Green, CJ.(19997): characterization of apoptosis in intestinal ischemia-reperfusion injury- a light and electron microsscopy study. Int Exp Pathol; 78(5): 355-63.
16. Shen. H., Chung, JM., Coggeshall, RE., Chung, k., (1999): Changes in trkA expression in the dorsal root ganglion after peripheral nerve inyury. EXP Brain Res; 127(2):141-6.
17. Sugimoto, T., Xiao, C., Ichikawa, H.(1998): Postnatal changes in Bax- immunoreactivity and apoptosis of the trigeminal primary neurons. Neurosci Lett; 258:97-100.
18. Tatton, WG., Wadia. JS., Ju, wy., Chalmers - Redman, RM., Tatton, NA. (1996): (-)- Deprenyl reduces neuronal apoptosis and facilitates neronal outgrowth by altering protein syntheses without inhibiting Monoamine oxiodase. Neural Transm Suppl; 48:45-59.
19. Unal, I., Gursoy- Ozdemir, Y., Bolay, H., Soylemezoglu, f., Saribas, O., Dalkarat (2001): Chronic daily administration of selegiline and EGb 761 increases brain's resistance to ischemia in mice. Brain Res; 917(2):174-81.
20. Wu, RM., Mohanakumar, KP., Murphy, DL., Chiueh, CC. (1994): Antioxidant mechanism and Protection of nigral neurons against MPP(+) toxicity by deprenyl(Selegiline). Ann NY Acad Sci ; 738:214-21.