

The effects of deprenyl on P75 receptor mRNA changes in new born rats after sciatic nerve axotomy

Tiraihi T¹, Amini H², Heshmati M^{2*} and Mowla SJ³

¹Department of Anatomy and Pathology, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University.

²Department of Anatomy and Pathology, Faculty of Medicine, Shahed University.

³Department of Genetic, Faculty of Basic Science, Tarbiat Modares University.

Abstract

Introduction: Neurotrophins belong to growth factor family and their function is based on their receptors. They bind two types of receptors: p75 and tyrosine kinase. The motoneuron survival or death depends upon the neurotrophic factors. Recent studies have demonstrated that axotomy in peripheral nerve induces apoptosis of motoneuron. Deprenyl or Selegiline is known as a drug with neuroprotective effect on motoneurons. In this investigation, we evaluated mRNA changes in p75 receptor by anti-apoptotic effect of deprenyl in motoneuron death induced by axotomy of rat sciatic nerve.

Methods: The left sciatic nerves of Sprague-Dawley newborn 3 days old rats, were axotomized in the middle of thigh. The newborn rats were divided into two groups; one group was treated with intra peritoneal injection of 2.5 mg/kg deprenyl (treated) and the other group with normal saline (untreated). Each group was divided to 3 sub groups as, the first was treated with 2.5 mg/kg deprenyl or normal saline one hour before surgical transection, the second and third were treated at, and one hour after surgery, respectively. Molecular studies for mRNA changes Trk-B and P75^{NTR} receptor were done on two groups of animals which were sacrificed 4 hours after injection and other one, 24 hours after injection.

Results: The RT-PCR revealed that deprenyl has reduced the mRNA P75 after 24 hours.

Conclusion: Deprenyl can maintain motoneurons by reducing mRNA P75 receptor.

Keyword: Neurotrophin, Deprenyl, Axotomy, Apoptosis, P75 receptor.

* Corresponding Author Email: marjanheshmaty@hotmail.com

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 و سبب حفظ یا مرگ سلولهای مربوطه میگردد. با توجه به مشخص شدن نقش نرو تروفینها، از داروهایی با این خاصیت دپرنیل یا سلزبیلین 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 بعد از 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 می دهد دپرنیل سبب کاهش mRNA گیرنده P75 پس از گذشت ۲۴ ساعت از تزریق می شود.

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

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

مقدمه

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 خانواده تومور نکروز فاکتور محسوب می شود [۲۴].

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

مطالعات نشان می دهد عملکرد گیرنده دارای طیف وسیعی است بطوری که در دوران تکوین و بعد از تولد، با توجه به نوع سلول و نروتروفین متصل شده عملکردگیرنده تغییر می کند. 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 پاره ای از اختلالات عصبی نظیر بیماری آلزایمر، پارکینسون، قطع عصب محیطی و

نروتروفینها خانواده ای از فاکتورهای رشد هستند. این مواد با اتصال به گیرندههای خاص خود در طی دوران تکوین در دو طیف مختلف نقش خود را ایفا می کنند به طوری که از یک طرف سبب تکثیر، مهاجرت، تمایز، رشد و ادامه روند چرخه سلولی و حفظ حیات سلولها می شوند و از سویی دیگر با جلوگیری از موارد فوق سبب آپوپتوز و از بین رفتن سلول خاص می شوند [۶ و ۱۱].

از این مواد نروتروفینی می توان NT-4/5، BDNF، NGF و NT-3 را نام برد با توجه به گیرندههایی که با نروتروفین به صورت اختصاصی متصل می شوند نقش نروتروفینها مشخص می گردد [۲۰].

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

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 ۱۲ عددی در داخل قفس های جداگانه به طور تصادفی قرار گرفتند. شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای ۲۳-۲۲ درجه سانتی گراد 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 تقسیم بندی آنها در زیر گروه های: (۱) مطالعه و (۲) کنترل بطور تصادفی انجام شد. بدین صورت که هر گروه به سه زیر گروه تقسیم و تعداد ۱۲ حیوان برای هر زیر گروه در نظر گرفته شد (کلا ۷۲ حیوان). تقسیم بندی زیر گروهها بر اساس مطالعات انجام شده بر حسب زمان انجام تزریق نسبت به عمل آکسوتومی عصب محیطی بود [۱۲ و ۲۲]. 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 انجام شد (شکل شماره ۱).

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 بعد از تولد تحت عمل آکسوتومی عصب سیاتیک چپ قرار گرفتند. بدین منظور ابتدا بوسیله هیپوترمی یخ بیهوش شدند در حالی که پوست ناحیه مورد نظر با بتادین ضد عفونی 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 قطعه ای حدود ۳-۲ میلی متر جدا و سپس پوست را با نخ ۰-6 بخیه و محل جراحی با بتادین شسته

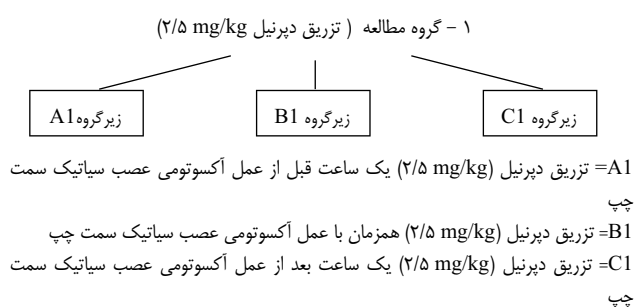
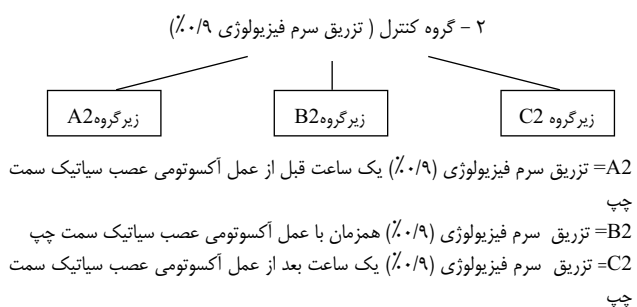
ضایعات نخاعی نیز نقش این گیرنده گزارش شده است [۱۵]. بیان گیرنده تیروزین کیناز B از روز اول بعد از تولد شروع و افزایش آن در حدود هفته دوم که مصادف با باز شدن پلکهای موش صحرایی است گزارش شده است [۱۹].

یکی از روشهای معمول آزمایشگاهی القاء مرگ آپوپتوزی سلولهای عصبی، آکسوتومی است [۱۳]. میزان آپوپتوز به عواملی مانند سن و شدت ضایعه وابسته است [۱۰ و ۱۱].

با توجه به نقش مؤثر نروتروفین ها در کاهش مرگ آپوپتوتیک توجه محققین به ساخت مواد شیمیایی که خاصیت نروتروفیکی دارند جلب شد. از بین این مواد، داروی دپرنیل یا Selegiline است که اولین بار توسط پروفیسور Knoll (۱۹۶۰) در مجارستان ساخته شد این دارو ابتدا به عنوان داروی ضدافسردگی معرفی شد ولی بعداً با مشخص شدن اثرات دیگر، در درمان بیماری نورودژنراتیو پارکینسون استفاده شد. تحقیقات نشان می دهد که اثرات دارو در طیف وسیعی قابل بررسی است به طوری که به دنبال متابولیسم دارو در کبد دیس متیل سلزین، آمفتامین و متامفتامین ایجاد می شود [۸ و ۲۳].

دیس متیل سلزین باعث مهار آنزیم منوآمینواکسیداز نوع B (MAO-B) می شود [۹]. امروزه علاوه بر اثر مهارتی آنزیم، اثر دپرنیل از طریق تغییر بیان ژن / سنتز پروتئین عنوان می گردد مثلاً با افزایش بیان SOD1، Bcl-2 و SOD2 از اثرات مخرب رادیکالهای اکسیداتیو و مرگ نرون جلوگیری می کند [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 نروتروفینی 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 گیرنده های نروتروفینی 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 و تعیین نقش احتمالی دارو در حفظ عملکرد نرونهای حرکتی بعد از آکسوتومی عصب سیاتیک را با استفاده از روش RT-PCR بررسی می کند.



شکل ۱

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

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

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 آگاروز 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 نرم افزار primer 3 و مقالات معتبر سفارش و تهیه گردید.

به همین منظور با استفاده از سایت NCBI با شماره دستیابی P75 → X05137 و Trk-B → m 55291 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.

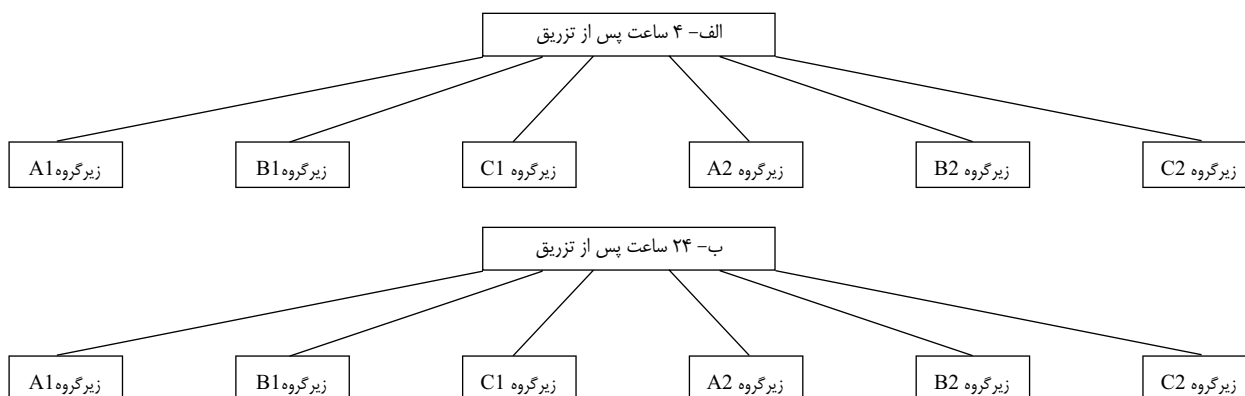
پرایمرهای مورد نظر از کمپانی MWGG-Biotech AG آلمان

و ضد عفونی گردید. با توجه به زیرگروهها تزریق انجام شد. بعد از 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، جمع آوری 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 (A2، C1، B1، A1 C2، B2) 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 زیر گروه قسمت ب: (۶ حیوان) جهت انجام تکنیک RT-PCR در نظر گرفته شد (شکل شماره ۲).

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 میلی لیتری 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 مورد ارزیابی قرار گرفت.

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

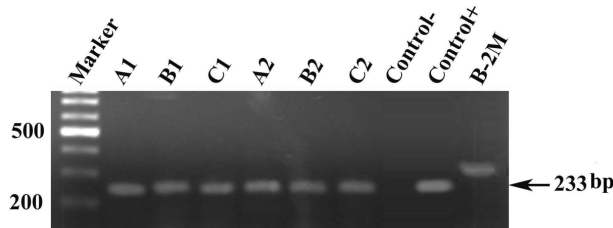


شکل ۲

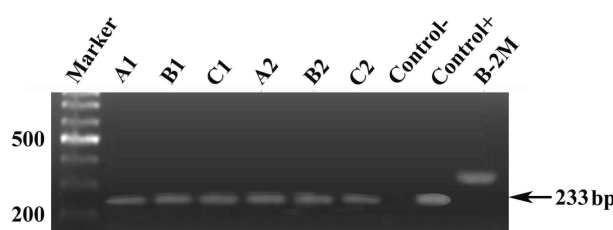
را نشان داد که اندازه آن معادل با اندازه قطعه طراحی شده $pb233$ بود و برای گیرنده Trk-B معادل با اندازه قطعه طراحی شده $bp245$ در سایت NCBI بود. کنترل داخلی نیز باندی به اندازه قطعه طراحی شده $bp318$ در سایت NCBI بود. نتایج نشان می‌دهد که در تمام زیرگروهها در نمونه‌برداری مربوط به ۴ ساعت پس از تزریق داروی دپرنیل یا سرم فیزیولوژی (الف) و ۲۴ ساعت پس از تزریق داروی دپرنیل یا سرم فیزیولوژی (ب) mRNA m ژن P75 نمایان است (شکل ۴). جهت تعیین هرگونه اختلاف احتمالی در بیان ژن P75 از روش نیمه آماری *semi quantitative* استفاده شد. بدین منظور شدت باندهای حاصل از الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز با کمک نرم‌افزار *total lab-phoretix* به آدرس info@totallab.com بدست آمد و محاسبه نسبت شدت باند P75 به شدت باند B2M در هر نمونه نخاع خارج شده، در هر مرتبه ژل گذاری محاسبه 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).

در نمونه کنترل مثبت ژن Trk-B مخچه موش صحرائی بالغ باندی به اندازه 245 bp نمایان است. از ژن B2M به عنوان کنترل داخلی استفاده می‌شود که این ژن در تمام سلولها بیان می‌گردد و در نمونه کنترل منفی با حذف آنزیم RT صحت و دقت مراحل انجام تکنیک PCR تایید شد (شکل ۵).



A: P75 (4h.)



B: P75 (24h.)

شکل ۴- باندهای حاصل از الکتروفورز DNA نمونه‌های نخاع حاکی از بیان ژن P75 در زیر گروه‌های A1، B1، C1، A2، B2، C2 و 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 صحرائی ۱ روزه) و باند B2M در هر دو شکل A و B نشان داده می‌شود.

با درجه خلوص *high purified salt free (HPSF)* به صورت لیوفیلیزه تهیه شد.

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

با استفاده از دما، زمان دناتوراسیون، اتصال و پلیمریزاسیون طبق (جدول ۲) واکنش تکثیر انجام شد.

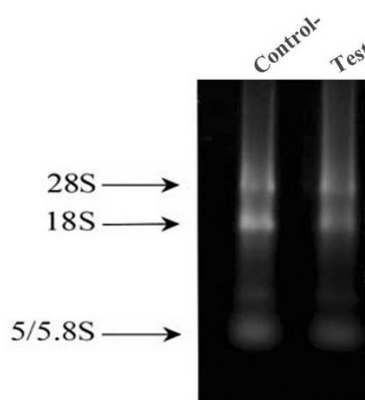
در نهایت یک سیکل بعنوان *extension* نهایی ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس میکروتیوپها از دستگاه خارج و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و برای تشخیص قطعه تکثیر شده از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد.

نتایج

اگر نمونه های RNA استخراج شده از نظر شیمیایی دست نخورده باشند از کیفیت بالایی برخوردارند. بدین ترتیب الگوی باندینگ ویژه‌ای را بر روی ژل آگارز نشان می‌دهند که حضور باندهای RNA ریبوزومی 18S و 28S نشان دهنده سالم بودن و دست نخورده بودن RNA استخراجی است و با این کیفیت بالا باندهای 5S و 5.8S نیز قابل مشاهده است (شکل ۳).

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

بررس تغییرات بیان mRNA گیرنده‌های P75 و Trk-B همراه با نمونه‌های کنترل منفی، مثبت و داخلی برای تمام نمونه‌ها در تمام زیر گروهها در هر بار واکنش PCR انجام شد. بدین ترتیب که در نمونه کنترل منفی با حذف مرحله افزودن آنزیم RT، در تمام نمونه‌ها هیچ گونه باندی مشاهده نشد. جهت بررسی کنترل مثبت برای گیرنده P75 از بافت نخاع موش صحرائی ۱ روزه که میزان mRNA ژن P75 آن بالا است استفاده شد (شکل ۴) و برای گیرنده Trk-B از بافت مخچه موش صحرائی بالغ که میزان mRNA بالا است استفاده شد (شکل ۵). الکتروفورز محصول PCR گیرنده P75 روی ژل آگارز یک باند



شکل ۳ - الگوی باندینگ RNA سالم و دست نخورده

بحث

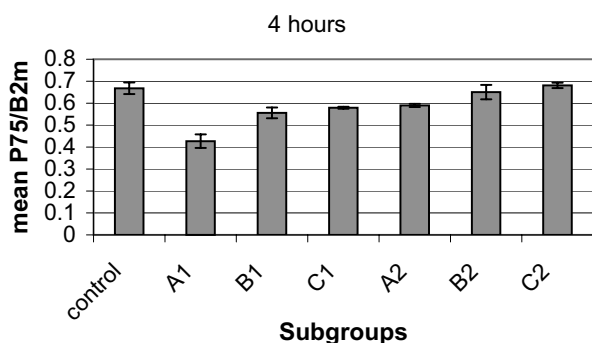
القاء فاکتورهای نروتروفیکی است [۱۲]. در بررسی اثرات دارو نقش آن در تغییر mRNA پاره‌ای از ژنها نیز مطرح است که می‌توان GDNF و BDNF را در سلولهای آستروسیت نام برد [۲۳].

نقش گیرنده P75 در تنظیم مکانیسم مرگ آپوپتوتیک سلولهای عصبی و افزایش mRNA این گیرنده در بیماری نورودژنراتیو نظیر آلزایمر، پیری و ضایعات قطع عصب محیطی تا حدی مشخص شده است. بدنال اکستومی عصب سیاتیک نوزادان موش صحرایی ۸۰٪ نرونهای حرکتی بدنال افزایش mRNA گیرنده P75 دچار مرگ آپوپتوتیک می‌شوند [۱۸].

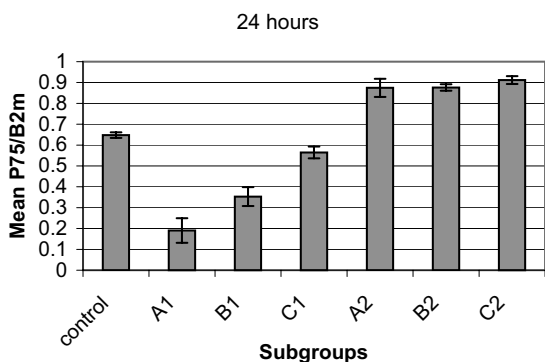
همچنین گزارش دیگری مرگ سلولهای اولیگودندروگلیال‌ها پس از ضایعه طناب نخاعی و دژنره شدن عصب محیطی بواسطه mRNA گیرنده P75 را ذکر می‌کند [۱۴].

گزارش Syroid علی‌رغم افزایش NGF و BDNF پس از اکستومی نوزادان موش صحرایی مرگ آپوپتوتیک سلولهای عصبی و شوان را ناشی از گیرنده P75 می‌داند [۲۱]. در موشهای فاقد گیرنده P75 مرگ سلولهای شوان و عصبی پس از صدمه به عصب محیطی مشاهده نمی‌شود [۷].

نتایج بدست آمده در این تحقیق نیز تا حدودی همراستا 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.

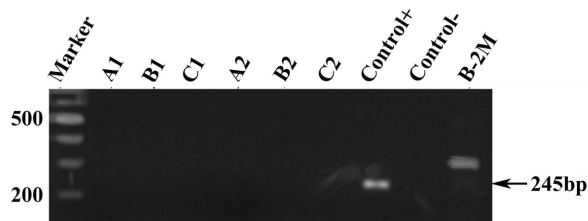


شکل ۷- نمودار ستونی از میانگین نسبت شدت باند P75NTR به شدت باند B2M در هر زیر گروه با نمونه‌برداری ۲۴ ساعت پس از تزریق و در نمونه کنترل مثبت که مربوط به نمونه نخاع موش صحرایی ۱ روزه است.

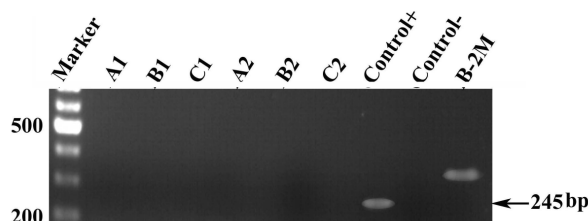
مرگ نرونهای حرکتی نابالغ در پی محروم شدن آنها از بافت‌های هدف مربوط در اثر اکستومی مدل مناسبی برای دست‌یابی به خاصیت نروتروفیکی داروی دپرنیل فراهم می‌کند. بطوری که خاصیت آنتی اکسیدانت و آنتی آپوپتوتیک آن به دنبال تأثیر بر مولکول‌های ضد آپوپتوز و رادیکالها مشخص شده است که با افزایش بیان مولکول‌های ضد آپوپتوز مانند Bcl-2 و آنتی اکسیدانت‌ها مرگ آپوپتوتیک را کاهش می‌دهد.

بدین ترتیب برای طیف گسترده اثرات داروی دپرنیل فرضیه‌هایی مطرح شد مبنی بر این که دپرنیل روی سلولهای عصبی نیز تأثیر دارد. بطوری که تحقیقات در این زمینه نشان می‌دهد که این دارو سبب حفظ سلولهای عصبی حسی در ضایعات عقده خلفی نخاع [۲۲] و سلولهای حسی شبکیه چشم موش صحرایی [۲۳] و حفظ نرونهای عصب بینایی موش صحرایی پس از ضایعه می‌شود [۴].

با مشخص شدن اثر نرون حفاظتی دارو بر روی سلولهای عصبی حسی توجه پاره‌ای از محققین به مطالعه اثر دارو بر نرون‌های حرکتی متمرکز شد و تحقیقات زیادی در این مورد صورت گرفت. که طبق گزارش Salo دپرنیل در اکستومی عصب فاسیپال (صورتی) موش صحرایی کاهش مرگ را نشان می‌دهد [۱۷]. در همین راستا گزارش دیگری وجود دارد که اثر دپرنیل را در بقاء نرونهای حرکتی اکستومی شده حیوانات بالغ یا نابالغ نشان می‌دهد [۳]. این اثر مشابه با اثر فاکتورهای تروفیکی بافت هدف یعنی BDNF است 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، C2 و B2M، 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.

- 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 increases 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 lacking the P75 receptor. *Neurosci Lett* 272 (1999) 191-194.
- [8] Knoll J, History of deprenyl: the first selective inhibitor of monoamine oxidase 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

قبلی است که پس از آکسوتومی عصب سیاتیک P75 mRNA افزایش می یابد و بررسی نیمه آماری نشان می دهد بعد از گذشت ۲۴ ساعت میزان mRNA گیرنده P75 در تمام زیرگروه های مورد نظر افزایش نسبتاً محسوسی دارد. تأثیر داروی دپرنیل در زیر گروههایی که داروی دپرنیل را دریافت کرده اند برای اولین بار نشان می دهد که mRNA گیرنده P75 کاهش می یابد 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 می باشد 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 مهارای آپوپتوز است [۱۲ و ۱۳]. همچنین بنظر می رسد نقش داروی دپرنیل در کاهش mRNA گیرنده P75 بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تزریق در زیرگروهی که یکساعت قبل از آکسوتومی دارو را دریافت کرده بود (زیر گروه A1) مشخص تر شده است.

مطالعات انجام شده در مورد گیرنده Trk-B نشان می دهد 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 می رسد [۱۹]. در بالغین نیز پس از ضایعه اعصاب محیطی پس از گذشت سه روز از ضایعه میزان بیان آن افزایش می یابد [۱ و ۱۳]. در بیماری های 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 در این تحقیق مبنی بر عدم ردیابی گیرنده Trk-B در نوزادان سه یا چهار روزه موش صحرایی احتمالاً 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 بعد از آکسوتومی می باشد. بدین ترتیب نتایج حاصله از این گیرنده همراستا با نتایج بدست آمده از تحقیقات قبلی است [۱ و ۱۳ و ۱۹]. در یک جمع بندی نیز این احتمال وجود دارد که داروی دپرنیل بکار برده شده در این تحقیق بر mRNA گیرنده Trk-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 اسکروزیس - آلزایمر 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, Frisén J, Antoniodel RS, Soriano E, Barbacid M, Silos-Santiago I, Trk B signaling is

- [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. *JN 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 axonal injury. *Dev Neurosci* 25 (2003) 65-71.
- 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.