Physiology and Pharmacology, 17 (1), 51-59
Spring 2013 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Role of a voltage-sensitive calcium channel blocker on inhibition of apoptosis in sensory neurons of cultured dorsal root ganglia in adult rat

Hamid Reza Momeni*, Mohammad Ali Shariatzadeh, Ahmad Hamta, Maryam Mirfakhraei, Najmeh Eskandari

Biology Dept, Faculty of Sciences, Arak University, Arak 38156-8-8349, Iran

Received: 15 Oct 2012 **Accepted: 27 Jan 2013**

Introduction: Under pathological conditions, abnormal increase in intracellular calcium concentrations is believed to induce cell death. In the present study, a voltage-sensitive calcium channel blocker (loperamide hydrochloride) was used to investigate its role in inhibition of apoptosis in sensory neurons of cultured spinal dorsal root ganglia (DRG).

Methods: L5 DRG from adult rats were dissected and divided into three groups: 1. Freshly prepared DRG; 2. Control DRG; and 3. DRG treated with voltage-sensitive calcium channel blocker (loperamide hydrochloride, 200 µM). The control and the treated DRG were incubated in a culture medium for 72 hours. The DRG were then fixed and sectioned by a cryostat. Morphological and biochemical features of apoptosis in sensory neurons were studied by fluorescent staining (Propidium iodide and Hoechst) and TUNEL methods, respectively.

Results: After 72 hours in culture, sensory neurons displayed morphological features of apoptosis. Most of these neurons also appeared as TUNEL positive. At this time period, the application of loperamide hydrochloride not only inhibited both morphological and biochemical features of apoptosis in the sensory neurons but also significantly increased the mean diameter of nucleus in these neurons compared to the control.

Conclusion: This study showed that elevated intracellular calcium concentration might be one of reasons for apoptosis of sensory neurons in the cultured DRG.

Key words: Dorsal root ganglia, Sensory neuron, Apoptosis, Loperamide hydrochloride

* Corresponding author e-mail: h-momeni@araku.ac.ir
Available online at: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۷ (۱)، ۵۱ – ۵۹
بهار ۱۳۹۲

فیزیولوژی و فارماکولوژی

نقش یک بلاکر کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ بر مهار آپوپتوزیس نورون های حسی گانگلیون های کشت شده ریشه پشتی نخاع رت بالغ

حمیدرضا مومنی*، سید محمد علی شریعت زاده، احمد همتا، مریم میرفخرایی، نجمه اسکندری
دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، اراک، کد پستی: ۳۸۱۵۶-۸-۸۳۴۹

دریافت: ۲۴ مهر ۹۱ پذیرش: ۸ بهمن ۹۱

چکیده

مقدمه: تحت شرایط پاتولوژیک، غلظت داخل سلولی کلسیم بطور غیر طبیعی افزایش یافته و منجر به مرگ سلولی می‌شود. در این پژوهش بلاکر کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ مورد استفاده قرار گرفت تا نقش آن بر مهار آپوپتوزیس نورون های حسی گانگلیون های کشت شده ریشه پشتی نخاع مورد بررسی قرار گیرد.

روش ها: گانگلیون های L5 از ریشه پشتی نخاع رت های بالغ خارج و به سه گروه تقسیم شدند: ۱- گانگلیون های لحظه زمانی صفر که بلافاصله فیکس شدند، ۲- گانگلیون های کنترل ۳- گانگلیون های تیمار شده با بلاکر کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ (لوپرامید هیدروکلراید، ۲۰۰ میکرومولار). گروه های کنترل و تیمار برای لحظه‌های زمانی ۷۲ ساعت در محیط کشت انکوبه و فیکس شدند و سپس از کلیه گانگلیون های فیکس شده برش تهیه شد. برای مطالعه مورفولوژیکی و بیوشیمیایی آپوپتوزیس نورون‌های حسی، به ترتیب از رنگ‌آمیزی فلئورسنت (پروپیدیوم آیوداید و هوخست) و تکنیک تانل استفاده شد.

یافته ها: نورون‌های حسی گانگلیون کشت شده برای ۷۲ ساعت، مشخصات مورفولوژیکی آپوپتوزیس را نمایان ساختند. علاوه بر آن، اکثر نورون های حسی به صورت تانل مثبت ظاهر شدند. در این زمان کاربرد لوپرامید هیدروکلراید نه تنها توانست مشخصات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی آپوپتوزیس را در نورون های حسی مهار نماید، بلکه توانست میانگین قطر هسته این نورون ها را بطور معنی داری نسبت به گروه کنترل افزایش دهد.

نتیجه گیری: افزایش کلسیم داخل سلولی احتمالاً یکی از دلایل آپوپتوزیس نورون های حسی در گانگلیون های کشت شده ریشه پشتی نخاع می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: گانگلیون‌های ریشه پشتی، نورون حسی، آپوپتوزیس، لوپرامید هیدروکلراید

مقدمه

کشت بافت اولین بار در آغاز قرن بیستم به عنوان روشی برای مطالعه رفتار سلول ابداع شد تا شرایطی مشابه آنچه که در in vivo بر بافت حاکم است را بوجود آورد. کشت گانگلیون های ریشه پشتی نخاع (Dorsal Root Ganglia) به عنوان مدلی برای کشت بافت در نظر گرفته شده و مطالعات متعددی نیز در این خصوص وجود دارد. بر خلاف آکسون نورون های موجود در سیستم اعصاب مرکزی که ترمیم نمی‌شوند، نورون های حسی موجود در سیستم اعصاب محیطی در محیط کشت از قابلیت بقا و ترمیم نسبتاً زیادی برخوردار هستند. در این خصوص مطالعات متعددی نیز در مورد ترمیم آکسون و مکانیسم‌های دخیل در آن در این نورون ها انجام شده است. با وجود قابلیت حیات بالای نورون های حسی در محیط کشت، تعدادی از آن‌ها در شرایط in vitro دستخوش مرگ سلولی می‌شوند. مطالعات صورت گرفته در این خصوص نشان می‌دهد که مرگ سلولی در این نورون ها به روش آپوپتوزیس بوده است. به

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: h-momeni@araku.ac.ir
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

عنوان مثال تحقیقات Lindwall و همکارانش [۱۴] نشان داد که طی کشت گانگلیون های ریشه پشتی نخاع رت های تازه متولد شده، تعدادی از نورون های حسی دستخوش آپوپتوزیس شده‌اند. این گروه کاهش (activating ATF3 transcription factor 3) را به عنوان مکانیسمی برای القا آپوپتوزیس در این نورون ها پیشنهاد نمودند. همچنین حدادی و همکاران [۸] گزارش نمودند که مرگ سلولی نورون های حسی گانگلیون های ریشه پشتی نخاع کشت شده موش بالغ از نوع آپوپتوزیس بوده است و فعال شدن کاسپاز ۳ را در این نورون ها به عنوان یکی از مکانیسم‌های دخیل در آپوپتوزیس این نورون ها مطرح نمودند. علاوه بر آن، به دنبال آسیب اعصاب محیطی مربوط به نورون های حسی گانگلیون های ریشه پشتی نخاع در شرایط in vivo تغییرات دژنراتیو در جسم سلولی این نورون ها حاکی از مرگ سلولی به روش آپوپتوزیس بوده است [۲، ۳، ۱۸، ۱۹].

مکانیسم‌های متعددی در خصوص مرگ نورونی مطرح است که از جمله می‌توان به افزایش غیر طبیعی یون کلسیم داخل سلولی اشاره نمود. تحت شرایط فیزیولوژیک غلظت کلسیم سیتوزول در سطح بسیار پایین است، در حالی که این غلظت در شرایط پاتولوژیک افزایش یافته و موجب شروع سیگنال هایی می‌گردد که به مرگ سلولی می‌انجامد. در این خصوص شواهدی دال بر مرگ سلولی القا شده توسط افزایش غلظت کلسیم داخل سلولی در سلول‌های تیمار شده با یونوفورهای کلسیم و یا مهار پمپ کلسیم موجود بر روی غشا سیتوپلاسمی وجود دارد [۱۱]. کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ یکی از راه های ورود کلسیم به درون سلول هستند. این کانال‌ها عضوی از خانواده بزرگ کانال‌های یونی وابسته به ولتاژ می‌باشند که با توجه به ویژگی‌های فارماکولوژیکی و بیوفیزیکی، انواع مختلفی از آن‌ها در سلول‌های مختلف شناسایی شده است [۳۰]. یکی از انواع این کانال‌ها نوع N می‌باشد که وجود آن‌ها در نورون ها ثابت شده است [۲۶]. در شرایط پاتولوژیک تغییر ولتاژ و یا سایر اختلالات یونی نورون ها منجر به باز شدن این کانال‌ها شده و با ورود بیش از اندازه کلسیم موجب افزایش غیرطبیعی کلسیم داخل سلولی [۲۰] و سرانجام مرگ سلولی می‌گردد.

اگر چه گزارش‌هایی دال بر آپوپتوزیس نورون های حسی در طی کشت عقده های ریشه پشتی نخاع وجود دارد، با این حال مکانیسم‌های متفاوتی جهت القا آپوپتوزیس را در این نورون ها مطرح نموده است [۸، ۱۴]. با توجه به اینکه آپوپتوزیس فرایند پیچیده ای است که می‌تواند از طریق مکانیسم‌های مختلف به طور همزمان القا شود، نه تنها مکانیسم‌های مختلف ارائه شده در خصوص آپوپتوزیس نورون های حسی را توجیه می‌نماید بلکه احتمال دخالت سایر مکانیسم‌ها در القا آپوپتوزیس این نورون ها را نیز می‌تواند مطرح نماید. از آنجا که کشت گانگلیون های ریشه پشتی نخاع می‌تواند مدلی از آکسوتومی نورون های حسی این گانگلیون ها باشد، لذا بررسی و شناسایی کلیه مکانیسم‌های دخیل در مرگ این نورون ها با هدف مهار آن‌ها می‌تواند استراتژی را جهت بقا این نورون ها و بنابراین تسهیل در امکان ترمیم آکسون های آسیب دیده آن‌ها ارائه نماید.

با توجه به این که افزایش بیش از حد سطح کلسیم سیتوزولی برای سلول‌ها و به خصوص نورون ها مرگ آور است، این احتمال وجود دارد که کشت گانگلیون های ریشه پشتی نخاع موجب شده است تا نورون های حسی آن در معرض افزایش کلسیم داخل سلولی قرارگرفته باشند. بنابراین می‌توان این گونه فرض نمود که با جلوگیری از افزایش بیش از حد این یون در داخل سلول بتوان از مرگ این نورون ها جلوگیری و یا حداقل مرگ آن‌ها را به تأخیر انداخت. یکی از این روش ها می‌تواند استفاده از بلاکر کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ باشد. در این خصوص مطالعات مختلفی نیز دال بر مهار آپوپتوزیس در نورون ها با استفاده از کاربرد بلاکر کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ وجود دارد [۱۵، ۲۸].

بنابراین پژوهش حاضر برای اولین بار با هدف بررسی اثر یک بلاکر کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ بر روی آپوپتوزیس نورون های حسی از گانگلیون های ریشه پشتی نخاع (که در شرایط طبیعی و بدون تأثیر عوامل خارجی کشت شده‌اند) طراحی شده تا به این سؤال پاسخ داده شود که آیا افزایش بیش از اندازه کلسیم داخل سلولی می‌توانست به عنوان یکی از عوامل محتمل برای القا آپوپتوزیس این نورون ها باشد.

مواد و روش ها

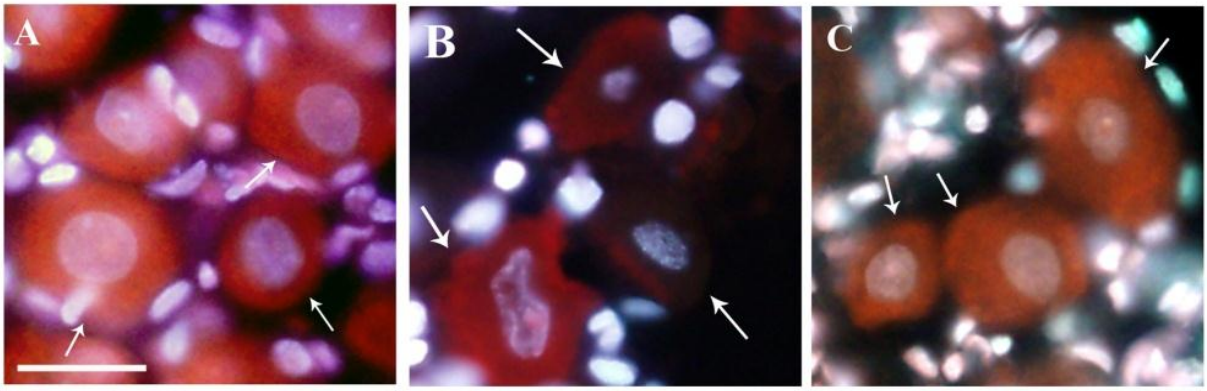
در این مطالعه رت های ماده‌ی بالغ نژاد ویستار با میانگین وزنی ۲۰±۲۰۰ گرم مورد استفاده قرار گرفتند. رت ها از انستیتو پاستور ایران خریداری و در خانه‌ی حیوانات در شرایط استاندارد، دمای ۲±۲۱ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۷۵ درصد و نور کنترل شده با شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی با دسترسی به آب و غذای کافی نگه‌داری شدند. در کلیه آزمایش‌ها، اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شده است. حیوانات با استفاده از اتر کاملاً بی‌هوش و توسط شکافتگی قلب کشته شدند. پس از باز نمودن ناحیه پشتی در محل نخاع، یک جفت گانگلیون L5 از گانگلیون های ریشه پشتی نخاع هر رت خارج و به پتری استریل حاوی محیط کشت سرد منتقل شدند. سپس نمونه‌ها به سه گروه تقسیم شدند: ۱-گانگلیون های لحظه زمانی صفر که بلافاصله فیکس شدند. ۲-گانگلیون های گروه کنترل و ۳-گانگلیون های گروه تیمار با لوپرامید هیدروکلراید (با غلظت موثر ۲۰۰ میکرومولار در این پژوهش) به عنوان یک بلاکر کانال کلسیمی وابسته به ولتاژ. نمونه های گروه کنترل و تیمار به پتری استریل حاوی ۲۰۰۰ میکرولیتر محیط کشت شامل ۵۰ درصد Minimum Essential Medium (MEM)، ۲۵ درصد سرم اسب، ۲۵ میلی مولار HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)، ۲۵ درصد Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)، ۱ درصد پنی‌سیلین-استرپتومایسین و ۶ گرم در لیتر گلوکز با pH=۷/۳-۷/۴ با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل و در انکوباتور Co_2 دار با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای ۷۲ ساعت انکوبه شدند.

گانگلیون های لحظه زمانی صفر و کشت شده توسط فیکساتور استفانینی شامل ۲ درصد پارافرمالدئید، ۰/۲ درصد اسید پیکریک در ۰/۱ مولار بافر فسفات با pH: ۷/۲ برای ۲۴ ساعت فیکس شدند. سپس گانگلیون ها ۳ بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه توسط PBS (Phosphate Buffered Saline) شستشو و برای مدت یک شب در محلول ساکاروز ۲۰ درصد در PBS، در یخچال نگهداری شدند. سپس گانگلیون ها با استفاده از cryostat (لایکا، آلمان) با ضخامت ۱۰ میکرون برش گیری و برش‌ها بر روی لام های آغشته به پلی- ال- لایزین (۱:۹ در آب مقطر) قرار گرفتند. سرانجام لام ها در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا هنگام استفاده نگهداری شدند.

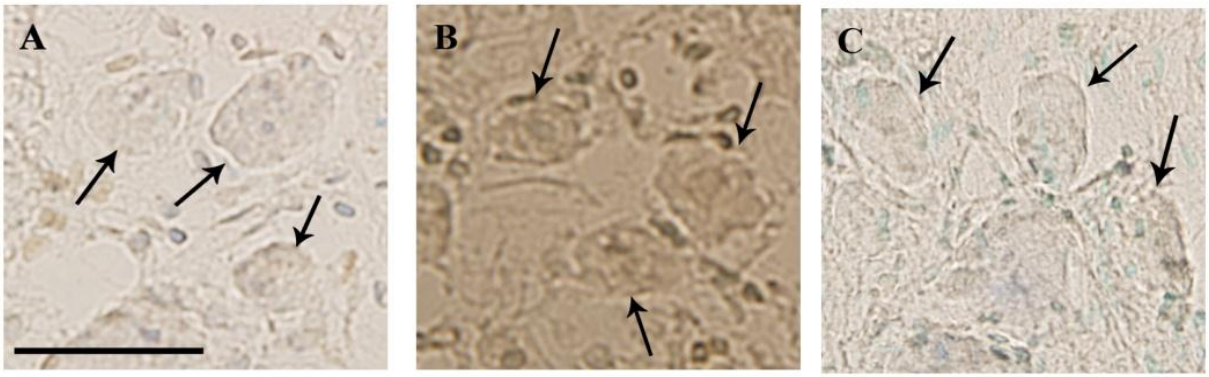
به منظور بررسی مشخصات مورفولوژیکی آپوپتوزیس در نورون‌های حسی، رنگ‌های فلئورسنت پروپیدیوم آیوداید (Propidium iodide, Sigma) با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر به مدت ۳ دقیقه و هوخست ۳۳۳۴۲ (Hoechst 33342, Sigma) با غلظت ۵ میکروگرم بر میلی لیتر به مدت ۳۰ ثانیه مورد استفاده قرار گرفتند. سپس لام ها با PBS شستشو داده شد (۳ بار و هر بار ۵ دقیقه) و پس از اضافه نمودن محلول گلیسرول/PBS (۱:۱) با لامل پوشانده شدند. لام ها سپس با استفاده از میکروسکوپ فلئورسنس و فیلتر مناسب مشاهده و از آن‌ها عکس تهیه شد. به منظور بررسی جنبه بیوشیمیایی آپوپتوزیس در نورون های حسی تکنیک تانل TUNEL (Terminaldeoxynucleotidyl transferase Biotin dutp nick end labling) مورد استفاده قرار گرفت. مراحل انجام تکنیک تانل بر اساس دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده (Chemicon, USA) انجام شد. سرانجام لام ها توسط میکروسکوپ نوری مشاهده و از آن‌ها عکس تهیه شد. جهت اندازه گیری قطر هسته نورون های حسی از نرم افزار موتیک استفاده شد و داده های حاصل از این اندازه‌گیری به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شدند. آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) همراه با آزمون Tukey برای سنجش آماری داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت و $P < ۰/۰۵$ به عنوان مرز معنی دار بودن داده‌ها در نظر گرفته شد.

یافته ها

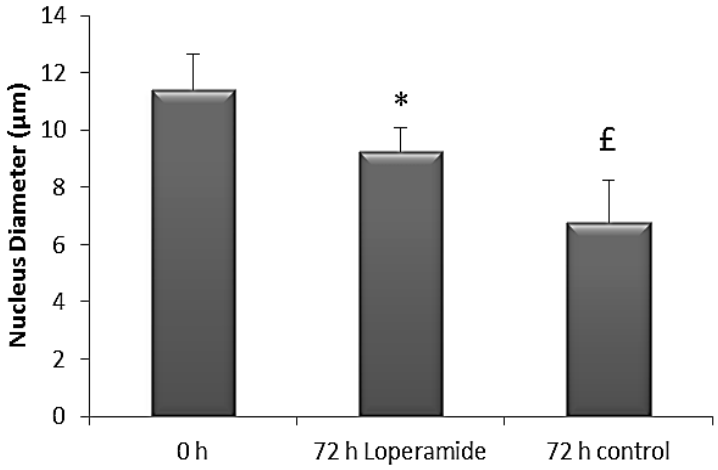
در گانگلیون‌های لحظه زمانی صفر، نورون‌های حسی دارای اجسام سلولی و هسته بزرگ بودند، مواد هسته ای توزیع طبیعی داشته و هیچ گونه علامت آپوپتوزیس مشاهده نشد (شکل ۱A). در اکثر نورون‌های حسی گانگلیون‌های کشت شده برای ۷۲ ساعت یعنی گروه کنترل (شکل ۱B) چروکیدگی سلول و متراکم شدن هسته و کروماتین به خوبی مشخص بود. تیمار با لوپرامید هیدروکلراید با غلظت ۲۰۰



شکل ۱- نقش یک بلاکر کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ (لوپرامید هیدروکلراید) در مهار آپوپتوزیس نورون‌های حسی گانگلیون‌های ریشه پشتی نخاع. رنگ آمیزی فلئورسنت پروپیدیوم آیوداید و هوخست ۳۳۳۴۲ تغییرات را در نورون های حسی نشان می‌دهد. (A) نورون‌های حسی گانگلیون‌های لحظه زمانی صفر. (B) نورون‌های حسی گانگلیون‌های کشت شده برای ۷۲ ساعت (کنترل). کاربرد لوپرامید هیدروکلراید برای ۷۲ ساعت (C) با غلظت ۲۰۰ میکرومولار توانست نشانه‌های مورفولوژیکی آپوپتوزیس را در نورون‌های حسی به طور قابل ملاحظه‌ای نسبت به گروه کنترل مهار نماید. فلش‌ها نورون های حسی را نشان می‌دهند. Scale bar = 50 µm



شکل ۲- تأثیر یک بلاکر کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ (لوپرامید هیدروکلراید) در مهار آپوپتوزیس نورون های حسی گانگلیون های ریشه پشتی نخاع با استفاده از تکنیک تانل (TUNEL). (A): بدون رنگ بودن نورون‌های حسی برش‌های مربوط به لحظه زمانی صفر بیانگر تانل منفی بودن این نورون‌ها بود. (B): رنگ قهوه ای هسته‌ها بیانگر تانل مثبت بودن نورون های حسی گانگلیون‌های کشت شده پس از ۷۲ ساعت در محیط کشت بود. (C): کاربرد لوپرامید هیدروکلراید با غلظت ۲۰۰ میکرومولار پس از ۷۲ ساعت توانست آپوپتوزیس را در نورون های حسی نسبت به گروه کنترل مهار نماید و نورون ها به صورت تانل منفی ظاهر شدند. فلش ها نورون های حسی را نشان می‌دهند. Scale bar = 50 µm



شکل ۳- اثر یک بلاکر کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ (لوپرامید هیدروکلراید) بر قطر هسته نورون‌های حسی گانگلیون‌های ریشه پشتی نخاع. میانگین قطر هسته نورون‌های حسی گانگلیون‌های ریشه پشتی نخاع کشت شده پس از ۷۲ ساعت نسبت به میانگین قطر هسته این نورون‌ها در لحظه زمانی صفر کاهش معنی داری را نشان داد. لوپرامید هیدروکلراید با غلظت ۲۰۰ میکرو مولار پس از گذشت ۷۲ ساعت در محیط کشت به طور معنی داری توانست کاهش قطر هسته نورون‌های حسی را در مقایسه با کنترل مهار نماید.داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است. (*:P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل و £:P<۰/۰۵ در مقایسه با لحظه صفر) (ANOVA, Tukey's test, n=25)

میکرومولار برای ۷۲ ساعت (شکل 1C) توانست نشانه های مورفولوژیکی آپوپتوزیس را در نورون های حسی نسبت به گروه کنترل به طور قابل ملاحظه ای مهار نماید. تکنیک تانل جهت بررسی جنبه‌ی بیوشیمیایی آپوپتوزیس (شکسته شدن DNA) در نورون‌های حسی گانگلیون های ریشه پشتی نخاع به کار برده شد. هسته نورون‌های حسی برش‌های مربوط به گانگلیون های لحظه زمانی صفر، بدون رنگ و بدین ترتیب تانل منفی (TUNEL negative) بودند (شکل 2A). پس از گذشت ۷۲ ساعت در محیط کشت، به تدریج هسته بعضی از نورون‌ها به رنگ قهوه ای ظاهر شدند که بیانگر نشاندار شدن هسته این نورون‌ها و تانل مثبت (TUNEL positive) بودن این سلول‌ها بود (شکل 2B). در این زمان کاربرد لوپرامید هیدروکلراید با غلظت ۲۰۰ میکرومولار (شکل 2C) توانست شکستگی DNA را در این نورون ها نسبت به گروه کنترل مهار نماید و نورون ها به صورت تانل منفی ظاهر شدند.

میانگین قطر هسته نورون های حسی گانگلیون های ریشه پشتی نخاع کشت شده پس از ۷۲ ساعت (کنترل) نسبت به میانگین قطر هسته این نورون‌ها در لحظه زمانی صفر کاهش معنی داری ($P < ۰/۰۵$) را نشان داد. کاربرد لوپرامید هیدروکلراید (۲۰۰ میکرومولار) پس از گذشت ۷۲ ساعت توانست کاهش میانگین قطر هسته نورون ها را نسبت به گروه کنترل بطور معنی داری ($P < ۰/۰۵$) جبران نماید (شکل ۳).

بحث

در تحقیق حاضر کشت گانگلیون های ریشه پشتی نخاع مورد استفاده قرار گرفت تا یکی از مکانیسم‌های احتمالی دخیل در مرگ نورون های حسی این گانگلیون ها مورد مطالعه قرار گیرد. این بررسی نشان داد که لوپرامید هیدروکلراید به عنوان بلاکر کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ توانست آپوپتوزیس ایجاد شده در نورون های حسی را مهار نماید. با استفاده از رنگ‌های فلئورسنت پروپیدیوم آیوداید و هوخست که می‌تواند با اتصال به DNA تغییرات هسته ای در طی آپوپتوزیس را مشخص نماید [۱۳، ۲۳]، نورون های حسی گانگلیون های کشت شده مشخصات مورفولوژیکی آپوپتوزیس مانند چروکیدگی سیتوپلاسم، متراکم شدن هسته و کروماتین را نشان دادند. مطالعات متعددی این مشخصات را به عنوان ویژگی‌های مورفولوژیکی آپوپتوزیس گزارش نموده‌اند [۲۲، ۲۴، ۲۹]. نتایج حاصل از تکنیک تانل توانست نتایج مورفولوژیکی را تایید نماید. این روش برای تشخیص مشخصه بیوشیمیایی آپوپتوزیس (قطعه قطعه شدن DNA) مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۲]. با این حال، این تکنیک دارای محدودیت‌هایی است، به طوری که گزارش‌هایی وجود دارد که این روش علاوه بر سلول‌های آپوپتوتیک قادر است سلول‌های نکروتیک را نیز به صورت تانل مثبت مشخص نماید [۱، ۷]. با این وجود در حال حاضر این تکنیک در بسیاری از تحقیقات جهت شناسایی آپوپتوزیس مورد استفاده قرار می‌گیرد [۴، ۲۲]. بر اساس نتایج کسب شده این احتمال وجود داشت که آپوپتوزیس مسئول مرگ نورون‌های حسی در گانگلیون های کشت شده ریشه پشتی نخاع باشد.

مطالعات نشان می‌دهد که آپوپتوزیس در سلول‌ها می‌تواند از طریق مکانیسم‌های متعددی القا شود. به عنوان مثال افزایش کلسیم داخل سلولی به عنوان یکی از مکانیسم‌های مهم دخیل در آپوپتوزیس نورون ها مطرح است. در این خصوص گزارش‌هایی دال بر القا آپوپتوزیس در نورون ها ناشی از افزایش غیر طبیعی کلسیم داخل سلولی در بیماری‌های ناشی از دژنره شدن نورون ها Neurodegenerative diseases (بیماری‌هایی که در آن نورون ها دچار اضمحلال می‌شوند) وجود دارد [۲۵].

کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ یکی از راه های ورود کلسیم به درون سلول هستند که می‌توانند در شرایط پاتولوژیک در روند آپوپتوزیس نقش داشته باشند [۲۶]. مطالعات نشان می‌دهد که استفاده از بلاکر کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ توانسته است آپوپتوزیس القا شده در نورون ها را مهار نماید [۱۵، ۱۶، ۲۸]. بنابراین در تحقیق حاضر از لوپرامید هیدروکلراید استفاده شد تا نقش این کانال‌ها در آپوپتوزیس نورون های حسی مشخص گردد. نتایج به دست آمده نشان داد لوپرامید هیدروکلراید می‌تواند جنبه های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی آپوپتوزیس را در نورون های حسی مهار نماید. لوپرامید به عنوان یک بلاکر کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ مطرح است [۵] که قادر است به طور کامل به درون سیستم اعصاب مرکزی نفوذ نماید [۲۷]. از آنجا که این

ماده همچنین قادر است که به عنوان یک آگونیست رسپتورهای اپیوئیدی نوع مو نیز عمل نماید [۶]، لذا امکان دخالت سیستم اپیوئیدی در نتایج کسب شده پژوهش حاضر منتفی نیست. با این وجود با توجه به نتایج پژوهش حاضر و اینکه لوپرامید قادر است جریان کلسیم به درون نورن های پیرامیدال هیپوکامپ موش [۵] و نورون های حسی گانگلیون های ریشه پشتی نخاع موش [۹] را مهار نماید، این احتمال را قوت می‌بخشد که در نورون های حسی لوپرامید بتواند نقش موثر تری به عنوان یک بلاکر کانال کلسیمی وابسته به ولتاژ تا یک آگونیست رسپتورهای اپیوئیدی مو ایفا نماید. بنابراین می‌توان احتمال داد که طی کشت گانگلیون های ریشه پشتی نخاع، تغییر ولتاژی در غشای سیتوپلاسمی نورون های حسی موجب باز شدن این کانال‌ها و بنابراین افزایش غیرطبیعی غلظت کلسیم داخل سلولی شده باشد و این افزایش به نوبه خود از طریق مکانیسم‌های مختلف وابسته به کلسیم توانسته است آپوپتوزیس را در نورون های حسی این عقده‌ها القا نماید. این که چطور و با چه مکانیسمی افزایش غیر طبیعی کلسیم داخل سلولی توانسته است منجر به آپوپتوزیس نورون های حسی شده باشد قابل بحث است. از آن جا که افزایش غیر طبیعی کلسیم داخل سلولی با فعال نمودن پروتئازها [۲۱] و اندونوکلئازهای [۱۷] وابسته به کلسیم می‌تواند در القا آپوپتوزیس نقش مهمی بازی نماید، بنابراین منطقی‌ترین احتمال در خصوص آپوپتوزیس نورون های حسی می‌تواند ناشی از فعال شدن این آنزیم‌ها باشد. علاوه بر این افزایش بیش از حد کلسیم داخل سلولی موجب عملکرد غیر طبیعی ارگانل های سلولی از جمله میتوکندری ها می‌شود. بدین ترتیب که با افزایش غیرطبیعی غلظت کلسیم سیتوزولی، جذب کلسیم توسط میتوکندری ها افزایش و منجر به تجمع بیش از اندازه کلسیم در این ارگانل می‌گردد. این امر موجب تغییر ولتاژ غشا میتوکندری ها و باز شدن منافذ این ارگانل شده که به واسطه آن منجر به آزاد شدن پروتئین های آپوپتوژنیک همچون سیتوکروم c، فاکتور القا کننده آپوپتوزیس (Apoptosis inducing factor) و اندونوکلئاز G از این اندامک می‌شود [۱۰].

از آنجا که کاربرد بلاکر کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ در محیط کشت گانگلیون‌های ریشه پشتی نخاع توانست نشانه‌های آپوپتوزیس را در نورون‌های حسی مهار نماید می‌توان احتمال داد که افزایش کلسیم داخل سلولی احتمالاً یکی از دلایل آپوپتوزیس نورون‌های حسی در گانگلیون های کشت شده ریشه پشتی نخاع می‌باشد.

سپاسگزاری

این پژوهش در آزمایشگاه تحقیقات فیزیولوژی گروه زیست شناسی دانشگاه اراک و با حمایت مالی این دانشگاه انجام شده است.

References

[1] Ansari B, Coates PJ, Greenstein BD, Hall PA, In situ end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. ***J Pathol*** 170 (1993) 1-8.

[2] Atlasi MA, Mehdizadeh M, Bahadori MH, Joghataei MT, Morphological identification of cell death in dorsal root ganglion neurons following peripheral nerve injury and repair in adult rat. ***Iran Biomed J*** 13 (2009) 65-72.

[3] Bahadori MH, Al-Tiraihi T, Valojerdi MR, Sciatic nerve transection in neonatal rats induces apoptotic neuronal death in L5 dorsal root ganglion. ***J Neurocytol*** 30 (2001) 125-130.

[4] Buschmann T, Martin-Villalba A, Kocsis JD, Waxman SG, Zimmermann M, Herdegen T, Expression of Jun, Fos, and ATF-2 proteins in axotomized explanted and cultured adult rat dorsal root ganglia. ***Neuroscience*** 84 (1998) 163-176.

[5] Church J, Fletcher EJ, Abdel-Hamid K, MacDonald JF, Loperamide blocks high-voltage-activated calcium channels and N-methyl-D-aspartate-evoked responses in rat and mouse cultured hippocampal pyramidal neurons. ***Mol Pharmacol*** 45 (1994) 747-757.

[6] DeHaven-Hudkins DL, Burgos LC, Cassel JA, Daubert JD, DeHaven RN, Mansson E, Nagasaka H, Yu G, Yaksh T, Loperamide (ADL 2-1294), an opioid antihyperalgesic agent with peripheral selectivity. ***J***

Pharmacol Exp Ther 289 (1999) 494-502.

[7] Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R, In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. ***Hepatology*** 21 (1995) 1465-1468.

[8] Haddadi M, ***Study of cell death in sensory neurons of dorsal root ganglia in adult mouse***. (dissertation). Biology department, Faculty of Science, Arak University, 2011.

[9] Hagiwara K, Nakagawasai O, Murata A, Yamadera F, Miyoshi I, Tan-No K, Tadano T, Yanagisawa T, Iijima T, Murakami M, Analgesic action of loperamide, an opioid agonist, and its blocking action on voltage-dependent Ca2+ channels. ***Neurosci Res*** 46 (2003) 493-497.

[10] Jeong SY, Seol DW, The role of mitochondria in apoptosis. ***BMB Rep*** 41 (2008) 11-22.

[11] Kajitani N, Kobuchi H, Fujita H, Yano H, Fujiwara T, Yasuda T, Utsumi K, Mechanism of A23187-induced apoptosis in HL-60 cells: dependency on mitochondrial permeability transition but not on NADPH oxidase. ***Biosci Biotechnol Biochem*** 71 (2007) 2701-2711.

[12] Labat-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla E, Negoescu A, TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. ***J Histochem Cytochem*** 46 (1998) 327-334.

[13] Lecoeur H, Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases. ***Exp Cell Res*** 277 (2002) 1-14.

[14] Lindwall C, Kanje M, The Janus role of c-Jun: cell death versus survival and regeneration of neonatal sympathetic and sensory neurons. ***Exp Neurol*** 196 (2005) 184-194.

[15] Mason RP, Leeds PR, Jacob RF, Hough CJ, Zhang KG, Mason PE, Chuang DM, Inhibition of excessive neuronal apoptosis by the calcium antagonist amlodipine and antioxidants in cerebellar granule cells. ***J Neurochem*** 72 (1999) 1448-1456.

[16] Momeni HR, Jarahzadeh M, Effects of a voltage sensitive calcium channel bloker and a sodium calcium exchanger inhibitor on apoptosis of motor neurons in adult spinal cord slices. ***Cell Journal*** 14 (2012) 171-176.

[17] Nagata S, DNA degradation in development and programmed cell death. ***Annu Rev Immunol*** 23 (2005) 853-875.

[18] Oliveira AL. Apoptosis of sensory neurons and satellite cells after sciatic nerve transection in C57BL/6J mice. ***Braz J Med Biol Res*** 34 (2001) 375-380.

[19] Oliveira AL, Risling M, Deckner M, Lindholm T, Langone F, Cullheim S, Neonatal sciatic nerve transection induces TUNEL labeling of neurons in the rat spinal cord and DRG. ***Neuroreport*** 8 (1997) 2837-2840.

[20] Ozaki T, Yamashita T, Ishiguro S, Mitochondrial m-calpain plays a role in the release of truncated apoptosis-inducing factor from the mitochondria. ***Biochim Biophys Acta*** 1793 (2009) 1848-1859.

[21] Ray SK, Hogan EL, Banik NL, Calpain in the pathophysiology of spinal cord injury: neuroprotection with calpain inhibitors. ***Brain Res Rev*** 42 (2003) 169-185.

[22] Sango K, Horie H, Saito H, Ajiki K, Tokashiki A, Takeshita K, Ishigatsubo Y, Kawano H, Ishikawa Y, Diabetes is not a potent inducer of neuronal cell death in mouse sensory ganglia, but it enhances neurite regeneration in vitro. ***Life Sci*** 71 (2002) 2351-2368.

[23] Suzuki T, Fujikura K, Higashiyama T, Takata K, DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy. ***J Histochem Cytochem*** 45 (1997) 49-53.

[24] Vogelbaum MA, Tong JX, Rich KM, Developmental regulation of apoptosis in dorsal root ganglion neurons. ***J Neurosci*** 18 (1998) 8928-8935.

[25] Vosler PS, Brennan CS, Chen J, Calpain-mediated signaling mechanisms in neuronal injury and neurodegeneration. ***Mol Neurobiol*** 38 (2008) 78-100.

[26] Westenbroek RE, Hell JW, Warner C, Dubel SJ, Snutch TP, Catterall WA, Biochemical properties and subcellular distribution of an N-type calcium channel alpha 1 subunit. ***Neuron*** 9 (1992) 1099-1115.

[27] Wuster M, Herz A, Opiate agonist action of antidiarrheal agents in vitro and in vivo--findings in support for selective action. ***Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*** 301 (1978) 187-194.

[28] Yagami T, Ueda K, Sakaeda T, Itoh N, Sakaguchi G, Okamura N, Hori Y, Fujimoto M, Protective effects of a selective L-type voltage-sensitive calcium channel blocker, S-312-d, on neuronal cell death. ***Biochem***

Pharmacol 67 (2004) 1153-1165.

[29] Yeo W, Gautier J, Early neural cell death: dying to become neurons. ***Dev Biol*** 274 (2004) 233-244.

[30] Zhang JF, Randall AD, Ellinor PT, Horne WA, Sather WA, Tanabe T, Schwarz TL, Tsien RW, Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca2+ channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. ***Neuropharmacology*** 32 (1993) 1075-1088.