



Antidepressant effect and toxicity of a new morpholino betalactam compound in male mice

Faegheh Baha'addini Beigi Zarandi^{1*}, Mohammad Hosein Fahmideh², Maesoomeh Eskandari³,
Ali Asghar Jarrahpour³

1. Dept. of Pharmacology, Medical School, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Fars, Iran

2. Student of Pharmacy School, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Fars, Iran

3. Dept. of Chemistry, College of Sciences, Shiraz University, Shiraz, Fars, Iran

Received: 20 Aug 2013

Accepted: 7 Jun 2014

Abstract

Introduction: In this study the antidepressant effect of a new morpholino betalactam composition, 1-(3-morpholinopropyl)-4-(naphthalene-2-yl)-3-phenoxyazetidin-2-one (EB9) administered at three doses, was investigated in an animal model of depression. The CNS stimulant, muscle coordination and toxic effects of this compound were also tested.

Methods: Morpholino betalactam at 10, 15 and 20 mg/kg, imipramine at 5, 10 and 20 mg/kg as a positive control and two solvents, distilled water and DMSO as negative controls were administered to white male mice. After a forced swimming pretest, the mice received two i.p. injections, the first one immediately after, and the second one five hours after the pretest. The duration of immobility and climbing behaviors, at 1 and 23.5 hours after the first injection were recorded as acute and subacute effects, respectively. For the evaluation of muscle coordination, rotarod test was used. Total activity test was done to test the CNS stimulant effect. Toxicity of the compound at the doses of 300-400 mg/kg was also studied and its LD₅₀ was calculated.

Results: The new morpholino betalactam compound significantly reduced the immobility time and increased the climbing time in the forced swimming test, without showing any significant effect on the total activity and rotarod test results. At the dose of 400 mg/kg, the compound caused liver damage and its LD₅₀ was estimated to be 325 mg/kg.

Conclusion: Morpholino betalactam may have antidepressant effect in human at doses which are not toxic.

Key words: morpholino betalactam, imipramine, forced swimming test, rotarod, motor activity, toxicity

* Corresponding author e-mail: zarandi@sums.ac.ir
Available online at: www.phypha.ir/ppj

اثر ضد افسردگی و سمیت یک مشتق مورفولینو بتالاکتام جدید در موش سوری نر

فائقه بهالذینی بیگی زرنندی^{۱*}، محمد حسین فهمیده^۲، معصومه اسکندری^۳، علی اصغر جراح پور^۳
۱. گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز
۲. دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز
۳. بخش شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز، شیراز

پذیرش: ۱۷ خرداد ۹۳

دریافت: ۷ شهریور ۹۲

چکیده

مقدمه: در این مطالعه اثر ضد افسردگی یک مشتق جدید مورفولینو بتالاکتام (۱) - (۳-مورفولینوپروپیل) - ۴ - (نفتالین - ۲-ایل) - ۳ - فنوکسی ازیپدین - ۲-اون) با نام مخفف EB9 در یک مدل حیوانی افسردگی بررسی شد.

روش ها: مورفولینو بتالاکتام در سه دوز ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم، ایمی پرامین در سه دوز ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم به عنوان کنترل مثبت و آب مقطر و DMSO به عنوان کنترل منفی استفاده شدند. داروها در دو نوبت یکی بلافاصله و دیگری پنج ساعت پس از یک آزمون اولیه شنای اجباری تزریق شد. سپس مدت زمان رفتارهای صعود و بی حرکتی حیوان یک و ۲۳.۵ ساعت پس از آزمون اولیه به عنوان اثرات حاد و تحت حاد، به ترتیب ثبت شد. اثرات بر عضلات، تحریک سیستم اعصاب مرکزی، و سمیت آن مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: مورفولینو بتالاکتام در آزمون شنای اجباری در حد معنی دار مدت زمان بی حرکتی را کاهش و مدت زمان رفتار صعود را افزایش داد؛ بدون این که در آزمون های روتارد و لوموتوراکتیویته تغییرات معنی داری نسبت به گروه کنترل ایجاد کند. در دوز ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عوارض کبدی ایجاد کرد. دوز کشنده ۵۰ درصد موش ها نیز ۳۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم تخمین زده شد.

نتیجه گیری: این ترکیب ممکن است در دوزهایی که سمی نیست اثر ضدافسردگی در انسان نشان دهد.

واژه های کلیدی: مورفولینو بتالاکتام، ایمی پرامین، آزمون شنای اجباری، روتارد، فعالیت حرکتی، سمیت

مقدمه

افسردگی یک اختلال خلق شایع، مزمن و تهدید کننده حیات است. افسردگی دارای اثرات عمده ای بر بهره وری اقتصادی و عملکرد فردی و اجتماعی، در سراسر جهان است و بار بسیار زیادی بر افراد، خانواده ها و جامعه تحمیل می کند.

شیوع افسردگی برای مردان ۱۲-۷ درصد و برای زنان ۲۵-۲۰ درصد تخمین زده می شود [۳۰]. حمله افسردگی عمده در ۸۰-۷۰ درصد موارد درمان پذیر است و بسته به نوع و شدت بیماری برای درمان چند راه از جمله دارو درمانی، روان درمانی و استفاده از شوک الکتریکی وجود دارد که رایج ترین آن درمان دارویی است. اما عوارض جانبی، تأخیر در شروع اثر درمانی و فقدان اثربخشی در برخی از بیماران از معایب این داروها می باشد. بنابراین جستجوی داروهای ضدافسردگی بهتر اهمیت دارد.

zarandi@sums.ac.ir

www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

غیر قابل فرار قرار گرفته و به طور متناوب رفتارهای فرار شامل تلاش برای بالا رفتن از دیواره بشر (صعود)، شنا کردن و بی حرکتی را نشان می‌دهد. داروهای ضدافسردگی رفتار بی حرکتی را در این آزمون کاهش می‌دهند که اعتبار این آزمون را در غربال گری داروهای ضدافسردگی تایید می‌کند [۸]، [۲۰]. در حالت بی حرکتی حیوان در یک محل ثابت باقی می‌ماند و به جز حرکات ضروری برای ماندن بر سطح آب حرکتی نشان نمی‌دهد. از آن جا که داروهای محرک سیستم اعصاب مرکزی با افزایش فعالیت حرکتی در آزمون شنای اجباری اثر مثبت کاذب دارند [۲۱] اثر این ترکیب بر فعالیت حرکتی حیوان هم بررسی شد. همچنین داروها ممکن است در فعالیت عضلانی اختلال ایجاد کنند و از این طریق در نتایج به دست آمده تداخل ایجاد کند [۱۱] که آزمون رتارد به منظور بررسی تأثیر ترکیب مورد نظر بر هماهنگی فعالیت عضلانی نیز انجام شد. LD_{50} ترکیب مورد مطالعه نیز تخمین زده شد، که عبارت است از دوزی از دارو که باعث ایجاد مرگ و میر در ۵۰ درصد از موش‌ها می‌شود. اثرات سمیت حاد این ترکیب بر ارگان‌های اصلی از جمله کبد نیز بررسی شد، یکی از مهم‌ترین اندام‌هایی که بسیاری از داروها مخصوصاً داروهای ضد افسردگی روی آن اثر مخرب دارند کبد است.

مواد و روش‌ها

روش ساخت بتا-لاکتام ۱-(۳-مورفولینوپروپیل)-۴-(نفتالین-۲-یل)-۳-فنوکسی ازییدین-۲-ون: به اختصار محلولی از فنوکسی استیل کلرید (0.6 mmol, 4.6 g, 0.78 ml) در دی کلرو متان به آرامی به محلولی از باز شیف ۳-مورفولینو-ان-(نفتالین-۲-یل متیلن) پروپان-۱-امین (1.00 mmol, 3.5 g) و تری اتیل امین (2.6 mmol) در ۱۵ میلی لیتر دی کلرو متان خشک در دمای 0 °C اضافه شد سپس به مخلوط واکنش اجازه داده شد تا به دمای محیط برسد، و بمدت ۲۴ ساعت ضمن چرخیدن، در این دما بماند. سپس ابتدا با (20 ml) محلول بی کربنات سدیم و بعد با همین حجم آب نمک ماده آلی از ناخالصی قطبی استخراج شد و بروی سولفات سدیم خشک شد. حلال به کمک تقطیر در خلاء جدا شد و محصول خالص به کمک کروماتوگرافی ستونی و حلال

اثر ضدافسردگی چند ترکیب از مشتقات مورفولین از جمله ربوکستین^۱ گزارش شده است [۴، ۱۰، ۳۲، ۳۴]. این دارو در مدل‌های حیوانی غربال گری داروهای ضد افسردگی اثر داشته است [۵، ۱۶]. ربوکستین یک داروی مهارکننده اختصاصی بازجذب نوراپی نفرین می‌باشد [۳۴] و در سال ۱۹۹۷ به عنوان اولین داروی نسل جدید ضد افسردگی معرفی شد و در درمان اختلال افسردگی [۲، ۱۲، ۲۶] و همچنین بی خوابی و اضطراب [۳۱] مفید گزارش شده است. این دارو همانند مهار کننده‌های اختصاصی بازجذب سروتونین در بزرگسالان به خوبی تحمل می‌شود [۲۲، ۲۳]. طبق گزارشات ربوکستین کم‌تر از مهار کننده‌های اختصاصی بازجذب سروتونین اضطراب، تهوع و مهار عملکرد جنسی ایجاد می‌کند و در مصرف طولانی مدت عوارض جانبی آن بیش‌تر از دارونما نیست. ربوکستین سمیت قلبی و تداخل دارویی مهمی نداشته و حملات تشنجی را افزایش نمی‌دهد. ربوکستین تمایل بسیار کمی به رسپتورهای آدرنرژیک، کولینرژیک، هیستامینرژیک و سروتونرژیک نشان می‌دهد، که مسئول عوارض جانبی داروهای ضد افسردگی هستند [۲۲]. ربوکستین به میزان داروهای ضد افسردگی مهار کننده اختصاصی بازجذب سروتونین موثر گزارش شده است. هم چنین در مقایسه با ضد افسردگی‌های سه حلقه ای عوارض جانبی کمتری داشته است [۳۲]. ربوکستین در تعداد محدودی از کشورهای اروپایی از جمله انگلیس، ایتالیا و اسپانیا مصرف می‌شود و در ایران موجود نیست. از طرفی ترکیبات دارای حلقه بتالاکتام نیز دارای اثرات بیولوژیک در سیستم اعصاب مرکزی می‌باشند [۱۴]. به طوری که اثر ضدافسردگی در موش پس از تزریق آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام مانند رترین و سفتازیدیم در دوزهای بالینی در انسان گزارش شده است [۳۳].

اخیراً سنتز یک سری ترکیبات بتالاکتام حاوی تکه مورفولینی (مورفولینو بتالاکتام) [۱۹] در ایران گزارش شده است. در این تحقیق اثر ضدافسردگی یکی از این ترکیبات در آزمون شنای اجباری بررسی شد. آزمون شنای اجباری به طور معمول برای نشان دادن اثربخشی داروهای ضدافسردگی استفاده می‌شود. در این آزمون حیوان در معرض یک استرس

1. Reboxetine

سه روز در لانه‌ی حیوانات گروه فارماکولوژی دانشکده‌ی پزشکی در گروه‌های ده تایی در قفس‌های استاندارد و دمای 23 ± 2 درجه سلسیوس و دوره ۱۲ ساعت روشنایی (۷ صبح تا ۷ عصر) و ۱۲ ساعت تاریکی نگه‌داری شدند. حیوانات به طور آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند. در تمام مراحل آزمایش با حیوانات آزمایشگاهی بر اساس مقررات مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی مصوب در دانشگاه علوم پزشکی شیراز رفتار شد.

در مجموع ۹۲ موش مورد استفاده قرار گرفت، ۲۴ موش در چهار گروه شش تایی دوزهای ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم ایمنی پرامین دریافت کردند و گروه کنترل آب مقطر دریافت کرد و ۴۰ موش در چهار گروه ده تایی دوزهای ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم مورفولینو بتا لاکتام دریافت کردند و گروه کنترل دی-ام-اس-اُ دریافت کرد. به ازای هر کیلوگرم وزن بدن موش یک میلی لیتر از محلول، داخل صفاقی تزریق شد.

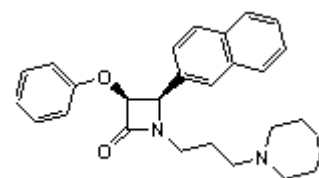
روش انجام آزمون شنای اجباری: در یک بشر شیشه‌ای به ارتفاع ۲۵ سانتی متر و قطر ۱۸ سانتی متر تا ارتفاع ۱۵ سانتی متر آب ریخته شد. در صورت قرار دادن موش در بشر، دم موش ته بشر را لمس نمی‌کرد. دمای آب بین ۲۱ تا ۲۳ درجه سانتیگراد ثابت نگه‌داشته شد. ابتدا در یک آزمون اولیه موش را جهت آشنایی با آب و شرایط آزمایش در بشر قرار داده و پس از پانزده دقیقه آن را از آب بیرون آورده و با یک حوله زیر یک لامپ به مدت ۱۵ دقیقه خشک شد. تزریق دارو دو مرتبه یکی بلافاصله بعد از آزمون اولیه و یکی پنج ساعت پس از آن انجام شد. سپس در زمان‌های یک ساعت و بیست و سه و نیم ساعت بعد از اولین تزریق مدت زمان بی حرکتی و صعود موش‌ها در هر دقیقه طی ۱۵ دقیقه ثبت شد. نتایج مربوط به یک ساعت بعد از اولین تزریق به عنوان اثرات حاد و اثرات ۲۳/۵ ساعت بعد از اولین تزریق به عنوان اثرات نیمه مزمن یا تحت حاد داروها در نظر گرفته شد.

در بررسی LD_{50} ، ۲۸ موش در چهار گروه هفت تایی تقسیم شدند و دوزهای ۴۰۰، ۳۷۵، ۳۵۰، ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم مورفولینو بتا لاکتام دریافت کردند. ۴۸ ساعت پس از تزریق، تعداد موش‌های مرده ثبت شد و در موش‌هایی که زنده ماندند با تزریق درون صفاقی کتامین هیدروکلراید بی

شوینده اتیل استات / اتانول با نسبت ۱/۱۰ به صورت جامد سفید و با راندمان ۶۰٪ و نقطه ذوب 132°C - 130°C بدست آمد.

داده‌های طیفی برای بتا-لاکتام بصورت زیر بدست آمد.
IR (KBr, cm^{-1}): 1755.1 ($\text{C}=\text{O}$) $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3 , ppm) 7.79 (4H, m, ArH), 7.47 (3H, m, ArH), 7.08 (2H, m, ArH), 6.76 (3H, m, ArH), 5.49 (1H, d, H-3, $J = 4.45$ Hz), 5.09 (1H, d, H-4, $J = 4.45$ Hz), 3.59 (4H, m, $\text{CH}_2\text{-O}$), 3.56 (4H, m, $\text{CH}_2\text{-N}$), 3.07 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-morpholine}$), 2.15 (2H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-morpholine ring}$), 1.68 (2H, m, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-morpholine ring}$). $^{13}\text{C-NMR}$ (62.9 MHz, CDCl_3 , ppm): 166.16 ($\text{C}=\text{O}$), 115.58-157.00 (aromatic carbons), 82.17 (C-3), 66.84 ($\text{CH}_2\text{-O}$), 62.63 (C-4), 56.15 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-morpholine ring}$), 53.59 ($\text{CH}_2\text{-N}$), 38.84 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-morpholine ring}$), 24.47 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-morpholine ring}$). MS (m/e, %): 323 (2.1), 247 (0.3), 246 (3.9), 169 (2.8), 128 (2.0), 127 (4.5), 100 (100), 86 (3.2), 77 (3.9), 70 (5.0), 69 (2.4). Anal. Calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_3$: C, 74.97, H, 6.78, N, 6.73. Found: C, 73.1, H, 6.6, N, 5.27.

مواد شیمیایی: ترکیب مورفولینو بتا لاکتام (۱) سنتز شده در بخش شیمی) در دی-ام-اس-اُ (مرک، آلمان) و پودر ایمنی پرامین (تهران دارو، ایران) در آب مقطر حل شد.



1-(3-morpholinopropyl)-4-(naphthalene-2-yl)-3-phenoxazetidin-2-one

در این مطالعه از موش‌های سوری نر استفاده شد، که ۲۵ تا ۳۵ گرم وزن داشتند و از لانه‌ی حیوانات موسسه‌ی تحقیقاتی و سرم سازی رازی در شیراز تهیه شدند و به مدت

هوشی عمیق ایجاد شد و ارگان‌های کبد، قلب، ریه و کلیه را از بدن موش‌ها بیرون آورده و به مدت یک هفته در فرمالین نگه داری شد. پس از آب گیری و پارافین گیری با برش دادن و رنگ آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین^۱ اسلایدها تهیه و زیر میکروسکوپ بررسی شدند.

در آزمون بررسی اثر تحریکی ترکیب مورفولینو بتالاکتام بر سیستم اعصاب مرکزی، تعداد حرکات هر موش توسط مشاهده مستقیم ثبت شد به این ترتیب که تعداد وقوع هر نوع حرکت موش از قبیل حرکت سر، دست، چرخش و حرکت به جلو و ایستادن روی دو پا طی پنج دقیقه قبل از آزمون شنای اجباری ثبت شد. جهت انجام آزمون رتارد موش‌ها ابتدا به مدت سه روز آموزش می دیدند تا با دستگاه آشنا شوند و بتوانند روی دستگاه خود را نگه دارند. سپس موش‌ها بعد از آزمون شنای اجباری روی دستگاه رتارد قرار می گرفتند و تعداد دورهایی که توانستند خود را روی دستگاه نگه دارند ثبت شد. سرعت چرخش دستگاه ۱۸ دور در دقیقه بود.

شکل های میانگین های داده ها در طی پنج دقیقه اول، دوم، سوم و پانزده دقیقه به صورت (میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین) توسط نرم افزار Microsoft office excel 2007 رسم شد.

آنالیزهای آماری و تعیین LD₅₀ با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گرفت. از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه^۲ و پس آزمون توکی^۳ استفاده و گروه های دارای اختلاف معنی دار مشخص شد. به عنوان سطح معنی دار $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته ها

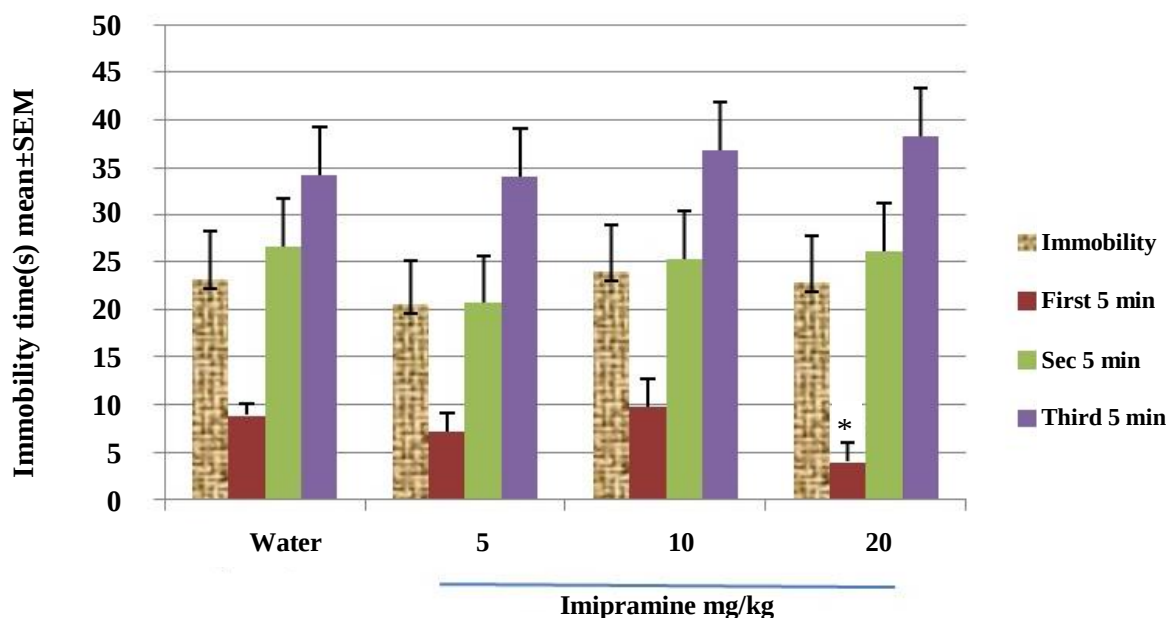
شکل های ۱ تا ۸ اثرات ایمپیرامین و مورفولینو بتالاکتام را بر مدت زمانی که موش‌ها بی حرکت بودند و یا در حال صعود بودند را در تست شنای اجباری نشان می دهد. اختلاف بین میانگین های مدت زمان بی حرکتی در گروه های سری

ایمپیرامین در پنج دقیقه اول معنی دار شد ($P < 0.05$). در گروهی که ایمپیرامین در دوز ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم دریافت کردند در پنج دقیقه اول میانگین مدت زمان بی حرکتی 4.0 ± 0.6 ثانیه بود که بر اساس پس آزمون توکی، نسبت به گروه کنترل (9.0 ± 1.1 ثانیه) کاهش معنی دار نشان داد (شکل ۱، $P < 0.01$). و همچنین در مورد رفتار صعود افزایش معنی دار مشاهده شد (شکل ۲، $P < 0.01$). شکل های ۳ و ۴ اثرات فوق را پس از دو بار تزریق ایمی پرامین، در زمان ۲۳.۵ ساعت بعد از اولین تزریق نشان می دهد. ایمپیرامین در هر سه دوز مدت زمان بی حرکتی را نسبت به گروه کنترل به طور معنی دار کاهش داد. اختلاف بین میانگین ها در گروه ها در پنج دقیقه سوم معنی دار شد. هم چنین در پنج دقیقه دوم در دوز ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم اختلاف نسبت به گروه کنترل معنی دار شد (شکل ۳، $P < 0.01$). شکل ۴ میانگین های مدت زمان صعود را ۲۳.۵ ساعت بعد از اولین تزریق نشان می دهد. ایمپیرامین در هر سه دوز مدت زمان صعود را نسبت به گروه کنترل در پنج دقیقه دوم و سوم افزایش داد. در پنج دقیقه سوم (شکل ۴، $P < 0.01$) در هر سه دوز و در پنج دقیقه دوم (شکل ۴، $P < 0.005$) در دوز ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل مشاهده شد.

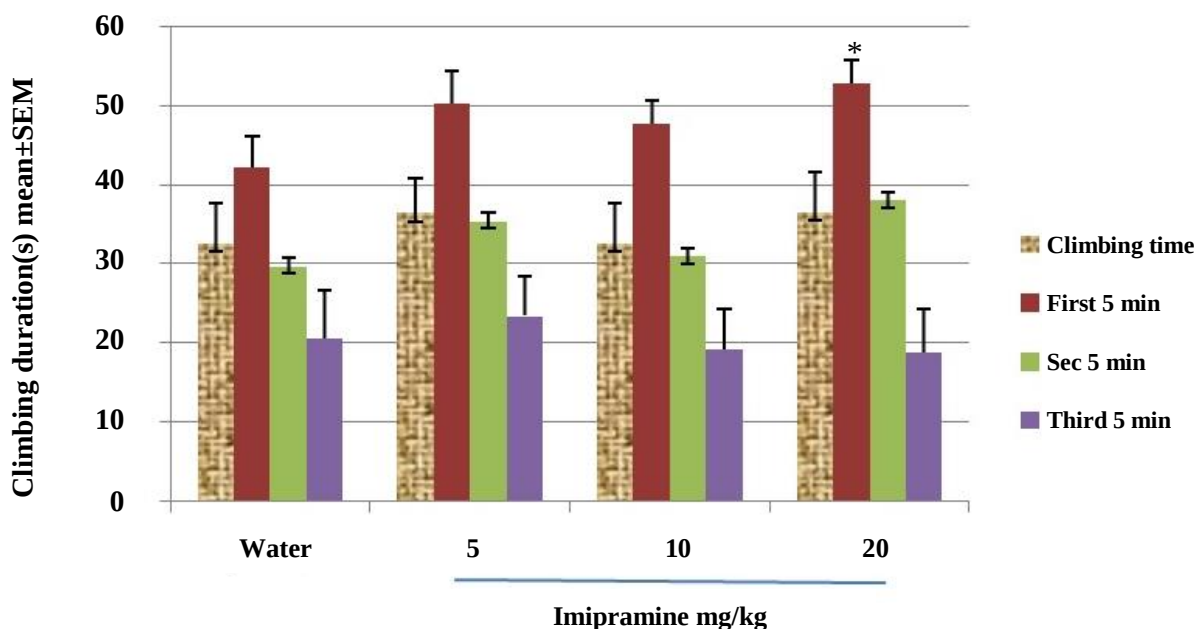
در شکل ۵ میانگین مدت زمان بی حرکتی دوزهای مختلف مورفولینو بتالاکتام در زمان یک ساعت بعد از اولین تزریق مشخص شده است که تفاوت معنی دار بین گروه ها مشاهده شد ($p < 0.01$). بر اساس پس آزمون توکی کاهش مدت زمان بی حرکتی در پنج دقیقه سوم در دوز های ۱۵ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم معنی دار بود (شکل ۵، $P < 0.05$). افزایش میانگین مدت زمان صعود که در دوز ۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم در پنج دقیقه سوم 33.3 ± 3.5 ثانیه بود نسبت به گروه کنترل که 17.1 ± 4.5 بود اختلاف معنی دار نشان داد (شکل ۶، $P < 0.05$).

در زمان ۲۳.۵ ساعت بعد از اولین تزریق کاهش میانگین های مدت زمان بی حرکتی در هر سه دوز نسبت به گروه DMSO مشاهده شد. در دوز ۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم مورفولینو بتالاکتام میانگین مدت زمان بی حرکتی در طی ۱۵ دقیقه نسبت به دی-ام-اس-ا کاهش معنی دار نشان داد. همچنین در پنج دقیقه سوم در دوزهای ۱۵ و ۲۰ میلی گرم

1. Hematoxylin and eosin stain
2. Oneway ANOVARM
3. Tukey



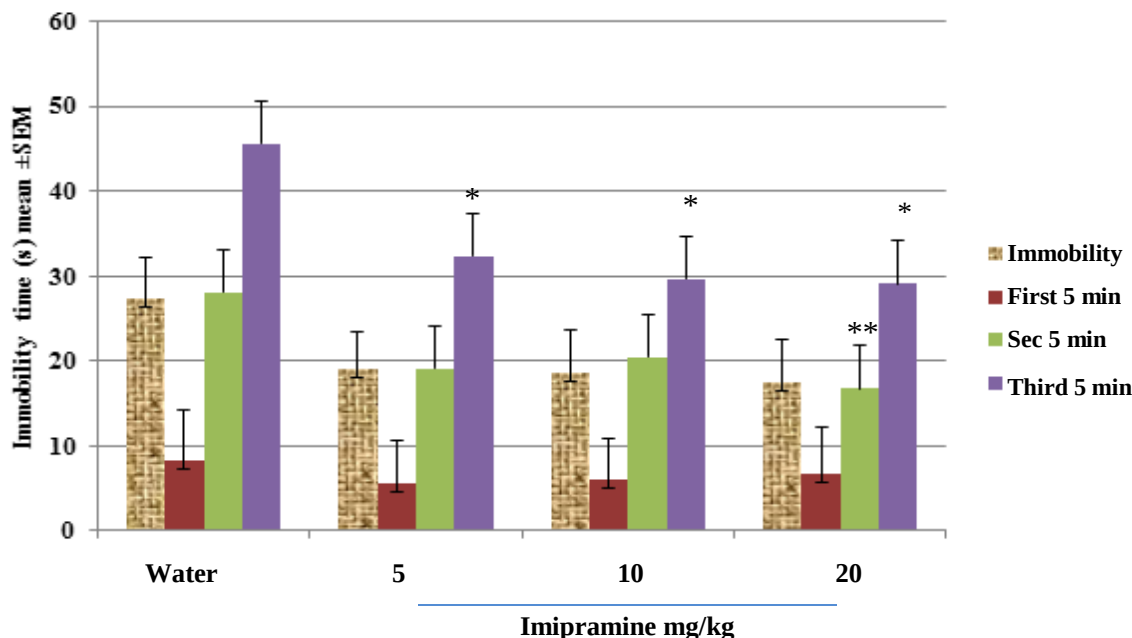
شکل ۱- تاثیر تزریق حاد درون صفاقی دوزهای مختلف از ایمپرامین یک ساعت بعد از تزریق، بر میانگین مدت زمان بی حرکتی در موش های سوری نر در آزمون شنای اجباری. هر ستون نشان دهنده میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین به ثانیه در شش حیوان می باشد. در گروه کنترل آب مقطر تزریق شد. T: نشانگر خطای استاندارد میانگین. *: اختلاف معنی دار با گروه دریافت کننده آب مقطر ($P < 0.01$).



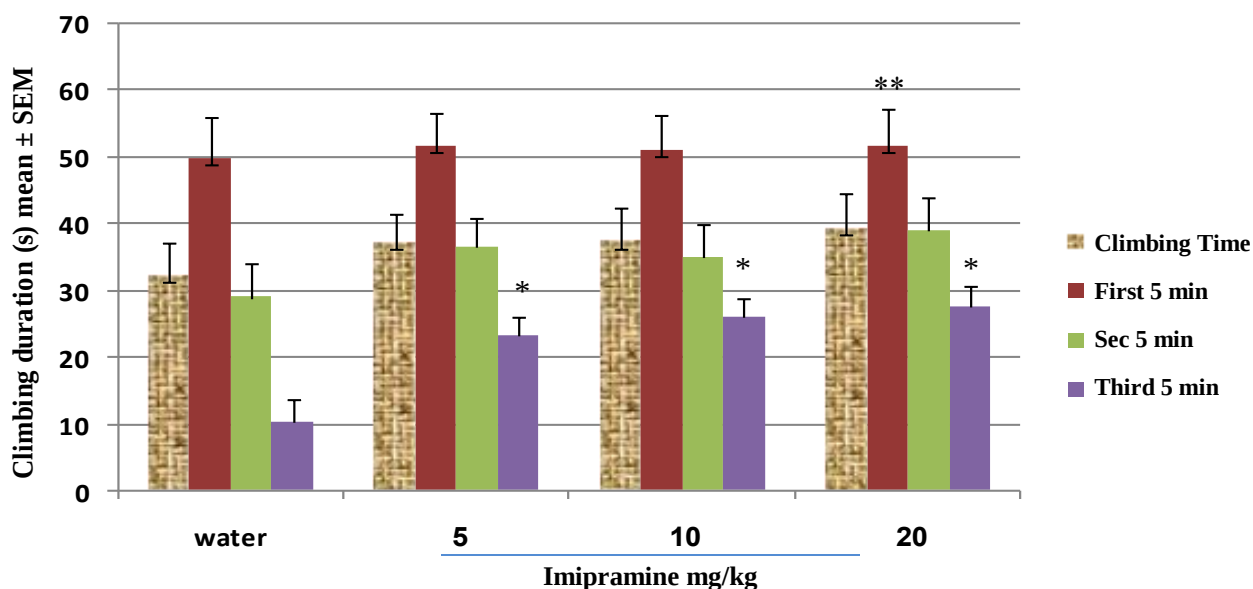
شکل ۲- تاثیر تزریق حاد درون صفاقی دوزهای مختلف از ایمپرامین یک ساعت بعد از تزریق، بر میانگین مدت زمان صعود در موش های سوری نر در آزمون شنای اجباری. هر ستون نشان دهنده میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین به ثانیه در شش حیوان می باشد. در گروه کنترل آب مقطر تزریق شد. T: نشانگر خطای استاندارد میانگین. *: اختلاف معنی دار با گروه دریافت کننده آب مقطر ($P < 0.01$).

نسبت به گروه کنترل معنی دار بود (شکل ۸، $P < 0.05$). محاسبه LD_{50} و بررسی سمیت در ارگان ها: طبق شکل ۹ LD_{50} برابر با ۳۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم محاسبه شد. در موش هایی که زنده ماندند علائم سمیت در ارگان های کبد،

بر کیلوگرم اختلاف معنی داری با گروه کنترل نشان دادند (شکل ۷، $P < 0.05$). اختلاف بین میانگین های مدت زمان صعود در دوز ۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم در طی ۱۵ دقیقه و در دوزهای ۱۵ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم در پنج دقیقه سوم



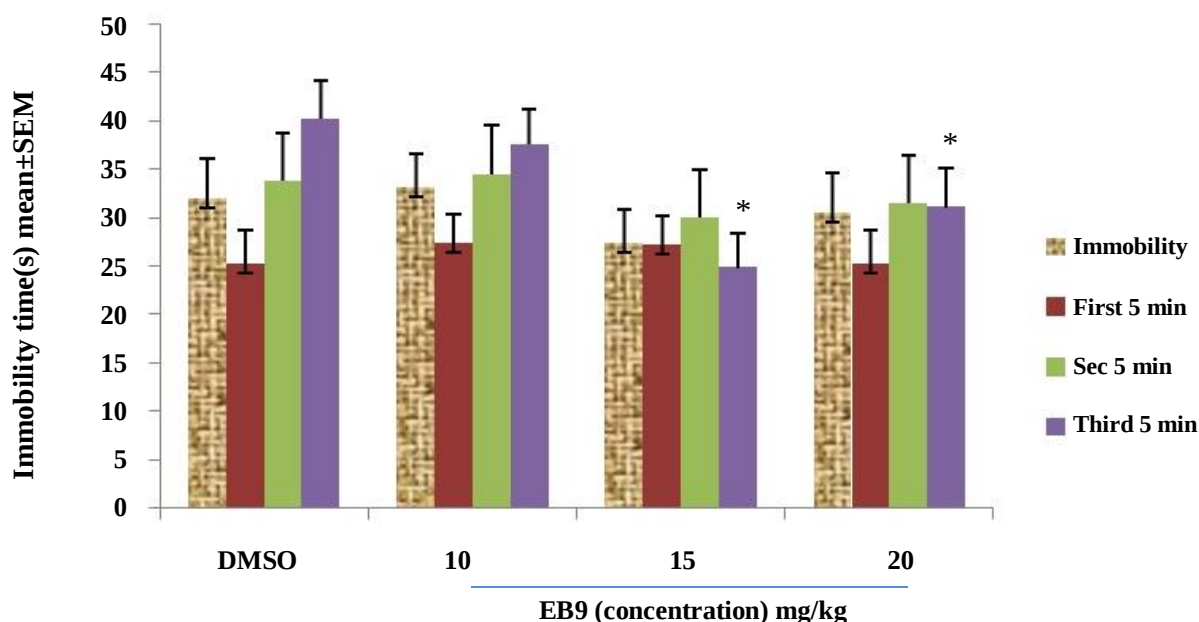
شکل ۳- تاثیر دو تزریق درون صفاقی دوزهای مختلف از ایمی پرامین ۲۳.۵ ساعت بعد از اولین تزریق، بر میانگین مدت زمان بی حرکتی در موش های سوری نر در آزمون شنای اجباری. هر ستون نشان دهنده ی میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین در شش حیوان به ثانیه می باشد. در گروه کنترل آب مقطر تزریق شد. T: نشانگر خطای استاندارد میانگین. *: اختلاف معنی دار با گروه دریافت کننده آب مقطر ($p < 0.01$)، **: اختلاف معنی دار با گروه دریافت کننده آب مقطر ($p < 0.004$)



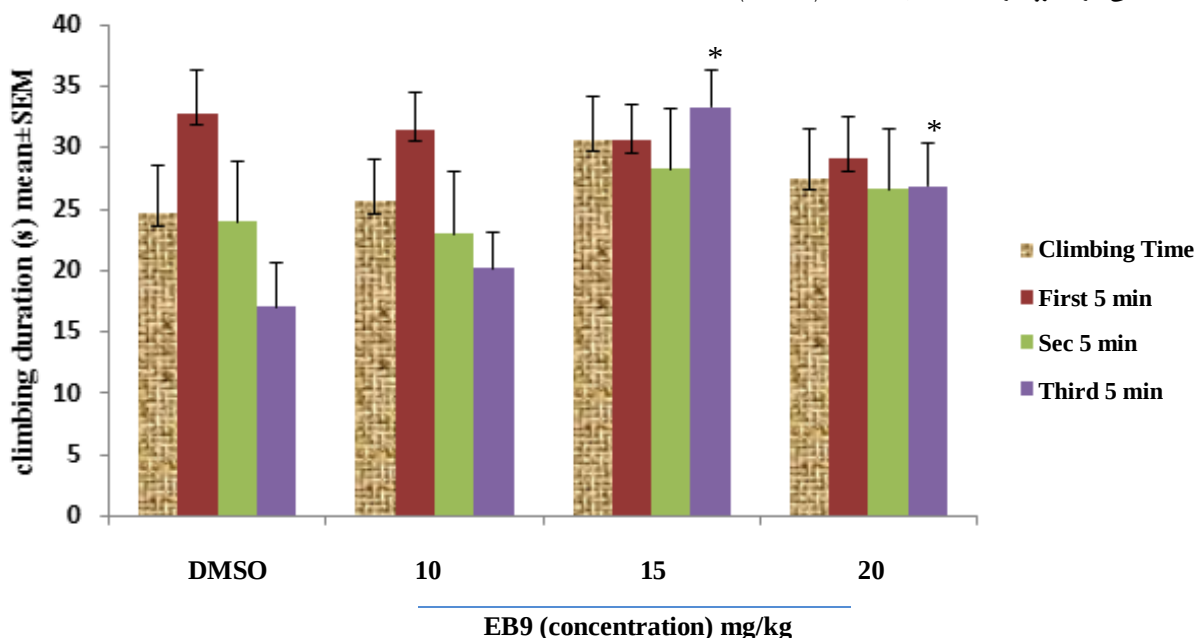
شکل ۴- تاثیر دو تزریق درون صفاقی دوزهای مختلف از ایمی پرامین ۲۳/۵ ساعت بعد از اولین تزریق، بر میانگین مدت زمان صعود در موش های سوری نر در آزمون شنای اجباری. هر ستون نشان دهنده ی میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین در شش حیوان به ثانیه می باشد. T: نشانگر خطای استاندارد میانگین. *: اختلاف معنی دار با گروه دریافت کننده آب مقطر ($p < 0.01$)، **: اختلاف معنی دار با گروه دریافت کننده آب مقطر ($p < 0.005$)

در شکل ۱۰ سلول های طبیعی کبد موش سوری با بزرگ نمایی ۳۰۰ برابر نشان داده شده است، همان گونه که مشخص است سلول ها و فاصله ی بین آن ها طبیعی است. در شکل ۱۱ سلول های کبد موش دریافت کننده دوز ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم مورفولینو بتالاکتام نشان داده شده است.

قلب، کلیه، و شش ها بررسی شد در دوز ۳۰۰ و ۳۵۰ میلی گرم بر کیلو گرم احتقان و خونریزی ملایمی در بافت های کلیه و ریه دیده شد. اما در دوز ۴۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم در کبد دو موش که زنده ماندند سمیت کبدی به شکل ballooning degeneration مشاهده شد.



شکل ۵- تاثیر یک تزریق درون صفاقی دوزهای مختلف از مورفولینوبتالاکتام یک ساعت بعد از تزریق بر میانگین مدت زمان بی حرکتی موش های سوری در آزمون شنای اجباری. هر ستون نشان دهنده میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین در ده حیوان به تائیه می باشد. در گروه کنترل دی ام اس ا تزریق شد. T: نشانگر خطای استاندارد میانگین. *: اختلاف معنی دار با گروه دریافت کننده DMSO ($P < 0.05$).

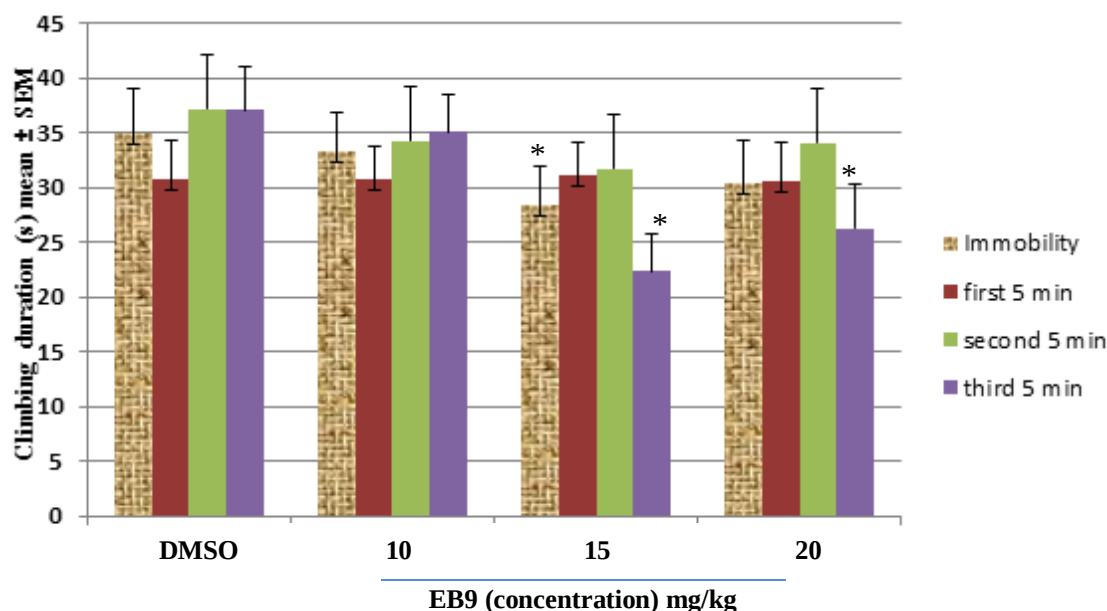


شکل ۶- تاثیر دوزهای مختلف از مورفولینوبتالاکتام یک ساعت بعد از تزریق حاد بر میانگین مدت زمان صعود موش های سوری در آزمون شنای اجباری. هر ستون نشان دهنده میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین به تائیه در ده حیوان می باشد. در گروه کنترل DMSO تزریق شد. T: نشانگر خطای استاندارد میانگین. *: اختلاف معنی دار با گروه دریافت کننده DMSO ($P < 0.05$).

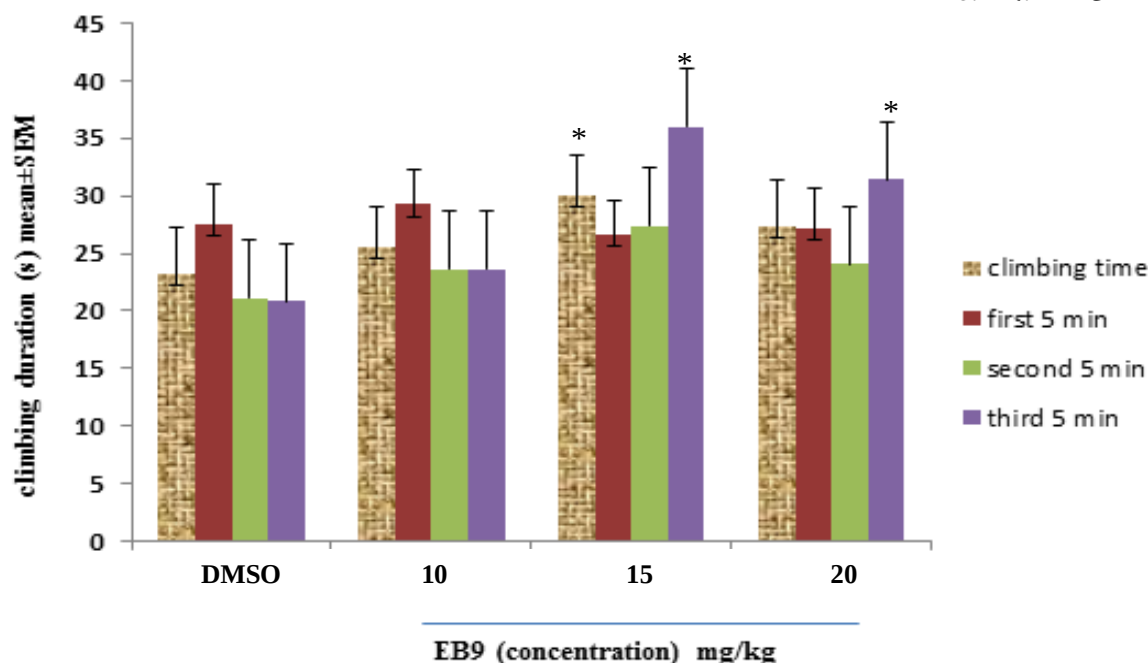
بحث

در این تحقیق ترکیب جدید مورفولینوبتالاکتام سنتز شده در دانشگاه شیراز اثرات مشابه ایمپیرامین در آزمون شنای اجباری در موش نشان داد. این آزمون اولین بار توسط

سلول ها علاوه بر این که متورم شده اند فاصله بین آن ها نیز کاهش یافته است و در سیتوپلاسم شناور شده اند. در گوشه بالای شکل نیز قسمتی که مشخص شده است نشان دهنده خون ریزی است.



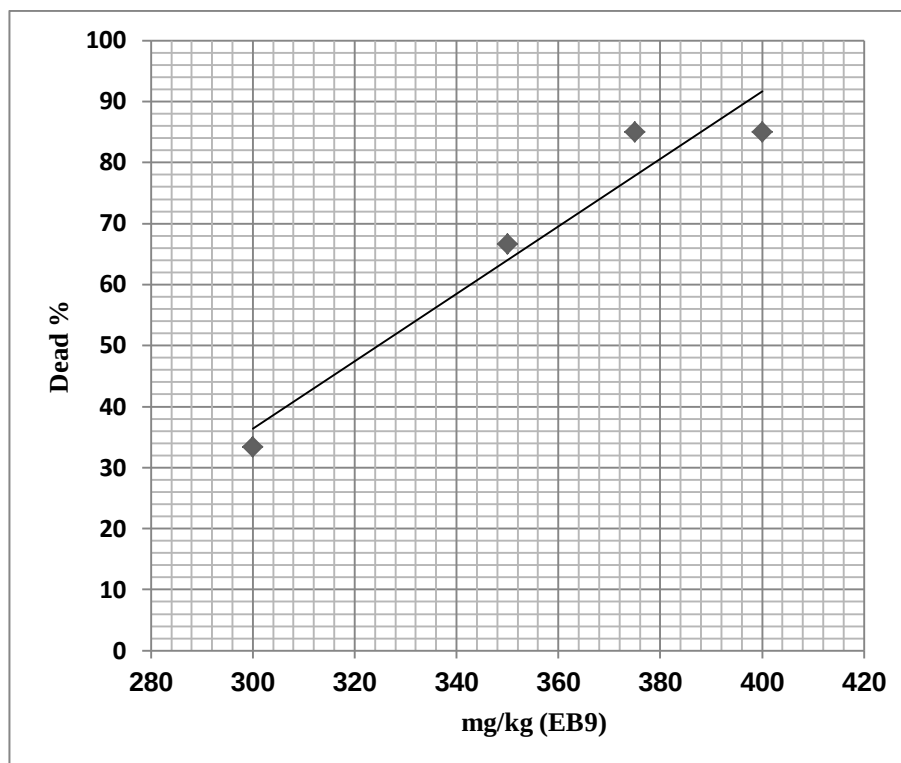
شکل ۷- تاثیر دو تزریق دوزهای مختلف از مورفولینو بتا لاکتام 23.5 ساعت بعد از اولین تزریق بر میانگین مدت زمان بی حرکتی موش های سوری نر در آزمون شنای اجباری. هر ستون نشان دهنده میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین به ثانیه در ده حیوان می باشد. DMSO به عنوان کنترل می باشد. T: نشانگر خطای استاندارد میانگین. *: اختلاف معنی دار با گروه کنترل، $P < 0.05$.



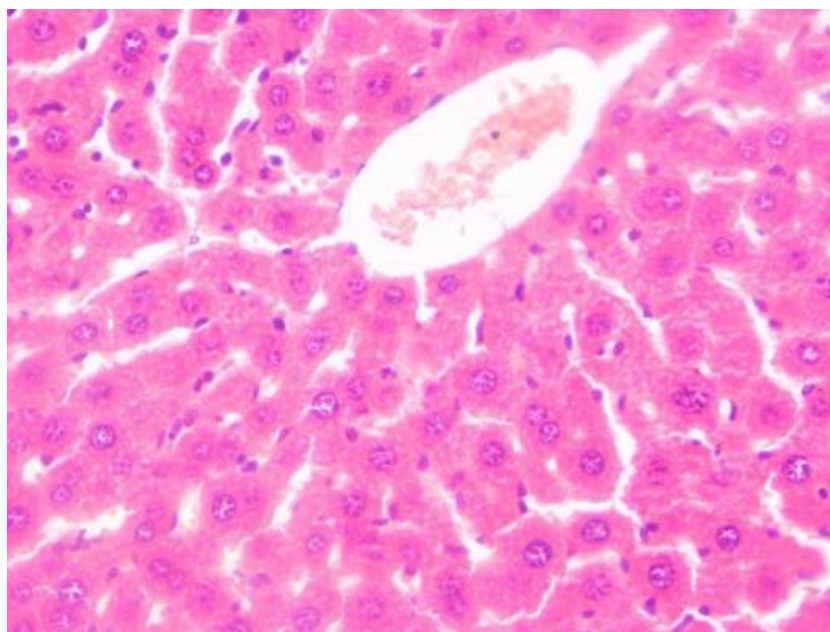
شکل ۸- تاثیر دو تزریق از دوزهای مختلف از مورفولینو بتالاکتام 23.5 ساعت بعد از اولین تزریق، بر میانگین مدت زمان صعود در موش های سوری نر در آزمون شنای اجباری. هر ستون نشان دهنده میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین در ده حیوان به ثانیه می باشد. در گروه کنترل DMSO تزریق شد. T: نشانگر خطای استاندارد میانگین. *: اختلاف معنی دار با گروه کنترل، $P < 0.05$.

کاهش تفاوت در پاسخ دهی در میان موش ها در یک گروه می شود [۱۷]. کاهش مدت زمان بی حرکتی در آزمون شنای اجباری شاخص اصلی نشان دهنده پتانسیل اثر ضدافسردگی است. این اثر برای انواع دسته های داروی ضدافسردگی نشان داده شده است [۸، ۲۴].

پورسولت و همکاران شرح داده شده است و سایر محققان اصلاحاتی در آن به وجود آورده اند [۱۷، ۲۸]. از جمله این اصلاحات انجام یک آزمون اولیه قبل از تزریق دارو می باشد که سبب افزایش مدت زمان بی حرکتی در آزمون اصلی که بعد از تزریق دارو انجام می گیرد می شود و همچنین سبب



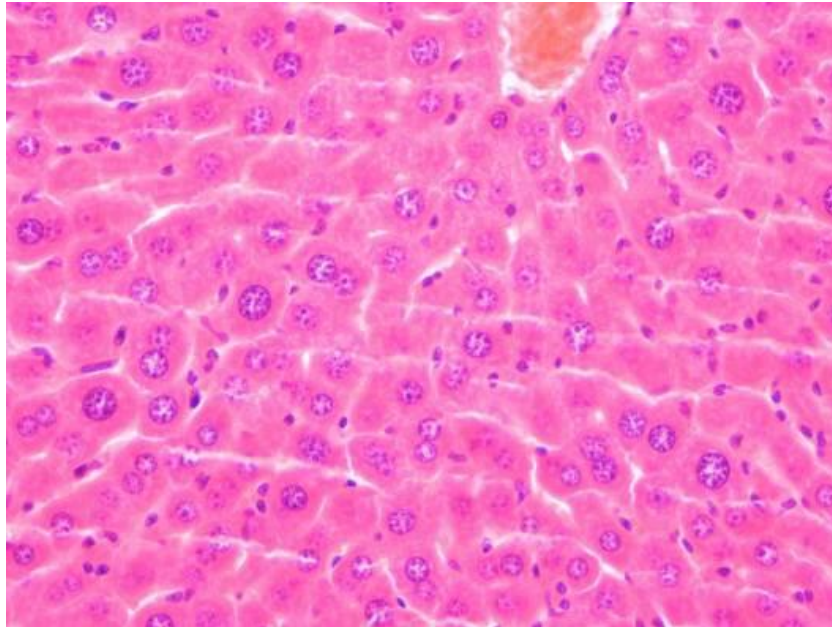
شکل ۹- ارتباط بین دوزهای مختلف مورفولینوبتالاکتام با درصد مرگ و میر موش های سوری نر طی ۲۴ ساعت، تعداد موش ها در هر گروه هفت سر بود.



شکل ۱۰- تصویر یک برش از کبد طبیعی موش سوری رنگ آمیزی شده توسط H&E و بزرگ نمایی $\times 300$

سوم به حد معنی دار رسید. اما در دوز بالاتر با یک تک دوز ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم ایمی پرامین، در پنج دقیقه اول مدت زمان بی حرکتی در حد معنی دار کاهش یافت و مدت زمان صعود افزایش یافت که با نتایج گزارش شده در مقالات مطابقت دارد [۱۷]. در مورد تأثیر ایمی پرامین پس از تکرار

در بررسی نتایج ایمی پرامین در پنج دقیقه اول و سوم آزمون نکات قابل توجهی مشاهده شد. به طوری که در گروه کنترل مدت زمان بی حرکتی در پنج دقیقه سوم بیش تر از پنج دقیقه اول بود. در نتیجه اثر دوز پایین ایمی پرامین، پنج میلی گرم بر کیلوگرم پس از دو بار تزریق تغییرات در پنج دقیقه



شکل ۱۱- تصویر یک برش از کبد موش سوری پس از تزریق مورفولینو بتالاکتام ۴۰۰ mg/kg با ضایعه‌ی ballooning degeneration و خونریزی رنگ آمیزی شده توسط H&E و بزرگ نمایی ۳۰۰×

اثر را نشان داد. یکی از علل این تأخیر در پاسخ ممکن است به علت اثرات سداتیو و شل کننده عضلانی حلال مورد استفاده باشد [۲۱، ۱۱] در این مطالعه DMSO که حلال مورفولینو بتالاکتام بود مدت زمان بی حرکتی را در مقایسه با آب مقطر در پنج دقیقه اول افزایش داده است. بنابراین استفاده از این حلال ممکن است سبب پوشاندن مقداری از اثر مورفولینو بتالاکتام در این آزمون شده باشد. بنابراین در مطالعات بعدی بهتر است از حلال دیگری استفاده شود و دفعات تزریق افزایش یابد. از آنجا که اثرات داروها در تست شنای اجباری ممکن است به علت اثرات تحریکی آن‌ها بر سیستم اعصاب مرکزی باشد در این تحقیق اثر ترکیب مورفولینو بتالاکتام بر فعالیت حرکتی و هماهنگی عضلانی آزمایش شد و تغییرات معنی داری مشاهده نشد. LD₅₀ این ترکیب پس از تزریق داخل صفاقی ۳۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم به دست آمد و اثرات سمی بر کبد در دوز ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم مشاهده شد که فاصله زیادی تا دوز درمانی نشان می‌دهد. سمیت حاد این ترکیب در مقایسه با سایر ترکیبات با ساختار مورفولینی ممکن است کمتر باشد با توجه به این که LD₅₀ آن‌ها ۱۵۰ mg/kg گزارش شده است [۴]. همچنین ممکن است سمیت کمتری نسبت به ایمپیرامین داشته باشد. سمیت ایمپیرامین داخل صفاقی در موش

تزریق آن در موش صحرایی گزارشاتی وجود دارد [۲۷]. اما در موش گزارشی یافت نشد. بنابراین اثرات دوزهای پایین‌تر در پنج دقیقه سوم قابل تشخیص می‌باشد.

در بررسی نتایج مورفولینو بتالاکتام نیز به طور مشابهی مشاهده شد که مدت زمان بی حرکتی را در آزمون شنای اجباری کاهش داد و اثربخشی ترکیب جدید قابل مقایسه با ایمی پرامین بود. شکل‌های ۵ و ۷ نشان می‌دهند هم تزریق یک دوز و هم دو دوز مورفولینو بتالاکتام در دوزهای ۱۵ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم در پنج دقیقه‌ی سوم دارای اختلاف معنی دار با گروه کنترل بود. اما در زمان یک ساعت پس از اولین تزریق در مدت زمان بی حرکتی و صعود در پنج دقیقه اول تغییرات معنی دار مشاهده نشد. در مطالعات قبلی گزارش شده است که مصرف مکرر چند دوز ایمی پرامین در مقایسه با یک دوز در موش صحرایی نتایج بهتری دارد چنان که در مصرف داروهای ضدافسردگی در انسان هم صدق می‌کند [۲۷]. در این مطالعه نیز مصرف دو نوبت دوز ۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم ایمی پرامین کاهش معنی داری در مدت زمان بی حرکتی ایجاد کرد ولی در مطالعات قبلی مصرف یک نوبت از همین دوز اثر معنی دار نداشته است [۲۸]. در پنج دقیقه اول آزمون شنای اجباری ایمی پرامین در دوز بالا مدت زمان بی حرکتی را کاهش داد اما ترکیب جدید در پنج دقیقه سوم این

دو تزریق هم مقایسه شد. بر اساس مطالعات انجام شده اثرات حاد داروهای ضدافسردگی بر روی نوروترانسمیترهای مغز برای ایجاد بهبودی کافی نیست و چند هفته مصرف دارو برای مشاهده اثر درمانی لازم است. بنابراین بررسی اثرات مصرف طولانی مدت این ترکیب بر روی نوروترانسمیترهای نوراپی نفرین، سروتونین و دوپامین در مطالعات آتی می‌تواند اطلاعات بیشتری در مورد مکانیسم اثر این ترکیب فراهم کند.

بررسی‌های مختلفی روی سمیت ترکیبات مختلف مورفولین صورت گرفته است از جمله این که مشخص شده است تنفس مورفولین باعث صدمه دیدن راه های هوایی در خرگوش می‌شود به علاوه باعث نکروز توبول های کلیوی و هم چنین نکروز سلول های کبدی در خرگوش شده است. خونریزی از دستگاه گوارش مخصوصاً معده و روده‌ی کوچک در خوکچه‌ی هندی و رت گزارش شده است. در موش سوری نیز مشکلات کلیوی و تخریب کبد را سبب شده است [۱۵]. بنابراین مطالعات سمیت مزمن ترکیب مورد مطالعه در دوزهای پایین ضروری می‌باشد.

سپاسگزاری

این تحقیق پایان نامه مصوب شورای پژوهشی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز می‌باشد. به این وسیله از همکاری‌های تکنیکی خانم فاطمه پیرسلامی و خانم مریم مجاهد قدردانی می‌نمایم.

۱۰۴ میلی گرم بر کیلوگرم گزارش شده است (Santa Cruz Biotechnology, Inc., safety datasheet) که در مقایسه با سمیت ترکیب جدید بیشتر می‌باشد. مطالعات مقایسه ای بین ترکیب جدید و داروهای ضدافسردگی رایج اطلاعات دقیق تری فراهم خواهد کرد.

استخلاف حلقه مورفولین بر روی ترکیبات مختلف به منظور ایجاد تغییر در مکانیسم اثر و یا قدرت اثر ضدافسردگی گزارش شده است [۳۴]. این آزمایش می‌تواند تا حدودی مکانیسم احتمالی اثر ضد افسردگی مواد مورد مطالعه را نیز پیشنهاد کند. داروهای مهارکننده‌ی انتخابی بازجذب سروتونین مثل فلوکستین رفتار شنا کردن را افزایش می‌دهند و داروهای موثر بر بازجذب نوراپی نفرین مثل ایمی پرامین باعث افزایش رفتار صعود می‌شوند [۳]. در این جا مشاهده شد که مورفولینوتالاکتام هم رفتار صعود را افزایش داد و هم رفتار بی حرکتی را کاهش داد، به این ترتیب می‌توان مکانیسمی شبیه ضد افسردگی‌های سه حلقه ای برای آن پیشنهاد کرد که با مطالعات مشابه که اثر برخی از مشتقات مورفولین را مثل ایمی پرامین در مهار بازجذب نور اپی نفرین می‌داند مطابقت دارد [۲۹].

در آزمون شنای اجباری اثرات حاد دارو قابل مشاهده است در صورتی که در انسان اثر داروهای ضدافسردگی پس از مصرف مزمن دارو مشاهده می‌شود. بنابراین در موش به طور معمول جهت جستجوی اثر ضدافسردگی ترکیبات فقط به مصرف تک دوز اکتفا می‌شود اما در این مطالعه اثر دارو پس از

References

- [1] Avramova PD, Danchev ND, Buyukliev RT, Synthesis, toxicological and pharmacological assessment of morpholinooximes. *Pharmazie* 54 (1999) 409-411.
- [2] Berzowski H, Van Moffaert M, Gagliano CA, Efficacy and tolerability of reboxetine compared with imipramine in a double-blind study in patients suffering from major depressive disease. *Eur Neuropsychopharmacol* 1 (1997) 37-47.
- [3] Bourin M, Colombel MC, Redrobe JP, Nizard J, Hascoet M, Baker GB, Evaluation of efficacies of different classes of antidepressants in the forced swimming test in mice at different ages. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 22 (1998) 343-351.
- [4] Corral C, Lissavetzky J, Manzanares I, Darias V, Expósito-Orta MA, Martín Conde JA, Sánchez-Mateo CC, Synthesis and Preliminary Pharmacological Evaluation of Thiophene Analogues of Viloxazine as Potential Antidepressant Drugs. *Bioorg Med Chem* 7 (1999) 1349-1359.
- [5] Connor TJ, Kelliher P, Harkin A, Kelly JP, Leonard BE,

- Reboxetine attenuates forced swim test-induced behavioural and neurochemical alterations in the rat. *Eur J Pharmacol* 379 (1999) 125–133.
- [6] Cryan JF, Dalvi A, Jin SH, Hirsch BR, Lucki I, Thomas SA, Use of dopamine-beta-hydroxylase-deficient mice to determine the role of norepinephrine in the mechanism of action of antidepressant drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 298 (2001) 651–657.
- [7] DeSanty KP, Amabile CM, Antidepressant-Induced Liver Injury. *Ann Pharmacother* 41 (2007) 1201–11.
- [8] Dziedzicka-Wasylewska M, Faron-Gorecka A, Kusmider M, Drozdowska E, Rogoz Z, Siwanowicz J, Caron MG, Bonisch H, Effect of antidepressant drugs in mice lacking the norepinephrine transporter. *Neuropsychopharmacology* 31(2006) 2424–2432.
- [9] Wong EH1, Sonders MS, Amara SG, Tinholt PM, Piercey MF, Hoffmann WP, Hyslop DK, Franklin S, Porsolt RD, Bonsignori A, Carfagna N, McArthur RA, Reboxetine: A Pharmacologically Potent, Selective, and Specific Norepinephrine Reuptake Inhibitor. *Biol Psychiatry* 47 (2000) 818–829.
- [10] Fish PV1, Deur C, Gan X, Greene K, Hoople D, Mackenny M, Para KS, Reeves K, Ryckmans T, Stiff C, Stobie A, Wakenhut F, Whitlock GA, Design and synthesis of morpholine derivatives SAR and dual serotonin & noradrenaline reuptake inhibition. *Bioorg Med Chem Lett* 18 (2008) 2562–2566.
- [11] Frazer A, Norepinephrine involvement in antidepressant action. *J Clin Psychiatry* 61 (2000) 25–30.
- [12] Ferguson JM, Wesnes KA, Schwartz GE, Reboxetine versus paroxetine versus placebo: effects on cognitive functioning in depressed patients. *Int Clin Psychopharmacol* 18 (2003) 9–14.
- [13] Ferguson JM, Mendels J, Schwart GE, Effects of reboxetine on Hamilton Depression Rating Scale factors from randomized, placebo-controlled trials in major depression. *Int Clin Psychopharmacol* 17 (2002) 45–51.
- [14] Goel RK, Singh A, Naidu PS, Mahajan MP, Kulkarni SK, PASS assisted search and evaluation of some azetidino-2-ones as C.N.S. active agents. *J Pharm Pharm Sci* 8 (2005) 182–189.
- [15] Hall PM, Plummer JL, Ilsley AH, Ahern MJ, Cmielewski PL, Williams RA, The pathology of liver injury induced by the chronic administration of alcohol and 'low-dose' carbon tetrachloride in Porton rats. *J Gastroenterol Hepatol* 9 (1994) 250–256.
- [16] Harkin A, Kelly JP, McNamara M, Connor TJ, Dredge K, Redmond A, Leonard BE, Activity and onset of action of reboxetine and effect of combination with sertraline in an animal model of depression. *Eur J Pharmacol* 364 (1999) 123–132.
- [17] Hirani K, Khisti RT, Chopde CT, Behavioral action of ethanol in Porsolt's forced swim test: modulation by 3alpha-hydroxy-5alpha-pregnan-20-one. *Neuropharmacology* 43 (2002) 1339–1350.
- [18] Holm KJ, Spencer CM, Reboxetine A Review of its Use in Depression. *J Clin Psychopharmacol* 12 (1999) 65–83.
- [19] Jarrahpour A, Jalbout AF, Eskandari M, Synthesis and physical characterization of (E)-1-(3-morpholinopropyl)-3-phenoxy-4-styrylazetidino-2-one as the first β -lactam bearing a morpholino moiety. *Molbank* 542 (2007) 1–4.
- [20] Kitada Y, Miyauchi T, Satoh A, Satoh S, Effects of antidepressants in the rat forced swimming test. *Eur J Pharmacol* 72 (1981) 145–52.
- [21] Lucki I, The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav Pharmacol* 8 (1997) 523–532.
- [22] Montgomery S, Ferguson JM, Schwartz GE, The antidepressant efficacy of reboxetine in patients with severe depression. *J Clin Psychopharmacol* 23 (2003) 45–50.
- [23] Montgomery SA, The place of reboxetine in antidepressant therapy. *J Clin Psychiatry* 59 (1998) 26–29.
- [24] Pilar-Cuellar F, Vidal R, Pazos A, Subchronic treatment with fluoxetine and ketanserin increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor, β -catenin and antidepressant-like effects. *Br J Pharmacol* 165 (2012) 1046–1057.
- [25] Page ME, Brown K, Lucki I, Simultaneous analyses of the neurochemical and behavioral effects of the norepinephrine reuptake inhibitor reboxetine in a rat model of antidepressant action. *Psychopharmacology* 165 (2003) 194–201.
- [26] Peselow ED, Other pharmacological and biological therapies. In: *Comprehensive Textbook of Psychiatry*. 7th ed. Baltimor: Lippincott, Williams & Wilkins, 2005, p. 2997–3009.
- [27] Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M, Behavioral

- despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* 47 (1978) 379-391.
- [28] Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M, Behavioural despair in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine. *Eur J Pharmacol* 51 (1978) 291-294.
- [29] 28. Pou-Hsiung W, James G, Keck & Michael MC. Design, synthesis, testing, and quantitative structure-activity relationship analysis of substituted salicylaldehyde Schiff bases of 1-amino-3-hydroxyguanidine tosylate as new antiviral agents against coronavirus. *J Med Chem* (1990) 608-621.
- [30] Sadock B, Sadock VA, editors, *Kaplan & Sadock Comprehensive textbook of psychiatry*. 8th ed. Williams & Wilkins, 2005, p. 1575-1654, 1713-1715.
- [31] Stahl SM, Mendels J, Schwartz GE, Effects of reboxetine on anxiety, agitation, and insomnia: results of a pooled evaluation of randomized clinical trials. *J Clin Psychopharmacol* 22 (2002) 388-392.
- [32] Tanum L, Reboxetine: tolerability and safety profile in patients with major depression. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 402 (2000) 37-40.
- [33] Volchegorskii IA, Trenina EA, Antidepressant activity of beta-lactam antibiotics and their effects on the severity of serotonin edema. *Bull Exp Biol Med* 142 (2006) 73-75.
- [34] Xu W, Gray DL, Glase SA, Barta NS, Design and synthesis of reboxetine analogs morpholine derivatives as selective norepinephrine reuptake inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 18 (2008) 5550-5553.
- [35] Yoshimi K, Tatsuo M, Akiko S, Susumu S. Effects of antidepressants in the rat forced swimming test. *Life science* 11 (1981) 320-348.