مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره چهاردهم، شمارهٔ ۴، تیر ۱۳۹۱، صفحه ۹۶-۹۰

بررسی ضایعات هیستوپاتولوژیک در ناحیه CA1 هیپوکمپ متعاقب تزریق بتا آمیلویید در مدل تجربی آلزایمر در موش صحرایی

سیدمحمد حسینی(PhD) [*۱]، ملیحه نوبخت(PhD) [۲]، پژمان مرتضوی(PhD) [۳]، بنفشه اسماعیل زاده(PhD) [۴]، ناهید رهبر روشن(PhD) [۵]، شیلا امید ظهیر(PhD) [۶]

۱- گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل
۲- گروه بافت شناسی و علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳- گروه پاتولوژی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران
۴- گروه علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی بوشهر
۵- گروه فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران
۶- دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

دریافت: ۹۰/۶/۲۸، اصلاح: ۹۰/۸/۱۸، پذیرش: ۹۱/۲/۱۳

خلاصه

سابقه و هدف: بیماری آلزایمر یک اختلال نورودژنراتیو و شایعترین علت دمانس است که با از دست رفتن تدریجی توانایی های شناختی و از دست رفتن حافظه همراه می باشد. این بیماری پیشرونده، غیرقابل برگشت و تدریجی است که موجب تغییرات رفتاری و کاهش توانایی فکری می‌گردد. از آنجاییکه هنوز مکانیسم دقیق بروز سمیت عصبی توسط بتا آمیلوئید شناسایی نشد، لذا در این مطالعه ضایعات هیستوپاتولوژیک در ناحیه CA1 هیپوکمپ متعاقب تزریق بتاآمیلویید در موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها: در این مطالعه تجربی از ۳۰ سر موش صحرایی بالغ نژاد ویستار آلبینو با وزن ۳۰۰-۲۵۰ گرم برای مطالعه رفتاری و بررسی هیستوپاتولوژیک استفاده شد. رت ها در سه گروه کنترل ، شم تزریق شده با بتا آمیلوئید (Beta Amyloid, Aβ) به طور مساوی تقسیم شدند. ضایعه با تزریق ۴ میکرولیتر از Aβ (1-40) در ناحیه هیپوکمپ ایجاد شد. جهت بررسی رفتاری از تست Y-maze و shuttle box ۱۴ و ۱۶ روز پس از ایجاد ضایعه استفاده شد. و برای بررسی بافت شناسی از رنگ آمیزی Nissl و Bielschowsky استفاده شد.

یافته ها: میانگین تغییرات رفتاری برای گروه شم برابر با ۸۰/۵۶٪، گروه کنترل برابر با ۸۶/۷٪، گروه AD برابر با ۴۶/۲٪ بود که تغییر رفتاری بین گروه AD و سایر گروهها اختلاف معنی داری داشت (p<۰/۰۰۰۱). تعداد نورون در هر میلی متر مربع در گروه های آلزایمر، کنترل و شم به ترتیب ۲/۹۲، ۶/۳۵ و ۶/۲۵ شد که کاهش تراکم نورونی در گروه آلزایمر در مقایسه با کنترل و شم معنی دار بود (p<۰/۰۰۰۱).

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که تزریق Aβ (1-40) باعث کاهش قابل توجه شاخصه‌های رفتاری و تعداد نورون ها در ناحیه CA1 در هیپوکمپ می گردد.

واژه های کلیدی: آلزایمر، هیپوکمپ، بتا آمیلوئید، حافظه، تغییرات نوروپاتولوژیک.

مقدمه

بیماری آلزایمر یک ضایعه نورودژنراتیو پیشرونده، غیرقابل برگشت و تدریجی است که موجب اختلال حافظه، کاهش توانایی فکری و تغییرات رفتاری می‌گردد (۱). ۱۰-۷ درصد افراد بالای ۶۵ سال از این بیماری رنج می برند (۲). زنان نسبت به مردان بیشتر در معرض خطر ابتلا به بیماری آلزایمر هستند (۳). با وجودی که هنوز مکانیسم دقیق بروز سمیت عصبی توسط بتا آمیلوئید شناسایی نشده، به نظر می رسد که استرس اکسیداتیو نقش اصلی را در این زمینه داشته باشد. پروتئین بتا آمیلوئید بیشترین ترکیب پروتئینی پلاکهای نوریتیک را تشکیل می‌دهد. این پروتئینها در داخل نورونها و فاصله بین آنها رسوب می‌کند که در نتیجه بروز التهاب و واکنش استرس اکسیداتیو باعث کاهش نورون در نواحی هیپوکمپ و قشر مغز می‌گردد (۱). در این خصوص یکی از اولین نواحی که در بیماری آلزایمر دچار کاهش نورونی می‌شود هیپوکمپ است (۱). هیپوکامپ، ناحیه ای است که وظیفه پردازش اطلاعات لازم برای شکل دهی حافظه را به عهده دارد (۴). هیپوکامپ و قشر مخ ساختارهای کلیدی تشکیل حافظه هستند، تزریق Aβ به هیپوکامپ می تواند باعث کاهش یادگیری، حافظه و بروز نوروژنراسیون

[*] مسئول مقاله:
آدرس: بابل، گرجی آباد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل، دانشکده دامپزشکی، تلفن: ۰۱۱۱-۲۴۱۵۰۰۰
e-mail:dr_hosseini2323@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.4.12.4]

در هیپوکامپ و کاهش در انتقال و پلاستیسیتی سیناپسی و اختلال عملکرد عصبی گردد. در بیماری آلزایمر، رادیکال های آزاد که مسئول وقوع دژنراسیون نورونی هستند، سبب شروع پروسه های اکسیداتیو و وقوع آسیب نورونی می گردند (۸-۴).

موتاسیون در ژن پروتئین پیشساز آمیلوئید (APP) بر روی کروموزوم ۲۱، آپولیپوپروتئین E بر روی کروموزم ۱۹ و ژن پروتیئن های پره سنایلین (presenilin) ۱ و ۲ که به ترتیب بر روی کروموزم های ۱۴ و ۱ واقع شده اند، در پاتوژنز بیماری آلزایمر دخالت دارند (۹). به نظر می‌رسد که یک اختلال در نوروترانسمیتر استیل کولین ایجاد می شود که در نتیجه در نورون های مرکزی یک کاهش انتقال عصبی ایجاد می گردد. سه تغییر میکروسکوپیک اصلی نیز در مغز این بیماران شامل رسوبات پروتئینی خارج سلولی که به عنوان پلاکهای آمیلوئید و رسوبات پروتئینی داخل سلولی به نام کلافه های نوروفیبریلاری ایجاد می گردد، از بین رفتن نورونها به صورت منتشر و تغییرات سیستم نوروترانسمیتری می‌باشد (۱۰). این پلاک ها در اثر نقص در پردازش پروتئین بتاآمیلوئید و پروتئین پیشساز آمیلوئید (APP) ایجاد می شوند (۱۱). بیشترین پپتیدهای آمیلوئید موجود در پلاک ها را پروتئین های بتاآمیلوئید (۴۰-۱) و بتا آمیلوئید (۴۲-۱) تشکیل می‌دهند. در مجموع دو نوع پلاک وجود دارد پلاکهای پیری senile) (plaques یا پلاکهای نوریتیک(neuritic plaques) که دارای هسته متراکم آمیلوئیدی می‌باشند و پلاک های منتشر (diffuse plaques) که فاقد چنین هسته‌ای هستند و به صورت پراکنده و با هاله‌ای روشن قابل رویت می باشند. پلاکهای نوریتیک باعث کاهش جمعیت نورونی همراه با اشکال مرگ نورونی (نکروز، آپاپتوز) و واکنش نورونی و گلیوز می باشند. در صورتی که پلاک های منتشر واکنش سلولی را بر نمی‌انگیزند. هیپوکامپ ناحیه ویژه در قشر مغز لیمبیک، در ناحیه تمپورال داخلی مغز قرار دارد (۱۲).

هیپوکامپ از سوبیکولوم، نواحی CA1, CA2 و CA3 و گیروس دنتیت تشکیل می شود. هیپوکمپ و سیستم کولینرژیک به طور اساسی در مراحل یاد گیری و حافظه درگیر می باشند. تست های هیستوپاتولوژیک و بیوشیمیایی برای شناسایی تغییرات دژنراتیو نورونی در مغز انجام می‌شود. شناخت این ضایعات در قسمت های مختلف مغز کمک شایانی در شناخت بیشتری از پاتوژنز بیماری و پیشرفت مدل های دقیق سلولی و حیوانی تأثیر داشته و نتیجتاً باعث استفاده مناسب از پروتکل های پیشگیری و درمانی می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی ضایعات هیستوپاتولوژیک در ناحیه CA هیپوکمپ متعاقب تزریق بتا آمیلوئید در موش صحرایی می باشد.

مواد و روشها

در این مطالعه تجربی از ۳۰ سر موش صحرایی (rat) نرآلبینو، نژاد ویستار با وزن ۳۰۰-۲۵۰ گرم و۱۰-۸ هفته، که از مرکز حیوانات دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه شدند، استفاده گردید. در مدت زمان آزمایش حیوانات در حیوانخانه با شرایط نوری فصلی و در قفس های پلاستیکی و دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. درجه حرارت اتاق در محدوده ۳۷ درجه سانتیگراد حفظ شد. تلاش گردید شرایط نگهداری و کار با حیوانات بر اساس توصیه های قوانین حمایت از حیوانات آزمایشگاهی(NIH) انجام گیرد. رت ها در سه گروه کنترل، Sham (در این گروه آب دو بار تقطیر تزریق شد و گروه آلزایمر تزریق شده با بتا آمیلوئید (Aβ) به طور مساوی تقسیم شدند. جهت ایجاد مدل آلزایمر، بتا آمیلوئید سنتتیک Aβ-۴۰ (Sigma CA. USA) در آب دو بار تقطیرحل گردید بطوریکه دارای غلظت ۲ nmol/µl در آمده و در اندازه های ۱۶ میکرولیتری در یک اپاندورف ریخته شده و در دمای ۷۰- تا زمان استفاده نگهداری شد. حیوانات با کتامین (Alfason, Woerden, Holland) ۶۰ میلی گرم برای هر کیلوگرم وزن و (Xylazine) (Alfason, Woerden, Holland) ۲۰ میلیگرم برای هر کیلوگرم وزن بی هوش شدند و در دستگاه استریوتاکسی (Stoelting co. USA) (Stereotaxi) قرار گرفتند. سپس پوست را شکافته تا جمجه مشاهده شود پس از ضد عفونی نمودن با بتادین با استفاده از دریل مختصات در نقطه مورد نظر- CA1:[Anterior-posterior (AP): 3/80, Mediolateral (ML): 2, Dorsoventral (DV): 2/6)]، که با کمک اطلس Paxinous and Watson (1986) مشخص شد، ایجاد حفره گردید. در گروه آلزایمر 4µl محلول Aβ-۴۰ پروتئین آمیلوئید را با کمک سرنگ هامیلتون ۱۰µl به صورت دو طرفه در طی ۱۲ دقیقه (۱۰ دقیقه تزریق، ۲ دقیقه ورود و ۲ دقیقه خروج سرنگ) تزریق شد. خروج سرنگ به آهستگی صورت گرفت. در گروه Sham همین روند با تزریق ۴µl آب دو بار تقطیر انجام شد.

برای انجام آزمایش رفتاری حافظه فضایی از دستگاه Y-maze ۱۴ روز پس از ایجاد ضایعه استفاده شد و آزمایش در ساعات ۱۸-۱۵ صورت پذیرفت. این دستگاه از جنس Plexiglas سیاه رنگ بوده، دارای سه بازوی عمود بر هم است. هر بازو دارای ۴۰ سانتی متر درازا، ۳۰ سانتی متر بلندی و ۱۵ سانتی متر پهنا است. در زمان آزمایش نیاز به سکوت می‌باشد و هر رت (بدون آشنایی قبلی به maze)، در انتهای یکی از بازوها قرار می گیرد و می تواند آزادانه به بازوهای دیگر وارد شود. البته شرط داخل شدن حیوان به یک بازو را ورود کامل تنه و ابتدای دم حیوان قرار دادیم. در واقع منظور از تغییر رفتار حیوان که در این جا به صورت حافظه فضایی (spatial memory) بیان می شود، به صورت ورود متناوب به هر سه بازو و به صورت سه تایی در نظر گرفته شد، میزان حافظه فضایی حیوان برابر است با تعداد حرکات ۳ تایی غیر تکراری ورود به بازوها تقسیم بر تعداد کل ورود به بازوها منهای ۲، که کل کسر در عدد ۱۰۰ ضرب می شود (۱۳). این آزمایش بر روی هر رت فقط یک بار انجام گردید. تعداد کل ورود به بازوها در حیوانات مقایسه گردید.

shuttle-box دو طرفه ساختاری است که می‌توان با آن تست اجتناب ممانعتی و اجتناب فعال را جهت ارزیابی حافظه انجام داد. تست اجتناب ممانعتی یکطرفه بر اساس تنبیه، انجام عملی همچون وارد شدن به محیط جدید می باشد (۱۴). تست رفتاری Single trial passive avoidance، ۱۶ روز پس از ایجاد مدل و تزریق سلول انجام شد. این آزمایش با استفاده از دستگاه shuttle-box(BPT Co., Tehran) انجام گردید. این دستگاه دارای ۲ اتاقک تاریک و روشن به اندازه یکسان است که از طریق یک در گیوتینی کوچک و مرکزی با هم ارتباط دارند. در این دستگاه شوک الکترونی از طریق کف فلزی مشبک زمانی که رت در اتاق تاریک قرار دارد، داده می شود. همه حیوان ها طی دو روز اول با قرار گیری به مدت ۵ دقیقه در اتاقک تاریک با دستگاه آداپته می شوند. در روز سوم رت ها را وارد اتاقک روشن نموده و پس از ۲ دقیقه ماندن در آنجا در

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.4.12.4]

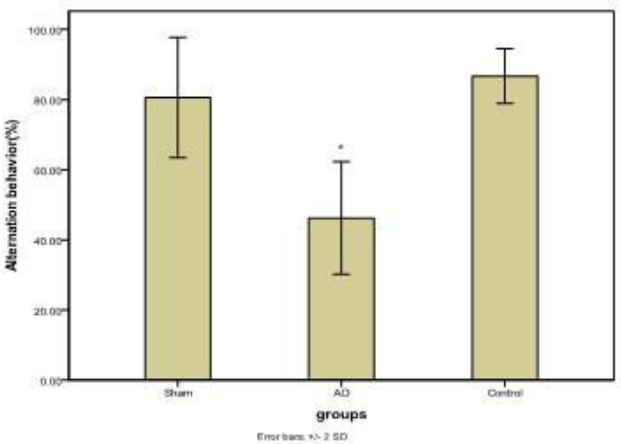
گیوتینی مرکز را باز نموده و با توجه به عدم تمایل به نور رت ها وارد اتاقک تاریک می‌شوند سپس درب بسته می شود و شوک الکتریکی به میزان ۲ ثانیه و ۱ میلی آمپر از کف اتاق به حیوان داده می شود. ۲۴ ساعت بعد در تکرار مجدد تست و ورود رت به اتاقک روشن و باز نمودن درب حد فاصل دو اتاقک، زمان ورود حیوان به اتاقک تاریک تا حداکثر ۶۰۰ ثانیه به عنوان رکورد این تست ثبت گردید. انجام این تست در ساعات ۱۵-۱۲ صورت پذیرفت (۱۳).

پس از انجام تست رفتاری حیوانات و پس از گذشت ۱۲ هفته حیوانات به روش پرفیوژن کشته شده و مغزشان جهت مطالعه بافت شناسی خارج گردید. برای انجام تکنیک پرفیوژن ابتدا حیوان تحت بی هوشی عمیق با کتامین و زایلازین قرار گرفت و محلول پارافرمالدئید ۰/۱ mol/L در بافر فسفات با PH:۷/۴ برای فیکسیشن از طریق عروق اصلی مورد استفاده قرار گرفت و پس از خروج مغز در محلول مشابهی جهت فیکسیشن نهایی به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. سپس طبق روند روتین پروسس بافتی و در نهایت برشهای کورونال سریالی با ضخامت ۸ µm توسط میکروتوم روتاری (Leitz, 1512, Germany) صورت گرفت و با رنگ نیسل و بیلچوسکی رنگ آمیزی شدند. در رنگ آمیزی نیسل در مساحت ۰/۲۶ mm^2 در ناحیه CA1 نورونها شمارش شدند این کار به کمک نرم افزار BioReport (Olympus Corporation, Tokyo, Japon) صورت گرفت و شمارش پلاک ها در رنگ آمیزی بیلچوسکی بررسی شد.

جهت آنالیز آماری برای شمارش نورون های CA1 همچنین جهت آنالیز آماری آزمون‌های تست های رفتاری از روش one-way analysis of variance (ANOVA) و Tukey استفاده گردید و p<۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

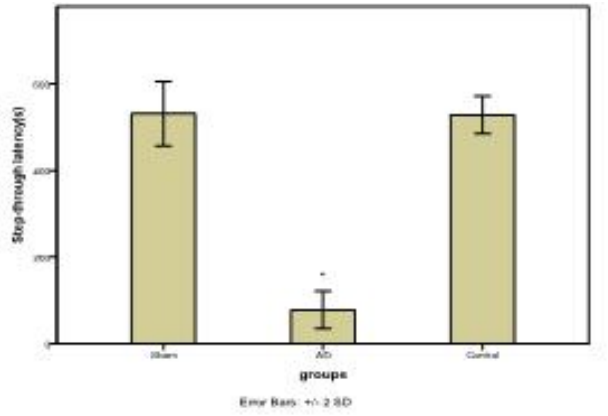
یافته ها

میانگین تغییرات رفتاری برای گروه شم برابر با ۸۰/۵۶٪ گروه کنترل برابر با ۸۶/۷٪ گروه آلزایمر برابر با ۴۶/۲٪ بود که تغییر رفتاری بین گروه آلزایمر و سایر گروهها اختلاف معنی داری داشت (p<۰/۰۰۰۱). اما میانگین اختلاف این تغییر رفتاری بین دو گروه Sham و کنترل معنی داری نبود (نمودار ۱).



نمودار ۱. مقایسه درصد هوشیاری بین گروه بیماری آلزایمر با کنترل و sham * (p<۰/۰۰۰۱).

تست رفتاری Single trial passive avoidance به صورت اجتناب رفتاری غیر فعال و شروع پاسخ تاخیری می باشد که در ارزیابی این تست میانگین زمان تاخیر در ورود به اتاق تاریک در بین گروهها مقایسه گردید. میانگین زمان تاخیر ورود در گروه Sham، ۵۲۸ ثانیه، گروه کنترل ۵۳۰/۷ ثانیه و در گروه آلزایمر برابر با ۷۷/۷ ثانیه بود و میانگین تغییر رفتاری بین گروه آلزایمر و سایر گروهها اختلاف معنی دار داشت (p<۰/۰۰۰۱). این در حالی است که میانگین اختلاف این تغییر رفتاری بین گروه های Sham و کنترل معنی داری نبود (نمودار ۲).



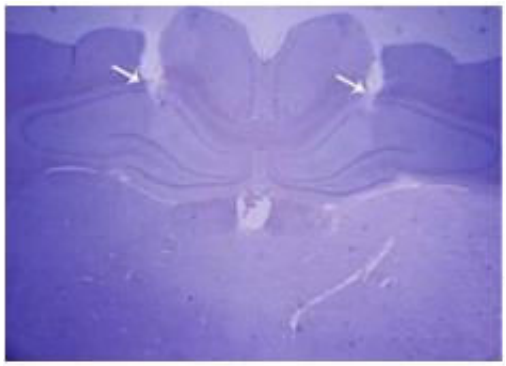
نمودار ۲. مقایسه پاسخ تاخیری گروه کنترل و sham با گروه بیماری آلزایمر * (p<۰/۰۰۰۱).

با توجه به تصویر می‌توان محل و مسیر تزریق در هیپوکامپ را در مقطع ۳/۸- (نسبت به برگما) در بررسی بافتی رنگ آمیزی نیسل مشاهده نمود. فلش ها مسیر تزریق را نشان می دهند (تصویر ۱). این بررسی در بخش داخلی CA1 و در مقطع 3.8- (نسبت به برگما) شمارش نورون های هرمی انجام گردید. در این خصوص مشخص گردید که کاهش معنی داری در تعداد نورون های CA1 در گروه آلزایمر نسبت به هر دو گروه Sham و کنترل در میانگین شمارش سلولی هر دو مقطع دیده می شود (تصویر ۲).

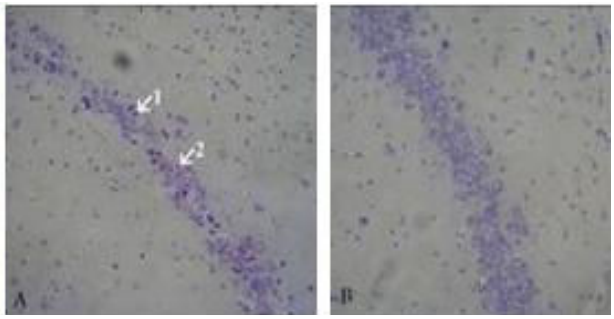
مقایسه بین تعداد نورون های ناحیه CA1 در مقطع ۳/۸- در مقایسه گروههای آلزایمر (۲/۹۲ نورون در هر میلی متر مربع) با کنترل (۶/۳۵ نورون در هر میلی متر مربع) و Sham (۶/۲۵ نورون در هر میلی متر مربع) معنی دار بود (p<۰/۰۰۰۱). در صورتی که بین گروه های کنترل و Sham اختلاف آماری معنی داری وجود نداشت. در رنگ آمیزی نیسل در گروه آلزایمر تراکم نورون ها به مقدار ۵۵/۶٪ در CA1 کاهش نشان داد. در بررسی هیستولوژی رنگ آمیزی بیلچوسکی دو نوع پلاک آمیلوئید در پلاک دیفیوز (منتشر، پراکنده) و پلاک های متراکم (پیری) رویت شد. این دو نوع پلاک هم در کورتکس و هم در هیپوکمپ دیده شد. حداکثر سایز پلاک های منتشر ۲۱۰µm اندازه گیری شد.

تعداد پلاک های منتشر در هیپوکمپ، ۲±۱۱ و ۱±۳ پلاک متراکم بطور متوسط در هر فیلد با بزرگنمایی ۱۰۰ مشاهده شد. دیسترفی نورونی در اطراف پلاک های منتشر بر خلاف پلاک های متراکم دیده نشد، همچنین پلاک های منتشر واکنش آماس نورونی و سلولهای گلیال را در بر نداشت. هسته آمیلوئید در پلاک های متراکم در هیپوکمپ مشاهده شد (تصویر ۳). در رنگ آمیزی بیلچوسکی هسته های پراکنده آمیلوئیدی قابل رویت بود.

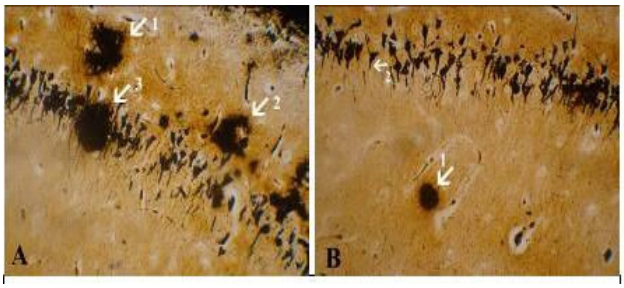
[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.4.12.4]



تصویر ۱. محل و مسیر تزریق در هیپوکامپ، مقطع 3.8- رنگ آمیزی نیسل



تصویر ۲. رنگ آمیزی نیسل ناحیه CA_1، بزرگنمایی 40X. A_1 مورفولوژی مرگ سلولی در گروه آلزایمر A_2 آپاپتوتیک بادی. B گروه کنترل



تصویر ۳. رنگ آمیزی بیلچوسکی در گروه بیماری آلزایمر با بزرگنمایی 40X. $A_{1,2}$ پلاک منشر در ناحیه CA1 در هیپوکمپ. A_3 پلاک متراکم. B_1 پلاک متراکم در پارانشیم هیپوکمپ B_2 کلافه های نوروفیبریلاری

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه تزریق توده های متراکم و منتشر آمیلوئید در گروه آلزایمر طی رنگ آمیزی بیلچوسکی مشخص گردید که باعث کاهش قابل توجه شاخصه های رفتاری و تعداد نورون ها در ناحیه CA1 در هیپوکمپ گردید. یکی از فرضیاتی که اغلب در مورد اتیولوژی بیماری آلزایمر مورد قبول واقع شده است، تجمع بتا آمیلوئید در پارانشیم مغز است. این پروتئین بیشترین ماده در رسوبات آمیلوئید واقع در پلاک های نوریتیک و دیواره عروق خونی بافت مغز بیماران را تشکیل می دهد و به عنوان یک حادثه اولیه، مسبب آغاز آبشاری وقایع پاتولوژیکی است. تحقیقات نشان می دهد که تزریق داخل مغزی بتا آمیلوئید سبب نزول یادگیری اجتنابی غیر فعال، کم شدن قدرت حافظه مرتبط با Y-maze و کاهش توانایی انجام water-maze در موش و موش صحرایی می شود (۱۵). همچنین تزریق بتا آمیلوئید به داخل هیپوکامپ می تواند باعث کاهش سطح یادگیری، نزول حافظه و بروز نورودژنراسیون در هیپوکامپ و کاهش در انتقال و پلاستیسیتی سیناپسی شود (۴و۶). در این بررسی مانند سایر مطالعات رسوب Aβ در مغز موجب نقصان فراگیری و حافظه شد. تست یادگیری اجتنابی غیر فعال را می توان به طور گسترده ای جهت ارزیابی حافظه در ارتباط با عملکرد قشر مغز و هیپوکمپ در جوندگان استفاده نمود. در بررسی این تست یادگیری اجتنابی غیر فعال بطور معنی داری کاهش عملکرد حافظه را در گروه آلزایمر نشان داد. نوروترانسمیتر ها در سیستم اعصاب مرکزی CNS نقش مهمی را در عملکرد و رفتار طبیعی فرد بالغ دارند. آنها با یکدیگر در شبکه های پیچیده در فرآیند یادگیری و حافظه تعامل دارند که در آن نقش محوری برای استیل کولین وجود دارد. استیل کولین استراز Acetylcholinestrase آنزیم مسئول هیدرولیز نمودن استیل کولین است و بنابراین باعث غیرفعال کردن استیل کولین در بدن می شود. تغییرات در این سطح آنزیم حاکی از اختلال در عملکرد اعصاب کولینرژیک است. مطالعات مختلف گزارش داده اند که تزریق پپتید Aβ(۱-۴۰) به بطن مغزی موش موجب اختلال یادگیری، دژنرسانس نورونی و تغییر آنزیم هایی مانند استیل کولین استراز و کولین اسیل ترانسفراز می گردد؛ که همه آنها ویژگی های شناخته شده ای از بیماری آلزایمر می باشند (۱۶). هیپوکامپ و قشر مخ ساختارهای کلیدی تشکیل حافظه هستند، تزریق Aβ به هیپوکامپ می تواند موجب نقصان انتقال سیناپسی و پلاستیسیته (۸) و اختلال عملکرد عصبی گردد (۷).

در مطالعه حاضر پلاک های مغزی منتشر تنها در گروه Aβ مشاهده شد. ضایعات مغزی مشاهده شده در مورد Aβ برای پلاک متراکم تعریف پذیر هستند زیرا آنها دیستروفی نورونی را باعث می شوند. در صورتیکه در اطراف پلاک منتشر هیچ تغییرات مورفولوژیک تشخیص داده شد. تزریق پروتئین Aβ به طور گسترده ای در تهیه مدل آلزایمر استفاده می شود. پروتئین Aβ ساختار مهم پلاک متراکم است و تصور می شود دلیل اصلی از دست رفتن سلولهای عصبی و در نتیجه ناتوانی در حافظه باشد (۱۷). به علاوه تحقیقات حاکی از آن است که تزریق پپتید بتا آمیلوئید (۱-۴۰) به داخل بطن مغزی سبب کاهش یادگیری، دژنراسیون نورونی و تغییر مارکرهای آنزیمی در سیستم کولینرژیک می گردد که همه اینها از خصوصیات شناخته شده بیماری آلزایمر به شمار می روند (۱۶). از طرف دیگر Malin و همکاران نشان دادند که چند بار تزریق دو طرفه محلول بتا آمیلوئید (۱-۴۰) با غلظت nmol ۳ به داخل هیپوکامپ می تواند سبب گلیوزیس و از بین رفتن نورون ها شده و پس از ۲ هفته از میزان قدرت یادگیری و حافظه دراز مدت بکاهد (۱۸). این در حالی است که نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر نشان می دهد که یک بار تزریق ۴ میکرولیتر محلول بتا آمیلوئید (۱-۴۰) با غلظت ۲ نانومول در هر میکرولیتر در هیپوکامپ بعد از گذشت دو هفته توانسته سبب کاهش معنی دار در آزمایش تغییر رفتار حافظه فضایی Y-maze در مقایسه با گروه Sham و کنترل شده، همچنین کاهش معنی دار در تعداد سلول های هرمی CA1 را باعث گردید. لازم به ذکر است که در این تحقیق، بتا آمیلوئید توانسته به میزان قابل توجهی سبب افزایش تراکم سلول های نوروگلی در ناحیه CA1 در مقایسه با گروه Sham و کنترل گردد. بروز بعضی تغییرات پاتولوژیک،

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.4.12.4]

نظیر آسیب سلول های اندوتلیال و آسیب سلول های عضلانی صاف در عروق خونی مغز بیماران مبتلا به آلزایمر در برخی مطالعات نشان داده شده است و همچنین، تحقیقات نشان می دهد که پروتئین بتا آمیلوئید می تواند در محیط کشت سلولی تاثیرات سمی بر سلول های آندوتلیال داشته باشد و باعث بروز آپاپتوزیس در آنها گردد (۱۹).

بنظر می رسد، نزول امتیازات رفتاری مربوط به حافظه در این بررسی، در ارتباط با نقص در مدار داخلی هیپوکامپ و در نتیجه اختلال در ارتباطات گسترده آن با مراکز قشری و زیر قشری باشد (۲۰). همچنین بنظر می رسد، بروز نورودژنراسیون در هیپوکامپ که به صورت کاهش نورون های هرمی واقع در ناحیه CA1 نشان داده شده است، از این عقیده حمایت می کند که در بیماری آلزایمر، رادیکال های آزاد که مسئول وقوع دژنراسیون نورونی هستند و توسط بتا آمیلوئید و نیز میکروگلیال های فعال شده تولید می شوند، سبب شروع پروسه های اکسیداتیو شده و باعث وقوع آسیب نورونی می گردند (۵). با توجه به این که در این تحقیق، در اثر تزریق پروتئین بتا آمیلوئید در هیپوکامپ موش های صحرایی، امتیازات رفتاری این حیوانات در ارتباط با حافظه فضایی و یادگیری اجتنابی غیر فعال نسبت به حیواناتی که بتا آمیلوئید دریافت نکرده بودند، کاهش یافته و همچنین از تعداد سلول های سالم در ناحیه CA1 هیپوکامپ در این ناحیه کاسته شده و رسوب مواد حاوی پروتئین بتا آمیلوئید در هیپوکامپ مشاهده گردیده که ایجاد آپاپتوزیس و دیستروفی نورونی، متعاقبا نقصان انتقال سیناپسی و اختلال عملکرد عصبی را سبب گردید و نهایتاً علائم بافتی و رفتاری مشابه بیماری آلزایمر در این حیوانات به چشم می خورد، می توان گفت که این حیوانات نمونه های خوبی به عنوان مدل بیماری آلزایمر جهت مطالعات آتی می باشند و همچنین نتایج مطالعه نشان داد که تزریق (۴۰-۱) Aβ باعث کاهش قابل توجه شاخصه‌های رفتاری و تعداد نورون ها در ناحیه CA1 در هیپوکمپ می گردد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از همکاری دپارتمان علوم تشریح و فارماکولوژی و مرکز تحقیقات سلولی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی تهران و همچنین از کمک و مساعدت ویژه خانمها فامیلی و حسنی تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.4.12.4]

Study of Histopathological Lesions in CA1 of the Hippocampus after Injection of Beta-Amyloid in a Rat Model of Alzheimer's Disease

S.M. Hoseini (PhD) [1*], M. Nobakht (PhD) [2], P. Mortazavi (PhD)[3], B. Esmailzade (PhD)[4], N. Rahbar-Rooshandel (PhD)[5], Sh. Omidzahir (PhD)[6]

1.Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Babol Branch, Babol, Iran
2.Department of Histology and Neuroscience, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3.Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran
4.Department of Anatomy, Boshehr University, Boshehr, Iran
5.Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
6. Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

J Babol Univ Med Sci; 14(4); Jul 2012; pp: 90-96.
Received: Sep 19th 2011, Revised: Nov 9th 2011, Accepted: May 3rd 2012.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder and the most common form of degenerative dementia with progressive loss of cognitive abilities and memory loss. AD is an irreversible, progressive chronic disease that it is the cause of behavior changes and deterioration of thinking ability. Since exact mechanism of neuro-toxicity by beta amyloid has not been identified yet, in this study, the histopathological lesions in CA1 of hippocampus after injection of beta-amyloid in a rat model of AD was studied.

METHODS: In this experimental study, 30 adult male Albino Wistar rats weighing (250-300 g) were used for behavioral and histopathological studies. The rats were randomly assigned to three groups; control, sham and β-amyloid (Aβ) injection. The lesion was induced by injection of 4µLof Aβ (1-40) into the hippocampal fissure. For behavioral analysis Y-maze and shuttle box were used respectively at the 14 and 16 days post-lesion. For histological studies, Nissl and Bielschowsky staining were done.

FINDINGS: The mean scores of alternation behavior for sham, control, and AD group were 80.56%, 86.7%, and 46.2%, respectively. AD group showed a significant reduction in alternation behavior as compared to control and sham group ($p<0.0001$). The number of neurons per square millimeter in the Alzheimer group, sham and control, respectively, 2.92, 6.35 and 6.25, and reduced neuronal density in Alzheimer's disease compared with control and sham groups were significant ($p<0.0001$).

CONCLUSION: In the present study, Aβ (1-40) injection into hippocampus could decrease the behavioral indexes and the number of CA1 neurons in hippocampus.

KEY WORDS: *Alzheimer's disease (AD), Hippocampus, β-amyloid (Aβ), Memory, Neuropathological changes.*

[*] **Corresponding Author;**
Address: Faculty of Veterinary Science, Islamic Azad University, Babol Branch, Gorjiabad St., Babol, Iran
Tel: +98 111 2415000
E-mail: dr_hosseini2323@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.4.12.4]

References

1.Parihar MS, Hemnani T. Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions. J Clin Neurosci 2004; 11(5):456-67.

2.Kong LN, Zuo PP, Mu L, Liu YY, Yang N. Gene expression profile of amyloid beta protein-injected mouse model for Alzheimer disease. Acta Pharmacol Sin 2005;26(6):666-72.

3.Gao S, Hendrie HC, Hall KS, Hui S. The relationships between age, sex, and the incidence of dementia and Alzheimer disease: a meta-analysis. Arch Gen Psychiatry 1998;55(9):809-15.

4.Stephan A, Laroche S, Davis S. Generation of aggregated beta-amyloid in the rat hippocampus impairs synaptic transmission and plasticity and causes memory deficits. J Neurosci 2001;21(15):5703-14.

5.Aksenova MY, Aksenov MY, Mactutus CF, Booze RM. Cell culture models of oxidative stress and injury in the central nervous system. Curr Neurovasc Res 2005;2(1):73-89.

6.Alvarez XA, Miguel-Hidalgo JJ, Lagares R, et al. Protective effects of anapsos in rats with hippocampal neurodegeneration. Eur Neuropsychopharmacol 1996;6(Suppl 3):75.

7.Koudinov AR, Berezov TT, Koudinova NV. Amyloid plaque (and not diffuse amyloid) is a condition for neuronal dysfunction. Clin Med Health Res 2001. http://clinmed.netprints.org/cgi/content/full/2001110002v1.

8.Shirai N, Suzuk H. Effect of dietary docasahexaenoic acid and catechins on maze behavior in mice. Ann Nutr Metab 2004;48(1):51-8.

9.Holroyd S, Shepherd ML. Alzheimer's disease: a review for the ophthalmologist. Surv Ophthalmol 2001;45(6):516-24.

10.Tiraboschi P, Hansen LA, ThaI LJ, Corey-Bloom J. The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of AD. Neurology 2004;62(11):1984-9.

11.Delagarza VW. Pharmacologic treatment of Alzheimer's disease: an update. Am Fam Physician 2003;68(7):1365-72.

12.Andin J, Enz A, Gentsch C, Marcusson L. Rivastigmine as a modulator of the neuronal glutamate transporter rEAAC 1 mRNA expression. Dement Geriat Cogn Disord 2005;19(1):18-23.

13.Roghani M, Joghataie MT, Jalali MR, Baluchnejadmojarad T. Time course of changes in passive avoidance and Y–Maze performance in male diabetic rats. Iran Biomed J 2006;10(2):99-104.

14.Bures J, Buresová O, Huston J. Techniques and basic experiments for the study of brain and behavior. 2nd ed. Netherlands, Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V. 1983; p: 326.

15.Mcdonald MP, Overmier JB. Present imperfect: a critical review of animal models of mnemonic impairments in Alzheimer's disease. Neurosci Biobehav Rev 1998;22(1):99-120.

16.Hashimoto M, Hossain S, Shimada T, et al. Docosahexaenoic acid provides protection from impairment of learning ability in Alzheimer's disease model rats. J Neurochem 2002;81(5):1084-91.

17.Li Y, Chopp M, Chen J, et al. Intrastriatal transplantation of bone marrow nonhomatopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice. J Cereb Blood Flow Metab 2000;20(9):1311-9.

18.Malin DH, Crothers MK, Lake JR, et al. Hippocampal injections of amyloid beta peptide 1-40 impair subsequent one- trial/day reward learning. Neurobiol Learn Mem 2001;76(2):125-37.

19.Gebbink MF, Voest EE, Reijerkerk A. Do antiangiogenic protein fragments have amyloid properties? Blood 2004; 104(6):1601-5.

20.Skutella T, Nitsch R. New molecules for hippocampal development. Trends Neurosci 2001;24(2):107-13.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1391.14.4.12.4]