Archive of SID

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۸۵/هفته دوم تیر ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۳/۵

بررسی اثر تزریق درون صفاقی لیپوپلی‌ساکارید (LPS) بر فرایندهای آپوپتوز، حافظه و ایجاد آلزایمر در هیپوکمپ موش‌های نر صحرایی نژاد ویستار در یک روش وابسته به زمان

دکتر شهربانو عریان[۱]، مرتضی نظری سرنجه[۲]، مسعود باقرپور زارچی[۲]، دکتر فریبا خداقلی[۳]، دکتر محمد نبیونی[۴]، دکتر کیانا شاهزمانی[۵]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: در این مطالعه اثر تزریق درون صفاقی لیپوپلی‌ساکارید (LPS یا Lipopolysaccharide) در ایجاد آپوپتوز با افزایش مقدار پروتئین‌های آپوپتوزی Bax (Bcl-۲-associated X protein) و Caspase-۳ و کاهش مقدار پروتئین ضد آپوپتوزی Bcl-۲ (B-cell lymphoma-۲) در هیپوکمپ رت و نیز اثر آن بر روی حافظه و بروز آلزایمر به صورت وابسته به زمان در ساعت‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۲۰ بعد از تزریق بررسی شد. هدف از این مطالعه، بررسی اثر عفونت باکتریایی (از طریق LPS) در ایجاد اختلال شناختی در حافظه در اثر یک بار تزریق LPS و نیز ایجاد مدل دیگری از موش‌های مبتلا به آلزایمر به جای تزریق آمیلوئید بتا (Aβ یا Amyloid-beta) و استرپتوزوتوسین (STZ یا Streptozotocin) به داخل مغز –که با مرگ و میر زیاد حیوانات همراه است– بود.

روش‌ها: از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار ۲۲۰-۲۳۰ گرمی برای تزریق درون صفاقی LPS و انجام آزمایش‌های مولکولی وسترن بلات (Western blot)، آزمایش آنزیمی و سنجش حافظه با دستگاه شاتل باکس (Shuttle-box) به صورت وابسته به زمان استفاده شد. در این مدل به جای تزریق Aβ و STZ به داخل مغز از LPS استفاده گردید. این ترکیب، به خاطر توانایی که در عبور از سد خونی- مغزی (BBB یا Blood–brain barrier) دارد، می‌تواند به سلول‌های مغزی به ویژه سلول‌های ناحیه‌ی هیپوکمپ حمله کند و موجب مرگ این سلول‌ها و ایجاد اختلال در حافظه شود.

یافته‌ها: افزایش مقدار پروتئین‌های آپوپتوزی Bax و Caspase-۳ و کاهش مقدار پروتئین ضد آپوپتوزی Bcl-۲ به صورت وابسته به زمان در گروه مورد نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. همچنین نتیجه‌ی آزمایش آنزیمی Caspase-۳ نتایج وسترن بلات را تأیید نمود. اختلال ایجاد شده به وسیله‌ی LPS در حافظه نیز توسط آزمایش شاتل باکس به صورت وابسته به زمان مشخص گردید. نتایج به دست آمده، معنی‌دار بودند ($P < ۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: LPS موجب افزایش بروز آپوپتوز و مرگ سلول‌های نورونی در ناحیه‌ی هیپوکمپ مغز موش‌های نر صحرایی نژاد ویستار به صورت وابسته به زمان می‌شود که این آپوپتوز، موجب کاهش قدرت حافظه‌ی حیوان می‌شود.

واژگان کلیدی: بیماری آلزایمر، آپوپتوز، شاتل باکس، لیپوپلی‌ساکارید

ارجاع: عریان شهربانو، نظری سرنجه مرتضی، باقرپور زارچی مسعود، خداقلی فریبا، نبیونی محمد، شاهزمانی کیانا. **بررسی اثر تزریق درون صفاقی لیپوپلی‌ساکارید (LPS) بر فرایندهای آپوپتوز، حافظه و ایجاد آلزایمر در هیپوکمپ موش‌های نر صحرایی نژاد ویستار در یک روش وابسته به زمان.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۸۵): ؟؟

۱- دانشیار، گروه فیزیولوژی جانوری، دانشکده‌ی زیست‌شناسی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
۲- کارشناس ارشد، گروه فیزیولوژی جانوری، دانشکده‌ی زیست‌شناسی،دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
۳- دانشیار، گروه سلولی مولکولی، دانشکده‌ی زیست‌شناسی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
۴- استادیار، گروه سلولی و مولکولی، دانشکده‌ی زیست‌شناسی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
۵- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: مرتضی نظری سرنجه
Email: mortezanazariserenjeh@gmail.com

www.mui.ac.ir
www.SID.ir
Proof Version

Archive of SID

مقدمه

از دست دادن توانایی شناختی با افزایش سن، فرایندی طبیعی است که سرعت و شدت آن بسیار متغیر می‌باشد. بیماری آلزایمر (AD یا Alzheimer's disease) در ابتدا دمانس (Dementia) پیری نامیده می‌شد. آلزایمر به نوعی از دمانس اطلاق می‌شود که به دلیل عواملی از قبیل سکته، ترومای مغزی یا مصرف الکل نباشد (۱). بیماری آلزایمر با تحلیل مغز و تخریب متمرکز نورونی، به ویژه در ناحیه‌ی هیپوکمپ و قسمت قاعده‌ای پیشانی، همراه است. بارزترین مشخصه‌ی این بیماری، تخریب نورون‌های کولینرژیک در هیپوکمپ و کورتکس پیشانی است و به نظر می‌رسد که این تخریب، عامل اصلی کاهش شناختی و از دست دادن حافظه‌ی کوتاه مدت در بیماری آلزایمر می‌باشد (۲).

بیشترین کاهش سیناپس‌ها در بخش‌های خارجی لایه‌ی مولکولی ژیروس دندانه‌ای هیپوکمپ می‌باشد که احتمال دارد در نتیجه‌ی کاهش ورودی از کورتکس انتورهینال باشد. کاهش یا اختلال عملکرد سیناپسی از طریق اختلال در ارتباطات نورونی باعث بروز نشانه‌های بالینی زوال عقلی می‌گردد. حتی سیناپس‌هایی که از نظر ساختاری به نظر سالم می‌آیند، ممکن است دچار اختلال عملکرد باشند (۳).

درک اختلال حافظه‌ای که بیماران مبتلا به آلزایمر تجربه می‌کنند، برای طراحی و تعیین میزان مؤثر بودن داروهای جدید برای درمان اختلال حافظه ضروری است. حافظه به مجموعه‌ای از توانایی‌های عقلی اطلاق می‌گردد که سیستم‌ها و جایگاه‌های متفاوتی درون مغز در آن دخالت دارند (۴). اختلال حافظه‌ی اپیزودیک (Episodic) (این حافظه وقتی به خدمت گرفته می‌شود که فرد به طور آگاهانه یک واقعه مانند صرف یک وعده‌ی غذایی با یک دوست را به یاد بیاورد)، دارای بیشترین تطابق بالینی در بیماران مبتلا به آلزایمر می‌باشد. اختلال در سیستم حافظه‌ی اپیزودیک یکی از علایم اولیه‌ی بیماری آلزایمر محسوب می‌گردد. از آن جایی که توانایی حافظه‌ی اپیزودیک در بیماران مبتلا به آلزایمر تقلیل می‌یابد، وقایعی که در گذشته‌ی دور رخ داده‌اند، به نسبت بهتر از وقایعی که بعد و یا مقداری قبل از شروع بیماری رخ داده‌اند، به خاطر آورده می‌شوند (۵).

مولکول‌های LPS (Lipopolysaccharide) که همچنین به عنوان لیپوگلیکان هم شناخته می‌شوند، مولکول‌های بزرگی هستند که شامل یک جزء لیپیدی و یک جزء پلی‌ساکاریدی هستند که توسط یک پیوند کووالانسی به هم متصل شده‌اند. این مولکول‌ها در غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی یافت می‌شوند و به عنوان اندوتوکسین عمل می‌کنند و پاسخ‌های ایمنی شدیدی را در حیوانات ایجاد می‌نمایند. این مولکول‌ها توانایی بروز آپوپتوز را در سلول دارند. مرگ سلولی از جمله آپوپتوز و همچنین التهاب از جمله فرایندهای درگیر در بیماری‌های نورودژنراتیو می‌باشد (۷-۶).

واژه‌ی آپوپتوز اولین بار در سال ۱۹۷۲ توسط Kerr و همکاران (به نقل از Elmore) به عنوان نوع متمایزی از مرگ سلولی مطرح شد. آپوپتوز در واقع فرم بسیار تنظیم شده‌ای از مرگ سلولی می‌باشد که نقش مهمی را در رشد و نمو طبیعی ارگانیسم‌های پر سلولی و شکل‌گیری بافت‌ها و اندام‌ها بازی می‌کند (۸). از نقطه نظر مکانیسم مولکولی و بیوشیمیایی، می‌توان گفت که آپوپتوز شامل یک آبشاری از

Proof Version

www.SID.ir

Archive of SID

فرایندهای بیوشیمیایی پیچیده‌ای است که داخل سلول رخ می‌دهد. مهم‌ترین آن‌ها شامل فعال شدن آنزیم‌های سیتوزولی تحت عنوان Caspaseها و همچنین یک گروه از اندونوکلئازهای وابسته به Caspaseها در داخل هسته می‌باشد (۱۰-۹).

Caspaseها پروتئازهای وابسته به سیستئین هستند که مولکول هدف را از محل کربوکسیل آسپارتات می‌شکنند. Caspaseها در سیتوپلاسم به فرم غیر فعال Procaspase حضور دارند و با فرایند پروتئولیز زیموژن، به فرم فعال تبدیل می‌شوند. بررسی تغییرات Caspase-۳ و Procaspase یکی از مهم‌ترین روش‌های بررسی آپوپتوز به شمار می‌رود. یک مکانیسم در مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، تنظیم افزایشی پروتئین پروآپوپتوتیک Bax (Bcl-۲-associated X protein) است.افزایش بیان Bax روی نفوذ پذیری غشای میتوکندری اثر می‌گذارد که منجر به فعال شدن کاسپازها می‌گردد و در نهایت، طی آن اجزای سلولی تجزیه می‌شوند.

به طور متضاد، Bcl-۲ (B-cell lymphoma-۲) یکی از ژن های کلیدی شناخته شده برای تنظیم کاهشی Bax است و بنابراین، قدرت مهار مسیر میتوکندریایی آپوپتوز را دارد. بیان بیش از حد Bcl-۲، فعالیت کاسپاز را تضعیف می کند که یک ارتباط احتمالی بین این عوامل ایجاد می کند (۱۱). در پژوهش های قبل، برای تأیید این که LPS موجب استرس سلولی می شود، همچنان که با افزایش در فعالیت JNK (c-Jun N-terminal kinases) و C-jun نشان داده شده است، فعال شدن Caspase-۳ در برش های هیپوکمپ مورد بررسی قرار گرفته است که نتایج حاکی از فعال شدن Caspase-۳، به طور همزمان با فعال شدن JNK در سلول‌های گرانولی ناحیه‌ی شکنج دندانه‌ای (DG یا Dentate gyrus) در هیپوکمپ می‌باشد (۱۲).

به منظور بررسی اثر LPS روی یادگیری و حافظه، یک گروه تحقیقاتی به مدت ۵ روز و به صورت مداوم به رت‌ها LPS تزریق کردند که نتایج به دست آمده نشان داد که تعداد شوک های الکتریکی لازم برای آموزش رت های LPS دریافت کرده، بیشتر شده است که مخالف با گروه شاهد می‌باشد (۱۳). Choi و همکاران نشان داده‌اند که موش‌هایی که LPS دریافت کرده‌اند، در روزهای اول و سوم بعد از دریافت LPS، در دستگاه سنجش حافظه ی موریس واتر میز (Morris water maze)، اختلال حافظه نشان می‌دهند (۱۴).

LPS موجب افزایش فعال شدن iNOS (Inducible nitric oxide synthase) و از این رو تولید NO (Nitric oxide) می‌شود (۱۶-۱۵). پروکسی نیتریت مشتق شده از NO می تواند موجب آسیب نیترایل برگشت به میتوکندری، آزاد شدن سیتوکروم C و فعال شدن Caspase-۳ شود (۱۷) که در نهایت، موجب آپوپتوز برونی می‌گردد.

روش‌ها

در این مطالعه از موش‌های صحرایی (Rat) نر، نژاد ویستار (Wistar) در محدوده‌ی وزنی ۲۵۰-۲۳۰ g که در مرکز پرورش حیوان دانشگاه خوارزمی تهران پرورش داده شدند و تحت مقررات نگهداری و کار تحقیقاتی با حیوانات آزمایشگاهی (با حرارت کنترل شده‌ی ۲ ± ۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۱۲ ساعت تاریکی، ۱۲ ساعت روشنایی) قرار داشتند و آب و

Proof Version

www.SID.ir

Archive of SID

غذای مخصوص حیوان (Pellet) به میزان کافی و همواره در دسترس بود.

مواد و لوازم جهت انجام مراحل مختلف تحقیق

الف – مواد مورد نیازجهت تزریق LPS:

محلول سالینی LPS، تزریق LPS به وسیله‌ی سرنگ انسولین

ب- لوازم مورد نیاز جهت جداسازی هیپوکمپ و انجام وسترن بلات (Western blot) (۱۸)

ه– گروه‌های مورد بررسی در این تحقیق شامل موارد زیر بود:

کلیه‌ی جمعیت مورد بررسی به دو گروه اصلی بررسی‌های مولکولی و آزمون رفتاری تقسیم شد. گروه‌هایی که برای آزمایش‌های مولکولی در نظر گرفته شدند، شامل ۶ گروه می‌باشند که شامل یک گروه شاهد و گروه‌های مورد ساعت‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۲۰ بعد از تزریق LPS بودند. گروه شاهد مقدار ۲۰۰ µl/kg سالین و گروه‌های دیگر مقدار ۳۰۰ µg/kg از LPS را در ۲۰۰ µl از سالین دریافت کردند و سپس در ساعت‌های مقرر به منظور انجام آزمون‌های مورد نظر گردن زده شدند.

ر– استخراج پروتئین از بافت هیپوکمپ (۱۸)

ش- مواد و لوازم مورد نیاز جهت انجام آزمون سنجش فعالیت Caspase-۳:

کیت سنجش فعالیت Caspase-۳، آب مقطر، سمپلر و سر سمپلر، دستگاه الایزا ریدر

ص- روش سنجش فعالیت Caspase-۳:

کیت سنجش فعالیت Caspase-۳ حاوی دو محلول به نام‌های A و B می‌باشد. به منظور انجام این آزمون، مقدار ۲۵ µl از محلول A را به همراه ۲۵ µl آب مقطر در ول‌های یک پلیت ۹۶ خانه‌ای می‌ریزیم و سپس مقدار ۲۵ µl از محلول B را به هر یک از ول‌ها اضافه می‌کنیم و به سرعت مقدار جذب در طول موج ۵۴۰ nm را در دستگاه الایزا ریدر می‌خوانیم. افزایش جذب به منزله‌ی افزایش فعالیت Caspase-۳ می‌باشد.

ض- آزمون رفتاری شاتل باکس (Shuttle-box) (۱۳)

آنالیز آماری

تمام داده‌ها حاصل میانگین ۳ بار تکرار مستقل از هم، هر بار ۳ بار آزمایش، هستند. تمام یافته‌ها به صورت Mean ± SEM ثبت شدند. آنالیز واریانس‌ها با آزمون ANOVA (Analysis of variance) انجام شد. $P < ۰/۰۰۱$ معیار معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

۱- LPS موجب افزایش مقدار عوامل آپوپتوزی و کاهش عوامل ضد آپوپتوزی می‌شود.

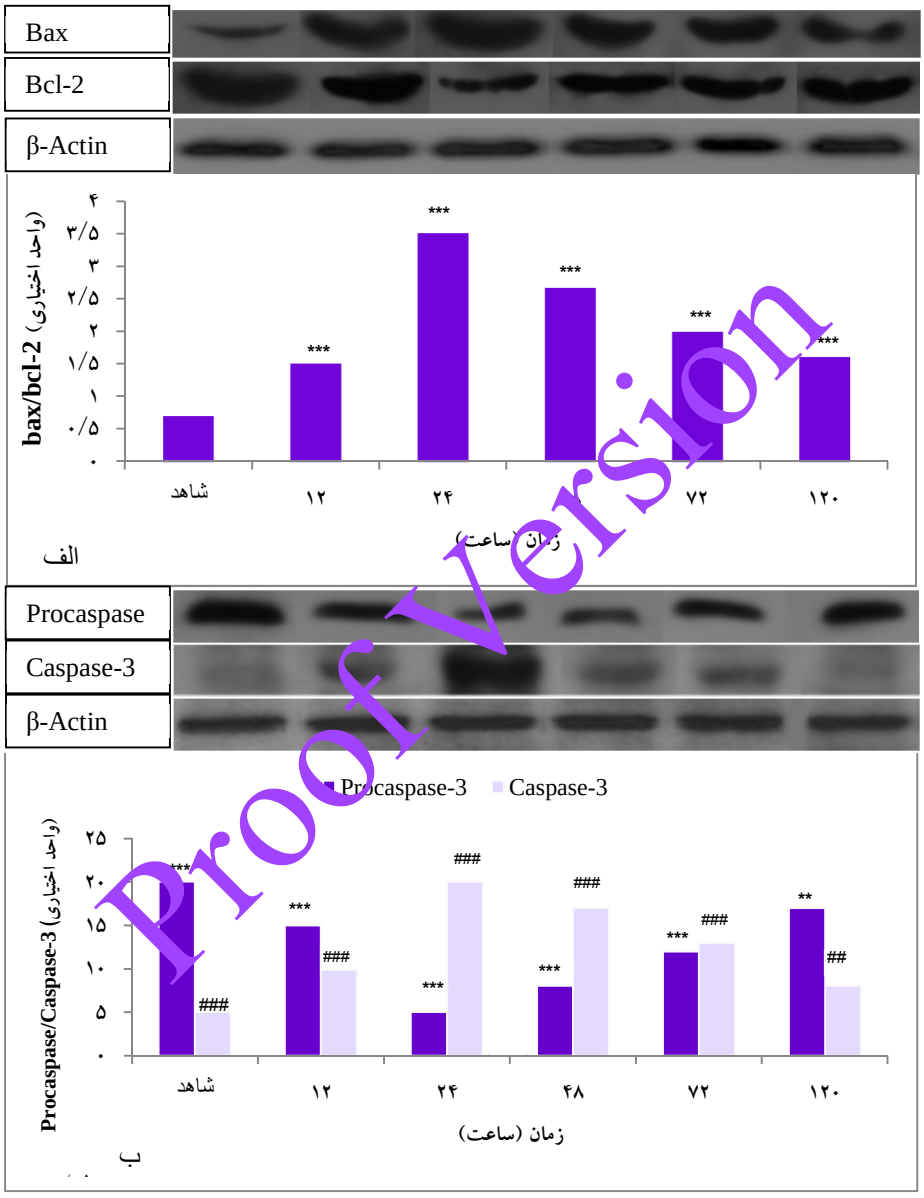
در این آزمایش، به منظور بررسی روند آپوپتوز سطوح عوامل آپوپتوزی Caspase-۳ و Bax و نیز سطح عامل ضد آپوپتوزی Bcl-۲ سنجیده شد. عوامل آپوپتوزی در یک روند تقریبی مشابه، افزایشی را در ساعت ۲۴ نشان دادند که این تأخیر ممکن است به دلیل وجود سد خونی- مغزی و به دنبال آن، مقاومت سلول‌های ناحیه‌ی هیپوکمپ در مقابل بروز مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول باشد. اندازه‌گیری میزان عامل Bcl-۲ روند تقریبی متقابلی با Bax را نشان می‌دهد؛ یعنی در زمان‌هایی که Bax سیر افزایشی داشته است، این عامل به مقادیر پایین کاهش یافته و به این طریق، سد دفاعی در برابر آپوپتوز شکسته شده است. در ساعت‌های بعد نیز تغییر چشمگیری در

Proof Version

www.SID.ir

Archive of SID

سطح این عوامل رخ نداده است که شاید به این دلیل باشد که سایر سلول‌های هیپوکمپ، تدابیری را برای مقابله با آپوپتوز تدارک دیده باشند که در این مطالعه، مجالی برای سنجش این موضوع وجود نداشت. چون در فاصله‌ی بین ساعت‌های ۱۲ و ۲۴ نیز سنجشی صورت نگرفت، به طور دقیق مشخص نشد که این افزایش در آپوپتوز در واقع در ساعت ۲۴ رخ داده است یا این که قبل از آن شروع شده است (شکل ۱).



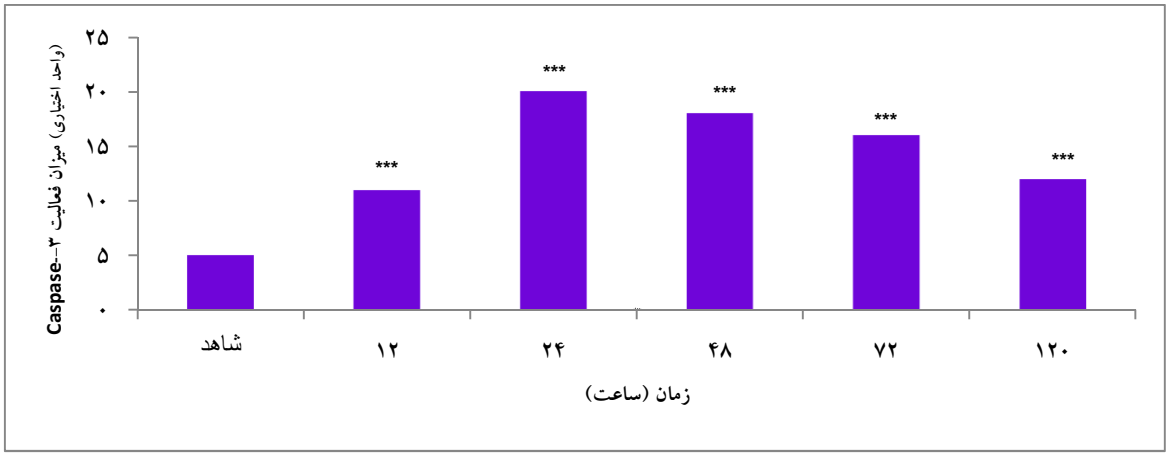
شکل ۱. اثرات تزریق درون صفاقی LPS (Lipopolysaccharide) بر تغییرات عوامل آپوپتوزی. الف) نتایج وسترن بلات و آنالیز کمی عوامل Bax (Bcl-۲-associated X protein) و Bcl-۲ (B-cell lymphoma-۲)، ب) نتایج وسترن بلات و آنالیز کمی عامل Caspase-۳. این شکل نشان می‌دهد که تزریق لیپوپلی‌ساکارید موجب افزایش سطح عوامل آپوپتوزی Bax و Caspase-۳ و به طور متقابل، کاهش سطح عامل ضد آپوپتوزی Bcl-۲ می‌شود. مقدار ۶۰ µg از پروتئین در وسترن بلات بر روی SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis) جدا شد و تحت تأثیر آنتی بادی‌های ضد Bax، Bcl-۲، Caspase-۳ و β-actin قرار گرفت.

$^{***}P < ۰/۰۰۱$؛ $^{**}P < ۰/۰۱۰$؛ $^{###}P < ۰/۰۰۱$؛ $^{##}P < ۰/۰۱۰$ تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه شاهد

Proof Version

www.SID.ir
www.mui.ac.ir

Archive of SID



شکل ۲. بررسی میزان فعالیت Caspase-۳. این نتایج مؤید نتایج حاصل از وسترن بلات برای این عامل آپوپتوزی می‌باشند. این نتایج با استفاده از کیت سنجش فعالیت Caspase-۳ در دستگاه الایزا ریدر به دست آمده‌اند.

$P < ۰/۰۰۱$* تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه شاهد**

۲- سنجش فعالیت Caspase-۳ توسط کیت آن نتایج وسترن بلات را تأیید می‌کند.

در این طرح به منظور کسب اطمینان بیشتر در مورد فعالیت Caspase-۳ و بروز آپوپتوز از کیت سنجش فعالیت Caspase-۳ هم استفاده شد که نتایج به دست آمده، روندی را مشابه با وسترن بلات برای این عامل آپوپتوزی نشان می‌دهد (شکل ۲).

۳- آزمون رفتاری انجام شده در این مطالعه بروز اختلال در حافظه را نشان می‌دهد.

در این طرح به منظور بررسی اثر LPS روی حافظه، از آزمون رفتاری شاتل باکس استفاده شد. این آزمون، تنها به منظور نشان دادن اثر اندوتوکسین در حافظه انجام شد و روند زمانی خاصی مد نظر نبود و نتایج به دست آمده، نشان داد که با وجود این که در ساعت ۱۲ اختلال در حافظه دیده نمی‌شود و حیوان از اتاقک روشن به اتاقک تاریک وارد نمی‌شود؛ اما این امر در ساعت ۲۴ اتفاق می‌افتد و حیوان به اتاقک تاریک وارد می‌شود. بنابراین با قاطعیت نمی‌توان گفت که عدم ورود حیوان به اتاقک تاریک در ساعت ۱۲ به این دلیل است که حافظه‌ی حیوان به درستی کار می‌کند، بلکه ممکن است به این دلیل باشد که التهاب ایجاد شده در حیوان باعث بروز عدم تمایل حیوان برای ورود به اتاقک تاریک به دلیل ضعف و بی‌حالی باشد و این ضعف در ساعت ۲۴ از بین می‌رود و حیوان هر چند با تأخیر اما در نهایت به اتاقک تاریک وارد می‌شود. در ساعت ۴۸ نیز نتیجه‌ای مشابه با ساعت ۲۴ رخ داد و حیوان به اتاقک تاریک وارد شد (شکل ۳).

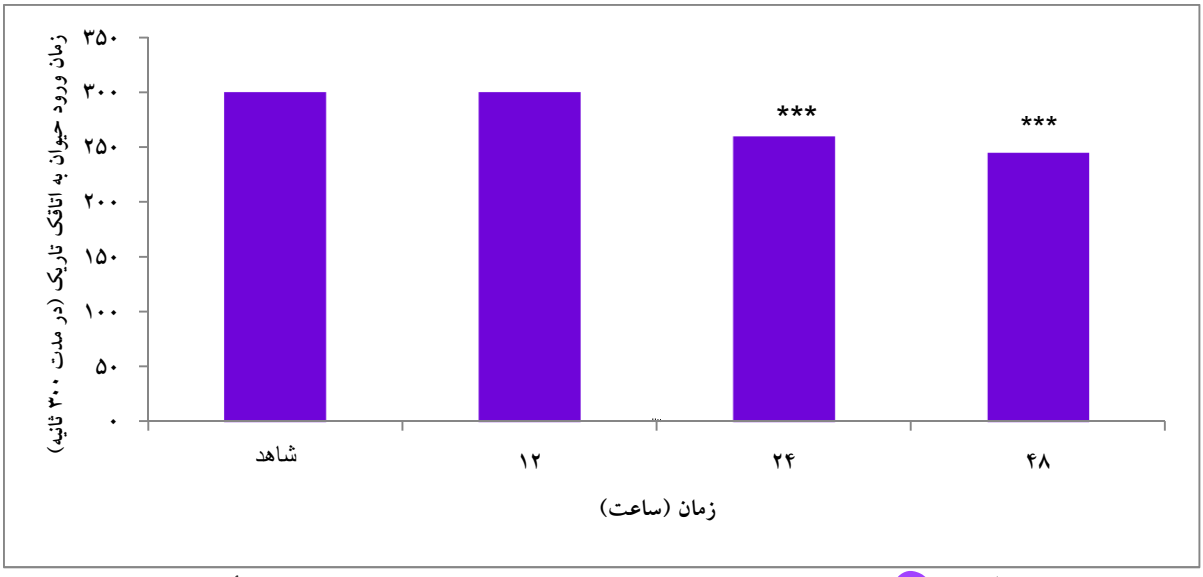
بحث

مطالعه‌ی حاضر به طور مشخصی افزایش سطح عوامل آپوپتوزی Caspase-۳ و Bax و نیز کاهش سطح عامل ضد آپوپتوزی Bcl-۲ را نشان می‌دهد. آزمون سنجش فعالیت Caspase-۳ با استفاده از کیت آن انجام شد و نتیجه‌ی به دست آمده، مؤید فعال شدن این عامل آپوپتوزی بود. همچنین موش‌هایی که LPS دریافت کرده بودند، در زمان کمتری نسبت به گروه شاهد به اتاقک تاریک شاتل باکس وارد شدند.

Proof Version

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳. نتایج حاصل از آزمون آماری شاتل باکس. این نتایج همچنان که در بالا گفته شد، نشان دهنده‌ی ورود با تأخیر حیوان به اتاقک تاریک می‌باشد که اثر LPS (Lipopolysaccharide) را در بروز اختلال در حافظه در آزمایش طراحی شده نشان می‌دهد. حیوانات در روز آموزش، نتایج مشابهی را در عدم ورود به اتاقک تاریک، به دنبال دریافت اولین شوک نشان دادند.

***P < ۰/۰۰۱ تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه شاهد**

بیماری آلزایمر یک بیماری پیش رونده و برگشت ناپذیر است که به آهستگی حافظه و مهارت‌های فکری را نابود می‌سازد و سرانجام حتی توانایی انجام ساده‌ترین فعالیت‌ها را نیز از فرد می‌گیرد. مهم‌ترین مشخصه‌ی این بیماری، انباشتگی پروتئین آمیلوئید بتا (Aβ یا Amyloid-beta) در سلول‌های عصبی در مغز و تجمع پروتئین Tau در نورون‌ها است. در این بیماری، انتقال اطلاعات در سیناپس‌ها دچار اختلال می‌شود و تعداد سیناپس‌ها رو به زوال می‌رود. آپوپتوز نوعی از مرگ سلولی به صورت یکسری از مراحل ملکولی در یک سلول است که منجر به مرگ آن سلول می‌شود. این یک روش طبیعی بدن برای رها شدن از سلول‌های غیر ضروری یا غیر طبیعی است.

پروتئین‌های خانواده‌ی Bcl-۲ مرحله‌ای را در مسیر حفاظت شده‌ی آپوپتوز تنظیم می‌کنند. Bcl-۲ تنها انکوژنی است که از طریق مهار آپوپتوز، علاوه بر افزایش مستقیم تکثیر سلولی، عمل می‌کند. نسبت Bax/Bcl-۲ و نتایج تشکیل هوموديمرهای Bax-Bax که آپوپتوز را تحریک می‌کنند یا هترودیمرهای Bax/Bcl-۲ که آپوپتز را مهار می‌کنند، باعث یک مکانیسم تنظیمی داخل سلولی می‌شوند. در بیماری‌های نورودژنراتیو، افزایش بیان Bax با کاهش بقای سلول همراه است (۱۹). آپوپتوز، مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول است که به وسیله‌ی خانواده‌ی آنتی آپوپتوزهای Bcl-۲ تنظیم می‌شود که پروتئین‌های خانواده‌ی Bcl-۲ به وسیله‌ی پروتئین Bax مهار می‌شود و در نتیجه‌ی آن، منفذهایی در غشای میتوکندری شکل می‌گیرد که موجب آزاد شدن سیتوکروم C و فعال شدن کاسپازها می‌شود و در ادامه، آپوپتوز صورت می‌گیرد (۲۰).

LPS اندوتوکسین باکتریایی است که در بافت‌های محیطی از طریق تحریک سلول‌های شبه ماکروفاژی

Proof Version

www.SID.ir

Archive of SID

سبب تحریک سیستم ایمنی می‌شود (۲۱). یکی از چندین نتایج LPS روی مغز، فعال شدن JNK از طریق فسفریلاسیون آن به دنبال اتصال IL-1β (Interleukin-1 beta) به گیرنده‌اش می‌باشد (۲۲). مطالعات نشان داده است که فعال شدن JNK با تغییرات تحلیلی در سلول‌های کورتکس اینتورینال (۲۳) و نیز هیپوکمپ (۲۴) همراه است. JNK موجب فعال شدن عامل رونویسی C-jun (۲۵) می‌شود که در نهایت، می‌تواند ۸- Csspase و ۳-Caspase را که عوامل مرتبط با استرس و مرگ سلولی هستند، فعال کند (۲۶). نتایج به دست آمده از مطالعه‌ی حاضر به طور مشخصی افزایش سطح عوامل آپوپتوزی ۳-Caspase و Bax و نیز کاهش سطح عامل ضد آپوپتوزی ۲-Bcl را نشان می‌دهد. این‌ها عواملی تعیین کننده‌ی بقا یا مرگ سلولی هستند. آن چه مشخص است، این است که به دنبال تزریق درون صفاقی LPS، سطح عوامل آپوپتوزی در سلول‌های ناحیه‌ی هیپوکمپ افزایش می‌یابد. این تغییرات، شاید در ساعت‌های بعدی با سرعت کمتری پیش برود؛ زیرا آمادگی سایر سلول‌ها برای مقابله با بروز مرگ سلولی، بیشتر می‌شود؛ اما با قاطعیت نمی‌توان گفت که افزایش این آمادگی می‌تواند از بروز مرگ سلولی جلوگیری کند.

شدت افزایش سطح این عوامل آپوپتوزی در مطالعه‌ی حاضر به حدی است که می‌توان انتظار داشت مرگ سلولی در سطح وسیعی رخ دهد و به دنبال این واقعه، اختلال در حافظه بروز نماید. همچنین در پژوهش حاضر به منظور تأیید نتایج به دست آمده برای افزایش سطح ۳-Caspase، آزمون سنجش فعالیت ۳-Caspase با استفاده از کیت آن انجام شد که نتیجه‌ی به دست آمده مؤید فعال شدن این عامل آپوپتوزی می‌باشد. موش‌هایی که LPS دریافت کرده‌اند، در زمان کمتری نسبت به گروه شاهد به اتاقک تاریک شاتل باکس وارد شدند. به این صورت که در گروه شاهد و در گروه ساعت ۱۲، ورود به اتاقک تاریک شاتل باکس یا صورت نمی‌گیرد و یا این که در زمانی خیلی دیر رخ می‌دهد؛ اما در ساعت ۲۴ ورود موش‌ها به اتاقک تاریک سریع‌تر رخ داده است و می‌توان آن را نشانه‌ی بروز اختلال در حافظه دانست. این اختلال در ساعت ۴۸ بیشتر شد و موش‌ها در زمانی کمتر نسبت به سایر گروه‌ها به اتاقک تاریک وارد شدند.

بنابراین، نتیجه‌گیری می‌شود که با افزایش مدت زمان پس از تزریق LPS، تعداد بیشتری از سلول‌های ناحیه‌ی هیپوکمپ که در حافظه نقش دارند، دچار مرگ سلولی می‌شوند و فرایند حافظه دچار اختلال می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در دانشگاه خوارزمی تهران و با حمایت مالی این دانشگاه انجام گرفته است. بدین وسیله از تمامی افرادی که در اجرای این مطالعه همکاری نمودند، قدردانی می‌گردد.

References

1. Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. N Engl J Med 2010; 362(4): 329-44.
2. Mufson EJ, Counts SE, Perez SE, Ginsberg SD. Cholinergic system during the progression of Alzheimer's disease: therapeutic implications. Expert Rev Neurother 2008; 8(11): 1703-18.
3. Coleman P, Federoff H, Kurlan R. A focus on the synapse for neuroprotection in Alzheimer

www.SID.ir
www.mui.ac.ir
Proof Version

Archive of SID

disease and other dementias. Neurology 2004; 63(7): 1155-62.
4. Squire LR. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. Neurobiol Learn Mem 2004; 82(3): 171-7.
5. Gold CA, Budson AE. Memory loss in Alzheimer's disease: implications for development of therapeutics. Expert Rev Neurother 2008; 8(12): 1879-91.
6. Heneka MT, O'Banion MK. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. J Neuroimmunol 2007; 184(1-2): 69-91.
7. Khan AA, Iadarola M, Yang HY, Dionne RA. Expression of COX-1 and COX-2 in a clinical model of acute inflammation. J Pain 2007; 8(4): 349-54.
8. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol 2007; 35(4): 495-516.
9. Roth KA. Caspases, apoptosis, and Alzheimer disease: causation, correlation, and confusion. J Neuropathol Exp Neurol 2001; 60(9): 829-38.
10. Mazumder S, Plesca D, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis. Methods Mol Biol 2008; 414: 13-21.
11. Breitner JC, Gau BA, Welsh KA, Plassman BL, McDonald WM, Helms MJ, et al. Inverse association of anti-inflammatory treatments and Alzheimer's disease: initial results of a co-twin control study. Neurology 1994; 44(2): 227-32.
12. Barry CE, Nolan Y, Clarke RM, Lynch A, Lynch MA. Activation of c-Jun-N-terminal kinase is critical in mediating lipopolysaccharide-induced changes in the rat hippocampus. J Neurochem 2005; 93(1): 221-31.
13. Tanaka S, Ide M, Shibutani T, Ohtaki H, Numazawa S, Shioda S, et al. Lipopolysaccharide-induced microglial activation induces learning and memory deficits without neuronal cell death in rats. J Neurosci Res 2006; 83(4): 557-66.
14. Choi DY, Lee JW, Lin G, Lee YK, Lee YH, Choi IS, et al. Obovatol attenuates LPS-induced memory impairments in mice via inhibition of NF-kappaB signaling pathway. Neurochem Int 2012; 60(1): 68-77.
15. Semmler A, Okulla T, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Heneka MT. Systemic inflammation induces apoptosis with variable vulnerability of different brain regions. J Chem Neuroanat 2005; 30(2-3): 144-57.
16. Yamada K, Komori Y, Tanaka T, Senzaki K, Nikai T, Sugihara H, et al. Brain dysfunction associated with an induction of nitric oxide synthase following an intracerebral injection of lipopolysaccharide in rats. Neuroscience 1999; 88(1): 281-94.
17. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. Physiol Rev 2007; 87(1): 315-424.
18. Cakala M, Malik AR, Strosznajder JB. Inhibitor of cyclooxygenase-2 protects against amyloid beta peptide-evoked memory impairment in mice. Pharmacol Rep 2007; 59(2): 164-72.
19. Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. Mol Cell Biochem 2011; 351(1-2): 41-58.
20. Perrin BJ, Huttenlocher A. Calpain. Int J Biochem Cell Biol 2002; 34(7): 722-5.
21. Quan N, Sundar SK, Weiss JM. Induction of interleukin-1 in various brain regions after peripheral and central injections of lipopolysaccharide. J Neuroimmunol 1994; 49(1-2): 125-34.
22. Loscher CE, Donnelly S, Mills KH, Lynch MA. Interleukin-1beta-dependent changes in the hippocampus following parenteral immunization with a whole cell pertussis vaccine. J Neuroimmunol 2000; 111(1-2): 68-76.
23. Vereker E, Campbell V, Roche E, McEntee E, Lynch MA. Lipopolysaccharide inhibits long term potentiation in the rat dentate gyrus by activating caspase-1. J Biol Chem 2000; 275(34): 26252-8.
24. Lonergan PE, Martin DS, Horrobin DF, Lynch MA. Neuroprotective actions of eicosapentaenoic acid on lipopolysaccharide-induced dysfunction in rat hippocampus. J Neurochem 2004; 91(1): 20-9.
25. Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Derijard B, et al. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. EMBO J 1996; 15(11): 2760-70.
26. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. Pharmacol Ther 2001; 92(1): 57-70.

Proof Version

www.SID.ir