تحقیقی

اثر TGF-α بر سلول‌های عصبی بنیادی شکنج دندانه‌ای و سلول‌های پیرامیدال ناحیه CA1 هیپوکامپ در موش صحرایی به دنبال ایسکمی - ریپرفیوژن

حسن علی‌پناه‌زاده[1]، دکتر منصوره سلیمانی[2]، دکتر سارا سلیمانی اصل[3]، دکتر مهدی مهدیزاده*[4]، دکتر مجید کاتبی[5]

۱- کارشناس ارشد، گروه علوم تشریحی ، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران. ۲- استادیار گروه علوم تشریحی ، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران. ۳- استادیار گروه علوم تشریحی ، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی همدان. ۴- استاد ، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی و گروه علوم تشریحی ، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران. ۵- استادیار گروه علوم تشریحی ، مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی ، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان.

چکیده

زمینه و هدف : *در ایسکمی مغزی، کاهش میزان متابولیت‌های مغزی در اثر کاهش جریان خون به کاهش ذخیره اکسیژن و در نتیجه مرگ بافت مغزی یا سکته مغزی منجر می‌شود. این مطالعه به منظور تعیین اثر TGF-α (transforming growth factor alpha) بر سلول‌های عصبی بنیادی شکنج دندانه‌ای و سلول‌های پیرامیدال ناحیه CA1 هیپوکامپ براساس مطالعات ایمونوهیستوشیمی و رفتاری در مدل تجربی ایسکمی – ریپرفیوژن مغزی در موش صحرایی نر انجام شد.*

روش بررسی : *این مطالعه تجربی روی ۴۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۳۰۰-۲۵۰ گرم در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد. موش‌ها به‌صورت تصادفی در گروه‌های کنترل (تعداد:۷)، شم (تعداد:۷)، ایسکمی (تعداد:۱۴) و درمان (تعداد:۱۴) قرار گرفتند. برای گروه کنترل مداخله‌ای صورت نگرفت. گروه شم فقط تحت استرس جراحی قرار گرفت. گروه ایسکمی (n=14) به دو زیرگروه تقسیم شد. ۷ سر موش تحت القاء ایسکمی با انسداد شریان‌های کاروتید مشترک به‌مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند و ۷روز بعد به روش استریوتاکسی ۵ میکرولیتر PBS (phoshate buffer salin) به داخل بطن راست تزریق شد و در روز ۱۲ ازنظر بیان Nestin بررسی شدند. ۷ سر موش باقیمانده پس از القاء ایسکمی و دریافت PBS دوماه بعد از نظر حافظه فضایی بررسی شدند. گروه درمان (n=14) به دو زیرگروه تقسیم شد. ۷ سر موش تحت القاء ایسکمی قرار گرفتند و ۷روز بعد ۵۰ نانوگرم TGF-α حل شده در ۵میکروگرم PBS به روش استریوتاکسی به داخل بطن راست تزریق شد. سپس در روز دوازدهم از نظر بیان Nestin بررسی شدند. ۷ سر موش باقیمانده پس از القاء ایسکمی و دریافت TGF-α دوماه بعد از نظر حافظه فضایی بررسی شدند. سپس از هر گروه نیمی از موش‌ها (۵ سر) در روز ۱۲ و نیمی دیگر (۵ سر) در روز ۷۲ بعد از فیکساسیون با روش پرفیوژن داخل قلبی از نظر بافتی با روش ایمونوهیستوشیمی و رنگ‌آمیزی نیسل بررسی شدند. برای بررسی حافظه فضایی از روش morris water maze استفاده شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-16 و آزمون ANOVA تجزیه و تحلیل شدند.*

یافته‌ها : *تجویز TGF-α به‌دنبال ایسکمی - ریپرفیوژن موجب افزایش بیان سلول‌های عصبی در شکنج دندانه‌ای شد و اختلاف معنی‌داری در تعداد نورون‌های پیرامیدال ناحیه CA1 هیپوکامپ موش‌ها در گروه‌های ایسکمی و درمان مشاهده گردید (P<۰/۰۵). همچنین در آزمون ماز آبی اختلاف معنی‌داری در شاخص حافظه فضایی در دو گروه ایسکمی و درمان مشاهده شد (P<۰/۰۵).*

نتیجه‌گیری : *این مطالعه نشان داد که استفاده از TGF-α باعث کاهش آسیب‌های ناشی از ایسکمی ریپرفیوژن به صورت افزایش تعداد نورون‌های پیرامیدال، بیان Nestin و بهبود حافظه می‌گردد.*

کلید واژه‌ها : *ایسکمی ، ریپرفیوژن ، حافظه فضایی ، نوروژنزیس ، هیپوکامپ ، TGF-α*

* نویسنده مسؤول : دکتر مهدی مهدیزاده ، پست الکترونیکی mehdizadehm@tums.ac.ir

نشانی : تهران ، دانشگاه علوم پزشکی تهران ، دانشکده پزشکی ، گروه علوم تشریحی ، تلفن ۸۸۶۲۲۶۸۹-۰۲۱ ، نمابر ۸۸۶۲۲۶۸۹

وصول مقاله : ۹۰/۶/۱۵ ، اصلاح نهایی : ۹۰/۹/۲۸ ، پذیرش مقاله : ۹۰/۱۰/۱۸

مقدمه

سکته مغزی یکی ازمهم‌ترین دلایل مرگ و میر و معلولیت در جهان است و افزایش سن مهم‌ترین عامل خطر آن می‌باشد (۱). ایسکمی مغزی عبارت است از کاهش میزان متابولیت‌های مغزی در اثر کاهش جریان خون که به کاهش ذخیره اکسیژن و در نتیجه مرگ بافت مغزی یا سکته مغزی منجر می‌شود (۲). در طی ایسکمی میزان اکسیژن و ATP مغز کاهش یافته و به‌دنبال آن میزان برداشت رادیکال‌های آزاد کاهش می‌یابد و در نتیجه رادیکال‌های آزاد و

Archive of SID

www.SID.ir

لاکتات ناشی از تنفس بی‌هوازی افزایش می‌یابد که موجب اسیدوز و مرگ سلولی می‌شود. در نتیجه فرایند ایسکمی - ریپرفیوژن، رادیکال‌های آزاد اکسیژن واکنش‌دهنده از قبیل پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل (OH^-) تولید می‌شوند که به بافت هدف حمله کرده و به‌شدت آسیب می‌رساند و آسیب ناشی از آن به‌مراتب بیشتر از ایسکمی تنها است (۳).

هیپوکامپ نقش مهمی را در تشکیل حافظه جدید و تجزیه و تحلیل اطلاعات فضایی ایفا می‌کند (۴). این ناحیه از مغز توسط شریان کرویدی قدامی که شاخه‌ای از کاروتید داخلی می‌باشد؛ خونرسانی می‌شود. این شریان به دلیل بلند و نازک بودن مستعد ترومبوزیس است. بنابراین هیپوکامپ جزو اولین مناطقی از مغز است که در بیماری‌های مغزی مثل آلزایمر، هانتیگتون، صرع، سکته‌مغزی، ایسکمی و به‌ویژه ترومای مغزی دچار آسیب می‌شود (۵). با توجه به نقش حیاتی هیپوکامپ، کاهش آسیب وارده و ترمیم آن در پی بیماری‌ها و آسیب‌های تروماتیک بسیار با اهمیت است.

سلول‌های عصبی جدیدی در نواحی مختلف مغز بالغ شامل dentate gyrus (DG) و sub ventricular zone (SVZ) تولید می‌شوند (۶و۷). همچنین به دنبال آسیب هیپوکامپ در اثر بیماری‌ها، ایسکمی وآسیب‌های تروماتیک نوروژنزیس تحت تاثیر عوامل درونی در ناحیه DG و SVZ برای جایگزینی نورون‌های آسیب‌دیده و ترمیم ضایعه افزایش می‌یابد (۸).

افزایش نوروژنزیز ناشی از سلول‌های بنیادی واقع در SVZ و DG مغز بالغ در گونه‌های مختلف پستانداران ممکن است موجب پیشرفت بهبود مورفولوژیکی و عملکردی بعد از ایسکمی مغز، تروما یا آسیب‌های دژنراتیو اولیه شود (۹)؛ ولی این روند افزایشی درونی قادر به جبران آسیب وارده نیست. لذا استفاده از عواملی که میزان نوروژنزیز را در DG و SVZ تحریک کند؛ می‌تواند گامی موثر در بهبود و ترمیم ضایعات هیپوکامپ به‌دنبال ایسکمی مغزی باشد.

TGF-α (transforming growth factor alpha) اولین پلی‌پپتید میتوژن و یکی از اعضای خانواده EGF (epidermal growth factors) است که رسپتورهای تیروزین کیناز سرتاسر غشایی EGFR را فعال می‌کنند. فعالیت تیروزین کیناز به ترتیب انتقال آبشاری از سیگنال‌ها را آغاز می‌کند که موجب تغییرات بیوشیمیایی مختلفی در سلول می‌گردد (۱۰) این تغییرات شامل افزایش سطح کلسیم داخل سلولی، افزایش گلیکولیز و افزایش بیان بعضی از ژن‌ها مانند ژن‌های EGFR است که در نهایت منجر به سنتز DNA و تکثیر سلول می‌گردد. عوامل رشد خانواده EGF در رشد، تمایز، حفظ و ترمیم بافت‌های مختلف، مانند سیستم عصبی و دستگاه گوارش دخالت دارند. این عوامل رشد توسط انواع مختلف سلول‌ها اعم از نورون‌ها، سلول‌های گلیال و سلول‌های اپیتلیال روده تولید و نقش مهمی را در تنظیم تکثیر، تمایز، مهاجرت، زنده‌ماندن سلول و حفظ هموستاز بافت ایفا می‌کنند. TGF-α که یکی از اعضای این خانواده است؛ در سطح بالایی در سیستم عصبی مرکزی بیان می‌شود و در مقایسه با سایر لیگاندها فراوانی و توزیع گسترده‌تری دارد (۱۰). TGF-α به‌عنوان فراوان‌ترین لیگاند EGF-R در تکامل سیستم عصبی مرکزی بالغین به‌خصوص در استریاتوم، بولب بویایی، هیپوکامپ و SVZ و ساقه مغز شناخته شده است (۱۱). باتوجه به نقش این عامل رشد در تکامل سیستم عصبی مرکزی و عدم وجود مطالعه‌ای دال بر نقش آن در بهبود نوروردژنراسیون القاء شده توسط ایسکمی – ریپرفیوژن؛ این مطالعه به منظور تعیین اثر TGF-α بر سلول‌های عصبی بنیادی شکنج دندانه‌ای و سلول‌های پیرامیدال ناحیه CA1 هیپوکامپ براساس مطالعات ایمونوهیستوشیمی و رفتاری در مدل تجربی ایسکمی – ریپرفیوژن مغزی در موش صحرایی نر انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۴۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۳۰۰-۲۵۰ گرم خریداری شده از انستیتو پاستور تهران در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران از تابستان ۱۳۸۸ تا پاییز ۱۳۸۹ انجام شد.

این مطالعه با تصویب کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران و طبق پروتکل اصول کار با حیوانات انجام گردید.

حیوانات تحت شرایط استاندارد با دوره روشنایی و تاریکی ۱۲ساعته و دمای ۳±۲۱ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و دسترسی کامل به آب آشامیدنی و غذای کافی داشتند.

گروه بندی حیوانات

حیوانات به صورت تصادفی انتخاب و در چهار گروه کنترل، شم، ایسکمی و درمان قرار گرفتند.

در گروه کنترل (n=7) هیچ مداخله‌ای روی حیوانات انجام نشد.

حیوانات گروه شم (n=7) تحت استرس جراحی بدون مسدود کردن شریان‌های کاروتید مشترک قرار گرفتند.

حیوانات گروه ایسکمی (n=14) به‌طور تصادفی در دو گروه زیر قرار گرفتند:

الف) تعداد ۷ سر موش تحت القاء ایسکمی قرار گرفتند و ۷ روز بعد به روش استریوتاکسی ۵ میکرولیتر PBS به داخل بطن راست تزریق شد و در روز ۱۲ ازنظر بیان Nestin بررسی شدند. مطالعات نشان می‌دهند که ۱۲ روز بعد از القاء نوروژنزیس اوج بیان Nestin می‌باشد (۱۲).

ب) تعداد ۷ سر موش پس از القاء ایسکمی و دریافت PBS دوماه بعد از نظر حافظه فضایی بررسی شدند. با توجه به سیناپتوژنز

www.SID.ir

دوماه بعد از القاء نوروژنزیس، حافظه فضایی برای تایید فیزیکی فانکشنال شدن سیناپس‌ها انجام گردید (۹).

گروه درمان (n=14) : به‌طور تصادفی در دو زیرگروه قرار گرفتند:

الف) تعداد ۷ سر موش تحت القاء ایسکمی قرار گرفتند. ۷روز بعد ۵۰ نانوگرم TGF-α حل شده در ۵میکروگرم PBS به روش استریوتاکسی به داخل بطن راست تزریق شد. سپس در روز دوازدهم از نظر بیان Nestin بررسی شدند (۱۲).

ب) تعداد ۷ سر موش پس از القاء ایسکمی و دریافت TGF-α دوماه بعد از نظر حافظه فضایی بررسی شدند.

ایجاد مدل ایسکمی

برای ایجاد مدل ایسکمی ابتدا حیوانات با استفاده از مخلوط کتامین (شرکت دارو پخش، ایران) ۱۰۰میلی‌گرم برای هرکیلوگرم وزن و گزیلازین (شرکت دارو پخش، ایران) ۱۰ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم وزن بیهوش شدند. سپس تحت شرایط استریل در قسمت قدامی گردن برشی به اندازه ۱/۵-۱ سانتی‌متر داده شد و پس از مشخص کردن شریان کاروتید مشترک، با استفاده از کلمپ‌های مخصوص این شریان به مدت ۳۰ دقیقه مسدود گردید. پس از آن کلمپ‌ها برداشته شد تا مجدداً جریان خون برقرار گردد (۱۳).

رنگ‌آمیزی نیسل (Nissl staining)

برای بررسی کاهش تعداد سلول به دنبال ایسکمی در ناحیه CA1 هیپوکامپ، از رنگ‌آمیزی کرزیل ویوله استات ۰/۱ درصد استفاده شد. در این رنگ‌آمیزی سلول‌های سالم به‌صورت سلول‌های یوکروماتین گرد دیده می‌شوند. از هر گروه ۴ سر موش و از هر موش تعداد ۱۰ برش برای رنگ‌آمیزی نیسل انتخاب گردید. بعد از تهیه عکس توسط نرم‌افزار Olysia bio report، شمارش سلولی در یک میلی‌متر مربع انجام شد. بدین منظور مغز موش‌های صحرایی در روز ۱۲ و بعد از پرفیوژن داخل قلبی با پارافرمالدهید ۴درصد خارج و پس از آماده‌سازی بافتی با پارافین قالب‌گیری شد. سپس مقاطع ۱۰میکرومتری تهیه و مقاطع با رنگ کریزل ویوله رنگ‌آمیزی گردید.

ایمونوهیستوشیمی

برای بررسی اثر القایی TGF-α بر سلول‌های عصبی بنیادی DG بیان پروتین Nestin با روش ایمونوهیستوشیمی انجام شد. مقاطع طبق روشی که در رنگ‌آمیزی نیسل توضیح داده شد؛ تهیه گردید و بعد از شفاف‌سازی و آبدهی، برای بلاک کردن لام‌ها در محلول ۱۰درصد پروکسیدهیدروژن، به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند و پس از احیای آنتی‌ژن با سیترات بافر و برداشتن آنتی‌ژن‌های نامربوط با BSA لام‌ها با آنتی‌بادی Nestin (abcam,ca:AB6142) به مدت یک‌ساعت، آنتی‌بادی secondary goat polyclonal (HRP) (abcam,ca6789) به مدت یک‌ساعت و با DAB substrate kit (CA number :11718096001) به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند و در نهایت برای رنگ‌آمیزی متضاد از رنگ نیسل استفاده گردید.

بررسی حافظه فضایی با دستگاه Morris water maze

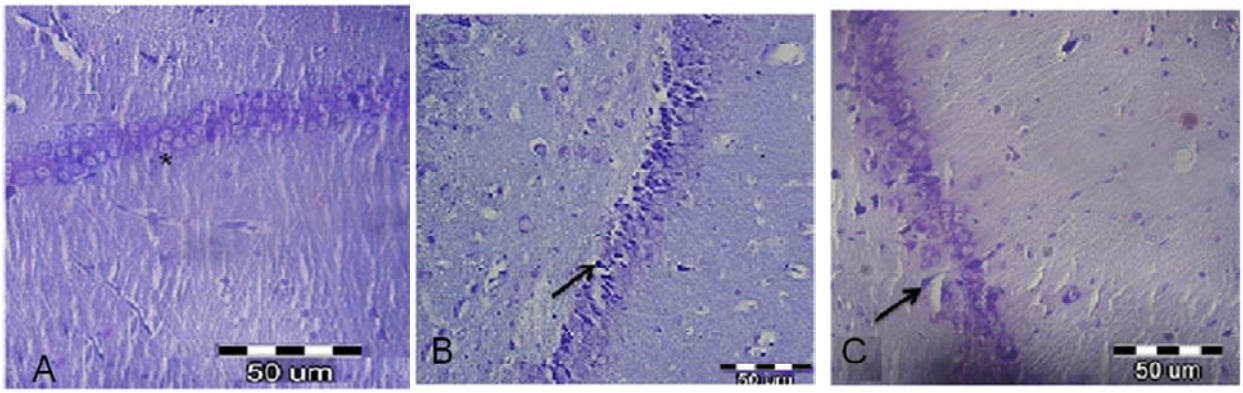
برای بررسی حافظه فضایی به دنبال به‌کار بردن TGF-α از دستگاه Morris water maze استفاده شد. این دستگاه برای بررسی یادگیری و حافظه فضایی طراحی شده و شامل حوضچه استوانه‌ای سیاه‌رنگ با قطر ۱۳۶ سانتی‌متر و ارتفاع ۶۰ سانتی‌متر می‌باشد که تا ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر با آب ۲۰-۱۹ درجه سانتی‌گراد پر می‌شود. این حوضچه به صورت فرضی به چهار ربع دایره تقسیم شده و سکوی کوچکی از جنس پلکسی‌گلاس با قطر ۱۰ سانتی‌متر و در یک سانتی‌متری زیر سطح آب در مرکز یکی از چهار ربع دایره قرار دارد که حیوان می‌تواند برای فرار از آب روی آن قرار گیرد. یک فرستنده نور مادون قرمز به موش متصل و مسیر حرکت حیوان از طریق یک دوربین مدار بسته که نور مادون قرمز را ردیابی کرده است؛ به کامپیوتر انتقال می‌یابد. هر موش به مدت ۳ روز و هر روز دو بلوک وهر بلوک شامل چهار کارآزمایی تحت آموزش قرار گرفتند. در هر کارآزمایی حیوان از یکی از چهار نقطه شروع شمال، جنوب، شرق یا غرب در آب رها شد. به‌طوری که صورتش به طرف آب حوض بود. یک کارآزمایی زمانی اتمام می‌یافت که موش بر روی سکو می‌رفت یا ۹۰ ثانیه شنا می‌کرد. موش‌هایی که سکو را پیدا نکردند؛ به روی سکو منتقل شدند. در هر دو حالت فوق به حیوان ۲۰ ثانیه فرصت داده شد که روی سکو بماند. پس از اتمام بلوک اول حیوان را از آب خارج کردیم و بعد از ۵ دقیقه استراحت بلوک ۲ را با همان شرایط بلوک اول انجام دادیم و در نهایت پس از اتمام کار حیوانات را از حوضچه خارج و خشک نموده و به حیوانخانه منتقل کردیم. در روز چهارم آزمایش برای انجام probe سکو را برداشتیم و یک بلوک با یک کارآزمایی انجام دادیم. سپس برای بررسی توانایی دیداری، حسی - حرکتی و انگیزشی حیوان تست سکوی آشکار انجام شد. به این صورت که سکو را در مرکز ربع دایره جنوب شرقی بالاتر از سطح آب قرار دادیم و با فویل آلومینیومی پوشاندیم که برای موش کاملاً قابل دید باشد و سپس یک بلوک با چهار کارآزمایی مشابه سکوی نهان انجام دادیم. در این تست زمان سیدن به سکوی مخفی، مسافت طی شده برای رسیدن به سکو و درصد ورود در ربع دایره هدف بررسی گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

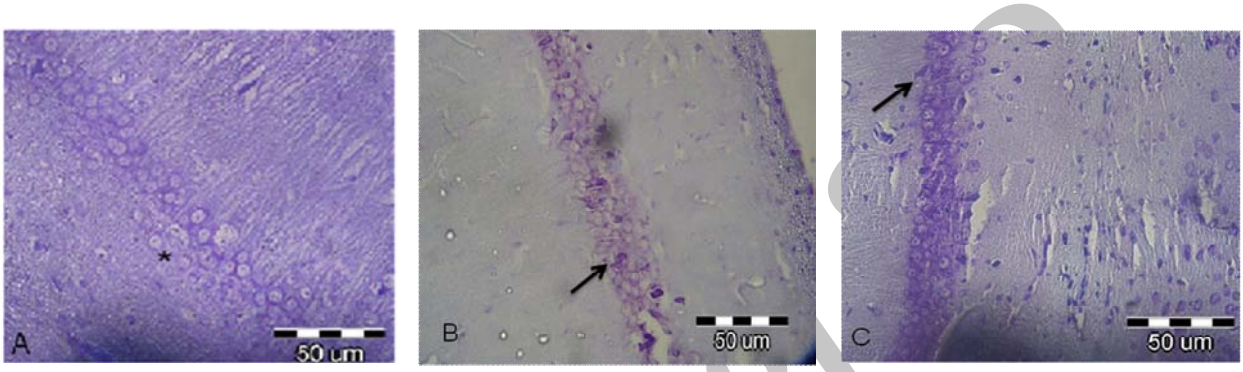
داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-16 و آزمون ANOVA تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

Archive of SID

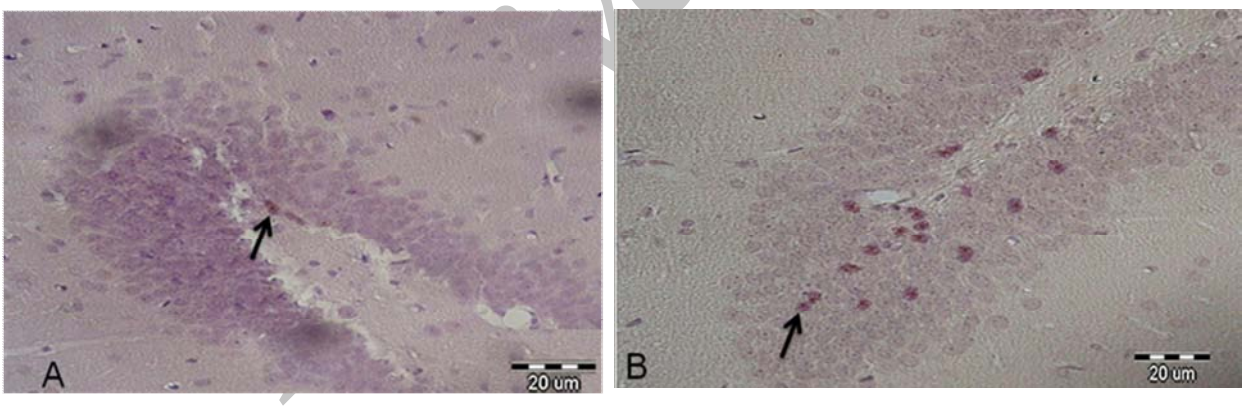
www.SID.ir



شکل ۱ : سلول‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ در برش کرونال در سطح ۳/۸ نسبت به برگما و با رنگ‌آمیزی کریزل ویوله در روز ۱۲ درمان در گروه‌های کنترل (A) ، ایسکمی (B) و درمان (C). علامت ستاره نورون‌های سالم دارای هسته سالم و یوکروماتین و نوک پیکان ساول پیکنوزه با هسته هتروکروماتین را نشان می‌دهند. رنگ‌آمیزی نیسل بزرگ‌نمایی ×۴۰



شکل ۲ : سلول‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ در برش کرونال در سطح ۳/۸ نسبت به برگما و با رنگ‌آمیزی کریزل ویوله در روز ۷۲ درمان در گروه‌های کنترل (A) ، ایسکمی (B) و درمان (C). علامت ستاره نورون‌های سالم دارای هسته سالم و یوکروماتین و نوک پیکان ساول پیکنوزه با هسته هتروکروماتین را نشان می‌دهند. رنگ‌آمیزی نیسل بزرگ‌نمایی ×۴۰



شکل ۳ : مقطعی از DG هیپوکامپ موش صحرایی در گروه ایسکمی (A) و درمان (B). نقاط قهوه‌ای (نوک پیکان) نشانگر بیان Nestin است که در گروه ایسکمی در مقایسه با گروه درمان توزیع کمتری دارد. رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی بزرگ‌نمایی ×۴۰۰

یافته‌ها

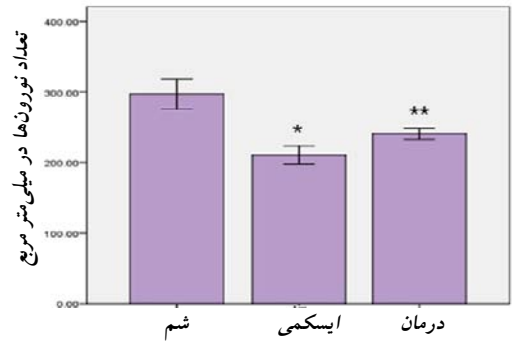
با توجه به عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل و شم، فقط داده‌های مربوط به گروه شم بیان شده است.

تعداد سلول‌های یوکروماتین ناحیه CA1 هیپوکامپ در گروه ایسکمی در روزهای ۱۲ و ۷۲ درمقایسه با گروه شم کاهش یافت ($P<۰/۰۵$). تجویز TGF-α منجر به افزایش سلول‌های یوکروماتین و سالم این ناحیه گردید که بررسی درون‌گروهی نشان داد؛ این افزایش در مقایسه با گروه ایسکمی معنی‌دار است ($P<۰/۰۵$) (شکل‌های ۱ و ۲) (نمودارهای ۱ و ۲).

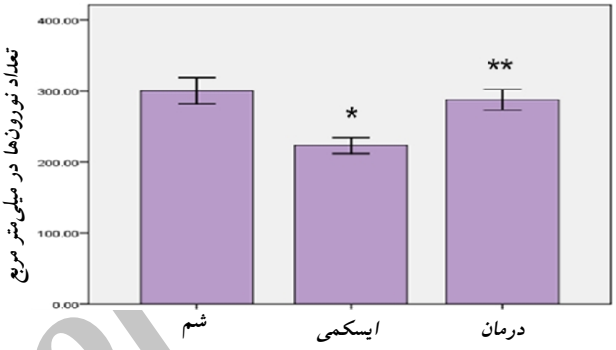
نتایج ایمونوهیستوشیمی بیان Nestin

بررسی بیان پروتئین Nestin در ناحیه DG هیپوکامپ با روش ایمونوهیستوشیمی نشان داد که این پروتئین در گروه دریافت کننده TGF-α توزیع بیشتری داشته است. همان‌طوری که در شکل ۳ مشخص شده است؛ در رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی رنگ قهوه‌ای نشانگر بیان Nestin (مارکر نورال استم سل) می‌باشد.

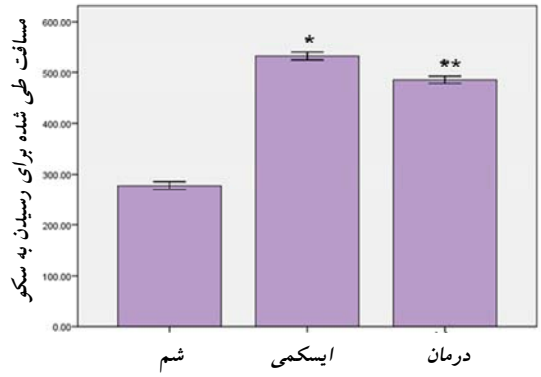
www.SID.ir



نمودار ۱ : تعداد سلول‌های یوکروماتین ناحیه CA1 هیپوکامپ
در گروه‌های مختلف تجربی در روز ۱۲ درمان
** P<۰/۰۱ در مقایسه با گروه شم ، ** P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه ایسکمی*



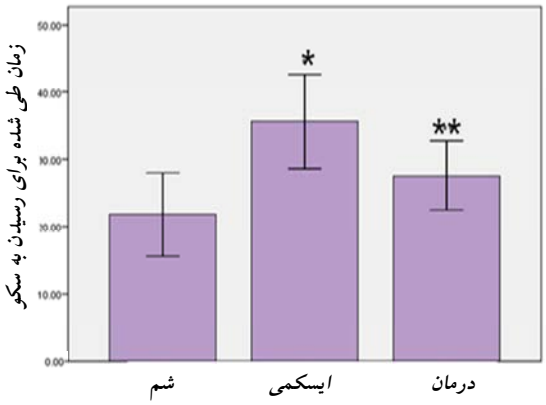
نمودار ۲ : تعداد سلول‌های یوکروماتین ناحیه CA1 هیپوکامپ
در گروه‌های مختلف تجربی در روز ۷۲ درمان
** P<۰/۰۱ در مقایسه با گروه شم ، ** P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه ایسکمی*



نمودار ۳ : مسافت طی شده برای رسیدن به سکوی مخفی
در تست MWM در روز ۷۲ درمان
** P<۰/۰۱ در مقایسه با گروه شم ، ** P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه ایسکمی*

نتایج آزمون رفتاری

با توجه به نتایج آزمون MWM گروه ایسکمی مسافت زیادی را برای رسیدن به سکوی مخفی در مقایسه با گروه شم طی نمود (P<۰/۰۱) (نمودار ۳). همچنین تجویز TGF-α منجر به کاهش معنی‌دار مسافت طی شده در مقایسه با گروه ایسکمی گردید (P<۰/۰۵). در رابطه با زمان طی شده برای رسیدن به سکوی مخفی، تفاوت آماری معنی‌داری بین گروه شم و گروه ایسکمی وجود داشت (P<۰/۰۱) و گروه ایسکمی زمان بیشتری را برای رسیدن به سکو طی کرد (نمودار ۴) و درمان با TGF-α منجر به کاهش معنی‌دار این زمان در مقایسه با گروه ایسکمی گردید (P<۰/۰۵).



نمودار ۴ : زمان طی شده برای رسیدن به سکوی مخفی
در تست MWM در روز ۷۲ درمان
** P<۰/۰۱ در مقایسه با گروه شم ، ** P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه ایسکمی*

بحث

در مطالعه حاضر اثر القایی TGF-α بر سلول‌های عصبی بنیادی شکنج دندانه‌ای هیپوکامپ و اثر حفاظتی آن بر سلول‌های پیرامیدال ناحیه CA1 هیپوکامپ براساس مطالعات ایمونوهیستوشیمی و رفتاری در مدل تجربی ایسکمی – ریپرفیوژن مغزی در موش صحرایی نر بررسی شد. براساس نتایج حاصله TGF-α توانست؛ موجب تحریک تکثیر سلول‌های عصبی بنیادی شکنج دندانه‌ای هیپوکامپ و سبب کاهش مرگ سلول‌های پیرامیدال ناحیه CA1 هیپوکامپ و بهبود الگوی رفتاری حیوانات به‌دنبال ایسکمی گردد.

در مطالعه Schmidt و Reymann مدل ایسکمی گلوبال مغزی موجب نورودژنراسیون وسیع در ناحیه CA1 هیپوکامپ، استریاتوم و نئوکورتکس گردید (۱۴) که موافق با مطالعه حاضر بود. به‌طوری که بستن هردو کاروتید مشترک (CCO) به مدت ۳۰ دقیقه موجب مرگ سلولی گسترده در ناحیه CA1 هیپوکامپ شد. به نحوی که کاهش معنی‌داری در میانگین تعداد سلول‌های ناحیه CA1 در گروه ایسکمی نسبت به سایر گروه‌ها و نیز تغییرات معنی‌داری در آزمایشات رفتاری حیوانات مشاهده شد. همچنین استفاده از آنتی‌بادی علیه Nestin افزایش قابل ملاحظه‌ای را در بیان این پروتئین در شکنج دندانه‌ای هیپوکامپ در گروه‌های درمانی با TGF-α در این مدل ایسکمی در موش صحرایی نشان داد.

در مطالعه Salazar-Colocho و همکاران ایسکمی مغزی موجب شروع تکثیر در CA1 و نوروژنزیز در DG هیپوکامپ در پاسخ به مرگ نورون‌های هرمی در CA1 گردید که این امر مستقل از

Archive of SID

www.SID.ir

کاهش جریان خون مغزی یا مهاجرت سلولی از SVZ است (۹). افزایش نوروژنزیز ناشی از سلول‌های بنیادی واقع در SVZ و DG مغز بالغ در گونه‌های مختلف پستانداران ممکن است موجب پیشرفت بهبود مورفولوژیکی و عملکردی بعد از ایسکمی مغز، تروما یا آسیب‌های دژنراتیو اولیه شود (۱۱) که مطابق با نتایج حاصله در مطالعه حاضر است.

در مطالعه Guerra-Crespo و همکاران TGF-α حجم آسیب ناشی از ایسکمی را کاهش داد. به طوری که این اثر ناشی از تغییر در نفوذپذیری عروق مغزی نبود و نتیجه‌گیری شد که TGF-α یک اثر محافظتی در مقابل مرگ سلول‌های عصبی بعد از ایسکمی موضعی گذرا دارد (۱۵). همچنین Leker و همکاران عنوان کردند که TGF-α می‌تواند موجب القاء آنژیوژنز، نوروژنز و نوروپوتکشن بعد از سکته شود (۱۶). پاسخ سلول‌های بنیادی عصبی به آسیب‌های ایسکمیک و نیز بهبودی رفتاری به‌طور قابل‌توجهی با به‌کار بردن TGF-α افزایش می‌یابد که نشان‌دهنده نزدیک‌شدن به یک روش درمانی برای سکته مزمن و سایر آسیب‌های نورولوژیک در انسان است (۱۷).

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که استفاده از TGF-α باعث کاهش آسیب‌های ناشی از ایسکمی ریپرفیوژن به صورت افزایش تعداد نورون‌های پیرامیدال، بیان Nestin و بهبود حافظه می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه حسن علی پناه زاده برای اخذ کارشناسی ارشد در رشته علوم تشریحی از دانشگاه علوم پزشکی تهران بود. بدین‌وسیله از کارکنان آزمایشگاه علوم اعصاب گروه علوم تشریحی دانشگاه علوم پزشکی تهران سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Senelick RC, Rossi PW, Dougherty K. Living with stroke: a guide for families: help and new hope for all those touched by stroke. 1st. New York: McGraw-Hill. 1999; pp:16-18.

2. Johansson BB. Current trends in stroke rehabilitation. A review with focus on brain plasticity. Acta Neurol Scand. 2011 Mar; 123(3):147-59.

3. Zini I, Tomasi A, Grimaldi R, Vannini V, Agnati LF. Detection of free radicals during brain ischemia and reperfusion by spin trapping and microdialysis. Neurosci Lett. 1992 Apr; 138(2): 279-82.

4. Taupin Ph. The Hippocampus: Neurotransmission and Plasticity in the Nervous System. 1st. New York: Nova Biomedical Books. 2008; pp:20-5.

5. Eichenbaum H. Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. Neuron. 2004 Sep; 44(1):109-20.

6. Lucas JA. Disorders of memory. Psychiatr Clin North Am. 2005 Sep; 28(3):581-97, 594.

7. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. J Comp Neurol. 1965 Jun;124(3):319-35.

8. Gage FH. Mammalian neural stem cells. Science. 2000 Feb; 287(5457):1433-8.

9. Salazar-Colocho P, Lanciego JL, Del Rio J, Frechilla D. Ischemia induces cell proliferation and neurogenesis in the gerbil hippocampus in response to neuronal death. Neurosci Res. 2008 May;61(1):27-37.

10. Xian CJ, Zhou XF. EGF family of growth factors: essential roles and functional redundancy in the nerve system. Front Biosci. 2004 Jan;9:85-92.

11. Altman J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. J Comp Neurol. 1969 Dec;137(4):433-57.

12. Cooper O, Isacson O. Intrastriatal transforming growth factor alpha delivery to a model of Parkinson's disease induces proliferation and migration of endogenous adult neural progenitor cells without differentiation into dopaminergic neurons. J Neurosci. 2004 Oct;24(41):8924-31.

13. McBean DE, Kelly PA. Rodent models of global cerebral ischemia: a comparison of two-vessel occlusion and four-vessel occlusion. Gen Pharmacol. 1998 Apr;30(4):431-4.

14. Schmidt W, Reymann KG. Proliferating cells differentiate into neurons in the hippocampal CA1 region of gerbils after global cerebral ischemia. Neurosci Lett. 2002 Dec;334(3):153-6.

15. Guerra-Crespo M, Gleason D, Sistos A, Toosky T, Solaroglu I, Zhang JH,et al. Transforming growth factor-alpha induces neurogenesis and behavioral improvement in a chronic stroke model. Neuroscience. 2009 May;160(2):470-83.

16. Leker RR, Toth ZE, Shahar T, Cassiani-Ingoni R, Szalayova I, Key S, et al. Transforming growth factor alpha induces angiogenesis and neurogenesis following stroke. Neuroscience. 2009 Sep;163(1):233-43.

17. Peng H, Wen TC, Tanaka J, Maeda N, Matsuda S, Desaki J, et al. Epidermal growth factor protects neuronal cells in vivo and in vitro against transient forebrain ischemia- and free radical-induced injuries. J Cereb Blood Flow Metab. 1998 Apr;18(4):349-60.

Archive of SID

www.SID.ir

Original Paper

Effect of transforming growth factor alpha of dentyte jyrus neurons and pyramidal cells of CA1 subfiled of hippocampus following ischemia-reperfusion in Rats

**Alipanahzade H (MSc)[1], Soleimani M (PhD)[2], Soleimani Asl S (PhD)[3]
Mehdizadeh M (PhD)*[4], Katebi M (PhD)[5]**

[1]MSc in Anatomy, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. [2]Assistant Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. [3]Assistant Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran. [4]Professor, Cellular and Molecular Research Center, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. [5]Assistant Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran.

Abstract

Background and Objective: Ischemia-reperfusion invoke cell death in hippocampus. This study was carried out to investigate the effect of transforming growth factor alpha (TGF-alpha) of dentyte jyrus neurons and pyramidal cells of CA1 subfiled of hippocampus following ischemia-reperfusion in rat models.

Materials and Methods: This experimental study was done on 40 male Wistar rats weighing 250-300gr. Animals were divided in four groups: control (n=7), sham (n=7), ischemia (n=14) and treatment (n=14). Sham group was just under surgical stress. In ischemia and treatment groups after induction of ischemia-reperfiusion by obstruction of carotid arteries blocked for 30 minutes, reperfusion PBS (phosphate buffer salin) and subsequently TGF-alpha (50 ng) were injected stereotaxicaly in lateral ventricle, respectively. In 12 and 72 days after treatment the brains were fixated by transcardial perfusion and stained by immunohistochemestry and nissle methods. Furthermore, morris water maze was used to evaluate the learning memory. Data were analyzed using SPSS-16 and ANOVA test.

Results: Injection of TGF-alpha increased the cell number in hippocampus of treatment group compared to ischemic group. TGF-alpha increased expression of neuron in dentyte jyrus of treatment group in comparison with ischemic group ($P<0.05$). Also spatial memory improved in treatment group in comparison with ischemia group.

Conclusion: TGF-alpha improves ischemia-induced neurodegenration and memory impairment.

Keywords: Ischemia-reperfusion, Spatial memory, Neurogeneis, Hippocampus, Transforming growth factor alpha

*** Corresponding Author: Mehdizadeh M (PhD), E-mail: mehdizadehm@tums.ac.ir**

Received 6 Sep 2011 **Revised** 19 Dec 2011 **Accepted** 8 Jan 2012

This paper should be cited as: Alipanahzade H, Soleimani M, Soleimani Asl S, Mehdizadeh M, Katebi M. [Effect of transforming growth factor alpha of dentyte jyrus neurons and pyramidal cells of CA1 subfiled of hippocampus following ischemia-reperfusion in Rats]. J Gorgan Uni Med Sci. 2012; 14(3): 26-32. [Article in Persian]

Archive of SID
www.SID.ir