

Original Paper

Effect of transforming growth factor alpha of dentate gyrus neurons and pyramidal cells of CA1 subfield 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

¹MSc in Anatomy, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
²Assistant Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
³Assistant Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.
⁴Professor, Cellular and Molecular Research Center, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
⁵Assistant 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- α) of dentate gyrus neurons and pyramidal cells of CA1 subfield 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-reperfusion by obstruction of carotid arteries blocked for 30 minutes, reperfusion PBS (phosphate buffer saline) and subsequently TGF- α (50 ng) were injected stereotaxically in lateral ventricle, respectively. In 12 and 72 days after treatment the brains were fixated by transcardial perfusion and stained by immunohistochemistry 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- α increased the cell number in hippocampus of treatment group compared to ischemic group. TGF- α increased expression of neuron in dentate gyrus 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- α improves ischemia-induced neurodegeneration and memory impairment.

Keywords: Ischemia-reperfusion, Spatial memory, Neurogenesis, 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

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

حسن علی پناهزاده^۱، دکتر منصوره سلیمانی^۲، دکتر سارا سلیمانی اصل^۳، دکتر مهدی مهدیزاده^{۴*}، دکتر مجید کاتبی^۵

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 سکنه 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 انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه تجربی روی ۴۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۲۵۰-۳۰۰ گرم در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد. موش‌ها به صورت 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) سه دو زیرگروه تقسیم شد. ۷ سر موش تحت القاء ایسکمی با انسداد شریان‌های کاروتید مشترک به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند و ۷ روز بعد به روش استریوتاکسی ۵ میکرولیتر PBS (phosphate buffer saline) به داخل بطن راست تزریق شد و در روز ۱۲ از نظر بیان Nestin بررسی شدند. ۷ سر موش باقیمانده پس از القاء ایسکمی و دریافت PBS دو ماه 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 ۷ روز بعد ۵۰ نانوگرم TGF- α حل شده در ۵ میکروگرم 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 دو ماه 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 آماري SPSS-16 و آزمون ANOVA تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: تجویز TGF- α به دنبال 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 ($P < 0/05$). همچنین در آزمون ماز آبی اختلاف معنی‌داری در شاخص حافظه فضایی در دو گروه ایسکمی و درمان مشاهده شد ($P < 0/05$).

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، نورونیزیس، 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

اثر کاهش جریان خون که به کاهش ذخیره اکسیژن و در نتیجه مرگ بافت مغزی یا سکنه مغزی منجر می‌شود (۲). در طی ایسکمی میزان اکسیژن و ATP مغز کاهش یافته و به دنبال آن میزان برداشت رادیکال‌های آزاد کاهش می‌یابد و در نتیجه رادیکال‌های آزاد و

مقدمه

سکنه مغزی یکی از مهم‌ترین 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

انواع مختلف سلول‌ها اعم از نورون‌ها، سلول‌های گلیال و سلول‌های اپیتلیال روده تولید و نقش مهمی را در تنظیم تکثیر، تمایز، مهاجرت، زنده ماندن 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 گسترده تری دارد (۱۰). TGF- α به عنوان فراوان‌ترین لیگاند EGF-R در تکامل سیستم عصبی مرکزی بالغین به خصوص در استریاتوم، بولب بویایی، هیپوکامپ و SVZ و ساقه مغز شناخته شده است (۱۱). با توجه به نقش این عامل رشد در تکامل سیستم عصبی مرکزی و عدم وجود مطالعه‌ای دال بر نقش آن در بهبود نورودژنراسیون 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 بر اساس مطالعات ایمونوهیستوشیمی و رفتاری در مدل تجربی ایسکمی - ریپرفیوژن مغزی در موش صحرایی انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۴۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۲۵۰-۳۰۰ 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 روشنائی و تاریکی ۱۲ ساعته 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 از نظر بیان Nestin بررسی شدند. مطالعات نشان می‌دهند که ۱۲ روز بعد از القاء نورودژنریس اوج بیان Nestin می‌باشد (۱۲).

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

لاکتات ناشی از تنفس بی‌هوایی افزایش می‌یابد که موجب اسیدوز و مرگ سلولی می‌شود. در نتیجه فرایند ایسکمی - ریپرفیوژن، رادیکال‌های آزاد اکسیژن و اکشن‌دهنده از قبیل پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل (OH⁻) تولید می‌شوند که به بافت هدف حمله کرده و به شدت آسیب می‌رساند و آسیب ناشی از آن به مراتب 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 کروییدی قدیمی 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، هانتینگتون، صرع، سکنه مغزی، 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 DG) dentate gyrus (و SVZ) sub ventricular zone (تولید می‌شوند (۶و۷). همچنین به دنبال آسیب هیپوکامپ در اثر بیماری‌ها، ایسکمی و آسیب‌های تروماتیک نورودژنریس تحت تاثیر عوامل درونی در ناحیه DG و SVZ برای جایگزینی نورون‌های آسیب‌دیده و ترمیم ضایعه افزایش می‌یابد (۸).

افزایش نورودژنریس 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 نورودژنریس را در DG و SVZ تحریک کند؛ می‌تواند گامی موثر در بهبود و ترمیم ضایعات هیپوکامپ به دنبال 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 آبخاری 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

دوماه بعد از القاء نورورژنیزس، حافظه فضایی برای تایید فیزیکی فانکشنال شدن سیناپس ها انجام گردید (۹).

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

(الف) تعداد ۷ سر موش تحت القاء ایسکمی قرار گرفتند. ۷ روز بعد ۵۰ نانوگرم TGF- α حل شده در ۵ میکروگرم 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) ۱۰۰ میلی گرم برای هر کیلوگرم وزن و گزیزلین (شرکت دارو پخش، ایران) ۱۰ میلی گرم برای هر کیلوگرم وزن بیهوش شدند. سپس تحت شرایط استریل در قسمت قدامی گردن برشی به اندازه ۱/۵-۱ سانتی متر داده شد و پس از مشخص کردن شریان کاروتید مشترک، با استفاده از کلمپ های مخصوص این شریان به مدت ۳۰ دقیقه مسدود گردید. پس از آن کلمپ ها برداشته شد تا مجدداً جریان خون برقرار گردد (۱۳).

رنگ آمیزی نیسل (Nissl staining)

برای بررسی کاهش تعداد سلول به دنبال ایسکمی در ناحیه CA1 هیپوکامپ، از رنگ آمیزی کرزیل ویوله استات ۰/۱ درصد استفاده شد. در این رنگ آمیزی سلول های سالم به صورت سلول های یوکروماتین گرد دیده می شوند. از هر گروه ۴ سر موش و از هر موش تعداد ۱۰ برش برای رنگ آمیزی نیسل انتخاب گردید. بعد از تهیه عکس توسط نرم افزار Olysia bio report، شمارش سلولی در یک میلی متر مربع انجام شد. بدین منظور مغز موش های صحرائی در روز ۱۲ و بعد از پرفیوژن داخل قلبی با پارافرمالدهید ۴ درصد خارج و پس از آماده سازی بافتی با پارافین قالب گیری شد. سپس مقاطع ۱۰ میکرومتری تهیه و مقاطع با رنگ کریزل ویوله رنگ آمیزی گردید.

ایمونوهیستوشیمی

برای بررسی اثر القایی TGF- α بر سلول های عصبی بنیادی DG بیان پروتین Nestin با روش ایمونوهیستوشیمی انجام شد. مقاطع طبق روشی که در رنگ آمیزی نیسل توضیح داده شد؛ تهیه گردید و بعد از شفاف سازی و آبدهی، برای بلاک کردن لام ها در محلول ۱۰ درصد پروکسید هیدروژن، به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند و پس از احیای آنتی ژن با سترات بافر و برداشتن آنتی ژن های نامربوط با BSA لام ها با آنتی بادی Nestin (abcam, ca: AB6142) به مدت یک ساعت، آنتی بادی polyclonal secondary (HRP) goat

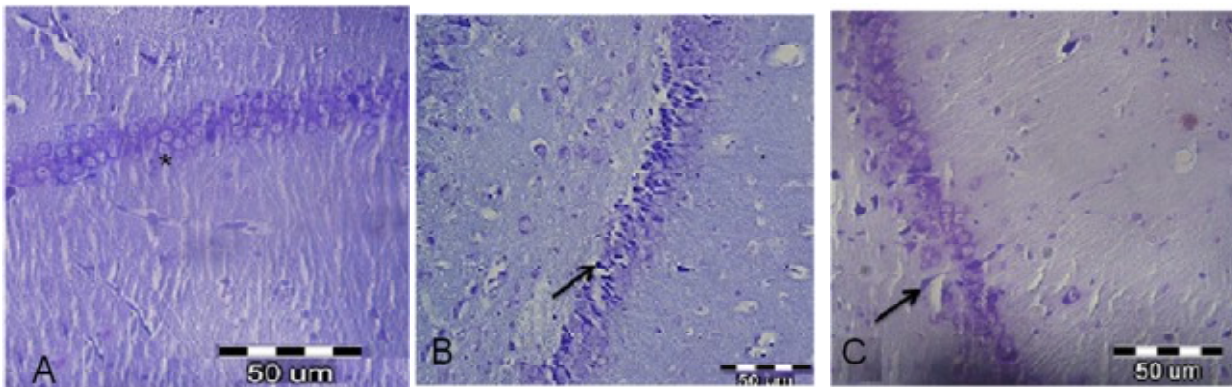
(abcam, ca6789) به مدت یک ساعت و با DAB substrate kit (CA number :11718096001) به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند و در نهایت برای رنگ آمیزی متضاد از رنگ نیسل استفاده گردید.

بررسی حافظه فضایی با دستگاه Morris water maze

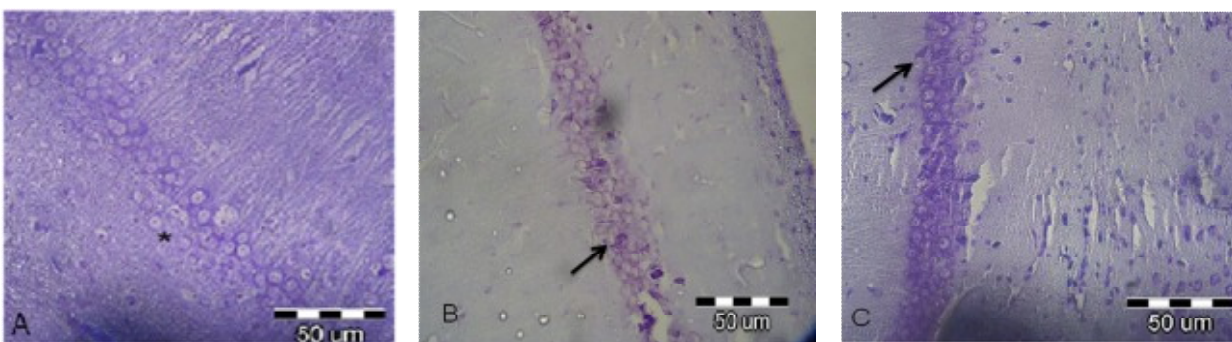
برای بررسی حافظه فضایی به دنبال به کار بردن TGF- α از دستگاه Morris water maze استفاده شد. این دستگاه برای بررسی یادگیری و حافظه فضایی طراحی شده و شامل حوضچه استوانه ای سیاه رنگ با قطر ۱۳۶ سانتی متر و ارتفاع ۶۰ سانتی متر می باشد که تا ارتفاع ۲۵ سانتی متر با آب ۲۰-۱۹ درجه سانتی گراد پر می شود. این حوضچه به صورت فرضی به چهار ربع دایره تقسیم شده و سکوی کوچکی از جنس پلکسی گلاس با قطر ۱۰ سانتی متر و در یک سانتی متری زیر سطح آب در مرکز یکی از چهار ربع دایره قرار دارد که حیوان می تواند 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 می یابد. هر موش به مدت ۳ روز و هر روز دو بلوک و هر بلوک شامل چهار کار آزمایی تحت آموزش قرار گرفتند. در هر کار آزمایی حیوان از یکی از چهار نقطه شروع شمال، جنوب، شرق یا غرب در آب رها شد. به طوری که صورتش به طرف آب حوض بود. یک کار آزمایی زمانی اتمام می یافت که موش بر روی سکوی رفت یا ۹۰ ثانیه شنا می کرد. موش هایی که سکوی را پیدا نکردند؛ به روی سکوی منتقل شدند. در هر دو حالت فوق به حیوان ۲۰ ثانیه فرصت داده شد که روی سکوی 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 سکوی را برداشتیم و یک بلوک با یک کار آزمایی انجام دادیم. سپس برای بررسی توانایی دیداری، حسی - حرکتی و انگیزشی حیوان تست سکوی آشکار انجام شد. به این صورت که سکوی 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 کار آزمایی مشابه سکوی نهان انجام دادیم. در این تست زمان سیدن به سکوی مخفی، مسافت طی شده برای رسیدن به سکوی و درصد ورود در ربع دایره هدف بررسی گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

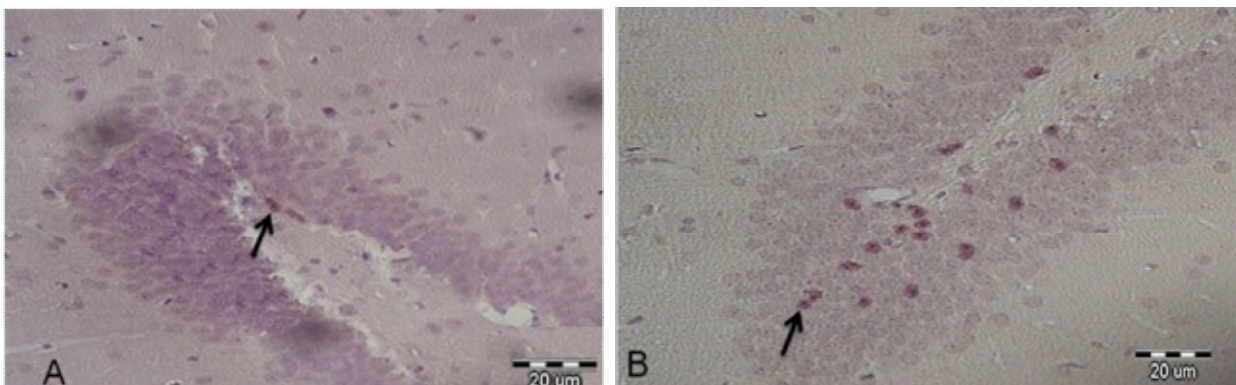
داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS-16 و آزمون ANOVA تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.



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×

(شکل‌های ۱ و ۲) (نمودارهای ۱ و ۲).

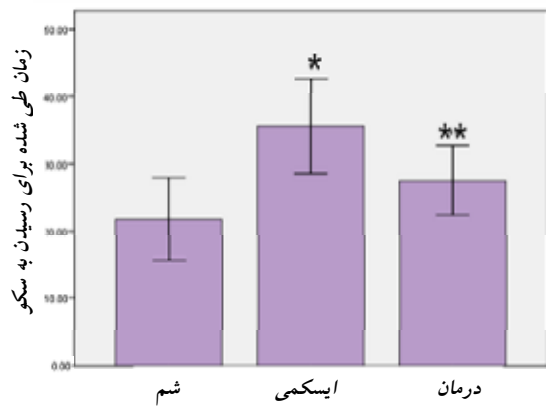
نتایج ایمونوهیستوشیمی بیان Nestin

بررسی بیان پروتئین Nestin در ناحیه DG هیپوکامپ با روش ایمونوهیستوشیمی نشان داد که این پروتئین در گروه دریافت‌کننده 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.

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 در مقایسه با گروه شم کاهش یافت ($P < 0/05$). 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 ($P < 0/05$)

داشت ($P < 0.01$) و گروه ایسکمی زمان بیشتری را برای رسیدن به سکو طی کرد (نمودار ۴) و درمان با TGF- α منجر به کاهش معنی دار این زمان در مقایسه با گروه ایسکمی گردید ($P < 0.05$).



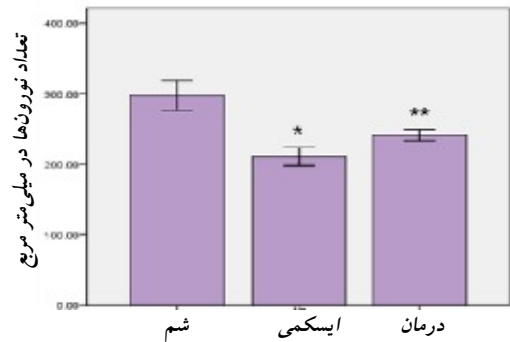
نمودار ۴: زمان طی شده برای رسیدن به سکو مخفی در تست MWM در روز ۷۲ درمان
* $P < 0.01$ در مقایسه با گروه شم، ** $P < 0.05$ در مقایسه با گروه ایسکمی

بحث

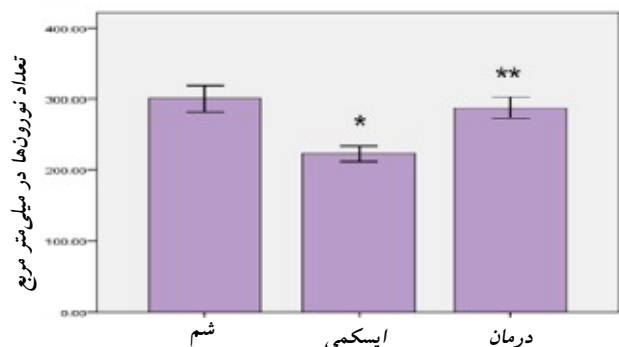
در مطالعه حاضر اثر القایی TGF- α بر سلول‌های عصبی بنیادی شکنج دندانه‌ای هیپوکامپ و اثر حفاظتی آن بر سلول‌های پیرامیدال ناحیه CAI هیپوکامپ براساس مطالعات ایمونوهیستوشیمی و رفتاری در مدل تجربی ایسکمی - رپرفیوژن مغزی در موش صحرایی نر بررسی شد. براساس نتایج حاصله TGF- α توانست؛ موجب تحریک تکثیر سلول‌های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

در مطالعه Reymann و Schmidt و مدل ایسکمی گلوبال مغزی موجب نورودژنراسیون وسیع در ناحیه CAI هیپوکامپ، استریاتوم و نئوکورتکس گردید (۱۴) که موافق با مطالعه حاضر بود. به طوری که بستن هردو کاروتید مشترک (CCO) به مدت ۳۰ دقیقه موجب مرگ سلولی گسترده در ناحیه CAI هیپوکامپ شد. به نحوی که کاهش معنی داری در میانگین تعداد سلول‌های ناحیه CAI در گروه ایسکمی نسبت به سایر گروه‌ها و نیز تغییرات معنی داری 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.

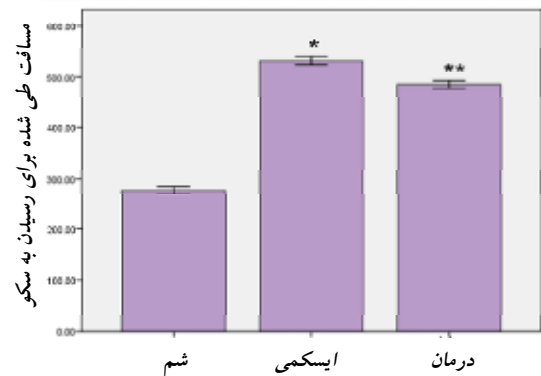
در مطالعه Salazar-Colocho و همکاران ایسکمی مغزی موجب شروع تکثیر در CAI و نورودژنریز در DG هیپوکامپ در پاسخ به مرگ نورون‌های هرمی در CAI گردید که این امر مستقل از



نمودار ۱: تعداد سلول‌های یوکروماتین ناحیه CAI هیپوکامپ در گروه‌های مختلف تجربی در روز ۱۲ درمان
* $P < 0.01$ در مقایسه با گروه شم، ** $P < 0.05$ در مقایسه با گروه ایسکمی



نمودار ۲: تعداد سلول‌های یوکروماتین ناحیه CAI هیپوکامپ در گروه‌های مختلف تجربی در روز ۷۲ درمان
* $P < 0.01$ در مقایسه با گروه شم، ** $P < 0.05$ در مقایسه با گروه ایسکمی



نمودار ۳: مسافت طی شده برای رسیدن به سکو مخفی در تست MWM در روز ۷۲ درمان
* $P < 0.01$ در مقایسه با گروه شم، ** $P < 0.05$ در مقایسه با گروه ایسکمی

نتایج آزمون رفتاری

با توجه به نتایج آزمون MWM گروه ایسکمی مسافت زیادی را برای رسیدن به سکو مخفی در مقایسه با گروه شم طی نمود ($P < 0.01$) (نمودار ۳). همچنین تجویز TGF- α منجر به کاهش معنی دار مسافت طی شده در مقایسه با گروه ایسکمی گردید ($P < 0.05$). در رابطه با زمان طی شده برای رسیدن به سکو مخفی، تفاوت آماری معنی داری بین گروه شم و گروه ایسکمی وجود

به آسیب‌های ایسکمیک و نیز بهبودی رفتاری به‌طور قابل توجهی با به‌کار بردن TGF- α افزایش می‌یابد که نشان‌دهنده نزدیک شدن به یک روش درمانی برای سکتة مزمن و سایر آسیب‌های نورولوژیک در انسان است (۱۷).

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که استفاده از TGF- α باعث کاهش آسیب‌های ناشی از ایسکمیک ریپرفیوژن به‌صورت افزایش تعداد نوروئین‌های 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. بدین وسیله 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.

کاهش جریان خون مغزی یا مهاجرت سلولی از SVZ است (۹). افزایش نورون‌تیز 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 ایسکمیک 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 ایسکمیک 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 ایسکمیک موضعی گذرا دارد (۱۵). همچنین Leker و همکاران عنوان کردند که TGF- α می‌تواند موجب القاء آنژیوژنز، نوروژنز و نوروپوتکشن بعد از سکتة شود (۱۶). پاسخ سلول‌های بنیادی عصبی

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.