

مقاله پژوهشی

ارزیابی تغییرات مولکولی مرتبط با آپوپتوز در ناحیه هیپوکامپ متعاقب تزریق بتا آمیلوئید در قشر انتورینال موش صحرایی؛ نقش محافظتی مسدودکننده‌های کانال کلسیمی

حمید غلامی پوربدیع^{۱*}، مرضیه جنیدی^۱، فریبا خداقلی^۲، فاطمه شاعرزاده^۲

۱. گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۲. مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

دریافت: ۳۰ تیر ۱۳۹۸

پذیرش: ۹ شهریور ۱۳۹۸

چکیده

زمینه و هدف: بیماری آلزایمر یک اختلال مغزی پیشرونده است که با زوال عقلی همراه است. قشر انتورینال یکی از اولین نواحی مغزی است که در بیماری آلزایمر درگیر می‌شود. در بیماران آلزایمری سطح بالایی از پروتئین بتا آمیلوئید در مناطق مختلف مغزی از جمله قشر انتورینال مشاهده می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند بتا آمیلوئید باعث اختلال هموستاز کلسیمی می‌شود. در این مطالعه تغییرات مولکولی در ناحیه CA1 هیپوکامپ متعاقب تزریق بتا آمیلوئید در ناحیه انتورینال و همچنین نقش احتمالی محافظتی مسدودکننده‌های کلسیمی مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: بتا آمیلوئید (یک میکروگرم/دو میکرولیتر) در قشر انتورینال دو طرف موش‌های ویستار نر تحت جراحی استرئوتاکسیکی تزریق شد و سپس یک کانول راهنما در بطن طرفی راست کاشته شد. ایزرادیپین و نیمودپین با دوز ۳۰ میکروگرم به صورت داخل بطنی روزانه به مدت ۶ روز تزریق شد. در روز هفتم میزان بیان کالپین ۲، کاسپاز ۱۲ و ۳ در ناحیه CA1 توسط تکنیک وسترن بلات اندازه گیری شد. برای نشان دادن سلول‌های دچار آپوپتوز از تست تانل استفاده شد.

یافته‌ها: تزریق بتا آمیلوئید در ناحیه انتورینال موجب افزایش بیان کالپین ۲، کاسپاز ۱۲ و ۳ در ناحیه CA1 شد. همچنین تعداد سلول‌های دچار آپوپتوز در ناحیه CA1 متعاقب آمیلوئیدوپاتی در قشر انتورینال افزایش یافت. بدنال تیمار موش‌ها با ایزرادیپین و نیمودپین بیان کالپین ۲، کاسپاز ۱۲ و ۳ کاهش یافت و همچنین تعداد سلول‌های آپوپتوتیک به سطح کنترل نزدیک شد.

نتیجه‌گیری: آمیلوئیدوپاتی قشر انتورینال می‌تواند پروفایل مولکولی مرتبط با آپوپتوز را در نواحی مجاور مانند CA1 تغییر دهد و تیمار با مسدودکننده‌های کانال کلسیمی می‌تواند از این تغییر جلوگیری کند.

واژه‌های کلیدی: بیماری آلزایمر، قشر انتورینال، مسدودکننده‌های کانال کلسیم، CA1

مقدمه

بیماری آلزایمر، یک بیماری مخرب و پیش‌رونده‌ی مغزی است که با زوال عقلی همراه است و باعث نابودی سلول‌های مغزی به ویژه در ناحیه هیپوکامپ می‌شود. در بیماران آلزایمری سطح بالایی از پروتئین بتا آمیلوئید در مناطق مغزی که در یادگیری و حافظه دخیل هستند مثل قشر انتورینال^۱ و

تشکیلات هیپوکامپ نشان داده شده است [۱]. پپتیدهای بتا آمیلوئید از ۳۸-۴۳ اسیدآمینه تشکیل شده‌اند که از دژنره شدن پیش ساز آمیلوئید بتا^۲ در اثر فعالیت آنزیم‌های بتا- و گاما-سکرتاز تشکیل می‌شوند [۳، ۲]. تجمع بتا آمیلوئید در هیپوکامپ باعث کاهش یادگیری و پلاستیسیته سیناپسی و

^۱ Entorhinal cortex^۲ Amyloid precursor protein

همچنین باعث فعال شدن آستروسیت‌ها و میکروگلیاها می‌شود که نتیجه آن آزاد شدن سائتوکین‌های التهابی و در نتیجه بروز پاسخ‌های التهابی و در آخر مرگ سلول‌های عصبی می‌باشد [۳]. تشکیلات هیپوکامپ شامل شاخ آمون^۳ (CA1-CA4)، شکنج‌دندانه‌ای و سابیکلوم است. مسیر انتورینال-هیپوکامپ برای کدگذاری انواع مختلف حافظه ضروری است و در بیماری آلزایمر این مسیر تحت تاثیر قرار می‌گیرد [۴، ۵]. از طریق مسیر پرفورنت نورون‌های لایه سوم (III) و دوم (II) قشر انتورینال به ترتیب به CA1 و شکنج‌دندانه‌ای^۴ متصل می‌شوند [۶]. در مراحل اولیه بیماری آلزایمر مقدار قابل‌توجهی از نورون‌های قشر انتورینال در لایه II از بین می‌روند [۷] نشان‌دهنده شده است که در مراحل اولیه بیماری آلزایمر کلاف‌های نورفیبری^۵ ابتدا در قشر انتورینال ظاهر و با پیشرفت بیماری به مناطق مجاور مانند هیپوکامپ سرایت می‌کند. نشان‌دهنده شده است که تجمع بت‌آمیلوئید باعث هیپرفسفریلاسیون پروتئین تاو^۶ و در نهایت تشکیل کلاف‌های نوروفیبری می‌شود [۸]. اختلال عملکرد سلولی و در نهایت آپوپتوز و مرگ سلولی ناشی از بت‌آمیلوئید در بیماری آلزایمر نقش مهمی دارد [۹]. آپوپتوز مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی است که در شرایط پاتولوژیک و فیزیولوژیک نقش مهمی را ایفا می‌کند. نشان‌دهنده شده است که گروهی از آنزیم‌ها به نام کاسپازها در مراحل اولیه آپتوز فعال می‌شوند [۱۰]. کاسپازها درستیوپلاسم به فرم غیرفعال پروکاسپاز حضور دارند و با فرآیند پروتئولیز، به فرم فعال تبدیل می‌شوند. بررسی تغییرات کاسپاز ۳ و پروکاسپازها یکی از مهمترین روش‌های بررسی آپوپتوز به‌شمار می‌رود. همچنین چندین پروتئاز غیرکاسپاز (پروتئاز وابسته به کلسیم) مانند کالپین-۲ ممکن است در اجرای آپوپتوز نقش داشته باشند. خانواده کالپین از دو ایزوفروم اصلی کالپین ۱ و ۲ تشکیل شده است که خود نیاز به کلسیم دارند و تصور می‌شود که افزایش سطح کلسیم داخل‌سلولی باعث ایجاد آبشار فرآیندهای بیوشیمیایی از جمله فعال‌سازی کالپین‌ها می‌شود. به دنبال آسیب‌های نخاعی و بیماری‌های دژنراتیو عصبی کالپین‌ها فعال شده و باعث آپوپتوز در سلول‌های عصبی می‌شوند. کالپین‌ها همچنین باعث فعال شدن

کاسپاز ۱۲ و موجب گسترش و تخریب سلولی می‌گردند [۱۱]. اگرچه مکانیسم فعال شدن آپوپتوز توسط بت‌آمیلوئید هنوز ناشناخته است ولی مطالعات نشان داده است که فرم‌های مختلف بت‌آمیلوئید باعث افزایش غلظت کلسیم درون سلولی می‌شود [۱۲]. نشان‌دهنده شده است که اختلال هومئوستاز کلسیم ناشی از بت‌آمیلوئید از روش‌های مختلفی نظیر افزایش انتشار کلسیم از منبع داخل‌سلولی مانند شبکه آندوپلاسمی [۱۳] و یا افزایش نفوذپذیری غشاء پلاسمایی به کلسیم از طریق کانال‌های واقع در غشاء از جمله کانال‌های کلسیم وابسته به ولتاژ از نوع L یا کانال گلوتاماتی^۷ NMDA واقع می‌شود. پیری و بت‌آمیلوئید به طور پیوسته سبب نفوذ یون کلسیم به نورون‌ها از طریق کانال‌های کلسیمی نوع L می‌شوند [۱۴، ۱۵]. شبکه آندوپلاسمی^۸ یک اندامک داخل‌سلولی است که در تنظیم هومئوستاز کلسیم داخل‌سلولی، تاشدگی پروتئین و فعال‌سازی مرگ سلولی دخیل است. در شرایط پاتولوژیک از جمله بیماری آلزایمر، افزایش شدید و طولانی مدت کلسیم داخل‌سلولی منجر به یک پدیده شناخته شده به نام استرس شبکه آندوپلاسمی می‌شود که در آن پروتئین‌های تا نخورده یا بد تاخورد انباشته می‌شوند و سپس مسیر آپوپتوز ناشی از استرس شبکه آندوپلاسمی فعال می‌شود. نشان‌دهنده شده است که کلاپسین و چندین کاسپاز از جمله کاسپاز ۱۲ و ۳ در استرس شبکه آندوپلاسمی نقش دارند. پیش‌بینی شده است که کاسپاز ۳ پروتئین پیش‌ساز آمیلوئیدی را تجزیه می‌کند و بنابراین مقدار بت‌آمیلوئید (۴۲-۱) را افزایش می‌دهد که به نوبه خود در یک چرخه معیوب منجر به فعال‌سازی بیشتر کاسپاز شده و در نهایت باعث افزایش مرگ سلولی در بیماری آلزایمر می‌شود. شواهد حاکی از آن است که مسدودکننده‌های کانال کلسیم می‌توانند باعث کاهش سرعت پیشرفت بیماری آلزایمر شوند [۱۶، ۱۷]. نشان‌دهنده شده است که مسدودکننده‌های کانال کلسیمی توانسته‌اند اختلال حافظه و یادگیری فضایی ناشی از بت‌آمیلوئید را بهبود بخشند [۱۸]. هنوز مشخص نیست که چگونه بیماری آلزایمر از یک ناحیه محدود مانند قشر انتورینال به نواحی مجاور سرایت می‌یابد. اما در مطالعه‌ای هریس^۹ و همکاران در مدل موشی که بیان ژن پیش‌ساز آمیلوئیدی در قشر انتورینال آن‌ها

³ Cornu Ammonis⁴ Dentate gyrus⁵ Neurofibrillary tangles⁶ Tau⁷ N-Methyl-D-Aspartate⁸ Endoplasmic reticulum⁹ Harris

بیش از حد القاء شده بود دریافتند که بت‌آمیلوئید می‌تواند به‌صورت انتقال آکسونی از قشر انتورینال به شکنج‌دندانه‌ای انتقال یابد و سبب ایجاد اختلال LTP در شکنج‌دندانه‌ای شود [۱۹]. از سوی دیگر، پالوپ^{۱۰} و همکاران نشان داده‌اند که بت‌آمیلوئید موجب افزایش فعالیت نورونی در ناحیه هیپوکامپ و ایجاد پاسخ جبرانی متعاقب در شکنج‌دندانه‌ای می‌شود [۲۰]. با این حال، ارتباط بین قشر انتورینال، CA1 و شکنج‌دندانه‌ای در مدل‌های تجربی بیماری آلزایمر به‌طور کامل مشخص نشده است و کاندید درمانی که از ساختار و عملکرد این شبکه محافظت کند، هنوز شناسایی نشده است. بنابراین، ما در این مطالعه به ارزیابی تغییرات مولکولی در ناحیه CA1 هیپوکامپ متعاقب تزریق بت‌آمیلوئید در قشر انتورینال پرداختیم و در نهایت نقش حفاظتی مسدودکننده‌های کانال‌های کلسیمی در برابر بت‌آمیلوئید بررسی کردیم.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار با محدوده وزنی (۲۳۰-۲۸۰ گرم) پرورش یافته در انستیتو پاستور ایران استفاده گردید. موشها در شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و در درجه حرارت کنترل شده $23 \pm 1^\circ\text{C}$ نگهداری شدند. حیوانات به غیر از زمان انجام آزمایش‌های رفتاری به آب و غذای کافی دسترسی داشتند. در این مدت سعی شد نکات اخلاقی در زمان نگهداری و اجرای مراحل مختلف آزمایشی رعایت گردد این مطالعه دارای کد اخلاق به شماره ۸۸۳۵۸-۱۲-۲۵ از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی می‌باشد.

روش القای آلزایمر و تزریق دارو

بت‌آمیلوئید ۱-۴۲ از شرکت Tocris انگلستان خریداری شد و در 0.1 M بافر فسفات با $\text{pH } 7.4$ حل شده سپس در میکرتیوپ‌هایی به حجم ۱۰ میکرولیتر توزیع گردید و در دمای 70°C تا زمان استفاده نگهداری شد. ۲ میکرولیتر از بت‌آمیلوئید تازه تهیه شده (0.5 میکروگرم بر میکرولیتر) برای هر تزریق استفاده شد. حیوانات به روش داخل صفاقی با کتامین^{۱۱} و زایلازین^{۱۲} بیهوش شدند و سپس سر حیوان در

دستگاه استریوتاکسی ثابت شد. موی قسمت جمجمه حیوان تراشیده شده و با پنبه آغشته به بت‌آمین سطح پوست سر جانور ضد عفونی شده توسط تیغ جراحی استریل یک برش از فاصله بین چشم‌ها تا گوش‌ها در خط وسط (در امتداد شیار ساژیتال میانی جمجمه) داده شد. با کمک پنبه و الکل سفید سطح جمجمه در قسمت مورد نظر تمیز شد و پوست و چربی اضافه این قسمت به‌طور کامل برداشته شدند. بعد از این که جمجمه کاملاً خشک شد نقطه‌های موردنظر برگما^{۱۳} و لامبدا^{۱۴} علامت گذاری گردید. با استفاده از اطلس پاکسینوس و واتسون مشخصات سمت راست انتورینال کورتکس ($\pm 6 =$ جانبی، $-8/2 =$ پشتی-شکمی و $-5/0.5 =$ قدامی-خلفی) مشخص شد و با مته دندان‌پزشکی سوراخ گردید [۲۱]. تزریق دارو به کمک یک سوزن تزریق شماره ۳۰ و لوله پلی اتیلن که به یک سرنگ هامیلتون ۵ میکرولیتری وصل بود انجام شد. در گروه آلزایمری دو میکرولیتر از بت‌آمیلوئید و در گروه کنترل نیز دو میکرو لیتر محلول فسفات بافر در طی سه دقیقه به داخل قشر انتورینال تزریق شد. سپس یک کانول راهنما با مختصات بطن راست ($1/8 =$ جانبی، $-3/4 =$ پشتی-شکمی و $-0.96 =$ قدامی-خلفی) از روی اطلس پاکسینوس و واتسون به اندازه یک میلی‌متر بالاتر از محل تزریق کار گذاشته شد. برای تهیه کانول راهنما، سرسنگ شماره ۲۳ (۸ میلی‌متر)، از جنس فولاد ضدزنگ به کار گرفته شد. کانول تعبیه‌شده، توسط دو عدد پیچ عینک و با استفاده از آکرل دندانپزشکی در محل خود محکم شدند. از روز اول جراحی تا روز شش، ایزرادپین و نیمودپین شرکت Tocris انگلستان هر دو با دوز (30 میکروگرم / 5 میکرولیتر) تزریق شدند. به گروه کنترل دی‌متیل‌سولفوکساید بصورت داخل بطنی تزریق گردید. داروها به‌وسیله کانول تزریق شماره ۳۰ که با یک رابط پلی‌اتیلنی به سرنگ هامیلتون ۵ میکرولیتری وصل بود، تزریق گردید. از مطالعه قبلی تعیین شده بود که داروی ایزرادپین و نیمودپین در دوز 30 میکروگرم بیشترین اثرات را داشته‌اند [۹]. به همین خاطر، در این مطالعه این دوز مورد بررسی قرار گرفت. بعد از انجام آخرین تزریق، جهت انجام پرفیوژن قلبی ابتدا حیوانات تحت بی‌هوشی عمیق با کتامین و زایلازین قرار گرفتند. سپس حیوانات بر روی تخت مخصوص پرفیوژن قرار داده شدند و

¹³ Bregma

¹⁴ Lambda

¹⁰ Palop

¹¹ Ketamine

¹² Xylazine

۱/۱۰۰۰ و کاسپاز ۳ از شرکت Abcam (آمریکا) با رقت ۱/۱۰۰۰ انکوبه شد و سپس با آنتی بادی ثانویه (ایمونوگلوبین ضد خرگوش از شرکت Invitrogen، آمریکا) انکوبه شدند. باندهای پروتئینی مورد نظر توسط کیت ECL^{۱۷} (Bioscience، آمریکا) قابل رویت شدند و و روی فیلم رادیوگرافی منتقل و با نرم افزار Image J مورد آنالیز قرار گرفتند.

تست تانل

برای انجام تست تانل، مغز حیوان‌ها به مدت ۲ روز در محلول پارافرمالدئید ۴٪ نگهداری شد و بلوکهای پرافینی تهیه شد. توسط دستگاه میکروتوم برش‌های مغزی با ضخامت ۵ میکرومتر تهیه شد و روی لام‌های با پوشش پلی‌ال-لایزین ۱٪ قرار داده شد. به منظور شناسایی سلول‌ای آپوپتوتیک از کیت تانل (Roche، آلمان) استفاده شد و طبق روش توضیح داده شد در کیت مراحل آزمایش انجام شد.

آنالیز آماری

نتایج آماری حاصل از این مطالعه با استفاده از نسخه ۶ نرم افزار گراف‌پد پریسم^{۱۸} مورد آنالیز قرار گرفت. نتایج این مطالعه با استفاده از روش آنالیز واریانس یکطرفه^{۱۹} آنالیز گردید. اطلاعات به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار میانگین برای هر گروه ارائه شد و سطح معنی‌دار $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

آنالیز واریانس یکطرفه تفاوت معنی‌داری را در میزان بیان کالپین و کاسپاز ۱۲ بین گروه‌ها نشان می‌دهد، به ترتیب $[F(3, 12) = 42/3, p = 0.001]$ و $[F(3, 12) = 8/1, p = 0.003]$ همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود تزریق بتا آمیلوئید در ناحیه انتورینال باعث افزایش معنی‌دار میزان بیان کالپین ۲ و کاسپاز ۱۲ در ناحیه CA1 نسبت به گروه کنترل گردید. تیمار روزانه حیوانات با ایزرادپین و نیمودپین باعث کاهش میزان بیان این دو پروتئین نسبت به گروه بتا آمیلوئیدی شد.

برشی در پوست ناحیه قدامی قفسه سینه و شکم آن‌ها داده شد. پس از بازکردن شکم، اتصالات کبد و دیافراگم قطع شده و غضروف‌های دنده‌های دو طرف بریده شده و جدار قدامی قفسه سینه بالا نگه‌داشته شد. پس از بازکردن پریکاردیوم، سر سوزنی متصل به بطری حاوی نرمال سالین ۰/۹ درصد وارد بطن چپ قلب گردید و با یک سوزن نیز شکافی در دهلیز راست ایجاد شد که از آن خون و محلول تزریقی پس از گردش در بدن، خارج می‌شد. جهت انجام آزمایش وسترن بلات مغز حیوان بلافاصله خارج و برشی هیپوکامپی با ضخامت ۵۰۰ میکرومتر توسط دستگاه ویبراتوم تهیه و ناحیه CA1 زیر میکروسکوپ لوپ جدا و جمع‌آوری گردید. جهت انجام تست تانل، ۲۵۰ میلی‌لیتر محلول فیکساتیو شامل پارافرمالدئید ۴٪ در فسفات بافر ۰/۱ مولار بعد از سالین به صورت داخل قلبی پروفیوژ شد و سپس مغز حیوان خارج و بلوک پرافینه تهیه شد.

وسترن بلات

جهت بررسی تغییرات بیان پروتئین‌های کالپین ۲، کاسپاز ۱۲ و ۳ در ناحیه CA1 از تکنیک وسترن بلات استفاده شد. یک هفته بعد از تزریق بتا آمیلوئید در ناحیه انتورینال بعد از القاء بیهوشی عمیق با کتامین و زایلازین و انجام عمل پرفیوژن سر حیوانات با گیوتین جدا و مغز آن‌ها خارج شد. هیپوکامپ‌های دوطرف خارج و با استفاده از ویبراتوم برش‌های با ضخامت ۵۰۰ میکرومتر تهیه شد. سپس ناحیه CA1 جدا و جمع‌آوری شده و بلافاصله در تانک ازت گذاشته شد و بعد از ۲۴ ساعت به فریزر ۷۰- منتقل شد. نمونه‌های بافتی در بافر لیزکننده هموژن شده و سپس بافت‌های هموژنه در دمای ۴°C و سرعت چرخش ۱۳۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. غلظت‌های پروتئینی هر نمونه مطابق روش برادفورد تعیین شدند و میزانی معادل ۵۰ میکروگرم از پروتئین کل هر نمونه جهت الکتروفورز^{۱۵} SDS-PAGE در نظر گرفته شد. پروتئین‌ها بر روی غشاهای PVDF^{۱۶} طبق راهنمایی‌های شرکت Bio-Rad منتقل شدند بعد از مرحله بلاکینگ، غشاها با آنتی بادی اولیه کالپین ۲، کاسپاز ۱۲ (از شرکت Cell Signaling Technology (آمریکا) با رقت

¹⁷ Enhanced chemiluminescence

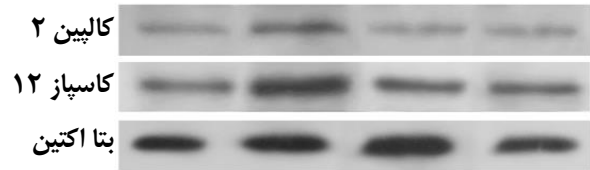
¹⁸ Graphpad Prism

¹⁹ One way ANOVA

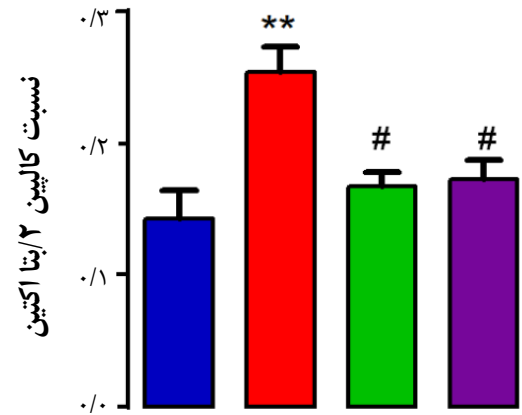
¹⁵ Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

¹⁶ Polyvinylidene fluoride

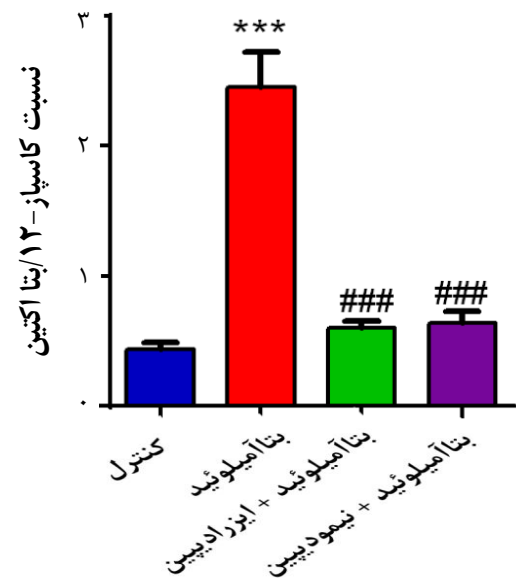
(الف)



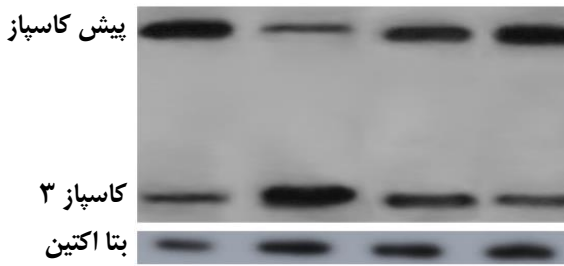
(ب)



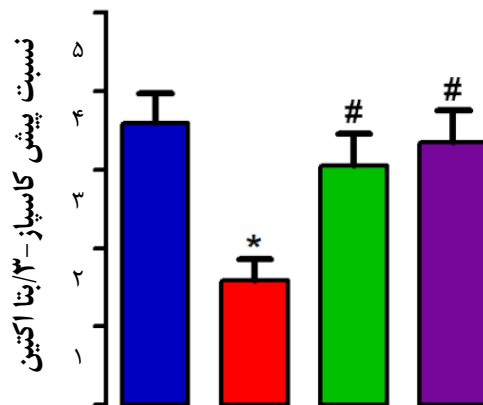
(ج)



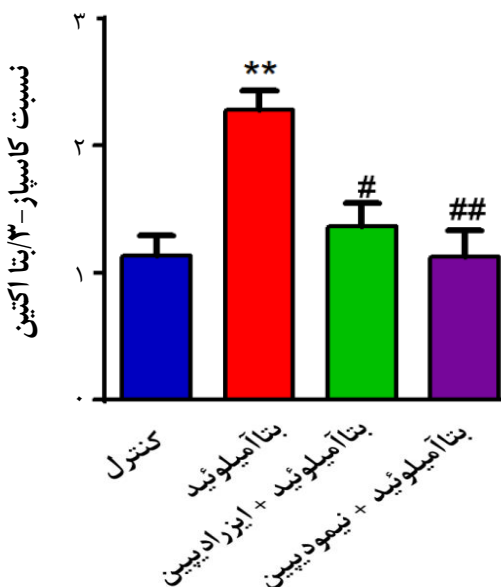
(الف)



(ب)



(ج)



شکل ۲- تزریق بت‌آمیلوئید به‌داخل قشر انتورینال باعث افزایش بیان کاسپاز ۳ می‌شود. (الف) یک نمونه از باندهای مربوط به پیش‌کاسپاز ۳، کاسپاز ۳ و بت‌آکتین را نشان می‌دهد. (ب) تزریق بت‌آمیلوئید به‌داخل قشر انتورینال باعث کاهش بیان پیش‌کاسپاز ۳ در ناحیه CA1 می‌گردد و تیمار حیوانات با ایزرادیپین و نیمودیپین سطح آن را به سطح کنترل بازگردانند. (ج) آمیلوئیدوپاتی قشر انتورینال باعث افزایش سطح کاسپاز ۳ در ناحیه CA1 می‌گردد و تیمار حیوانات با ایزرادیپین و نیمودیپین سطح بیان این پروتئین را بطور معنی‌داری کاهش داد. ترتیب باندها متناظر با ترتیب ستون‌ها در هیستوگرام هستند. *: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل با $p < 0.05$. **: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل با $p < 0.01$. #: اختلاف معنی‌دار با گروه بت‌آمیلوئید با $p < 0.05$ و ###: اختلاف معنی‌دار با گروه بت‌آمیلوئید با $p < 0.01$. تعداد حیوان در هر گروه ۴ سر.

شکل ۱- افزایش سطح کالپین ۲ و کاسپاز ۱۲ در ناحیه CA1 متعاقب تزریق بت‌آمیلوئید به داخل قشر انتورینال. (الف) یک نمونه از باندهای مربوط به کالپین ۲، کاسپاز ۱۲ و بت‌آکتین را نشان می‌دهد. (ب) نشان می‌دهد تزریق بت‌آمیلوئید به‌داخل قشر انتورینال باعث افزایش بیان کالپین ۲ در ناحیه CA1 می‌گردد و تیمار حیوانات با ایزرادیپین و نیمودیپین سطح بیان کالپین ۲ را بطور معنی‌داری کاهش می‌دهد. (ج) آمیلوئیدوپاتی قشر انتورینال باعث افزایش سطح کاسپاز ۱۲ در ناحیه CA1 می‌گردد و تیمار حیوانات با ایزرادیپین و نیمودیپین سطح بیان این پروتئین را بطور معنی‌داری کاهش می‌دهد. ترتیب باندها متناظر با ترتیب ستون‌ها در هیستوگرام هستند. توجه شود مقیاس محور عمودی در دو هیستوگرام با هم فرق دارد. **: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل با $p < 0.01$ و ***: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل با $p < 0.001$. #: اختلاف معنی‌دار با گروه بت‌آمیلوئید با $p < 0.05$ و ###: اختلاف معنی‌دار با گروه بت‌آمیلوئید با $p < 0.001$. تعداد حیوان در هر گروه ۴ سر.

همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود میزان بیان پیش‌ساز پروتئین کاسپاز ۳ در ناحیه CA1 متعاقب آمیلوئیدوپاتی در قشر انتورینال کاهش یافت و تیمار حیوانات با ایزرادپین و نیمودیپین تغییر بیان این پروتئین را به گروه کنترل نزدیک کرد [$F(3, 12) = 9/5, p = 0/001$] بررسی میزان بیان کاسپاز ۳ نشان داد که بیان این پروتئین نیز در ناحیه CA1 متعاقب میکروتزریق بت‌آمیلوئید در قشر انتورینال نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری یافت ($p < 0/01$). درحالی که تیمار حیوانات با ایزرادپین و نیمودیپین توانست به میزان معنی‌داری بیان این پروتئین در ناحیه CA1 را نسبت به گروه بت‌آمیلوئیدی کاهش دهد ($p < 0/05$).

شکل ۳ تغییرات آپوپتوتیک سلول‌های (سلول‌های قهوه‌ای‌رنگ که با فلش نشان داده شده است) ناحیه قشر انتورینال، شکنج‌دندانه‌ای و CA1 را متعاقب تزریق بت‌آمیلوئید در قشر انتورینال نشان می‌دهد. همانطور که مشخص است تغییرات آپوپتوتیک در ناحیه CA1 متعاقب آمیلوئیدوپاتی قشر انتورینال مشاهده می‌شود اما وسعت آن نسبت به شکنج‌دندانه‌ای و قشر انتورینال کمتر است. درحالی که تیمار روزانه حیوانات به مدت شش روز با ایزرادپین و نیمودیپین تغییرات آپوپتوتیک ناشی از بت‌آمیلوئید را در هر سه ناحیه کاهش داد و این کاهش در ناحیه شکنج‌دندانه‌ای نسبت به دو ناحیه دیگر بارزتر به نظر می‌رسد.

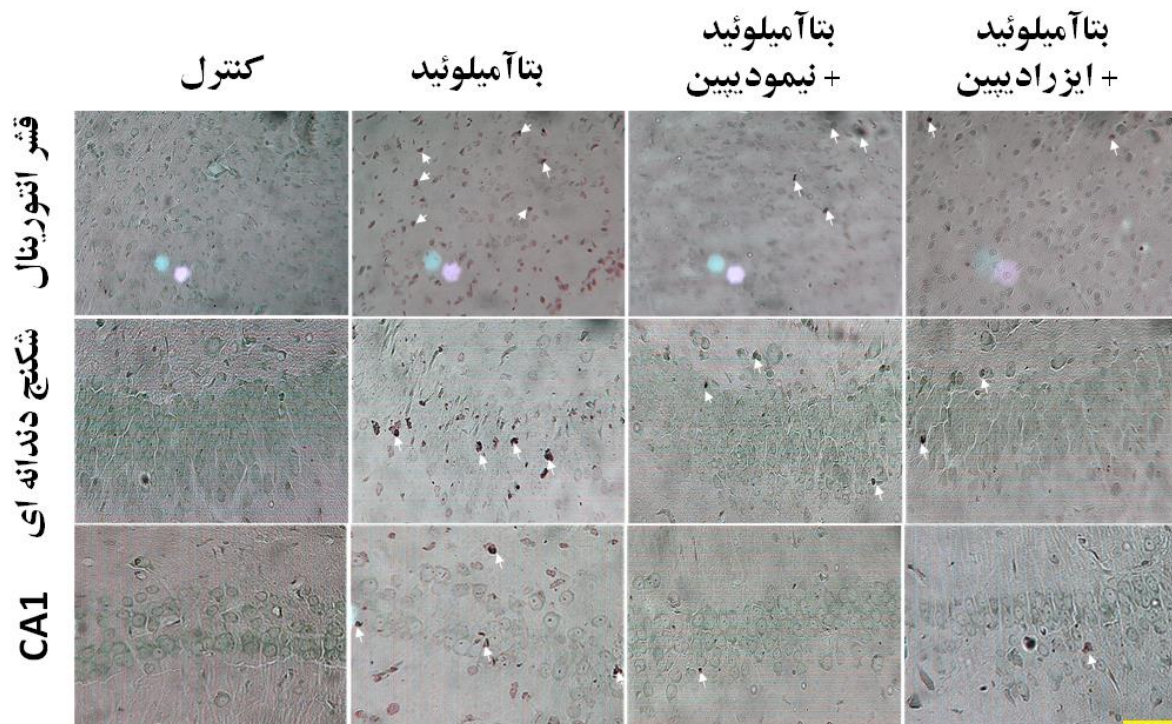
بحث

هدف از این مطالعه بررسی تغییرات مولکولی مرتبط با آپوپتوز در ناحیه CA1 متعاقب تزریق بت‌آمیلوئید در ناحیه انتورینال بود. ما دریافتیم که به دنبال القاء آمیلوئیدوپاتی در قشر انتورینال بیان پروتئین‌های کالپین ۲، کاسپاز ۱۲ و ۳ در ناحیه CA1 افزایش می‌یابد. همچنین در آزمایش تانل تغییرات آپوپتوتیک واضحی در ناحیه CA1 در گروه بت‌آمیلوئیدی مشاهده شد. در حالیکه تیمار حیوانات با مسدودکننده‌های کانال کلسیمی یعنی ایزرادپین و نیمودیپین سطح بیان پروتئین‌های مذکور را کاهش و میزان سلول‌های دچار آپوپتوز را در ناحیه CA1 کاهش داد.

بیماری آلزایمر رایج‌ترین شکل زوال عقل است که منجر به تخریب و مرگ سلول‌های عصبی در نواحی مغزی به‌ویژه نواحی درگیر در فرایند یادگیری و تشکیل حافظه می‌شود [۱].

براک^{۲۰} و همکارانش برای اولین بار در سال ۱۹۹۱ نشان دادند که قشر انتورینال اولین ناحیه از مغز است که در بیماری آلزایمر درگیر می‌شود و سپس این بیماری به شیوه شبه پریونی به سایر نواحی مغزی سرایت می‌کند. آن‌ها کلافه‌های نوروفیبری را در این مطالعه مورد بررسی قرار داده بودند [۲۲]. در ارتباط با علت بیماری آلزایمر چندین دیدگاه وجود دارد مانند تجمع بت‌آمیلوئید و در نهایت رسوب آن در مغز که برخی از محققین آن را دلیل اصلی بیماری آلزایمر می‌دانند اما برخی بیشتر روی هیپرفسفریلاسیون پروتئین تاو تاکید دارند که در داخل سلول منجر به تشکیل کلافه‌های نوروفیبری شده و در نهایت با مختل کردن نقل و انتقال آکسونی باعث مرگ سلولی می‌شود. اخیراً دو نظریه دیگر مطرح است یکی اختلال در هومئوستاز کلسیم داخل سلولی و دیگری اختلال متابولیتی [۲۳، ۹]. اما در مورد دو فرضیه اول یعنی بت‌آمیلوئید و هیپرفسفریلاسیون پروتئین تاو هنوز مشخص نیست کدام یک مقدم می‌شود. اما اخیراً یک مطالعه نشان داده است که تیمار سلول‌ها با بت‌آمیلوئید منجر به هیپرفسفریلاسیون پروتئین تاو می‌شود و چنین استدلال نموده است که بت‌آمیلوئید بر پروتئین تاو در آسیب‌زایی بیماری آلزایمر تقدم دارد. اینکه چگونه بیماری از یک نقطه شروع و به نواحی دیگر سرایت می‌کند هنوز مشخص نیست. ما در مطالعات قبلی دریافتیم که تزریق محلول تازه بت‌آمیلوئید به داخل قشر انتورینال منجر به تغییر پروفایل مولکولی در شکنج‌دندانه‌ای [۲۴]، تغییر فعالیت سلولی در این ناحیه، به هم خوردن تعادل جریانات سیناپسی تحریکی [۱۸] و مهارت به نفع مهار، اختلال در جریان کلسیمی در شکنج‌دندانه‌ای [۲۵] در نهایت آهسته‌شدن روند یادگیری و اختلال در انعطاف‌پذیری (تغییر یا سویچ) حافظه می‌شود. این که قشر انتورینال می‌تواند باعث بروز تغییرات در نواحی هدف مجاور باشد، می‌تواند کمک‌کننده باشد. تغییرات دیده‌شده در نواحی شکنج‌دندانه‌ای و CA1 همچنین می‌تواند ناشی از انتقال مونومرها، دیمرها یا اولیگومر بت‌آمیلوئید از ناحیه تزریق به نواحی مذکور بوده باشد. در تایید این دیدگاه، هریس و همکاران در یک مدل موشی که دچار افزایش بیان ژن پیش‌ساز بت‌آمیلوئید در قشر انتورینال بود، نشان دادند که بت‌آمیلوئید قادر است به صورت داخل آکسونی از قشر انتورینال به شکنج‌دندانه‌ای انتقال یابد و بیان پروتئین‌های مربوط به فعالیت نورونی را در آن ناحیه تغییر دهد [۱۹]. ما در این

²⁰Braak



شکل ۳- تغییرات آپوپتوتیک سلول‌های ناحیه قشر انتورینال، شکنج‌دندانه‌ای و CA1 متعاقب تزریق بت‌آمیلوئید در قشر انتورینال. تزریق بت‌آمیلوئید به داخل قشر انتورینال باعث افزایش تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در قشر انتورینال، شکنج‌دندانه‌ای و ناحیه CA1 گردید و درمان با مسدودکننده‌های کانال کلسیمی توانست جلوی اثر مخرب بت‌آمیلوئید را به‌ویژه در ناحیه شکنج‌دندانه‌ای بگیرد. (بزرگ نمایی ۲۰۰، مقیاس (خط زرد) ۵۰ میکرومتر)

و همکاران گزارش کرده‌اند که مسدودکننده‌های کانال کلسیمی قادر هستند از رده سلولی نوروبلاستوما موشی در برابر بت‌آمیلوئید محافظت کنند [۱۲]. ما در این مطالعه ایزرادپین و نیمودیپین را به‌صورت داخل‌بطنی تزریق کردیم. بنابراین اثر محافظتی این داروها بر سلول‌های ناحیه CA1 می‌تواند ناشی از حفظ نورون‌های قشر انتورینال و در نتیجه نگهداری ارتباط نورونی در شبکه هیپوکامپی باشد. همچنین محافظت مستقیم سلول‌های ناحیه CA1 از جمله مکانیسم دیگری است که توسط این داروها ممکن است رخ داده باشد. جهت اطمینان در این باره بهتر است مطالعه‌ای طراحی شود که در آن با تزریق موضعی بت‌آمیلوئید در ناحیه CA1 بتوان اثر محافظتی مستقیم این داروها را بهتر مشخص کرد.

نتیجه‌گیری

در پایان، نتایج این مطالعه نشان داد که تزریق بت‌آمیلوئید در قشر انتورینال منجر به تغییر بیان پروتئین‌های مرتبط با آپوپتوز در ناحیه CA1 می‌شود و درمان با مسدودکننده‌های کانال کلسیمی توانست از این تغییرات جلوگیری کند. با توجه به اینکه بیماری

مطالعه دریافتیم که مسدودکننده‌های کانال کلسیمی ایزرادپین (که نسبت به سایر دی‌هیدروپیریدین‌ها با تمایل بیشتری کانال کلسیمی وابسته به ولتاژ نوع CV1.3 را مسدود می‌کند) و نیمودیپین (با تمایل ۱۰ برابر بیشتر، کانال نوع CaV1.2 را نسبت به CaV1.2 مسدود می‌کند) از تغییرات آپوپتوتیک در ناحیه CA1 به دنبال آمیلوئیدوپاتی قشر انتورینال جلوگیری می‌کند. مطالعات زیادی در خصوص نقش کلسیم در بیماری آلزایمر انجام شده است. برای مثال نشان داده شده است که بت‌آمیلوئید از طریق افزایش نفوذپذیری غشاء پلاسمایی نورون‌ها به یون کلسیم باعث مختل شدن هومئوستاز کلسیم داخل سلولی می‌شود [۲۳]. به‌علاوه گزارش شده است که بت‌آمیلوئید به‌طور اختصاصی باعث افزایش فعالیت و تعداد کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ نوع L می‌شود [۲۴]. قبلاً هم ما دریافتیم که مسدودکننده‌های کانال کلسیمی مانع تغییر پروفایل مرتبط با آپوپتوز در ناحیه شکنج‌دندانه‌ای می‌شود [۱۸]. همچنین در مقاله‌ای که اخیراً به چاپ رسیده است ما نشان دادیم که این داروها از استرس شبکه اندوپلاسمی در ناحیه شکنج‌دندانه‌ای به دنبال تزریق بت‌آمیلوئید در قشر انتورینال جلوگیری می‌کنند [۱۸]. در همین راستا، آنکوندا^{۲۱}

²¹ Anekonda

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

نقش نویسندگان

ح.غ.پ.ب: طراحی ایده، انجام مطالعه، آنالیز داده‌ها و نوشتن مقاله؛ م.ج: نوشتن مقاله؛ ف.خ: نظارت بر انجام مطالعه؛ ف.ش: انجام مطالعه.

آزایمر از یک ناحیه محدود مانند قشر انتورینال شروع و به سایر نواحی گسترش می‌یابد استفاده از مسدودکننده‌های کانال کلسیمی می‌تواند کاندید درمانی مناسبی برای جلوگیری از پیشرفت بیماری در مراحل اولیه بیماری باشند. اما برای تایید نهایی اثر محافظتی این داروها در این خصوص مطالعات بیشتری لازم است.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر بخشی از پایان‌نامه دوره دکتری مصوب مرکز علوم اعصاب شهید بهشتی می باشد و از آن مرکز بابت تامین هزینه مالی قدردانی می‌گیرد.

فهرست منابع

- [1] Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H, Alzheimer's disease. *Lancet* 368 (2006) 387-403.
- [2] Fiock KL, Smith JD, Crary JF, Hefti MM, Beta-amyloid and Tau Pathology in the Aging Feline Brain. *J Comp Neurol* (2019) in press.
- [3] Glenner GG, Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120 (2012) 534-539.
- [4] Eichenbaum H, Lipton PA, Towards a functional organization of the medial temporal lobe memory system: role of the parahippocampal and medial entorhinal cortical areas. *Hippocampus* 18 (2008) 1314-1324.
- [5] Squire LR, Stark CE, Clark RE, The medial temporal lobe. *Annu Rev Neurosci* 27 (2004) 279-306.
- [6] van Groen T, Miettinen P, Kadish I, The entorhinal cortex of the mouse: organization of the projection to the hippocampal formation. *Hippocampus* 13 (2003) 133-49.
- [7] Braak H, Braak E, Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82 (1991) 239-259.
- [8] Dong J, Zhou M, Wu X, Du M, Wang X, Memantine combined with environmental enrichment improves spatial memory and alleviates Alzheimer's disease-like pathology in senescence-accelerated prone-8 (SAMP8) mice. *J Biomed Res* 26 (2012) 439-447.
- [9] Walsh DM, Selkoe DJ, Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron* 44 (2004) 181-193.
- [10] Han SI, Kim YS, Kim TH, Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions. *BMB Rep* 41 (2008) 1-10.
- [11] Wlodkowicz D, Skommer J, McGuinness D, Hillier C, Darzynkiewicz Z, ER-Golgi network-A future target for anti-cancer therapy. *Leuk Res* 33 (2009) 1440-1447.
- [12] Anekonda TS, Quinn JF, Harris C, Frahler K, Wadsworth TL, Woltjer RL, L-type voltage-gated calcium channel blockade with isradipine as a therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 41 (2011) 62-70.
- [13] Tu H, Nelson O, Bezprozvanny A, Wang Z, Lee SF, Hao YH, Serneels L, De Strooper B, Yu G, Bezprozvanny I, Presenilins form ER Ca²⁺ leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease-linked mutations. *Cell* 126 (2006) 981-93.
- [14] Chan SL, Mayne M, Holden CP, Geiger JD, Mattson MP, Presenilin-1 mutations increase levels of ryanodine receptors and calcium release in PC12 cells and cortical neurons. *J Biol Chem* 275 (2000) 18195-18200.
- [15] Texido L, Martin-Satue M, Alberdi E, Solsona C, Matute C, Amyloid beta peptide oligomers directly activate NMDA receptors. *Cell Calcium* 49 (2011) 184-190.
- [16] Malhotra JD, Kaufman RJ, ER stress and its functional link to mitochondria: role in cell survival and death. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3 (2011) a004424.
- [17] Fritze J, Walden J, Clinical findings with nimodipine in dementia: test of the calcium hypothesis. *J Neural Transm Suppl* 46 (1995) 439-453.
- [18] Pourbadie HG, Naderi N, Mehranfard N, Janahmadi M, Khodagholi F, Motamedi F, Preventing effect of L-type calcium channel blockade on electrophysiological alterations in dentate gyrus granule cells induced by entorhinal amyloid pathology. *PLoS one* 10 (2015) e0117555.
- [19] Harris JA, Devidze N, Verret L, Ho K, Halabisky B, Thwin MT, Kim D, Hamto P, Lo I, Yu GQ, Palop JJ, Masliah E, Mucke L, Transsynaptic progression of amyloid-beta-induced neuronal dysfunction within the entorhinal-hippocampal network. *Neuron* 68 (2010) 428-41.
- [20] Palop JJ, Chin J, Roberson ED, Wang J, Thwin MT, Bien-Ly N, Yoo J, Ho KO, Yu GQ, Kreitzer A, Finkbeiner S, Noebels JL, Mucke L, Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of

- inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease. *Neuron* 55 (2007) 697-711.
- [21] Paxinos G, Watson C, The rat brain in stereotaxic coordinates. 5th ed. Elsevier, academic Press, 2005: 118.
- [22] Braak H, Braak E, Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82 (1991) 239-259.
- [23] Baumann O, Walz B, Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. *Int Rev Cytol* 205 (2001) 149-214.
- [24] Pourbadie HG, Naderi N, Khodagholi F, Shaerzadeh F, Motamedi F, L-type calcium channel blockade alleviates molecular and reversal spatial learning and memory alterations induced by entorhinal amyloid pathology in rats. *Behav Brain Res* 237 (2013) 190-199.
- [25] Pourbadie HG, Naderi N, Delavar HM, Hosseinzadeh M, Mehranfard N, Khodagholi F, Janahmadi M, Motamedi F, Decrease of high voltage Ca^{2+} currents in the dentate gyrus granule cells by entorhinal amyloidopathy is reversed by calcium channel blockade. *Eur J Pharmacol* 794 (2017) 154-161.

Research paper

Evaluation of apoptosis related molecular profile in the hippocampus following microinjection of amyloid-beta into the rat's entorhinal cortex; Protective role of calcium channel blockersHamid Gholami Pourbadie^{1*}, Marzieh Joneidi¹, Fariba Khodagholi², Fatemeh Shaerzadeh²

1. Department of Physiology and Pharmacology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

2. Neuroscience Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 21 July 2019

Accepted: 31 August 2019

Abstract

Background and aims: Alzheimer's disease (AD) is a progressive brain disorder that is associated with dementia. The entorhinal cortex (EC) is one of the first brain regions affected in AD. High level of beta-amyloid (A β) is seen in various brain regions, including the EC. Previous studies have shown that A β causes calcium dyshomeostasis. In this study, molecular changes in the CA1 region following microinjection of A β into the EC and the potential protective role of calcium channel blockers was investigated.

Methods: A β (1 μ g/2 μ l) was injected into the right EC of male Wistar rats under stereotaxic surgery, and then a guide cannula was planted in the right ventricle. Isradipine and nimodipine were intraventricularly injected at 30 μ g daily for 6 days. On the seventh day, the expression of Calpain 2, Caspase 12 and 3 in hippocampal CA1 was measured by western blot technique. Pro-apoptotic changes were also assessed by Tunnel test.

Results: Results indicated that A β injection into the EC increased the expression of Calpain 2, Caspase 12 and 3 in the CA1 region. Apoptotic cells were also increased in the CA1 region following amyloidopathy in the EC. Following the treatment of the rats with isradipine and nimodipine, the expression of Calpain 2, Caspase 12 and 3 decreased, and the number of apoptotic cells was returned to the control level.

Conclusion: EC amyloidopathy may change the molecular profile associated with apoptosis in neighbor regions such as CA1 and treatment with calcium channel blockers can prevent the changes.

Keywords: Alzheimer's disease, entorhinal cortex, calcium channel blockers, CA1

Please cite this article as follows:

Gholami Pourbadie H, Joneidi M, Khodagholi F, Shaerzadeh F, Evaluation of endoplasmic reticulum stress related molecular profile in the hippocampus following microinjection of amyloid-beta into the rat's entorhinal cortex; Protective role of calcium channel blockers. *Iran J Physiol Pharmacol* 3 (2019) 89-98.

*Corresponding author: h_gholamipour@pasteur.ac.ir (ORCID ID: 0000-0002-7634-7428)