IranJPP
Iranian Journal of
Physiology and Pharmacology

مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران

سال ۱۳۹۸ ، دوره ۳، شماره ۲، پیاپی ۱۰، صفحه ۹۸-۸۹

مقاله پژوهشی

ارزیابی تغییرات مولکولی مرتبط با آپوپتوز درناحیه هیپوکامپ متعاقب تزریق بتاآمیلوئید 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 ازپروتئین بتاآمیلوئید درمناطق مختلف مغزی از جمله قشر انتورینال مشاهده می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند بتاآمیلوئید باعث اختلال هومئوستاز کلسیمی می‌شود. در این مطالعه تغییرات مولکولی درناحیه CA1 هیپوکامپ متعاقب تزریق بتاآمیلوئید در ناحیه انتورینال و همچنین نقش احتمالی محافظتی مسدودکننده‌های کلسیمی مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: بتاآمیلوئید (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 نیمودیپین با دوز ۳۰ میکروگرم به‌صورت 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 نشان‌دادن سلول‌های دچار آپوپتوز از تست تانل استفاده شد.

یافته‌ها: تزریق بتاآمیلوئید 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. بدنبال تیمار موش‌ها با ایزرادیپین و نیمودیپین 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 بتاآمیلوئید درمناطق مغزی که در یادگیری و حافظه دخیل هستند مثل قشر انتورینال[1] و تشکیلات هیپوکامپ نشان داده شده است [۱]. پپتیدهای بتاآمیلوئید از ۴۳-۳۸ اسیدآمینه تشکیل شده‌اند که از دژنره شدن پیش ساز آمیلوئید بتا[2] در اثر فعالیت آنزیم‌های بتا- و گاما-سکرتاز تشکیل می‌شوند [۳، ۲]. تجمع بتاآمیلوئید در هیپوکامپ باعث کاهش یادگیری و پلاستیسیتی سیناپسی و

[1] Entorhinal cortex

[2] Amyloid precursor protein

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: h_gholamipour@pasteur.ac.ir (ORCID ID: 0000-0002-7634-7428)

همچنین باعث فعال‌شدن آستروسیت‌ها و میکروگلیاها می‌شود که نتیجه آن آزاد شدن سایتوکین‌های التهابی و در نتیجه بروز پاسخ های التهابی و در آخر مرگ سلول‌های عصبی می‌باشد [۳]. تشکیلات هیپوکامپ شامل شاخ آمون[3] (CA1-CA4)، شکنج‌دندانه‌ای و ساببکلوم است. مسیر انتورینال–هیپوکامپ برای کدگذاری انواع مختلف حافظه ضروری است و در بیماری آلزایمر این مسیر تحت تاثیر قرار می‌گیرد [۵، ۴]. از طریق مسیر پرفورنت نورون‌های لایه سوم (III) و دوم (II) قشر انتورینال به ترتیب به CA1 و شکنج‌دندانه‌ای[4] متصل می‌شوند [۶]. در مراحل اولیه بیماری آلزایمر مقدار قابل‌توجهی از نورون‌های قشر انتورینال در لایه II از بین می‌روند [۷] نشان‌داده شده است که در مراحل اولیه بیماری آلزایمر کلاف‌های نورفیبری[5] ابتدا در قشر انتورینال ظاهر و با پیشرفت بیماری به مناطق مجاور مانند هیپوکامپ سرایت می‌کند. نشان‌داده شده است که تجمع بتاآمیلوئید باعث هیپرفسفریلاسیون پروتئین تاو[6] و در نهایت تشکیل کلاف‌های نوروفیبری می‌شود [۸]. اختلال عملکرد سلولی و در نهایت آپوپتوز و مرگ سلولی ناشی از بتاآمیلوئید در بیماری آلزایمر نقش مهمی دارد [۹]. آپوپتوز مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی است که در شرایط پاتولوژیک و فیزیولوژیک نقش مهمی را ایفا می‌کند. نشان داده شده است که گروهی از آنزیم‌ها به نام کاسپازها در مراحل اولیه‌ی آپتوز فعال می‌شوند [۱۰]. کاسپازها درسیتوپلاسم به فرم غیرفعال پروکاسپاز حضور دارند و با فرآیند پروتئولیز، به فرم فعال تبدیل می‌شوند. بررسی تغییرات کاسپاز ۳ و پروکاسپازها یکی از مهمترین روش های 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 می شود که افزایش سطح کلسیم داخل‌سلولی باعث ایجاد آبشار فرآیندهای بیوشیمیایی از جمله فعال سازی کالپین‌ها می‌شود. به دنبال آسیب‌های نخاعی و بیماری‌های دژنراتیو عصبی کالپین‌ها فعال شده و باعث آپوپتوز در سلول‌های عصبی می‌شوند. کالپین‌ها همچنین باعث فعال‌شدن کاسپاز ۱۲ و موجب گسترش و تخریب سلولی می‌گردند [۱۱]. اگرچه مکانیسم فعال‌شدن آپوپتوز توسط بتاآمیلوئید هنوز ناشناخته است ولی مطالعات نشان داده است که فرم‌های مختلف بتاآمیلوئید باعث افزایش غلظت کلسیم درون سلولی می شود [۱۲]. نشان داده شده است که اختلال هومئوستازکلسیم ناشی از بتاآمیلوئید از روش‌های مختلفی نظیر افزایش انتشارکلسیم 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 NMDA[7] واقع می‌شود. پیری و بتاآمیلوئید به طور پیوسته سبب نفوذ یون کلسیم به نورون‌ها از طریق کانال های کلسیمی نوع L می‌شوند [۱۵، ۱۴]. شبکه آندوپلاسمی[8] 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 داخل سلولی منجر به یک پدیده شناخته شده به نام استرس شبکه اندوپلاسمی می‌شود که در آن پروتئین‌های تا نخورده یا بد تاخورده انباشته می‌شوند و سپس مسیر آپوپتوز ناشی از استرس شبکه اندوپلاسمی فعال می‌شود. نشان داده شده است که کلاپسین و چندین کاسپاز از جمله کاسپاز ۱۲ و ۳ در استرس شبکه اندوپلاسمی نقش دارند. پیش‌بینی شده است که کاسپاز ۳ پروتئین پیش‌ساز آمیلوئیدی را تجزیه می‌کند و بنابراین مقدار بتاآمیلوئید (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 [۱۷، ۱۶]. نشان داده شده است که مسدودکننده‌های کانال کلسیمی توانسته‌اند اختلال حافظه و یادگیری فضایی ناشی از بتاآمیلوئید 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[9] و همکاران در مدل موشی که بیان ژن پیش‌ساز آمیلوئیدی در قشر انتورینال آن‌ها

[3] Cornu Ammonis
[4] Dentate gyrus
[5] Neurofibrillary tangles
[6] Tau

[7] N-Methyl-D-Aspartate
[8] Endoplasmic reticulum
[9] Harris

بیش‌ازحد القاء شده بود دریافتند که بتاآمیلوئید می‌تواند به‌صورت انتقال آکسونی از قشر انتورینال به شکنج‌دندانه‌ای انتقال یابد و سبب ایجاد اختلال LTP در شکنج‌دندانه‌ای شود [۱۹]. از سوی دیگر، پالوپ[10] و همکاران نشان داده‌اند که بتاآمیلوئید 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 به طور 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 درناحیه CA1 هیپوکامپ متعاقب تزریق بتاآمیلوئید در قشر انتورینال پرداختیم و در نهایت نقش حفاظتی مسدودکننده‌های کانال‌های کلسیمی در برابر بتاآمیلوئید 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 ۱ ± ۲۳ ^{o}C نگهداری شدند. حیوانات به غیر از زمان انجام آزمایش‌های رفتاری به آب وغذای 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

بتاآمیلوئید ۴۲–۱ از شرکت Tocris انگلستان خریداری شد و در ۰/۱ M بافر فسفات با pH ۷/۴ حل شده سپس در میکرتیوپ‌هایی به حجم ۱۰ میکرولیتر توزیع گردید و در دمای ۷۰– ^{o}C تا زمان استفاده نگهداری شد. ۲ میکرولیتر از بتاآمیلوئید تازه تهیه شده (۰/۵ میکروگرم بر میکرولیتر) برای هر تزریق استفاده شد. حیوانات به روش داخل صفاقی با کتامین[11] و زایلازین[12] بیهوش شدند و سپس سر حیوان در دستگاه استریوتاکسی ثابت شد. موی قسمت جمجمه حیوان تراشیده شده و با پنبه آغشته به بتادین 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 این‌که جمجمه کاملاً خشک شد نقطه‌های موردنظر برگما[13] و لامبدا[14] علامت گذاری گردید. با استفاده از اطلس پاکسینوس و واتسون مشخصات سمت راست انتورینال کورتکس (۶± = جانبی، ۸/۲–= پشتی–شکمی و ۵/۰۵–= 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 بتاآمیلوئید 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 (۱/۸ = جانبی ، ۳/۴– = پشتی–شکمی و ۰/۹۶– = قدامی–خلفی) از روی اطلس پاکسینوس و واتسون به اندازه یک میلی‌متر بالاتر از محل تزریق کار گذاشته شد. برای تهیه کانول راهنما، سرسرنگ شماره ۲۳ (۸ میلی‌متر)، از جنس فولاد ضدزنگ به کار گرفته شد. کانول تعبیه‌شده، توسط دو عدد پیچ عینک و با استفاده از آکریل دندانپزشکی در محل خود محکم شدند. از روز اول جراحی تا روز شش، ایزرادیپین و نیمودیپین شرکت Tocris انگلستان هر دو با دوز (۳۰ میکروگرم/ ۵ 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 ایزرادیپین و نیمودیپین در دوز ۳۰ 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

[10] Palop
[11] Ketamine
[12] Xylazine
[13] Bregma
[14] Lambda

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 وسترن‌بلات 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 به‌صورت داخل قلبی پروفیوژ شد و سپس مغز حیوان خارج و بلوک پارافینه تهیه شد.

وسترن بلات

جهت بررسی تغییرات بیان پروتئین‌های کالپین ۲، کاسپاز ۱۲ و ۳ در ناحیه CA1 از تکنیک وسترن‌بلات استفاده شد. یک هفته بعد از تزریق بتاآمیلوئید 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 درتانک 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 ^{o}C ۴ و سرعت چرخش ۱۳۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. غلظت‌های پروتئینی هر نمونه مطابق روش برادفورد تعیین شدند و میزانی معادل ۵۰ میکروگرم از پروتئین کل هر نمونه جهت الکتروفورز SDS-PAGE[15] در نظر گرفته شد. پروتئین‌ها بر روی غشاهای PVDF[16] طبق راهنمایی‌های شرکت Bio-Rad منتقل شدند بعد از مرحله بلاکینگ، غشاها با آنتی‌بادی اولیه کالپین ۲، کاسپاز ۱۲ (از شرکت Cell Signaling Technology (آمریکا) با رقت ۱/۱۰۰۰ و کاسپاز ۳ از شرکت Abcam (آمریکا) با رقت ۱/۱۰۰۰ انکوبه شد و سپس با آنتی‌بادی ثانویه (ایمونوگلوبین ضد خرگوش از شرکت Invitrogen، آمریکا) انکوبه شدند. باندهای پروتئینی مورد نظر توسط کیت ECL[17] (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.

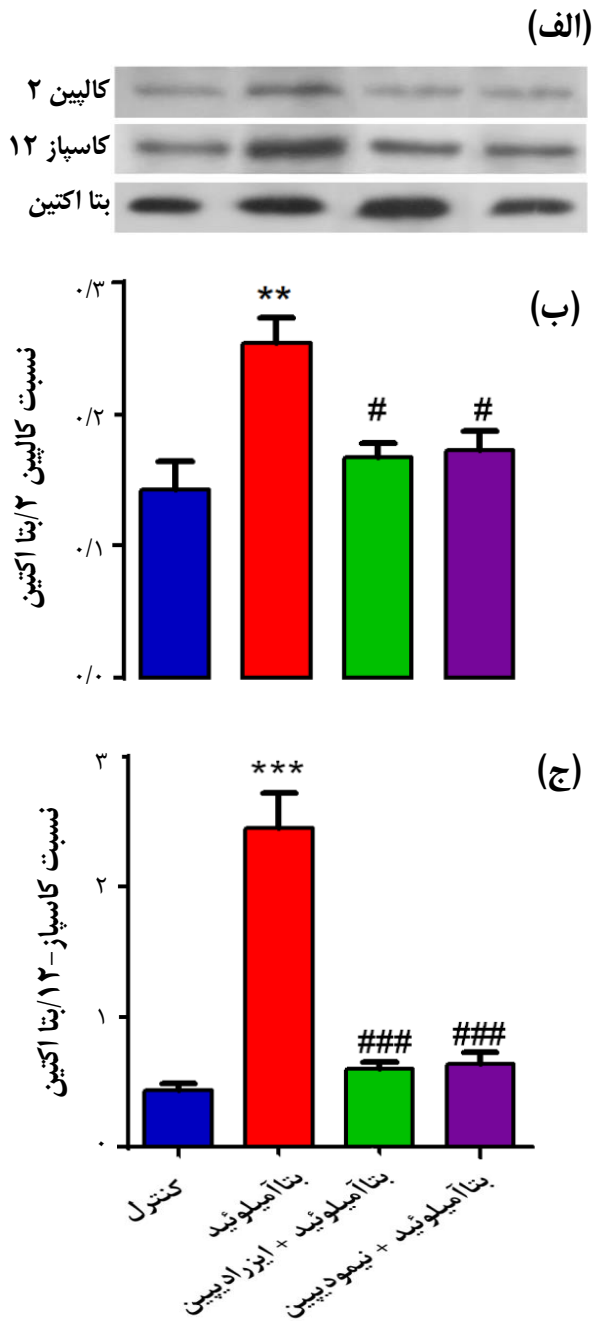
آنالیز آماری

نتایج آماری حاصل از این مطالعه با استفاده از نسخه ۶ نرم افزار گراف‌پد پریسم[18] مورد آنالیز قرار گرفت. نتایج این مطالعه با استفاده از روش آنالیز واریانس یکطرفه[19] آنالیز گردید. اطلاعات به‌صورت میانگین ± خطای معیار میانگین برای هر گروه ارائه شد و سطح معنی‌دار $p <$ ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

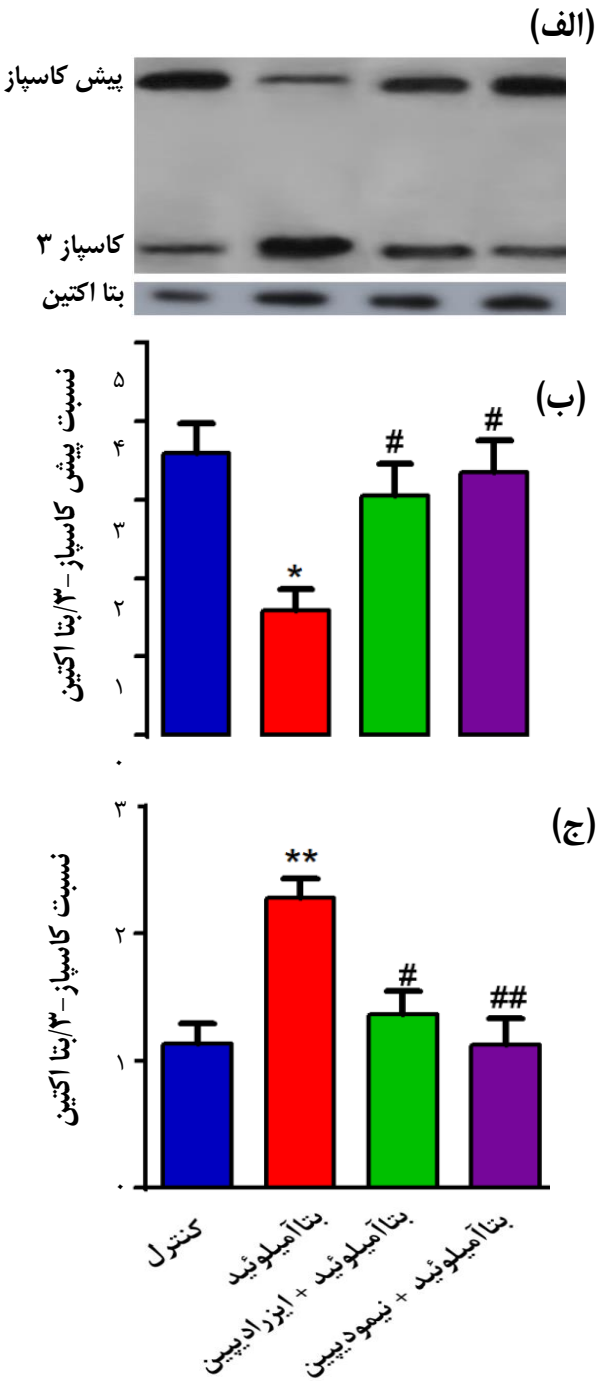
یافته‌ها

آنالیز واریانس یکطرفه تفاوت معنی‌داری را در میزان بیان کالپین و کاسپاز ۱۲ بین گروه‌ها نشان می‌دهد، به ترتیب [F(۳, ۱۲) = ۸/۱, p =۰/۰۰۳] و [F(۳, ۱۲) = ۴۲/۳, p =/۰۰۰۱] همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود تزریق بتا آمیلوئید در ناحیه انتورینال باعث افزایش معنی‌دار میزان بیان کالپین ۲ و کاسپاز ۱۲در ناحیه CA1 نسبت به گروه کنترل گردید. تیمار روزانه حیوانات با ایزرادیپین و نیمودیپین باعث کاهش میزان بیان این دو پروتئین نسبت به گروه بتاآمیلوئیدی شد.

[15] Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
[16] Polyvinylidene fluoride
[17] Enhanced chemiluminescence
[18] Graphpad Prism
[19] One way ANOVA



شکل ۱- افزایش سطح کالپین ۲ و کاسپاز ۱۲ در ناحیه CA1 متعاقب تزریق بتاآمیلوئید به داخل قشر انتورینال. (الف) یک نمونه از باندهای مربوط به کالپین ۲، کاسپاز ۱۲ و بتااکتین را نشان می‌دهد. (ب) نشان می‌دهد تزریق بتاآمیلوئید 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 منتاظر با ترتیب ستون‌ها در هیستوگرام هستند. توجه شود مقیاس محور عمودی در دو هیستوگرام با هم فرق دارد. **: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل با $p < ۰/۰۱$ و ***: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل با $p < ۰/۰۰۱$. #: اختلاف معنی‌دار با گروه بتاآمیلوئید با $p < ۰/۰۵$ و ###: اختلاف معنی‌دار با گروه بتاآمیلوئید با $p < ۰/۰۰۱$. تعداد حیوان در هر گروه ۴ سر.



شکل ۲- تزریق بتاآمیلوئید به‌داخل قشر انتورینال باعث افزایش بیان کاسپاز ۳ می‌شود. (الف) یک نمونه از باندهای مربوط به پیش‌کاسپاز ۳، کاسپاز ۳ و بتااکتین را نشان می‌دهد. (ب) تزریق بتاآمیلوئید 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 بازگرداندند. (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 منتاظر با ترتیب ستون‌ها در هستوگرام هستند. *: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل با $p < ۰/۰۵$ و **: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل با $p < ۰/۰۱$. #: اختلاف معنی‌دار با گروه بتاآمیلوئید با $p < ۰/۰۵$ و ##: اختلاف معنی‌دار با گروه بتاآمیلوئید با $p < ۰/۰۱$. 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 ایزرادیپین و نیمودیپین تغییر بیان این پروتئین را به گروه کنترل نزدیک کرد [$F\ (۳, ۱۲) = ۹/۵,\ p = ۰/۰۰۱$] بررسی میزان بیان کاسپاز ۳ نشان داد که بیان این پروتئین نیز در ناحیه CA1 متعاقب میکروتزریق بتاآمیلوئید در قشر انتورینال نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری یافت ($p <۰/۰۱$). درحالی‌که تیمار حیوانات با ایزرادیپین و نیمودیپین توانست به میزان معنی‌داری بیان این پروتئین در ناحیه CA1 را نسبت به گروه بتاآمیلوئیدی کاهش دهد ($p <۰/۰۵$) دهد.

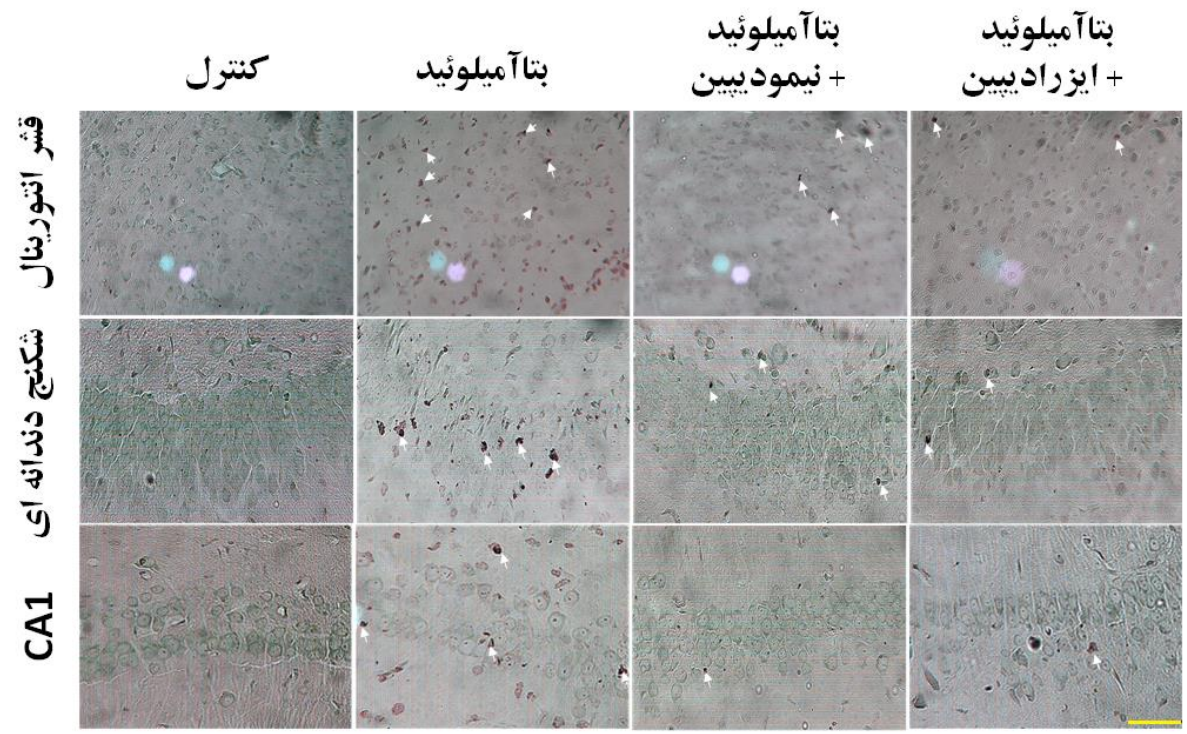
شکل ۳ تغییرات آپوپتوتیک سلول‌های (سلول‌های قهوه‌ای‌رنگ که با فلش نشان داده شده است) ناحیه قشر انتورینال، شکنج‌دندانه‌ای و CA1 را متعاقب تزریق بتاآمیلوئید در قشر انتورینال نشان می‌دهد. همانطور که مشخص است تغییرات آپوپتوتیک در ناحیه CA1 متعاقب آمیلوئیدوپاتی قشر انتورینال مشاهده می‌شود اما وسعت آن نسبت به شکنج‌دندانه‌ای و قشر انتورینال کمتر است. درحالی‌که تیمار روزانه حیوانات به مدت شش روز با ایزرادیپین و نیمودیپین تغییرات آپوپتوتیک ناشی از بتاآمیلوئید را در هر سه ناحیه کاهش داد و این کاهش در ناحیه شکنج دندانه‌ای 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 بتاآمیلوئید 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 بتاآمیلوئیدی مشاهده شد. در حالیکه تیمار حیوانات با مسدودکننده‌های کانال کلسیمی یعنی ایزرادیپین 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[20] 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 بتاآمیلوئید 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 مختل‌کردن نقل و انتقال آکسونی باعث مرگ سلولی می‌شود. اخیراً دو نظریه دیگر مطرح است یکی اختلال در هومئوستاز کلسیم داخل‌سلولی و دیگری اختلال متابولیتی [۲۳، ۹]. اما در مورد دو فرضیه اول یعنی بتاآمیلوئید و هیپرفسفریلاسیون پروتئین تاو هنوز مشخص نیست کدام یک مقدم می‌شود. اما اخیراً یک مطالعه نشان داده است که تیمار سلولها با بتاآمیلوئید منجر به هیپرفسفریلاسیون پروتئین تاو می‌شود و چنین استدالال نموده است که بتاآمیلوئید 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 بتاآمیلوئید به داخل قشر انتورینال منجر به تغییر پروفایل مولکولی در شکنج‌دندانه‌ای [۲۴]، تغییر فعالیت سلولی در این ناحیه، به‌هم‌خوردن تعادل جریانات سیناپسی تحریکی [۱۸] و مهاری به نفع مهار، اختلال در جریان کلسیمی در شکنج‌دندانه‌ای [۲۵] در نهایت آهسته‌شدن روند یادگیری و اختلال در انعطاف‌پذیری (تغییر یا سوییچ) حافظه می‌شود. این‌که قشر انتورینال می‌تواند باعث بروز تغییرات در نواحی هدف مجاور باشد، می تواند کمک‌کننده باشد. تغییرات دیده‌شده در نواحی شکنج‌دندانه‌ای و CA1 همچنین می‌تواند ناشی از انتقال مونومرها، دیمرها یا اولیگومر بتاآمیلوئید 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 بتاآمیلوئید در قشر انتورینال بود، نشان دادند که بتاآمیلوئید قادر است به‌صورت 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

[20]Braak



شکل ۳- تغییرات آپوپتوتیک سلول‌های ناحیه قشر انتورینال، شکنج‌دندانه‌ای و CA1 متعاقب تزریق بتاآمیلوئید در قشر انتورینال. تزریق بتاآمیلوئید 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 بتاآمیلوئید را به‌ویژه در ناحیه شکنج‌دندانه‌ای بگیرد. (بزرگ نمایی ۲۰۰، مقیاس (خط زرد) ۵۰ میکرومتر)

مطالعه دریافتیم که مسدودکننده‌های کانال کلسیمی ایزرادیپین (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 بتاآمیلوئید از طریق افزایش نفوذپذیری غشاء پلاسمایی نورون‌ها به یون کلسیم باعث مختل‌شدن هومئوستاز کلسیم داخل سلولی می‌شود [۲۳]. به‌علاوه گزارش شده است که بتاآمیلوئید به‌طوراختصاصی 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 بتاآمیلوئید در قشر انتورینال جلوگیری می‌کنند [۱۸]. در همین راستا، آنکوندا[21] و همکاران گزارش کرده‌اند که مسدودکننده‌های کانال کلسیمی قادر هستند از رده سلولی نوروبلاستوما موشی در برابر بتاآمیلوئید محافظت کنند [۱۲]. ما در این مطالعه ایزرادیپین 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 بتاآمیلوئید در ناحیه CA1 بتوان اثر محافظتی مستقیم این داروها را بهتر مشخص کرد.

نتیجه‌گیری

در پایان، نتایج این مطالعه نشان داد که تزریق بتاآمیلوئید 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

[21] Anekonda

آلزایمر از یک ناحیه محدود مانند قشر انتورینال شروع و به سایر نواحی گسترش می‌یابد استفاده از مسدودکننده های‌کانال 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.

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.

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 stageing 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] Wlodkowic D, Skommer J, McGuinness D, Hillier C, Darzyn kiewicz 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 streotaxic coordintes. 5th ed. Elsevier, academic Press, 2005: 118.

[22] Braak H, Braak E, Neuropathological stageing 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 blockers

Hamid Gholami Pourbadie[1*], Marzieh Joneidi[1], Fariba Khodagholi[2], Fatemeh Shaerzadeh[2]

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 (Aβ) is seen in various brain regions, including the EC. Previous studies have shown that Aβ causes calcium dyshomeostasis. In this study, molecular changes in the CA1 region following microinjection of Aβinto the EC and the potential protective role of calcium channel blockers was investigated.

Methods: Aβ (1 µg/2 µl) 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 µg 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 Aβ 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)