مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۴۹/هفته اول آبان ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۳/۲۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۶/۲۴

بررسی تأثیر آهن و رژیم غذایی پر کلسترول بر آپوپتوز در شکنج دندانه‌دار از تشکیلات هایپوکامپ

دکتر غلامرضا دشتی[۱]، دکتر بهمن رشیدی[۱]، دکتر پرهام رئیسی[۲]، لیلا ره‌افروز[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: برخی مطالعات بیانگر تأثیر افزایش غیر طبیعی آهن و کلسترول در مغز در پاتوژنز بیماری‌های نورودژنراتیو همچون آلزایمر می‌باشد، اما مطالعات انجام گرفته در این زمینه اندک و نتایج آن‌ها با یکدیگر متناقض است. از آن جایی که شیوع این بیماری‌ها، به ویژه آلزایمر در حال افزایش می‌باشد، مطالعه‌ی حاضر با هدف تعیین تأثیر آهن و رژیم غذایی پر کلسترول بر آپوپتوز در شکنج دندانه‌دار از تشکیلات هایپوکامپ به انجام رسید.

روش‌ها: رت‌های نر نیوزلندی به گروه‌های شاهد، آهن (رژیم ۵۰ mg/kg)، گروه کلسترول (رژیم حاوی کلسترول ۲ درصد) و گروه کلسترول و آهن تقسیم شدند. سطح سرمی کلسترول، LDL (Low-density lipoprotein) و HDL (High-density lipoprotein) قبل و بعد از رژیم ۶ هفته‌ای بررسی و اندازه‌گیری شد و سپس میزان آپوپتوز سلول‌های عصبی در تشکیلات هایپوکامپ آن‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی TUNEL test (Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin–dUTP nick end labeling) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: پس از استفاده از رژیم غذایی پرکلسترول، سطح سرمی کلسترول، LDL و HDL در گروه‌های دریافت کننده‌ی کلسترول به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < ۰/۰۵$). همچنین، آپوپتوز سلول‌های عصبی در شکاف دندانه‌دار هیپوکامپ در گروه دریافت کننده‌ی رژیم پرکلسترول در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت ($P < ۰/۰۵$). استفاده از آهن به تنهایی یا همراه با کلسترول، تأثیری بر میزان آپوپتوز سلول‌های عصبی نداشت.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه نشان داد که تجویز رژیم غذایی پر کلسترول بر سطح آپوپتوز سلولی تأثیر معنی‌دار دارد؛ به طوری که تجویز رژیم حاوی کلسترول تنها و رژیم آهن و کلسترول، سطح آپوپتوز سلولی را افزایش می‌دهد. اما تجویز آهن، تأثیر قابل ملاحظه و معنی‌داری در افزایش یا کاهش آپوپتوز ندارد.

واژگان کلیدی: آلزایمر، آپوپتوز، رژیم پر کلسترول، آهن

ارجاع: دشتی غلامرضا، رشیدی بهمن، رئیسی پرهام، ره‌افروز لیلا. **بررسی تأثیر آهن و رژیم غذایی پر کلسترول بر آپوپتوز در شکنج دندانه‌دار از تشکیلات هایپوکامپ.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۴۹): ۱۴۶۷-۱۴۵۹

مقدمه

آهن، یکی از مهم‌ترین ترکیبات موجود در بدن انسان، به خصوص در بافت مغز و کبد می‌باشد. ثابت شده است که افزایش غیر طبیعی آهن در مغز، سبب پیدایش شماری از بیماری‌های نورودژنراتیو از قبیل پارکینسون و آلزایمر خواهد شد (۲-۱). مطالعات، نشان دهنده‌ی افزایش غلظت آهن در تشکیلات هیپوکامپ، آمیگدال و کورتکس پری‌فورم در بیماران

۱- دانشیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دانشجوی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: لیلا ره‌افروز
Email: leila_afrouz@outlook.com

مبتلا به آلزایمر می‌باشند (۳). پراکسید هیدروژن، یکی از رادیکال های آزاد است و می‌تواند به وسیله‌ی گلوتاتیون دفع شود. درحضور آهن آزاد در پلاسما، پراکسید هیدروژن به یون هیدروکسیل اکسیده می‌شود که از رادیکال‌های آزاد با قدرت بالا و خطرناک می‌باشد. این رادیکال آزاد، پروتئین و چربی موجود در غشای سلولی را اکسید می‌کند که منجر به عدم یکپارچگی سلول و در نهایت مرگ آن خواهد شد (۴-۳).

کلسترول نیز نقش مهمی در پاتوژنز بیماری آلزایمر ایفا می‌کند (۷-۵). کلسترول، یک لیپید سلولی است که جهت فعالیت سلولی عصبی و نیز سلول‌های گلیا در مغز ضروری است. این ترکیب، در تنظیم فعالیت آنزیم‌های متصل به غشا، گیرنده‌ها، کانال‌های یونی، اندوسیتوز، بیان آنتی‌ژن‌ها و پایداری میکروتوبول‌ها در سلول‌های عصبی نقش دارد (۹-۸). از طرفی، اختلال در هموستاز کلسترول، سبب ایجاد بیماری‌های نورودژنراتیو مانند آلزایمر و نیمن پیک تیپ C خواهد شد (۱۰).

بارزترین علامت بیماری آلزایمر، تجمع غیر طبیعی پروتئین β- آمیلوئید در نواحی خاصی از مغز می‌باشد. تولید و نیز کلیرانس این پروتئین توسط سطح سلولی کلسترول تنظیم می‌شود (۱۱). سطح افزایش یافته‌ی کلسترول، سبب افزایش این پروتئین در سلول‌های مغز مدل‌های حیوانی مبتلا به آلزایمرخواهد شد (۱۲). مهم‌ترین عوامل خطر ژنتیکی که در ایجاد بیماری آلزایمر نقش دارد، جهش روی ژن مربوط به آپولیپوپروتئین E (APOE یا Apolipoprotein E) است که نقش کلیدی در تنظیم کلسترول دارد (۷).

سطح افزایش یافته‌ی کلسترول در سلول‌های عصبی، سبب القای استرس اکسیدان در این سلول ها می‌شود و متابولیت های کلسترول نیز در ایجاد اثرات سیتوتوکسیک و تولید اکسیژن واکنش پذیر نقش مهمی دارند (۵). این اثرات، در مجموع سبب فعال سازی واسطه های التهابی و کاهش انعطاف پذیری غشای سلول‌های عصبی، پلاستیسیتی سیناپسی و در نهایت مرگ سلول های عصبی خواهند شد (۱۱). شیوع بالاتر بیماری‌های نورودژنراتیو مانند آلزایمر در کشورهای غربی، می‌تواند در ارتباط با رژیم غذایی پر کلسترول و چرب در این کشورها باشد (۵).

با توجه به اثرات اکسیدان و آپوپتوتیک کلسترول، هدف از این مطالعه، بررسی اثرات آهن و کلسترول بر آپوپتوز سلول‌های عصبی در شکنج دندانه‌دار هیپوکامپ رت‌های تغذیه شده با رژیم غذایی پر کلسترول و آهن بود.

روش‌ها

حیوانات مورد مطالعه رت‌های نر از نژاد سفید نیوزلندی با وزن ۲۰۰ ± ۲۲۰۰ گرم بود.

روش کار بدین صورت بود که در ابتدا آزمودنی‌ها در شرایط سیکل تاریکی و روشنی به صورت ۱۲ ساعته و غذا و آب بدون هیچ محدودیتی نگهداری شدند. سپس رت‌ها به طور تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند:

۱. گروه اول غذای معمول (شاهد)

۲. گروه دوم غذای پر کلسترول (حاوی کلسترول ۲ درصد)

۳. گروه سوم غذای معمول و آهن (۵۰ mg/kg)

۴. گروه چهارم غذای پر کلسترول و آهن (حاوی کلسترول ۲ درصد و ۵۰ mg/kg آهن)

هر گروه به مدت ۶ هفته رژیم غذایی را دریافت کردند و در مرحله‌ی بعد، پس از بیهوش کردن و جدا کردن سر حیوان، مغز از جمجمه خارج و پس از تثبیت در فرم‌آلدهید ۴ درصد بافر شد و پس از پاساژ بافتی، در پارافین قالب‌گیری شد.

آماده‌سازی نمونه‌ها برای میکروسکوپ نوری: برای این که روند تثبیت به خوبی انجام گیرد، ابعاد نمونه‌ها تا حد امکان کوچک انتخاب گردید و حجم تثبیت کننده حدود ۱۰۰–۵۰ برابر حجم نمونه بود و نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در تثبیت کننده باقی ماندند. مواد تشکیل دهنده‌ی تثبیت کننده شامل **cc** ۱۰۰ فرمالین ۱۰ درصد، **cc** ۹۰۰ آب مقطر، **g** ۴ سدیم فسفات مونوبازیک، **g** ۶/۵ سدیم فسفات دی‌بازیک بودند.

سپس مراحل پاساژ یا گردش بافت بر اساس روش‌های متداول شامل آب‌گیری (Dehydration)، شفاف‌سازی C (Leering)، آغشتگی (Impregnation) و قالب‌گیری (Embedding) انجام گرفت.

برای تهیه مقاطع میکروسکوپی، نمونه ها در بلوک‌های پارافینی قالب گیری شدند. برای این منظور از قطعات Luckhart استفاده شد. برای قالب‌گیری ابتدا لازم است که پارافین ذوب شود و پارافین مذاب به درون قالب تهیه شده ریخته شود و سپس نمونه‌ی بافت به وسیله‌ی یک پنس گرم برداشته و در جهت (Orientation) مناسب در پارافین قرار داده شود. بدین ترتیب، نمونه در داخل بلوک پارافینی آماده‌ی برش می‌گردد.

برش یا مقطع‌گیری (Sectioning): با میکروتوم دوار (Rotary) مقاطعی به ضخامت µ ۵–۳ تهیه گردید. روی لام، چند قطره الکل ۱۰ درصد ریخته شد و یک سری ۶–۴تایی از مقاطع تهیه شده روی آن باز گردید.

اسلایدها برای مدتی حدود ۱۲۰–۳۰ دقیقه در اون (Oven) با دمای °C ۵۸–۵۶ قرار گرفت تا پارافین مقطع بافتی ذوب شود و علاوه بر آن، بافت به خوبی بر روی لام بچسبد و در حین رنگ‌آمیزی جدا نشود. سپس برای تشخیص سلول‌های آپوپتوتیک، از روش TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin–dUTP nick end labeling) با استفاده از کیت‌های تشخیصی شرکت Roch و طبق دستورالعمل شرکت تولید کننده استفاده گردید. بعد از فاصله‌ی کوتاهی از برداشتن پارافین (Dewaxation کردن)، اسلایدها با پروتئیناز k تیمار شد و در دمای **°C** ۳۷ به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. سپس اسلایدها با محلول PBS (Phosphate-buffered saline) (دمای **°C** ۲۵) شستشو داده شد و در محلول حاوی ۰/۱ M Trist-HCL در pH ۷ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت و سپس دوباره با محلول PBS شستشو داده شد. سپس ترکیب واکنشی TUNEL اضافه شد و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای **°C** ۳۷ در محفظه‌ی مرطوب انکوبه گردید.

در مرحله‌ی بعد، اسلایدها شسته و دی آمینو–بنزیدین (DAB یا ۳,۳–Diaminobenzidine) برای مدت ۳۰–۱۵ دقیقه در دمای اتاق اضافه شد. بعد از آن، با آب شیر شستشو داده شد و با هماتوکسیلین رنگ زمینه‌ای انجام شد. سپس نمونه‌ها در گزیلل شفاف‌سازی گردید و با ریختن یک یا دو قطره چسب کانادا بالزام یا انتلان روی برش، با دقت لامل روی برش گذاشته و با فشار مختصر چسب پخش شد تا به طور یکنواخت و بدون حباب، هوا زیر لامل قرار گیرد. لام‌ها تمیز شد و پس از خشک شدن چسب، نمونه‌ها برای مطالعه با میکروسکوپ نوری

آماده شد. سپس با استفاده از دوربین متصل به میکروسکوپ نوری عکس‌برداری شد و با استفاده از نرم‌افزار تصویری Motic شمارش سلول‌های آپوپتوتیک انجام شد. نتایج بافتی با استفاده از آزمون‌های Non parametric one-way ANOVA، Dunn's multiple comparisons test for post test و Kruskal-Wallis و نتایج سطح سرمی کلسترول تام، LDL (Low-density lipoprotein) و HDL (High-density lipoprotein) با آزمون‌های Repeated measures ANOVA و Tukey آنالیز شد.

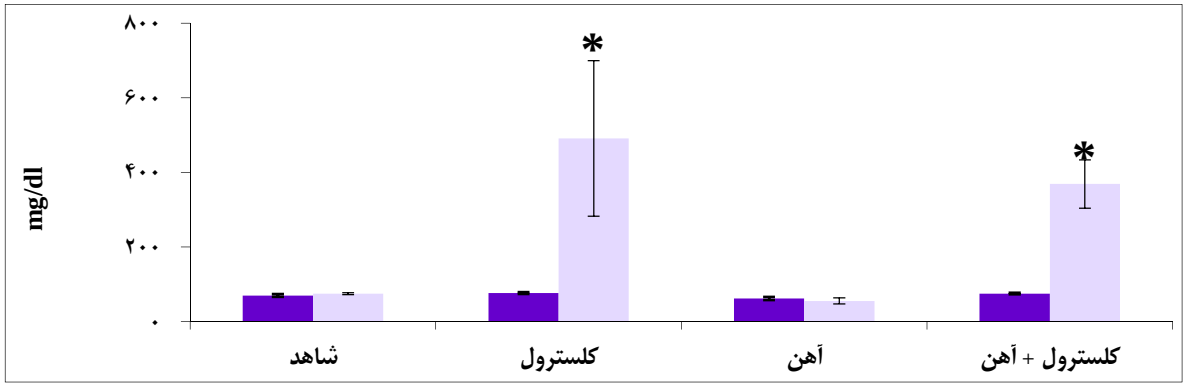
یافته‌ها

در این مطالعه، ۲۰ سر رت نر در چهار گروه ۵ تایی مورد مطالعه و بررسی قرار گرفتند. میانگین سطح کلسترول قبل از مداخله در چهار گروه شاهد، آهن، پر کلسترول و نیز پر کلسترول و آهن، طبق آزمون One-way ANOVA، اختلاف معنی‌داری نداشت، اما بعد از مداخله، در سطح سرمی کلسترول در گروه‌های دریافت کننده‌ی کلسترول، تفاوت معنی‌دار مشاهده گردید. از طرف دیگر، سطح کلسترول در گروه شاهد و گروه آهن نسبت به قبل از مداخله، تفاوت محسوسی پیدا نکرد؛ اما در دو گروه رژیم پر کلسترول و نیز کلسترول و آهن، سطح کلسترول به طور معنی‌داری بالا رفت (به ترتیب P = ۰/۰۰۱ و P < ۰/۰۰۱) (شکل ۱).

میانگین سطح سرمی LDL قبل از مداخله، در چهار گروه تحت مطالعه طبق آزمون One-way ANOVA، اختلاف معنی‌داری نداشت (P = ۰/۷۷۰)؛ اما بعد از مداخله، در گروه‌های دریافت کننده‌ی کلسترول، تفاوت معنی‌دار وجود داشت (P < ۰/۰۰۱) (شکل ۲).

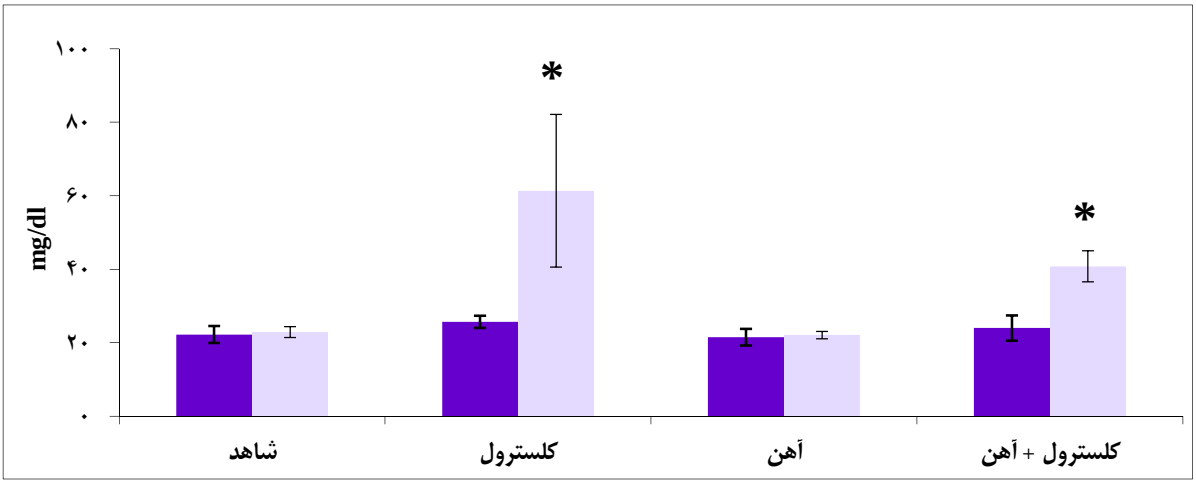
طبق آزمون One-way ANOVA، میانگین سطح سرمی HDL قبل از مداخله، اختلاف معنی‌داری در چهار گروه نداشت؛ اما بعد از مداخله، در گروه‌های دریافت کننده‌ی کلسترول، اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (شکل ۳). از طرف دیگر، آزمون Repeated measures ANOVA نیز نشان داد که تغییرات سطح کلسترول، LDL و HDL در چهار گروه مذکور اختلاف معنی‌دار دارد.

انجام آزمون تعقیبی LSD بر روی داده‌ها نشان داد که درصد آپوپتوز سلولی بین دو گروه شاهد و دریافت کننده‌ی آهن، اختلاف معنی‌دار نداشت، اما درصد آپوپتوز سلولی در گروه دریافت کننده‌ی کلسترول نسبت به گروه شاهد، اختلاف معنی‌دار داشت (شکل ۴).



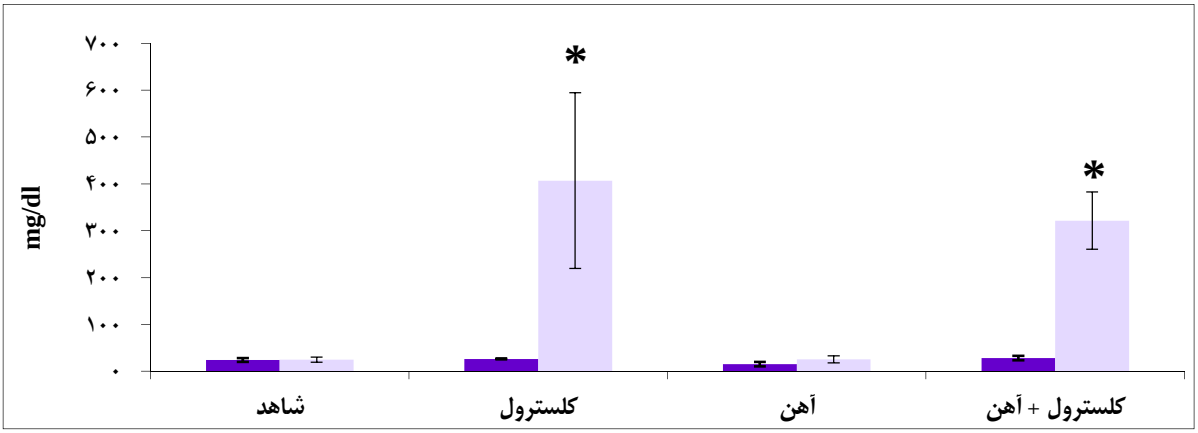
شکل ۱. سطح سرمی کلسترول در گروه‌های مورد مطالعه قبل و بعد از دریافت رژیم پر کلسترول

(n = ۵؛ *: P < ۰/۰۵۰ در مقایسه با گروه شاهد)



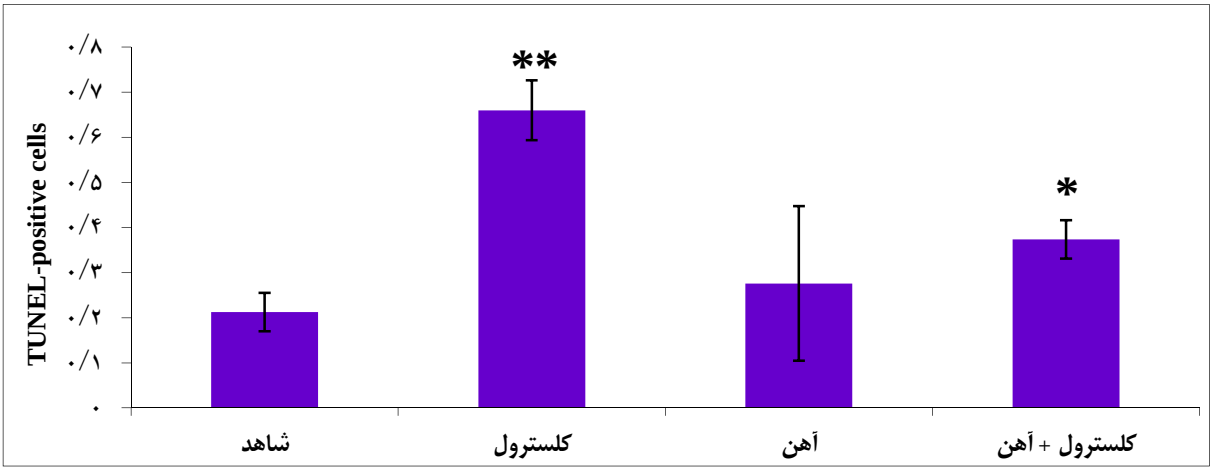
شکل ۲. سطح سرمی HDL (High density lipoprptein) در گروه‌های مورد مطالعه قبل و بعد از دریافت رژیم پر کلسترول

(n = ۵؛ *: P < ۰/۰۵۰ در مقایسه با گروه شاهد)



شکل ۳. سطح سرمی LDL (Low density lipoprptein) در گروه‌های مورد مطالعه قبل و بعد از دریافت رژیم پر کلسترول

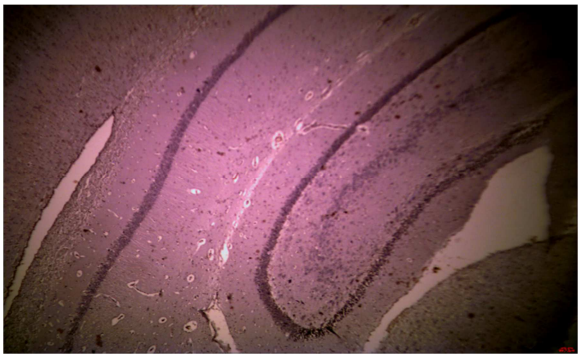
(n = ۵؛ *: P < ۰/۰۵۰ در مقایسه با گروه شاهد)



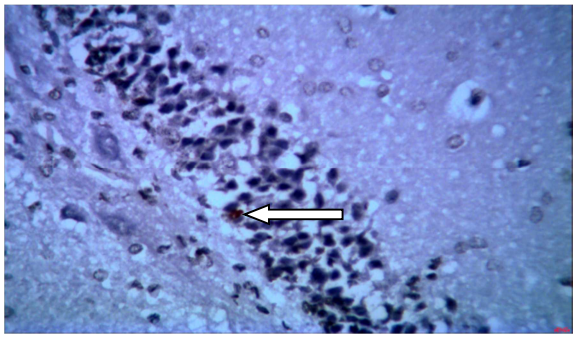
شکل ۴. میزان آپوپتوز در سلول‌های لایه‌ی گرانولوزای هایپوکامپ رت‌ها قبل و بعد از دریافت رژیم پر کلسترول

(n = ۵؛ *: P < ۰/۰۵۰ در مقایسه با گروه شاهد)

نتایج بررسی‌های بافت‌شناسی نشان داد که کلسترول سبب افزایش قابل ملاحظه در میزان مرگ سلول‌های عصبی در تشکیلات دندانه‌دار هایپوکامپ گردید ($P < ۰/۰۵۰$) (اشکال ۵ و ۶).

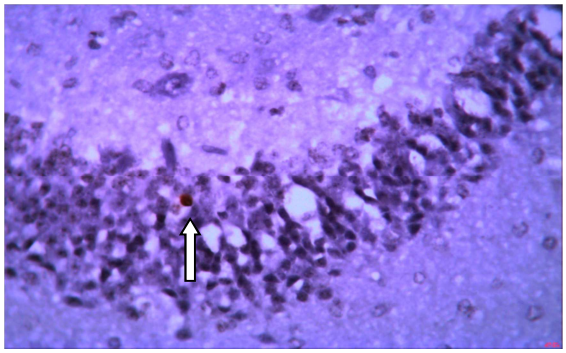


شکل ۵. فتومیکروگراف از ناحیه‌ی هسته‌ی دندانه‌ای در هایپوکامپ با رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin–dUTP nick end labeling)، بزرگ‌نمایی ۴ ×



شکل ۶. فتومیکروگراف از ناحیه‌ی هسته‌ی دندانه‌ای در هایپوکامپ گروه دریافت کننده‌ی کلسترول با رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin–dUTP nick end labeling)
سلول‌های آپوپتوتیک به صورت قهوه‌ای رنگ مشخص است.
بزرگ‌نمایی ۴۰ ×

استفاده از آهن سبب کاهش معنی‌دار در میزان مرگ سلول‌های عصبی در تشکیلات هایپوکامپ نشد؛ میزان آپوپتوز سلولی، بین گروه‌های پرکلسترول و پرکلسترول و آهن تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۷).



شکل ۷. فتومیکروگراف از ناحیه‌ی هسته‌ی دندانه‌ای در هایپوکامپ در گروه دریافت کننده‌ی کلسترول به همراه آهن با رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin–dUTP nick end labeling)
سلول‌های آپوپتوتیک به صورت قهوه‌ای رنگ مشخص است.
بزرگ‌نمایی ۴۰ ×

بحث

هدف کلی از انجام این مطالعه، تعیین تأثیر آهن و رژیم غذایی پر کلسترول بر آپوپتوز در شکنج دندانه‌دار از تشکیلات هیپوکامپ بود. مقایسه‌ی سطح سرمی کلسترول، LDL و HDL در بین گروه‌ها نشان دهنده‌ی آن است که این عامل در تمامی گروه‌ها قبل از شروع رژیم‌ها یکسان بوده است. پس از دریافت رژیم پر کلسترول به مدت ۶ هفته، سطح سرمی کلسترول، LDL و HDL در گروه پر کلسترول و نیز گروه پر کلسترول و آهن افزایش قابل توجهی نسبت به قبل از شروع رژیم در همان گروه‌ها و نیز نسبت به گروه شاهد داشت. علاوه بر این، مصرف آهن در گروه پر کلسترول و آهن نیز سبب کاهش قابل ملاحظه‌ی سطح سرمی کلسترول، LDL و HDL نشد.

در این بررسی، کلسترول سبب افزایش معنی‌دار در میزان مرگ سلول‌های عصبی در تشکیلات دندانه‌دار هایپوکامپ گردید؛ ولی استفاده از آهن سبب کاهش

معنی‌دار در میزان مرگ سلول های عصبی در تشکیلات هایپوکامپ نشد. یافته های این مطالعه، تأیید کننده‌ی نتایج مطالعات قبلی بود (۱۱). این نتایج نشان می‌دهند که مصرف بیش از حد کلسترول می‌تواند سبب افزایش آپوپتوز و مرگ سلول‌های عصبی در لایه‌ی گرانولوزا از سلول‌های هایپوکامپ رت‌های نر شود.

هایپرکلسترولمی، عامل خطر مهمی در ایجاد بیماری آلزایمر شناخته شده است (۷، ۵)؛ به طوری که این ترکیب، در تنظیم فعالیت آنزیم‌های متصل به غشا، گیرنده‌ها، کانال‌های یونی، اندوستیوز، بیان آنتی‌ژن‌ها و پایداری میکروتوبول‌ها در سلول‌های عصبی نقش دارد (۹-۸) و اختلال در هموستاز کلسترول، سبب ایجاد بیماری‌های نورودژنراتیو خواهد شد (۱۰).

از این رو، می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که بالا بودن سطح کلسترول (حداقل در مدل حیوانی) باعث افزایش سطح آپوپتوز سلولی می‌شود و بدین طریق، با تسریع دژنراسیون سلول‌های مغزی، در بروز بیماری‌هایی مانند آلزایمر نقش قابل توجهی دارد.

آهن، یکی از مهم‌ترین ترکیبات موجود در بدن انسان، به خصوص در بافت مغز و کبد می‌باشد که در بدن انسان تولید نمی‌شود؛ بلکه از طریق تغذیه وارد بدن می‌گردد. این عنصر حیاتی، نقش مهمی در تشکیل گویچه‌های قرمزخون دارد و یک جزء حیاتی از هموگلوبین است که وظیفه‌ی حمل اکسیژن را به عهده دارد. این ماده در تشکیل میوگلوبین نیز نقش دارد که ماده‌ی رنگی موجود سلول‌های عضلانی است و اکسیژن را برای استفاده در مواقع فعالیت ذخیره می‌کند. بیشترین میزان تجمع آهن در مغز، در سلول‌هایی دیده می‌شود که غلاف میلین را تولید می‌کنند و تخریب غلاف میلین، سبب از بین رفتن سلول‌های مغزی و تشدید آلزایمر می‌گردد (۱۱).

این تأثیر، ناشی از اثرات اکسیداتیو عنصر آهن بر روی سیستم عصبی می‌باشد (۴). در مجموع، مطالعه‌ی حاضر نشان داد که به دنبال مصرف کلسترول، آپوپتوز به شدت افزایش می یابد و رژیم پر آهن به تنهایی، نتوانسته تغییری در آپوپتوز ایجاد کند؛ نیز زمانی که با کلسترول به کار رفت، تأثیر محسوسی در مرگ سلول ها نداشت. با توجه به آن که این مطالعه بر روی حیوانات سالم انجام گرفت، به نظر می‌رسد شرایطی چون مدت و زمان دریافت نیز نقش به‌سزایی دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای حرفه‌ای لیلا ره‌افروز به شماره‌ی ۲۹۰۳۳۶ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است که در معاونت تحقیقات و فناوری این دانشگاه تصویب و اجرا شده است. بدین وسیله، نویسندگان از حمایت‌های بی‌دریغ این معاونت تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

1. Bostanci MO, Bas O, Bagirici F. Alpha-tocopherol decreases iron-induced hippocampal and nigral neuron loss. Cell Mol Neurobiol 2010; 30(3): 389-94.
2. Gerlach M, Ben-Shachar D, Riederer P, Youdim MB. Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases? J Neurochem 1994; 63(3): 793-807.
3. Samudralwar DL, Diprete CC, Ni BF, Ehmann WD, Markesbery WR. Elemental imbalances in the olfactory pathway in Alzheimer's disease. J Neurol Sci 1995; 130(2): 139-45.
4. Qian Z, Wang Q, Pu Y. Brain iron and neurological disorders. Chin Med J (Engl) 1997;

110(6): 455-8.
5. Bosco DA, Fowler DM, Zhang Q, Nieva J, Powers ET, Wentworth P, et al. Elevated levels of oxidized cholesterol metabolites in Lewy body disease brains accelerate alpha-synuclein fibrilization. Nat Chem Biol 2006; 2(5): 249-53.
6. Crisby M, Rahman SM, Sylven C, Winblad B, Schultzberg M. Effects of high cholesterol diet on gliosis in apolipoprotein E knockout mice. Implications for Alzheimer's disease and stroke. Neurosci Lett 2004; 369(2): 87-92.
7. Fuentes F, Lopez-Miranda J, Sanchez E, Sanchez F, Paez J, Paz-Rojas E, et al. Mediterranean and low-fat diets improve endothelial function in hypercholesterolemic men. Ann Intern Med 2001; 134(12): 1115-9.
8. Jansen S, Lopez-Miranda J, Castro P, Lopez-Segura F, Marin C, Ordovas JM, et al. Low-fat and high-monounsaturated fatty acid diets decrease plasma cholesterol ester transfer protein concentrations in young, healthy, normolipemic men. Am J Clin Nutr 2000; 72(1): 36-41.
9. Corrigan FM, Van Rhijn AG, Macintyre F, Skinner ER, Horrobin DF. Dietary supplementation with zinc sulphate, sodium selenite and fatty acids in early dementia of Alzheimer's type. II: Effects on Lipids. Journal of Nutritional Medicine 1991; 2(3): 265-71.
10. Yanagisawa K. Cholesterol and amyloid beta fibrillogenesis. Subcell Biochem 2005; 38: 179-202.
11. Ghribi O, Golovko MY, Larsen B, Schrag M, Murphy EJ. Deposition of iron and beta-amyloid plaques is associated with cortical cellular damage in rabbits fed with long-term cholesterol-enriched diets. J Neurochem 2006; 99(2): 438-49.
12. Lindqvist A, Mohapel P, Bouter B, Frielingsdorf H, Pizzo D, Brundin P, et al. High-fat diet impairs hippocampal neurogenesis in male rats. Eur J Neurol 2006; 13(12): 1385-8.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 13.06.2015
Vol. 33, No. 349, 1st Week, November 2015
Accepted: 15.09.2015

The Effect of Iron and Cholesterol on Neuronal Apoptosis in Dentate Gyrus of Hippocampus in Rabbits Fed with High-Cholesterol Diet

Gholam Reza Dashti PhD[1], Bahman Rashidi PhD[1], Parham Reisi PhD[2], Leila Rah-Afrouz[3]

Original Article

Abstract

Background: Some of the studies showed that abnormal high level of iron and cholesterol in the brain had neurodegenerative effects such as in Alzheimer's disease. But, the previous studies in this field were not enough and had controversy in results. As the prevalence of Alzheimer's disease is increasing, this study aimed to evaluate the effect of iron and cholesterol on the level of neuronal apoptosis in dentate gyrus of hippocampal formation.

Methods: Male New Zealand white rabbits were divided into the control, the iron (50 mg/kg; gavage), the high-cholesterol diet (containing 2% cholesterol), and the high-cholesterol diet plus iron groups. Serum levels of total cholesterol, high-density lipoprotein (LDL), and low-density lipoprotein (HDL), before and after the regimen for 6 weeks, were measured. Then, the rabbits for immunohistochemical staining via TUNEL test (Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin–dUTP nick end labeling) and evaluation of neuronal apoptosis in dentate gyrus of hippocampal formation were anesthetized and brains were dissected.

Findings: After the regimens, serum levels of total cholesterol, LDL, and HDL in the cholesterol-receiving groups increased significantly compared to the control group ($P < 0.05$ for all). Histological results demonstrated that neuronal apoptosis in the dentate gyrus of the high-cholesterol diet group increased significantly ($P < 0.05$) comparing to the control group. Iron had not significant effect when used alone or with cholesterol on neuronal apoptosis in the dentate gyrus in rabbits.

Conclusion: Our recent results showed that high-level cholesterol diet had significant effect on the neuronal apoptosis in the dentate gyrus in rabbits; but use of iron alone or with high-level cholesterol diet had not significant effect on it.

Keywords: Apoptosis, Alzheimer's disease, Cholesterol, Iron

Citation: Dashti GhR, Rashidi B, Reisi P, Rah-Afrouz L. **The Effect of Iron and Cholesterol on Neuronal Apoptosis in Dentate Gyrus of Hippocampus in Rabbits Fed with High-Cholesterol Diet.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(349): 1459-67

1- Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Associate Professor, Department of Physiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Student of Medicine, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Leila Rah-Afrouz, Email: leila_afrouz@outlook.com