



**Physiological and Histochemical Study of the
Protective Effect of Alpha Lipoic Acid (α -LA) Against
Lead-Induced Neurotoxicity in Rats**

BY

Heba Ahmed Abd El-Hamed Hassan El-Dash

Assistant lecturer at Zoology Department, Faculty of
Science, Fayoum University

A Thesis

Submitted for the Fulfillment

Of

The requirements for Ph.D. Degree

In

Molecular and Integrated Physiology

Department of Zoology

Faculty of Science

Fayoum University

2016

ABSTRACT

Occupational high-grade lead (Pb^{2+}) exposure has been reduced in recent decades as a result of increased regulation. However, environmental Pb^{2+} exposures remain widespread; as this metal is highly malleable, resistant to corrosion & extensively used in many purposes especially in building construction, for the past several millennia. Pb^{2+} is a ubiquitous and potent neurotoxicant, induces several neurophysiological and behavioral changes & alters the function of multiple organs and systems. The nervous system is the primary target for the low levels of Pb^{2+} exposures & the developing brain appears to be especially vulnerable to Pb^{2+} neurotoxicity. Relatively low, sub-clinical doses of Pb^{2+} that produce no overt signs of encephalopathy but can affect cognitive, emotional, & motor functions.

Chronic lead exposure has been shown to produce behavioral disturbances in both human & animal models involved in certain forms of learning and memory. These disturbances are associated with alterations in monoamine neurotransmitters in the central nervous system (CNS).

Also, Pb^{2+} induces oxidative stress and membrane disturbances in the brain and the oxidative damage has been proposed as a possible mechanism of lead neurotoxicity. Apoptosis is also thought to relate to lead neurotoxicity.

The present study, focused on the two brain areas (hippocampus & cerebral cortex). It was designed to investigate the two possible mechanisms involved in lead neurotoxicity and the potential protective effects of α -Lipoic acid (α -LA), as an antioxidant against lead-induced neurotoxicity.

α -Lipoic acid has been reported to be highly effective in improving the thiol capacity of the cells and in reducing lead-induced neurotoxicity. In this study, forty adults healthy male albino rats (130 ± 10 g) were used and divided into five equal groups (eight rats in each) as follows: (GP_I) Normal control group (C); rats were enrolled as a normal blank control group: (GP_{II}) Initiation group (Lead acetate, Pb^{2+} , control group) (A); rats were injected intraperitoneal (*i.p.*) once per day in a dose of 20 mg/kg.b.wt for two weeks: (GP_{III}) Treatment group (α -Lipoic acid control group) (B); rats were injected (*i.p.*) daily with α -LA (20 mg/kg.b.wt) for three weeks: (GP_{IV}) Pre-initiation treatment group (***prophylactic group***) (D); rats were injected (*i.p.*) per day with α -Lipoic acid (20 mg/kg.b.wt) for one week and then for another two weeks received the above mentioned doses of lead acetate together with the same dose of α -Lipoic acid: (Gp_V) Post-initiation treatment group (***therapeutic group***) (E); male rats were injected (*i.p.*) once per day with lead acetate for two weeks then were injected (*i.p.*) daily with α -Lipoic acid for successive three weeks with the above-mentioned dose. At the propitiate experimental periods rats from each group were killed by sudden decapitation and then brain tissues were immediately collected for experiments.

The levels of lipid peroxidation as malondialdehyde (MDA), protein carbonyl content (PCC), reduced glutathione (GSH), nitrite/nitrate (NO), also, the activity of acetylcholinesterase (AChE), norepinephrine (NE), dopamine (DA), serotonin (5- HT) and the change in the energy content measured as adenosine triphosphate (ATP) were estimated in the selected brain regions (hippocampus & cerebral cortex) of adult male albino rats in the different groups. In addition, the effect of lead acetate exposure on spatial learning and memory in Morris Water Maze (MWM) was determined. These altered biochemical variables were supported by histopathological examinations.

Results showed that administration of Pb^{2+} (Lead acetate) leading to enhancement of lipid peroxidation MDA, PCC in brain regions with a concomitant reduction in GSH levels, NO production, and AChE activity. In addition, the levels of NE, DA, 5- HT and ATP were decreased in the brain regions. However, the administration of α -LA showed a protective effect against lead acetate induced neurotoxicity. Rats treated with α -LA showed a corresponding decrease in brain lipid peroxidation MDA and PCC. Furthermore, there was an increase in brain GSH level, NO production, AChE activity and the levels of NE, DA & 5- HT and ATP.

Behavior data showed that Pb^{2+} exposure impaired spatial learning assessed in MWM and there was a significant day's effect with significant differences between control and lead acetate groups and treated animals with α -Lipoic acid. Also, rats exposed to Pb^{2+} had higher platform location latency than the control group during probe trial ($p < 0.05$). Groups treated with α -Lipoic acid showed that α -LA can reverse cognitive

dysfunction, (MWM) test, observed in rats treated with Lead acetate and improves performance on memory tasks.

Finally, histological studies showed that Pb^{2+} caused degeneration of neurons and pyknosis in the brain of rats. Rats treated with α -Lipoic acid revealed an improvement in histopathological alteration induced by Lead acetate.

The data showed that α -LA has a good effect when administered as a therapeutic drug more than as a prophylactic one.

المخلص العربي

يعتبر (الرصاص Pb^{2+}) معدن سام و يعرف بانه سم النمو العصبي. وبالرغم من أنه قد تم تقليل استخدام الرصاص الحالي الا انه لا يزال هناك خطرمن التعرض للرصاص بسبب استقرار الرصاص البيئي وعدم وجود أي عتبة آمنة للتعرض له.

يتعرض البشر لهذا المعدن من مصادر عديدة، منها الهواء الملوث، الماء، التربة، والغذاء.

الرصاص، من المعادن الثقيلة، وقد استخدم من قبل البشر لأغراض تكنولوجية كثيرة، ويعتبرهو السبب الرئيسي لتوزيعه على نطاق واسع، ويسبب عددا من الآثار السلبية في الإنسان والحيوان، مثل العيوب السلوكية، الفسيولوجية، و البيوكيميائية في البشر.

التعرض المزمن أو الحاد للرصاص يسبب ضعف في الجهاز العصبي المركزي (CNS) و التعرض لمستوى منخفض من الرصاص هو المسؤول عن عيوب السلوك العصبي و ضعف القدرات العقلية لأنه قادر على عبور حاجز الدم في المخ مما يؤدي الى حدوث السمية العصبية.

يؤثر أيضا الرصاص على القشرة المخية للفص الجبهي، و الحصين، والمخيخ ويتسبب في حدوث مجموعة متنوعة من الاضطرابات العصبية، مثل تلف في المخ، والتخلف العقلي، والمشاكل السلوكية، والتعلم والذاكرة، وتلف الأعصاب، و حدوث بعض الأمراض مثل مرض الزهايمر، ومرض الشلل الرعاش.

و تلعب الأكسدة دورا هاما في حدوث السمية العصبية التي يسببها الرصاص.

تشير الدلائل إلى أن التعرض للرصاص يعزز من إنتاج الخلايا لأنواع الاكسجين التفاعلية (ROS) وبيروكسيد الدهون، مما قد يؤدي إلى تلف الأنسجة.

وبالإضافة إلى ذلك، ثبت أن إستحثاث موت الخلايا المبرمج في مناطق المخ نتيجة لأنواع الاكسجين التفاعلية (ROS) والضرر التأكسدي الناتج عن الرصاص.

تم حدوث السمية العصبية في ذكور الجرذان البيضاء في العمل الحالي عن طريق إستخدام خلات الرصاص.

و بالإضافة إلى حقن خلات الرصاص للحيوانات، فقد تم حقن حمض الليبويك (α -LA) أيضا داخل الصفاق مرة واحدة يوميا بجرعة ٢٠ ملليجرام/كجم من وزن الجسم.

وقد اتضح أن حقن حمض الليبويك (α -LA) له فعالية عالية في تحسن الحالة إلى حد كبير عن طريق عكس الاكسدة والحد من السمية العصبية التي يسببها الرصاص. وقد أجريت هذه الدراسة الحالية لتقييم التأثير المحتمل لحمض الليبويك ضد الرصاص المسبب للسمية العصبية في الجرذان.

و تم الحصول على النتائج من أربعون (٤٠) ذكر من الجرذان البيضاء الناضجة و المقسمة إلى خمس مجموعات، كل مجموعة تحتوي على ثمانية (٨) جرذان كالتالي:

- (١) مجموعة ضابطة لكل مجموعات التجربة (C).
- (٢) مجموعة تمهيدية (خلات الرصاص، Pb^{+2} ، مجموعة ضابطة للجرذان المحقونة بخلات الرصاص) (A).
- (٣) مجموعة علاجية (حمض الليبويك، α -LA، مجموعة ضابطة للجرذان المحقونة بحمض الليبويك) (B).
- (٤) مجموعة العلاج بدء التمهيدية (حقن حمض الليبويك لمدة اسبوع ثم حقن حمض الليبويك مع خلات الرصاص لمدة اسبوعين) (D)، و تعرف باسم المجموعة الوقائية.

٥) مجموعة العلاج بعد التمهيدية (حقن خلات الرصاص لمدة اسبوعين ثم حقن حمض الليبويك لمدة ثلاث اسابيع (E)، وتعرف باسم المجموعة العلاجية.

و في جميع جردان المجموعات السابقة الذكر تم قياس بعض التحاليل البيوكيميائية كالتالي:

(١) مالون داي الدهيد.

(٢) محتوى البروتين كاربونيل.

(٣) جلوتاثيون المختزل.

(٤) أكسيد النيتريك.

(٥) نشاط أسيتيل كولين إستيراز.

(٦) الناقلات العصبية أحادية الأمين الإورا إيبينيفرن، الدوبامين، و السيروتونين).

(٧) التغير في محتوى الطاقة الذي يقاس في صورة أدينوسين ثلاثي الفوسفات. وتم تعيين جميع القياسات في مناطق المخ المختلفة (الحصين والقشرة المخية) في ذكور الجرذان البيضاء البالغة في المجموعات المختلفة.

(٨) بالإضافة إلى ذلك تم تحديد اختبار التعلم والذاكرة في متاهة موريس المائية.

وفي النهاية تم فحص الأنسجة المرضية عن طريق تحديد التغيير في بنية المخ بسبب تأثير خلات الرصاص المسببة للسمية العصبية عن طريق استخدام صبغة الهيماتوكسيلين والإيوسين والفحص النسيجي باستخدام صبغة الطولويدين الزرقاء.

التحاليل رقم ١،٣، ٦، و ٧ تم قياسها باستخدام جهاز HPLC ، بينما التحاليل الأخرى تمت باستخدام طريقة الطيفي.

تم استخدام طريقة (ANOVA) من النوع الإحصائي في تحليل كل النتائج التي تم الحصول عليها. و كنتيجة نهائية للعمل يمكن تلخيص النتائج كالتالي:

العلاج بمضاد الأكسدة (α -LA) يؤدي إلى انخفاض معدلي المألون داي الدهيد، ومحتوى البروتين كاربونيل في المخ. كما أنه يؤدي إلى إرتفاع معدلات كلا من الجلوتاثيون المختزل، إنتاج أكسيد النيتريك، نشاط أسيتيل كولين إستيراز، مستويات الناقلات العصبية أحادية الأمين (الهورا بيبينيفرن، الدوبامين، و السيروتونين)، و أدينوسين ثلاثي الفوسفات في المخ في مجموعات العلاج.

حقن α -LA يحسن الحالة اما عن طريق حقنة كطريقة وقائية أو علاجية ولكن تأثيره أكثر وضوحا (كبير) في الطريقة العلاجية مقارنة بالطريقة الوقائية.

بالإضافة إلى ذلك أظهرت البيانات الخاصة بالسلوك الحيواني أن المجموعات التي عولجت بحمض الليبويك تستغرق وقت أقصر و أقل في فترة الكمون (للحصول على المنصة) من المجموعات التي عولجت بخلات الرصاص في اليوم الأول من جلسة التعلم. ولتأكيد ضعف الذاكرة، كما هو موضح في الجرذان التي تم حقنها بخلات الرصاص والموهنة من قبل حمض الليبويك، قد تم إختبار التحقق وسجلت متوسط الفترات في المنطقة التي لا يوجد بها المنصة. و قد وجد أن المجموعة (٤) و (٥) تقضي وقت أطول في هذه المنطقة من المجموعات التي عولجت بخلات الرصاص.

لذلك، الجرذان التي تم التعامل معها بحمض الليبويك لمدة ٣ أسابيع تحسن و تقلل من السمية العصبية التي يسببها خلات الرصاص.

وأخيرا، أظهرت الدراسات النسيجية أن الرصاص تسبب في تاكل الخلايا العصبية وتغلظ في أنويتها في مخ الجرذان. أوضحت الجرذان التي تم التعامل معها بحمض الليبويك تحسنا في تغيير الأنسجة الناتجة عن خلات الرصاص.

الدراسة الفسيولوجية والهستوكيميائية للأثر الوقائي لحمض
الليبيك ضد الرصاص المسبب للسمية العصبية فى الجرذان

رسالة مقدمة من

هبة أحمد عبد الحميد حسن الدش

بكالوريوس العلوم ٢٠٠٤ قسم علم الحيوان و الكيمياء - كلية العلوم بالفيوم

جامعة القاهرة

ماجستير ٢٠١١ علم الحيوان - فسيولوجي (علم وظائف الاعضاء) قسم علم

الحيوان - كلية العلوم

جامعة الفيوم

للحصول على دكتور الفلسفة فى العلوم

الفسيولوجياالجزئية المتكاملة

قسم علم الحيوان

كلية العلوم - جامعة الفيوم

٢٠١٦