

## مقاله پژوهشی

## مقایسه میزان عنصر روی در طی تکامل مورفومتریک هیپوکامپ رت: از دوره جنینی تا هفته دوم پس از تولد

حدیجه فوقی<sup>۱</sup>، اعظم حسینی<sup>۲</sup>، سید کاوه حجت<sup>۳</sup>، شهریار احمدپور<sup>۴\*</sup>

<sup>۱</sup> عضو هیئت علمی گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران  
<sup>۲</sup> کارشناس ارشد زیست شناسی تکوینی، دانشگاه آزاد واحد جهرم، جهرم، ایران  
<sup>۳</sup> استادیار روانپزشکی، مرکز تحقیقات اعتیاد و علوم رفتاری، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران  
<sup>۴\*</sup> نویسنده مسئول: شهریار احمدپور، استادیار علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی  
 پست الکترونیک: shahahmadpour@gmail.com

وصول: ۱۳۹۱/۱۲/۱ اصلاح: ۱۳۹۱/۱۲/۱۳ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۲/۲۱

## چکیده

**زمینه و هدف:** ناحیه هیپوکامپ دارای غلظت بسیار بالایی از عنصر روی می باشد که در انتقال سیناپسی و احتمالاً در شکل پذیری و رشد هیپوکامپ نقش دارد. در این تحقیق قصد بر آن است که میزان روی را در تشکیلات هیپوکامپ جنین های رت در طی دوره های قبل و بعد از تولد با استفاده از متد Timm و ارتباط آن را با تغییرات حجمی زیر نواحی هیپوکامپ مورد بررسی قرار دهیم.

**مواد و روش کار:** در این مطالعه از جنین های ۱۱ و ۲۱ و نوزادان ۷ و ۱۴ روزه رت نژاد ویستار استفاده گردید. نمونه ها با روش تیم رنگ آمیزی و میزان رنگ پذیری با استفاده از نرم افزار Mat lab ۷/۵ کمی گردید. حجم زیر نواحی هیپوکامپ نیز به شیوه کاولیاری اندازه گیری شد. نتایج با نرم افزار Mat lab 7 مورد تجزیه تحلیل قرار گرفت.

**یافته ها:** نیجه رنگ آمیزی Timm در روز های ۱۱ و ۲۱ قبل از تولد و هفته اول و دوم پس از تولد منفی بود. میزان کمی شده رنگ پذیری به شیوه Timm نیز اختلاف معنی داری نشان نداد ( $P > 0.05$ ). اختلاف حجم نواحی جیروس دندان دار،  $CA_1$  و  $CA_3$  در روزهای جنینی تا روز ۷ پس از تولد اختلاف معنی دار نشان نداد ( $P > 0.05$ ). در حالیکه این میزان در روز ۱۴ پس از تولد اختلاف معنی داری با روز های ۷ پس از تولد و دوره جنینی ۱۱ و ۲۱ نشان داد ( $P > 0.05$ ).

**نتیجه گیری:** به نظر می رسد روی در جریان تکامل مورفومتریک هیپوکامپ نقش ندارد و هیپوکامپ از هفته دوم پس از تولد به شکل نهایی خود می رسد.

**واژه های کلیدی:** روی، هیپوکامپ، استریولوژیک، روش تیم

## مقدمه

سلولی در طی تکامل جنینی است. نیروهای درونزاد که موجب رانش و درهم تنیدگی جیروس دندان دار و شاخ آمون می شوند احتمالاً از عواملی مانند تکثیر سلولی و سیناپتوژنیز نشأت می گیرند. پاپانه های سیناپسی در هیپوکامپ دارای غلظت بسیار بالایی از روی است که در انتقال سیناپسی و احتمالاً در شکل پذیری و رشد هیپوکامپ نقش دارد [۴، ۵]. روند تکاملی صحیح نیازمند ارکستر هماهنگ سیناپسی نرمال است و هرگونه انحراف از روند طبیعی چرخش و دینامیک تکاملی در هیپوکامپ

هیپوکامپ به عنوان مرکز سیستم لیمبیک در حافظه و نقشه شناختی (cognitive map) نقش کلیدی در انسان و حیوانات ایفا می نماید. تکامل هیپوکامپ ارتباط بسیار نزدیک و تنگاتنگی با تکامل مغز دارد. هیپوکامپ در کف شاخ تمپورال بطن طرفی قرار دارد و به لحاظ ساختاری از دو ناحیه شاخ آمون و جیروس دندان دار تشکیل یافته است. در مقاطع بافتی این دو ناحیه به شکل دو حرف C در هم فرورفته آرایش یافته اند [۱، ۲، ۳]. هیستوآرکیتکتونیک هیپوکامپ نتیجه دینامیک لایه های

### روش کار

۸ سر رت ماده بالغ و ۲ سر رت نر بالغ نژاد ویستار (GF ۲۸۰-۲۵۰) جهت سازگاری با محیط، یک هفته در شرایط آزمایشگاهی (۱۲ ساعت تاریکی و روشنایی و دمای  $22 \pm 2$ ) نگهداری و سپس این ۸ سر رت ماده به طور تصادفی در دو قفس جای داده شدند. به هر یک از قفس ها یک موش نر اضافه گردید. پس از جفت گیری و مشاهده واژینال پلاک رت های ماده باردار در گروههای چهارگانه به شرح زیر تقسیم گردیدند:

۱- رت های باردار گروه ۱۱ جنینی: (N=2)

۲- رت های باردار گروه ۲۱ جنینی: (N=2)

۳- رت های باردار گروه روز ۷ پس از تولد: (N=2)

۴ رت های باردار گروه ۱۴ پس از تولد: (N=2)

سر جنین و نوزادان هر گروه (N=4) پس از جداسازی در محلول پرفیوژن به منظور فیکساسیون قرار داده شد. پس از تثبیت و آماده سازی بافتی و قالب گیری با پارافین بصورت افقی از سقف کاسه سر با میکروتوم برش های ۱۰ میکرونی داده و از برشها بر اساس نمونه برداری سیستماتیک تصادفی استریولوژیک انجام بعمل آمد. از هر دو برش متوالی یکی جهت رنگ آمیزی به شیوه Timm جهت آشکار کردن روی (Zn) و دیگری با کربل و بوله [۱۷] جهت تعیین حجم لایه های پیرامیدال و گرانولر به شیوه کاولیاری مورد بررسی قرار گرفتند. برشها به روش Timm [۱۸] به شرح زیر رنگ آمیزی گردیدند:

### روش رنگ آمیزی Timm

الف- پرفیوژن بافت مغز جنین رت: مغز جنین ها پس از خارج کردن جنین در محلول های زیر به مدت ۶۰ دقیقه:  
 ۱- سولفید سدیم ۲- سدیم فسفات ۳- آب دیونیزه ۴- فرمالین بافر شده ۱۰٪ ب- شستشو در آب دیونیزه و انتقال به فرمالین ۱۰٪ بافر شده ۱- گلو تار آل دئید ۱/۵ ساعت  
 ۲- بافر فرمالین ۲۴ ساعت ج- قالب گیری ۱- انتقال مغز ها در اتانول سری ۱۰۰، ۹۵ و ۷۰ در صد ۲- انتقال به CHCL<sub>3</sub> یک شب ۳- پارافین زدایی (زابلن سه تعویض) د- آبدهی ۱- قراردادن در محلول Timm ۴۵ درجه در تاریکخانه و سپس در ۶۰ درجه ۲- شستشو ۳- زایلند- چسباندن ۱- محلول Timm- صغ عربی ml ۳۱۲۰- سترات بوفر ml ۴۲۰- هیدروکینون ml ۶۰ ۵- نترات

منجر به آنومالیهای مغزی می گردد. مطالعات نشان داده است که ناهنجاریهای مورفولوژیک هیپوکامپ با آنومالیهای مغز مانند آژنزی کورپوس کالوزوم، لیسنسفال، هولوپروزنسفال، صرع تمپورال و آلزایمر همراه است [۶]. به طور مثال آنومالی شکل یا وضعیت فرارگیری هیپوکامپ به صورت چرخش غیرطبیعی در ناهنجاری های کورتکس گزارش شده است. [۷، ۸، ۹] تکامل دینامیک هیپوکامپ در رت تا ۲ هفته پس از تولد (انسان از ماه دوم زندگی داخل رحمی آغاز) ادامه دارد. و ساختمان بالغ و نهایی آن متأثر از عوامل متعددی همچون سیناپتوژنیزس، ارتباطات نورونی و مرگ برنامه ریزی شده می باشد. از جمله عوامل مؤثر در سیناپتوژنیزس و ارتباطات نورونی بین شاخ آمون و جیروس دنداندار عنصر روی می باشد. روی دومین عنصر فراوان در مغز می باشد. مقدار آن در تشکیلات هیپوکامپ سه برابر بیشتر از مقدار آن در مغز می باشد. عنصر روی در بسیاری از فعالیتهای سلولی از جمله متابولیسم، عملکرد پروتئینها، آنزیم ها، در ثبات ساختار DNA, RNA و آنتی اکسیدانی نقش دارد. عنصر روی در بافت عصبی در تنظیم انتقال سیناپسی و همچنین رسپتوری نقش حیاتی ایفا می کند [۱۳-۱۰]. عنصر روی در تبدیل اسید گلوتامیک به گلو تامات نقش دارد و به مقدار فراوان در پایانه های اکسون های گرانولر که در ناحیه CA<sub>3</sub> سیناپس می نمایند یافت می شود [۱۴، ۱۵]. مطالعات نشان داده است که کمبود روی باعث ناهنجاریهای سیستم عصبی مرکزی و کاهش فعالیت سیناپسی می گردد [۱۴]. بررسی تکامل هیپوکامپ اغلب بر پایه شواهد تصویرنگاری بوده است. مطالعات بافتی نیز صرفاً به مقایسه لایه های بافتی هیپوکامپ در انسان و میمون پرداخته اند [۱۶]. با توجه به اهمیت عنصر روی در تکامل سیستم عصبی، مقایسه تغییرات آن در طی تکامل مورفولوژیک قبل و بعد از تولد هیپوکامپ می تواند به درک پاتولوژی های مرتبط با مورفولوژی این بخش کمک نماید. هدف از این مطالعه بررسی میزان روی در تشکیلات هیپوکامپ جنین های رت در دوره های قبل و بعد از تولد با استفاده از متد Timm و تغییرات حجمی این ناحیه و شاخ آمون را با روش استریولوژیک و داده پردازی بر پایه رایانه ی نورواناتومیک اندازه گیری نماییم.

با استفاده از روش کاولیاری محاسبه گردید (جدول ۱). اختلاف حجم در روزهای جنینی (Embryonic day) تا روز ۷ پس از تولد (post natal day) اختلاف معنی دار نشان نداد ( $p=0/08$ ). میزان حجم محاسبه شده در روز ۱۴ پس از تولد اختلاف معنی داری با روزهای ۷ پس از تولد و دوره جنینی ۱۱ و ۲۱ نشان داد ( $p=0/02$ ). ارتباط رشد هماهنگ شده در روز ۱۱ جنینی، رشد حجمی ناحیه جیروس دندانان دار (DG) با ناحیه CA3 فاصله حجمی  $3\text{mm}^3$  تا  $0/4$  با ضریب  $r=0/7$  را نشان داد. ضریب این تغییرات برای روز ۲۱ جنینی  $r=0/35$  برای روز ۷ پس از تولد ناحیه جیروس دندانان دار را با نواحی CA3  $r=0/78$  و ناحیه CA1  $r=0/4$  بدست آمد. برای روز ۱۴ پس از تولد ناحیه جیروس دندانان دار با ناحیه CA3 در فاصله رشد حجمی  $0/5$  تا  $0/7$  میزان همبستگی  $r=0/78$  و ناحیه CA1 با جیروس دندانان دار (DG) در فاصله حجمی  $0/4$  تا  $0/5$  میزان همبستگی  $r=0/6$  محاسبه گردید. و همچنین مقدار زاویه جیروس دندانان دار در هفته دوم ۳۵ درجه تعیین گردید که با میزان افزایش حجم نواحی شاخ امون CA1 و CA3 دارای ارتباط منفی بود ( $r=-0/85$ ).

نقره ۱ml پس از کد گذاری عکسبرداری و سپس عکس ها با استفاده از نرم افزار  $7/8\text{MAT lab}$  تحلیل شده تا میزان روی بافتی را بر اساس gray scale کمی سازی شود [۱۹]. همچنین ارتباط رشد حجمی زیر نواحی شاخ امون (CA1, CA3) با ناحیه جیروس دندانان دار به عنوان یک شاخص رشد هماهنگ شده عملکرد سیناپسی بالغ مور بررسی قرار گرفت. نتایج در محیط نرم افزاری  $7/8\text{MAT lab}$  مورد بررسی قرار گرفت.

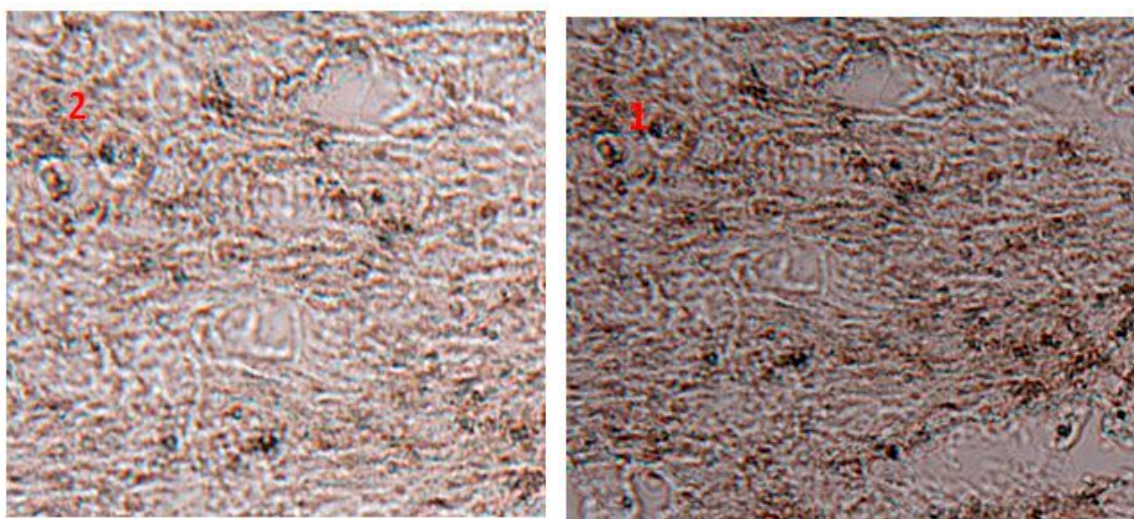
#### یافته ها

برشهای رنگ آمیزی شده به شیوه Timm در روزهای ۱۱ و ۲۱ قبل از تولد کاملاً منفی و رنگ پذیری مشاهده نگردید (تصویر ۱-۲). در روزهای ۷ و ۱۴ پس از تولد رنگ پذیری نورونی کاملاً منفی و فقط در بعضی نورون ها واکنش به صورت منفرد مشاهده گردید (تصاویر ۳ و ۴). مقدار کمی شده رنگ پذیری در محیط  $\text{MAT lab}$  یک پلات مقدار عددی برای دوره ۱۱، ۲۱، ۷ بعد از تولد و ۱۴ پس از تولد به ترتیب  $105 \pm 5$ ،  $106 \pm 7$ ،  $108 \pm 6$  و  $104 \pm 6$  محاسبه گردید که نشان دهنده نبود اختلاف معنی دار در رنگ پذیری به روش Timm بود ( $p > 0/05$ ) (تصویر ۵). حجم نواحی جیروس دندانان دار و CA1 و CA3

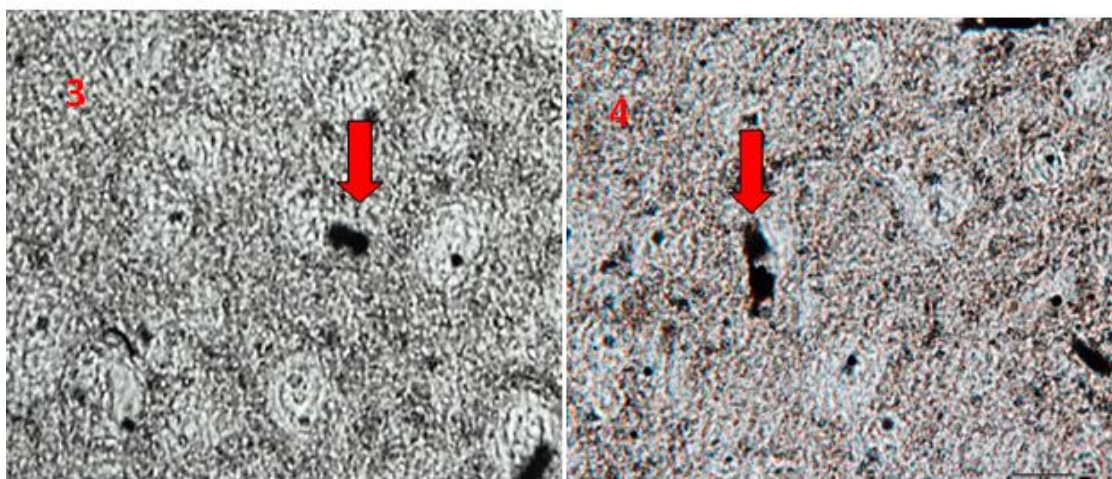
جدول ۱: محاسبه حجم زیر نواحی هیپوکامپ

| Region | ED11             | ED21             | PD7              | PD14 |
|--------|------------------|------------------|------------------|------|
| DG     | $0/04 \pm 0/01$  | $0/04 \pm 0/008$ | $0/04 \pm 0/009$ | *    |
| CA1    | $0/02 \pm 0/005$ | $0/04 \pm 0/007$ | $0/06 \pm 0/006$ | *    |
| CA3    | $0/02 \pm 0/06$  | $0/04 \pm 0/007$ | $0/06 \pm 0/006$ | *    |

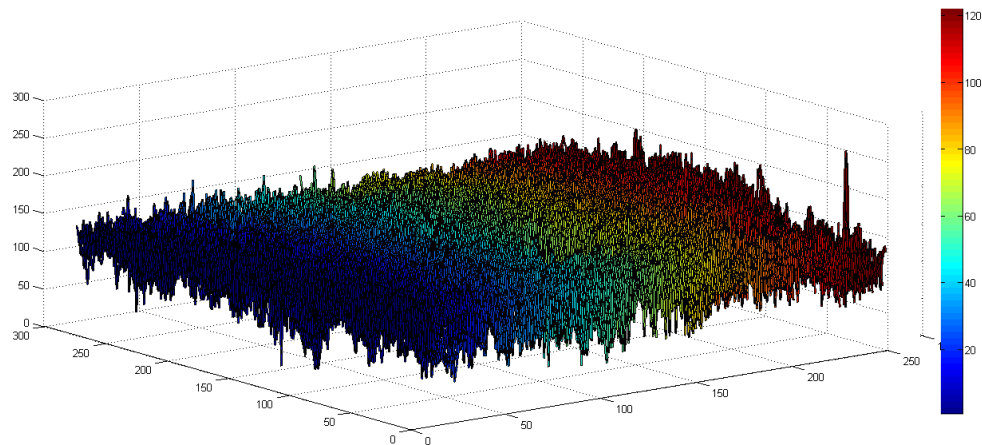
میزان حجم زیر نواحی هیپوکامپ در روزهای جنینی (ED) و پس از تولد (PD) برای نواحی جیروس دندانان دار (DG)، CA1 و CA3. مقایسه حجم محاسبه شده به شیوه کاولیاری اختلاف معنی دار در روز ۱۴ پس از تولد در هر سه ناحیه را نشان می دهد. (واحد به میلی متر مکعب  $\text{mm}^3$ ) ( $p < 0/05$ ) \*



تصویر (۱) روز ۱۱ جنینی رنگ آمیزی Timm. واکنش منفی. تصویر (۲) روز ۲۱ جنینی رنگ آمیزی Timm. واکنش منفی بزرگنمایی X۱۰۰.



تصویر (۳) روز ۷ پس از تولد. رنگ آمیزی Timm. واکنش منفی. تصویر (۴) روز ۱۴ پس از تولد رنگ آمیزی Timm واکنش منفی. در بعضی نواحی نورون هایی با واکنش مثبت مشاهده گردید (پیکان). بزرگنمایی X۱۰۰.



تصویر ۵: رنگ آمیزی به شیوه Timm و تبدیل آن در نرم افزار Matlab به یک پلات سه بعدی. مقدار عددی برای دوره ۱۱، ۲۱، ۷ بعد از تولد و ۱۴ پس از تولد به ترتیب  $105 \pm 5$ ،  $106 \pm 7$ ،  $108 \pm 6$  و  $104 \pm 6$  محاسبه گردید که نشان دهنده نبود اختلاف معنی دار در رنگ پذیری به روش Timm بود (فاصله ۵۰ تا ۱۰۰ گروه ۱۱ قبل تولد، ۱۵۰-۱۰۰ گروه ۲۱ قبل تولد، ۲۰۰-۱۵۰ گروه پس از تولد روز ۷ و ۲۵۰-۲۰۰ گروه پس از تولد روز ۱۴) ( $P > 0.05$ )

## بحث

نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان داد که عنصر روی تا روز ۱۴ پس از تولد در هیپوکامپ رت تجمع نمی یابد و با روش متالوگرافی تیم قابل آشکار شدن نیست. نتایج ما همچنین نشان داد که حجم نواحی  $CA_1$ ،  $CA_3$  و جیروس دندانده دار در طی هفته اول PD7 تا PD14 به حداکثر رشد نسبت به دوره جنینی می رسد. از دیگر نتایج بدست آمده این مطالعه بررسی همزمانی رشد سه ناحیه در یک محیط نرم آفزاری Mat lab بود. برطبق نتایج این بخش رشد حجمی جیروس دندانده دار و ناحیه  $CA_3$  در روز ۱۱ جنینی دارای ارتباط مستقیم و هماهنگ شده می باشند. به تدریج در زمان تولد رشد هر سه ناحیه متوازن شده و تغییرات حجمی کمتر می گردد. در هفته اول پس از تولد رشد حجمی نواحی  $CA_3$  و جیروس دندانده دار شدت بیشتری می گیرد و ارتباط رشد حجمی دو ناحیه به طور مشخصی معنی دار می شود در

حالی که این ارتباط برای ناحیه  $CA_1$  ارتباط ضعیفی را نشان می دهد. در روز ۱۴ پس از تولد ارتباط رشد حجمی سه ناحیه در فواصل معینی همبستگی قوی را نشان داد. این بخش از نتایج برای اولین بار ارتباط رشد حجمی سه ناحیه مرتبط مغزی را مورد بررسی قرار داد که بیشتر از این گزارش نگردیده است. همچنین با افزایش حجم نواحی شاخ آمون و جیروس دندانده دار میزان زاویه تاخوردگی جیروس دندانده دار به حد بالغ نزدیک می گردد که نشان از ارتباط بین حجم و چرخش مورفومتریک این ناحیه دارد. از دیگر نتایج این مطالعه می توان به چرخش جیروس دندانده دار و هیپوکامپ در غیاب عنصر روی اشاره نمود. آکسون سلول های گرانولر جیروس دندانده دار با فرستادن الیاف خزه ای گلوتامرژیک به نورون های پیرامیدال  $CA_3$  نقش مهمی درحافظه و تثبیت اطلاعات شناختی ایفا می نمایند. همچنین سلول های گرانولر دارای توانایی منحصر به فرد تکثیر حتی در دوره

مستقل از ظهور این عنصر در هیپوکامپ صورت می گیرد. تغییرات حجمی نواحی CA3 و جیروس دندانان دار وابستگی مستقیمی را نشان می دهند که می تواند نشان از ارتباط نورواناتومیک و الگوی بالغ باشد.

#### نتیجه گیری

در یک نتیجه گیری، به نظر می رسد تکامل مورفومتریک هیپوکامپ ارتباطی با ظهور روی در این ناحیه تا دوره پس از تولد ندارد و رشد نواحی CA<sub>1</sub>، CA<sub>3</sub> و جیروس دندانان دار مستقل از ظهور این عنصر در هیپوکامپ صورت می گیرد. تغییرات حجمی نواحی CA<sub>3</sub> و جیروس دندانان دار وابستگی مستقیمی را نشان می دهند که می تواند نشان از ارتباط نورواناتومیک و الگوی بالغ باشد.

#### تشکر و قدر دانی

این پژوهش با حمایت های مالی و معنوی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی مصوبه شورای پژوهشی و قرارداد ۹۰/۶۰/۶۷۹ انجام پذیرفت. بدین وسیله از جناب آقای دکتر گلشن معاون پژوهشی دانشگاه تشکر و قدردانی می گردد.

بزرگسالی را دارا می باشند که برای تداوم حافظه ضروری است [۲۰]. با توجه به ارتباط نورواناتومیک بین دو ناحیه که به طور مستقیم می باشد به نظر می رسد رشد حجمی این دو ناحیه نیز دارای هماهنگی و ارتباط قوی در دوره جنینی و پس از تولد باشد. نتایج بدست آمده در میزان رنگ پذیری با روش تیم حاکی از رشد و سیناپتوژنیز مستقل از عنصر روی حداقل تا دو هفته پس از تولد دارد. نتایج بدست آمده از این بخش مطالعه در راستای نتایج فلش هار کروفورد<sup>۱</sup> و کوفورد<sup>۲</sup> می باشد [۲۳-۲۱]. (1966)آلتمن<sup>۳</sup> نیز گزارش نمود تا سه هفته پس از تولد روی در هیپوکامپ تجمع نمی یابد [۲۴]. با توجه به نقش روی در تکامل اعصاب و بخصوص عملکرد سیناپسی [۱۵] و همچنین نتایج این مطالعه به نظر می رسد در فاصله زمانی دور جنینی تا هفته دوم پس از تولد تکامل مورفومتریک هیپوکامپ متأثر از عوامل دیگری مانند تاثیر ژن های خاصی مانند باشد [۱۴، ۲۰]. تکثیر سلولی در هیپوکامپ ناشی از اثر ژن ها می تواند در تغییرات حجم نواحی هیپوکامپ موثر باشد بر همین اساس الگوی سیناپسی نیز متأثر از فعالیت ژنی است [۲۵]. با توجه به نتایج این مطالعه و نتایج مشابه ظهور روی در هیپوکامپ تا هفته دوم پس از تولد اتفاق نمی افتد و با توجه به نتایج آلتمن روز ۲۱ پس از تولد روی در سلول های گرانولر آشکار می گردد. سلول های گرانولر مهمترین نرون های گلوتامرژیک هیپوکامپ محسوب می شوند و الیاف گلوتامرژیک خود را به CA3 می فرستند [۲۰]. روی نیز از جمله عناصر دخیل و مهم در سازوکارهای سیناپسی گلوتامرژیک است [۵]. علاوه بر آن روی در فعالیت گیرنده های گاباژیک و گلیسین نیز نقش دارد [۲۶]. با توجه به نقش گیرنده های گلوتامرژیک در یادگیری و حافظه [۲۰] به نظر میرسد نقش روی بیشتر در عملکرد نورونی و احتمالاً در پلاستیسیته هیپوکامپ باشد [۴، ۵]. در پایان می توان نتیجه رفت تکامل مورفومتریک هیپوکامپ ارتباطی با ظهور روی در این ناحیه تا دوره پس از تولد ندارد و رشد نواحی CA<sub>1</sub>، CA<sub>3</sub> و جیروس دندانان دار

1 -fleischhauer Crawford

2 -koford

3 -Altman

## References

1. Lavenex P, Lavenex PB, Building hippocampal circuits to learn and remember: insights into the development of human memory, *Behav Brain Res* 2013 Feb 18.
2. Ho NF, Hooker JM, Sahay A, Holt DJ, Roffman JL, In vivo imaging of adult human hippocampal neurogenesis: progress, pitfalls and promise, *Mol Psychiatry* 2013 Feb 26;18(4):404-416
3. Witter MP, Amaral DG, *The Rat Nervous System* 2004 3rd ed. California, USA: Elsevier Academic, P: 637-703.
4. Zaidel D.W, Quantitative Morphology of Human Hippocampus ,Early Neuron Development, *Ana. Rec.* 1999; 254:87-91
5. Sato SH M, Frazier J M and Goldberg A, the distribution and binding of zinc in the hippocampus, *J Neurosci* 1984;4 (6):1662-1670
6. Righini A, Zirpoli S, Parazzini C, "et al", Hippocampal infolding angle changes during brain development assessed by prenatal MR imaging, *AJNR* 2006; 27:2093-97
7. Baker LL, Barkovich AJ, The large temporal horn: MR analysis in developmental brain anomalies versus hydrocephalus, *AJNR* 1992; 13:115-122
8. Lehericy S, Dormont D, Semah F, "et al", Developmental abnormalities of the medial temporal lobe in patients with temporal lobe epilepsy, *AJNR* ,1995; 16:617-626
9. De Leon MJ, Golomb J, George AE, "et al", The radiologic prediction of Alzheimer disease: the atrophic hippocampal formation, *AJNR*, 1993; 14:897-906
10. O'Dell BL, Roles of zinc and copper in the nervous system, *Prog Clin Biol Res* 1993; 380:147- 162.
11. Sandstead HH, Understanding zinc: recent observations and interpretations, *J Lab Clin Med* 1994; 124:322-327.
12. Frederickson CJ, Bush AI Synaptically released zinc: Physiological functions and pathological effects, *Biometals* 2001; 14:353-366.
13. Vallee BL. Zinc: biochemistry, physiology, toxicology and clinical pathology, *Biofactors* 1988; 1:31-36.
14. Kim. S.H, Kim .Y .S, Lee B Y, Lee H S, Detection Methods of Histochemically-reactive Zinc in the CNS at the Light Microscopical Level, *KJEM* 2008; 38(1):1-6
15. Heltige C C, Barbas H, Role of mechanical factors in morphology of the primate cerebral cortex, *Plos computational Biology* 2006;2(3):146-156
16. Berger B, Esclapez M, Alvarez CH, Human and Monkey Fetal Brain Development of the Supramammillary-Hippocampal Projections: A System Involved in the Regulation of Theta Activity, *J.Comp.Neurol.*2001; 429:515-529.
17. Ahmadpour, Volumetric Study of Dentate Gyrus and CA3 Region in Hippocampus of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: Effect of Insulin and Ascorbic acid, *IJP* 2009;3 (1), 1-4 [Persian]
18. Danscher G , Histochemical demonstration of heavy metals, A revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electron microscopy, *Histochemistry* 1981;71:1-16.
19. Ahmadpour sh, Younesi A. Quantification of TUNEL assay with MAT lab: comparison with stereological method, *J Clin & Experiment pathol* 2012, 2:2 [Persian]
20. Kier E.L, Kim J H , Fulbright R K and Bronen R A, Embryology of the Human Fetal Hippocampus: MR Imaging, *Anatomy and Histology, AJNR* 1997;18:525-532.
21. Fleischhauer, Marlan O, Intracavity electromagnetically induced transparency , *Optics Letters* ,1975: 23; 4: 295-297.
22. Crawford I. L. and Connor, J. D, Zinc in maturing brain: hippocampal concentration and localization, *J. Neurochem* 1972:19:1451-1458
23. Koford and D. L., Otis., Assessing the role of conspecific attraction in habitat restoration for Henslow's sparrows in Iowa, *Prairie Naturalist* 1970:43:23-28
24. Altman K, Greengard O, Correlation of kynurenine excretion with liver tryptophan pyrrolase levels in disease and after hydrocortisone induction, *J Clin Invest* 1966;45(10):1527-1534.
25. Seress L, Abraham H, Tornoczky T, "et al", Cell formation in the human hippocampal formation from mid-gestation to the late postnatal period, *Neurosci* 2001; 105( 4): 831-843.
26. Frederickson CJ, Bush AI Synaptically released zinc: Physiological functions and pathological effects, *Biometals* 2001;14:353-366.

Original Article

## Comparison of Zinc level during the morphometric development of rat hippocampus: from embryonic to postnatal second week

Foghi Kh<sup>1</sup>, Hosseini A<sup>2</sup>, Hojjat Sk<sup>3</sup>, Ahmadpour Sh<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty member of anatomical Sciences department, Medicine school, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran

<sup>2</sup>Msc of developmental biology, Azad University, Jahrom, Iran

<sup>3</sup>Assistant Professor of psychiatry, North Khorasan University of Medical Sciences, Addiction and behavioral sciences research center, Bojnurd, Iran

**\*Corresponding Author:**  
Assistant Professor of  
Anatomical Sciences, North  
Khorasan University of  
Medical Sciences  
E-mail:  
shahahmadpour@gmail.com

---

### Abstract

**Background & Objectives:** Hippocampus area contains a high concentration of zinc which plays a role in synaptic transmission and probably plasticity and hippocampus development. This study aimed to assess zinc level in the hippocampal formation of rat embryos by using Timm method and its relation with volume changes of subregions of hippocampus before and after birth.

**Material and Methods:** In this study, wistar rats' embryos on days 11, 21 and postnatal days of 7 and 14 were used. Samples were stained by Timm method and the degree of staining was quantified by Mat lab 7.5 software, The volume of hippocampal sub regions were estimated by cavalieri's method. The results were analyzed in Mat lab software 7.5.

**Results:** Timm staining on embryonic days of 21 and 11 before birth and first and second weeks after the birth were negative. The quantified results of Timm staining showed no significant level of difference ( $p > 0.05$ ). The volume difference of dentate gyrus, CA3 and CA1 regions showed no meaningful difference till seventh day postnally ( $p > 0.05$ ) while the volume changes of the day 14 after birth showed significant level of difference in comparison with the postnatal day of 7 and embryonic days of 11 and 21 ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** It seems zinc dose not play a role during morphometric development of hippocampus and hippocampus attains its final shape from postnatal Second week.

**Key word:** zinc, hippocampus, stereology, Timm method

---

**Submitted:** 19 Feb 2013

**Revised:** 3 Mar 2013

**Accepted:** 11 Mar 2013