





دانشگاه تربیت معلم  
دانشکده علوم  
گروه زیست شناسی

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد سلولی - تکوینی جانوری

بیان فاکتور رشد اندوتلیوم عروقی (VEGF) در مایع مغزی - نخاعی کودکان  
مبتلا به هیدروسفالی مادرزادی

استاد راهنما  
دکتر محمد نبیونی

اساتید مشاور  
دکتر فرهاد مشایخی  
دکتر هما محسنی کوچصفهانی

نگارش  
محمد ناجی

اردیبهشت ماه 1388

## تشکر و قدردانی

- به پایان رسیدن این تحقیق جز با یاری خداوند و تلاش ها و کمک های اساتید و دوستان عزیز امکان پذیر نبوده است، با سپاس فراوان از
- 1- استاد ارجمند جناب آقای دکتر محمد نبیونی که از آغاز این طرح بنده و دوستان، همواره از راهنمایی ها و کمک های ایشان بهره مند بودیم.
  - 2- استاد ارجمند جناب آقای دکتر فرهاد مشایخی که کمک های بسیار ایشان در انجام این طرح تنها بخش کوچکی از آنچه از ایشان آموخته ام بوده است.
  - 3- سرکار خانم دکتر هما محسنی کوچصفهانی که افتخار شاگردی ایشان در دوره کارشناسی ارشد را داشتم و همواره از راهنمایی ایشان بهره مند شده ام؛ بخصوص در این مطالعه که همواره در مقام مشاور بنده را یاری کرده اند.
  - 4- استاد بزرگوار جناب آقای دکتر کاظم پریور که بنده را با رهنمود های خویش یاری نموده اند و زحمت داوری پایان نامه را به عهده داشتند.
  - 5- استاد بزرگوار سرکار خانم دکتر مهناز آذرنیا که افتخار شاگردی ایشان را دارم و زحمت داوری پایان نامه را به عهده داشتند.
  - 6- دوست عزیز جناب آقای دکتر حمید رضا جمالزاده که نقش بسزایی در انجام این طرح بخصوص در تامین هزینه ها بر عهده داشتند.
  - 7- سرکار خانم دکتر شهربانو عریان مدیر محترم گروه زیست شناسی دانشگاه تربیت معلم.
  - 8- دوست عزیز جناب آقای میثم یزدان خواه که انجام این مطالعه بدون حضور ایشان غیر ممکن بوده و حقیقتا از هر منظری فردی شایسته همکاری هستند.
  - 9- سرکار خانم دکتر فریده نجات، جراح مغز و اعصاب در بیمارستان مرکز طبی کودکان، که زحمت مراحل مشکل نمونه گیری بر عهده ایشان بوده است.

10- کادر پرستاری بیمارستان مرکز طبی کودکان که تمام هماهنگی های لازم برای جمع آوری نمونه ها را بر عهده گرفتند.

11- با سپاس فراوان از تمامی دوستان عزیزی که در تمام مراحل انجام کار مشوق و یاریگر بنده بودند: آقای دکتر مسعود ملکی، سیامک یاری، جواد رسولی، سید ابوذر حسینی زاده، یاسر تهمتئی، مجید رجبی، حسام خدا کرمی، سید احسان حسینی، سید جمیل صحت، مهدی تهرانی و.....

## چکیده

بیان فاکتور رشد اندوتلیوم عروقی (VEGF) در مایع مغزی - نخاعی کودکان مبتلا به

### هیدروسفالی

هیدروسفالی در اثر تجمع مایع مغزی - نخاعی (cerebrospinal fluid, CSF) در بطن ها ایجاد می شود. میلو مننگوسل یک نقص شایع لوله عصبی می باشد که در اثر نقص هایی در نورولاسیون در مراحل ابتدایی دوران جنینی رخ می دهد. هیدروسفالی یکی از علائم شایعی است که با میلو مننگوسل همراه است. CSF محتوی تمام یون های اصلی سرم در حدود نزدیک به سرم خون است. گلوکز و اسید های آمینه نیز از اجزا CSF هستند ولی در این میان پروتئین ها مهم ترین اجزا CSF در تکوین مغز هستند. CSF دارای فاکتورهای رشد و سایتوکین هایی می باشد که در نوروژنزی و تمایز سلول های عصبی اهمیت دارند. الگوی بیان این فاکتورها در CSF در طی بیماری های عصبی مختلف، مثل مالتیپل اسکلروزیس، آلزایمر و پارکینسون تغییر می کند. در مورد محتویات پروتئینی CSF بیماران مبتلا به هیدروسفالی و میلو مننگوسل اطلاعات کمی در دسترس می باشد. VEGF مهم ترین فاکتور در تحریک رگ زایی (انژیوژنز) و افزایش نفوذ پذیری عروق بوده و تاثیر آن بر افزایش نفوذ پذیری سد خونی - مغزی و نقش آن در القا آسیب در سد خونی - مغزی به اثبات رسیده است. از سوی دیگر این فاکتور امروزه به عنوان یک فاکتور نوروتروفیک نیز شناخته می شود که بر بقا و تکثیر سلول های عصبی اثر گذار است و بیان آن در آسیب های مغزی افزایش می یابد.

هدف از مطالعه حاضر بررسی میزان تغییر در بیان VEGF در شرایط هیدروسفالی می باشد تا اهمیت آن در فیزیوپاتولوژی هیدروسفالی مشخص شود. نمونه های مایع مغزی - نخاعی از فضای بطنی و ناحیه کمری کودکان زیر یک سال مبتلا به هیدروسفالی (n=16) و میلو مننگوسل (n=14) در طی عمل جراحی، با رضایت کتبی والدین، به دست آمدند. از CSF

کودکان مشکوک به مننژیت که نتیجه کشت آنها منفی شده بود به عنوان گروه کنترل (n=20) استفاده شد. از کودکان نمونه های سرم خون نیز گرفته شد زیرا مقایسه تغییرات بیان VEGF در سرم با CSF به روشن تر شدن اهمیت VEGF در شرایط هیدروسفالی و به پیش بینی محل تولید VEGF کمک می کند. محتوی کلی پروتئین نمونه های CSF توسط روش بردفورد اندازه گیری شد. به وسیله جداسازی الکتروفورز و رنگ آمیزی نیترات نقره مشخص شد که الگوی بیان یک سری از پروتئین ها در بیماران با گروه کنترل تفاوت نشان می دهد. از میان نوار های شناسایی شده در طی الکتروفورز غلظت سه نوار در نمونه های بیمار تفاوت واضحی را نسبت به نمونه های کنترل نشان داد. نوار های با وزن ملکولی متوسط (40-30 کیلو دالتون) و پایین (20-15 کیلو دالتون) را می توان به فاکتور های نوروتروفیک یا زیر واحد های آن ها نسبت داد. از این میان نوار 20 – 15 کیلو دالتونی را می توان به زیر واحد های VEGF نسبت داد. به منظور بررسی میزان بیان VEGF، سطح بیان این فاکتور در CSF و سرم با استفاده از کیت الایزا (DVE00, R&Dsystems) بررسی شد. نتایج این آزمایش نشان داد که غلظت VEGF در سرم کودکان بیمار اندکی افزایش یافته است که این افزایش معنی دار نبوده است در حالیکه بیان این فاکتور در CSF کودکان بیمار نسبت به کودکان سالم تفاوت بسیار معنی داری نشان داد. افزایش بیان VEGF در CSF چندین برابر افزایش محتوی کلی پروتئین بود. این نکته نشان می دهد که سلول های خاصی در سیستم عصبی مسئول افزایش غلظت VEGF در CSF هستند. در حالت طبیعی VEGF در سطوح بسیار پایین در مغز بیان می شود ولی در هیپوکسی موضعی یا سیستمیک آستروسیت ها، نورون ها و میکرو گلیا ها بیان آن را افزایش می دهند. در مجموع افزایش بیان VEGF را می توان به تولید بیشتر آن در دستگاه عصبی مرکزی نسبت داد ولی نقش دقیق VEGF در فیزیوپاتولوژی هیدروسفالی و میلومننگوسل با توجه به نقش های متفاوت آن نیاز به مطالعات گسترده تری دارد.

كلمات كلىدى: فاكفور رشء انءوءللىوم عروقى؁ هىءروسفالى؁ مىلومنىنسىل؁ مالىع ملىزى -

نلىاعى؁ اللىوى الكفروفورفوك.

## فهرست مطالب

<u>صفحه</u>	<u>عنوان</u>
12	اختصارات.....
14	مقدمه .....
15	1-1- هیدروسفالی .....
15	1-2- طبقه‌بندی هیدروسفالی .....
16	1-2-1- هیدروسفالی مادرزادی .....
17	1-2-2- هیدروسفالی اکتسابی.....
18	1-2-3- هیدروسفالی ارتباطی .....
18	1-2-4- هیدروسفالی انسدادی .....
19	1-2-5- هیدروسفالی با فشار طبیعی .....
19	1-3- نقش CSF در پاتوژنز هیدروسفالی .....
25	1-4- نواقص لوله عصبی .....
27	1-4-1- علائم و نشانه‌های اسپینا بیفیدا .....
28	1-4-2- ناهنجاری آرنولدکیاری .....
30	5 – 1- تولید، گردش و باز جذب مایع مغزی – نخاعی.....
31	1-6- نقش CSF در طی تکوین مغز .....
32	1-6-1- ترکیب CSF در طی تکوین مغز .....
35	1-6-2- کشیدن CSF .....



## عنوان

## صفحه

- 36 ..... 1-6-3- مهار فاکتورهای رشد در CSF و نیز تاثیر آن بر محیط کشت
- 38 ..... 1-7- خانواده فاکتور رشد اندوتلیوم عروقی (VEGF)
- 41 ..... 1-7-1- نورون ها و پیش ساز های عصبی
- 43 ..... 1-7-2- سلول های گلیال
- 44 ..... 1-7-3- تنظیم تولید VEGF بوسیله میزان اکسیژن
- 46 ..... 1-7-4- VEGF و آسیب های ایسکمیک مغزی (سکته)
- 48 ..... 1-7-5- VEGF و ترمیم عصب
- 50 ..... 1-7-6- VEGF در سایر اختلالات تحلیل رونده عصبی
- 51 ..... 1-8- اهداف اصلی تحقیق

## فصل دوم

- 53 ..... مواد و روش ها
- 54 ..... 2-1- نمونه گیری
- 55 ..... 2-2- اندازه گیری غلظت پروتئینی به روش بردفورد
- 56 ..... 2-3- مطالعه پروتئین ها به روش الکتروفورز
- 58 ..... 2-4- الکتروفورز به روش SDS-PAGE در سیستم نا پیوسته
- 59 ..... 2-4-1- محلول های لازم
- 63 ..... 2-4-2- آماده سازی نمونه های مایع مغزی-نخاعی و تزریق آن ها در ژل
- 64 ..... 2-5- نحوه رنگ آمیزی ژل به روش رنگ آمیزی نیترات نقره

<u>صفحه</u>	<u>عنوان</u>
65	2-6-2- الایزا (ELISA) .....
66	2-6-1- نحوه‌ی آزمایش .....
69	2-7- آنالیز آماری .....

### فصل سوم

70	نتایج .....
71	3-1- بررسی محتوای غلظت کل پروتئین موجود در CSF .....
74	3-2- نتایج حاصل از الکتروفورز .....
76	3-3- بررسی میزان بیان فاکتور VEGF در CSF .....
79	3-4- میزان بیان فاکتور VEGF در نمونه‌های سرم بیمار و کنترل .....

### فصل چهارم

81	بحث و تفسیر .....
82	4-1- بیان VEGF در تحقیق حاضر .....
84	4-2- افزایش بیان VEGF در شرایط هیپوکسی .....
86	4-3- VEGF و افزایش نفوذپذیری سد خونی- مغزی .....
87	4-4- ارتباط VEGF با سلول‌های گلیال و گلیوزیس .....
88	4-5- مقاومت نوروں‌ها در شرایط هیدروسفالی .....
89	4-6- VEGF و آسیب‌های مغزی در هیدروسفالی .....
91	4-7- نتیجه‌گیری کلی .....
92	4-8- پیشنهادات .....

عنوان

صفحه

فصل پنجم

93 ..... 5-1- منابع

حروف اختصاری (abbreviations):

ALS: amyotrophic lateral sclerosis  
AQ: cerebral aqueduct  
BBB: blood brain barrier  
BDNF: brain-derived neurotrophic factor  
BrdU: 5-bromo-2'- deoxyuridine  
BSA: bovine serum albumin  
CC: cerebral cortex  
CP: choroid plexus or cortical plate  
CSF: cerebrospinal fluid  
FGF-2: fibroblast growth factor-2  
GE: germinal epithelium  
GFAP: glial fibrillary acidic protein  
HIF: hypoxia inducible factor  
HRE: hypoxia-response element  
ICP: intracranial pressure  
MBP: myelin basic protein  
MS: multiple sclerosis  
MZ: marginal zone  
NPH: normal pressure hydrocephalus  
NSE: neuron specific enolase  
NT-3: neurotrophin-3  
PHD: proline hydroxylase domain-containing  
PIGF: placental growth factor  
TGF- $\beta$ : transforming growth factor- beta  
VEGF: vascular endothelial growth factor

VPF: vascular permeability factor

UTR: untranslated region

فصل اول

مقدمه

## 1-1- هیدروسفالی

هیدروسفالی از واژه های یونانی هیدرو (hydro) به معنای آب و سفالوس (cephalus) به معنای سر مشتق شده است. هیدروسفالی هنگامی رخ می دهد که مایع مغزی- نخاعی (cerebrospinal fluid, CSF) در بطن ها و یا فضای زیر عنکبوتیه مغز جمع شود. افزایش فشار درون جمجمه ای (intracranial pressure) در این حالت می تواند ناشی از تولید بیش از حد معمول CSF (برای مثال در پاپیلوماى شبکه‌ی کورویئید)، مسدود شدن مسیر جریان CSF و یا نقص در عملکرد ساختارهای مسئول بازجذب CSF باشد. هیدروسفالی حدوداً در 1 کودک از 1000 کودک متولد شده مشاهده می شود، عوامل مختلفی مانند تومورهای مغزی و ضربه مغزی نیز می تواند باعث بروز این بیماری پس از تولد شوند (Bagley, 1997).

## 2-1- طبقه بندی هیدروسفالی

اگرچه هیدروسفالی می تواند بواسطه ی تولید غیر طبیعی CSF (بعنوان مثال تومورهای شبکه کورویئید) رخ دهد ولی معمولاً هیدروسفالی هنگامی رخ می دهد که مسیر خروج CSF از مغز به گونه ای مسدود شود. جراحان مغز و اعصاب هیدروسفالی را براساس زمان و چگونگی رخ دادن آن به انواع مادرزادی (congenital) و اکتسابی (acquired)؛ و با توجه به این که در بازجذب CSF نقصی رخ داده باشد یا اینکه خروج CSF از بطن ها مسدود شده باشد به انواع ارتباطی (communicating) و انسدادی (non-communicating) تقسیم بندی می کنند (Pattisapu., 2001). نوع دیگری از هیدروسفالی موسوم به هیدروسفالی با فشار طبیعی وجود دارد که از این سیستم طبقه بندی مستثنی است. این اصطلاح برای شرایط متنوعی که در آنها بطن ها بزرگ می شوند ولی افزایش فشار درون جمجمه ای رخ نمی دهد، استفاده می شود. شرایطی مثل آلزایمر و آتروفی بافت مغز می توانند باعث بروز این چنین حالتی شوند (Johanson et al., 2004). برخی از اصطلاحات دیگر نیز ممکن است برای توصیف حالت

خاصی از هیدروسفالی بکار برده شوند مثل aqueduct stenosis (مسدود شدن کانال Sylvius) که می‌تواند به وسیله‌ی یک کیست رخ دهد ولی در کل به آن هیدروسفالی غیر ارتباطی می‌گویند (Harrington et al., 1996).

## 1-2-1- هیدروسفالی مادرزادی (congenital hydrocephalus)

وقتی که منشا هیدروسفالی یک نقص پیش از تولد یا ناهنجاری مغزی باشد که مقاومت در برابر خروج CSF را افزایش دهد به آن هیدروسفالی مادرزادی می‌گویند (Pattisapu., 2001). فاکتورهای مختلفی می‌توانند باعث هیدروسفالی مادرزادی شوند مانند:

1- *Toxoplasmosis*: *T.gondii* یک انگل تک سلولی است که از طریق گوشت و خاک آلوده یا تماس مستقیم با حیوانات منتقل می‌شود.

2 *Cytomegalovirus* (CMV): یک ویروس متعلق به خانواده هرپس ویروس‌ها است و علائمی شبیه به سرماخوردگی معمولی پس از تولد ایجاد می‌کند.

3- ویروس *Rubella*: که باعث ایجاد سرخک می‌شود و در اثر آن ناهنجاری‌های جنینی مختلفی ایجاد می‌شود که یکی از آن‌ها هیدروسفالی است.

4- هیدروسفالی وابسته به کروموزوم X: یک نارسایی وراثتی است که در اثر یک ژن غیر طبیعی بر روی کروموزوم X نوزادان پسر ایجاد می‌شود. بنابراین این بیماری فقط توسط مادر به نسل بعد منتقل می‌شود (Harrington and Merrill., 1988).

هیدروسفالی مادرزادی معمولاً همراه با سایر نارسایی‌های دستگاه عصبی مرکزی است. پس از یک مطالعه طولانی 17 ساله سه نارسایی مادرزادی نورولوژیک دیگر در ارتباط با هیدروسفالی شناسایی شد: اننسفالی (anencephaly)، *spina bifida* و انسفالوسل (encephaloceles) (Harrington and Merrill., 1988). از 370 نوزاد متولد شده با این نارسایی‌ها فقط 10/5 درصد (39 نفر) تا سال 1990 زنده بودند (Wiswell et al., 1990).



اگر چه هیدروسفالی می‌تواند به دلایل متنوعی ایجاد شود، هیدروسفالی مادرزادی اغلب بخشی از سایر اختلالات نورولوژیک و ناهنجاری‌های مادرزادی است. اختلالاتی که هیدروسفالی همراه آن‌ها رخ می‌دهد به ترتیب فراوانی عبارتند از:

1- نقص‌های لوله عصبی (Neural tube defects , NTDs) مثل Spina bifida

2- ناهنجاری‌های Chiari (Chiari malformations)

3- سندروم Dandy Walker (بزرگ شدن بطن چهارم و عدم تکوین بخش ورمیس مخچه)

4- ناهنجاری Vein of galen

5- هیدراننسفالی (عدم پیدایش نیمکره های مغز)

6- Craniosynostosis (بسته شدن زود هنگام درزهای جمجمه)

7- Schizencephaly (ایجاد شکاف های غیر طبیعی در نیمکره های مغز)

2-2-1- هیدروسفالی اکتسابی (acquired hydrocephalus)

هیدروسفالی پس از تولد نیز می‌تواند بوسیله‌ی شرایطی که مقاومت به خروج CSF را افزایش می‌دهند مثل مسدود شدن مسیر حرکت CSF ایجاد شود. البته تومورهای مغز، کیست عنکبوتیه، خونریزی درون جمجمه‌ای یا درون بطنی، ضربه‌های مغزی و عفونت‌هایی مثل مننژیت نیز در ایجاد هیدروسفالی اکتسابی دخالت دارند (Matsumoto and Tamaki., 1991; Pattisapu. , 2001).

### 3-2-1- هیدروسفالی ارتباطی (communicating hydrocephalus)

واژه ارتباطی نشان دهنده این است که محل افزایش مقاومت به خروج CSF خارج از سیستم بطنی و جایی در فضای زیر عنكبوتیه قرار دارد. هیدروسفالی ارتباطی توسط یکی از سه عامل زیر ایجاد می‌شود:

1- تولید زیاد CSF (ندرتاً در ارتباط با پاپیلومای شبکه کوروئید است)

2- گرفتگی وریدی (یک حالت کمیاب که معمولاً به عنوان otitic hydrocephalus شناخته می‌شود)

3- مقاومت به خروج CSF از فضای زیر عنكبوتیه بخاطر چسبیدن لایه عنكبوتیه یا نقص در مسیرهای خروج CSF.

واژه ارتباطی یعنی این که بطن‌های مغز با هم ارتباط دارند و CSF می‌تواند از آنها وارد فضای زیر عنكبوتیه شود. انسداد در مسیر حرکت CSF در سیستم بطنی رخ نمی‌دهد بلکه جایی در فضای زیر عنكبوتیه یا مسیر خروج CSF رخ می‌دهد. همچنین این نوع هیدروسفالی می‌تواند نتیجه التهاب پرده‌های مننژ مثل عفونت یا حضور خون یا سلول‌های تومور در فضای زیر عنكبوتیه باشد (Matsumoto and Tamaki., 1991).

### 4-2-1- هیدروسفالی انسدادی (non-communicating hydrocephalus)

هیدروسفالی انسدادی یا غیر ارتباطی هنگامی که مسیر حرکت CSF جایی در سیستم بطن‌های مغز مسدود شود ایجاد می‌گردد مثل خروجی‌های بطن چهارم (منافذ لوشکا و ماژندی). معمول‌ترین نقطه برای مسدود شدن مسیر حرکت CSF، aqueduct of sylvius است که به آن aqueduct stenosis می‌گویند. با وجود این مسدود شدن منفذ Monro یعنی خروجی بطن‌های جانبی به بطن سوم نیز امکان‌پذیر است (Bradley et al., 1996).

در aqueduct stenosis بعنوان فراوان‌ترین نوع هیدروسفالی انسدادی مسیر حرکت CSF از بطن سوم به چهارم مسدود می‌شود در نتیجه در اثر افزایش فشار درون جمجمه‌ای، بطن‌ها شروع به بزرگ شدن می‌کنند، در مجموع هیدروسفالی انسدادی شایع‌ترین نوع هیدروسفالی در دوران جنینی است (Bradley et al., 1996).

### 5-2-1- هیدروسفالی با فشار طبیعی (normal pressure hydrocephalus)

تشخیص افراد با این بیماری هنگامی صورت می‌گیرد که بطن‌ها بزرگ شده باشند ولی فشار درون جمجمه‌ای افزایش نیابد یا افزایش اندکی داشته باشد. NPH معمولاً در سنین بالا مشاهده می‌شود و در اثر مسدود شدن مسیر حرکت CSF و آتروفی غیر طبیعی مغز ایجاد می‌شود. NPH به دو دسته تقسیم می‌شود:

1- آنهایی که در اثر مننژیت یا خونریزی فضای زیر عنکبوتیه دچار بیماری شده‌اند.

2- نوع idiopathic، که در آن‌ها عامل NPH مشخص نیست (Kudo et al., 2000; Tullberg et al., 2000)

### 3-1- نقش CSF در پاتوژنز هیدروسفالی

Hydrocephalic Texas (H-Tx)، رت مدل هیدروسفالی مناسبی است که از یک کلنی نرمال در اثر یک جهش خودبخودی جداسازی شده است و بدن‌بال آن بوسیله آمیزش‌های برادر - خواهری حفظ شده است (Kohn et al., 1981, 1984). مطالعات اخیر نشان می‌دهد که یک جهش تک ژنی باعث هیدروسفالی در این مدل می‌شود و این صفت به صورت اتوزوم مغلوب با نفوذ ناقص به نسل‌های بعد منتقل می‌شود. به همین دلیل فقط حدود 40 درصد از نوزادان در یک آمیزش خالص H-Tx بیماری را نشان می‌دهند. در این رت‌ها، هیدروسفالی در پی مسدود شدن جریان CSF ایجاد می‌شود (Cai et al., 2000).

یک گرفتگی شدید در روز 18 حاملگی یعنی همزمان با اوج نوروزنز و مهاجرت گسترده سلول‌ها به کورتکس در حال تکوین در *aqueduct sylvius*، رابط بین بطن سوم و چهارم، رخ می‌دهد و در پی آن بطن‌های مغز شروع به بزرگ شدن می‌کنند و علائم هیدروسفالی بروز می‌کند و رشد و نمو مغز نیز مختل می‌شود (Mashayekhi et al. , 2000) (شکل 1-1).

نشان داده شده است که در حالت طبیعی از روز E18 (embryonic day) به بعد مهاجرت گسترده‌ای از *germinal epithelium* (GE) به سمت *cortical plate* (CP) رخ می‌دهد و قطر کورتکس افزایش معنی‌داری پیدا می‌کند ولی این رویداد در H-Tx پس از مسدود شدن مسیر CSF رخ نمی‌دهد و کورتکس بصورت نابالغ باقی می‌ماند (شکل 1-2).

ابتدا به نظر می‌رسید که این نقص رشد و نمو به علت افزایش فشار درون جمجمه‌ای پس از مسدود شدن جریان CSF و تجمع آن در بطن‌ها باشد ولی بعداً مشخص شد که این فشار تا 10 روز پس از تولد یعنی زمانی که استخوان‌های جمجمه بهم می‌رسند، رخ نمی‌دهد. از طرفی بررسی فواصل بین سلولی هیچ‌گونه کاهشی را نشان نداد یعنی این‌که نازک شدن کورتکس در اثر فشردگی نبوده است (Mashayekhi et al. , 2000).

بررسی سلول‌های در حال تکثیر در سطح مغز بوسیله تزریق *BrdU* به رت‌های باردار این نکته را به اثبات رساند که در GE رت H-Tx نسبت به نمونه‌های نرمال تعداد کمتری از سلول‌های در حال تکثیر وجود دارند و تراکم این سلول نیز کاهش یافته است. پس عوامل ناشناخته‌ای باعث مهار تکثیر و رشد و نمو طبیعی سلول‌های مغز شده‌اند (Mashayekhi et al. , 2000) (شکل 1-3).