اثرات تاموکسیفن بر فراساختار و تعداد سلولهای هیپوکامپ جنین و نوزاد موش صحرایی

نوروز نجف‌زاده I

***دکتر ملیحه نوبخت** II

دکتر سید بهنام‌الدین جامعی III

پروانه طباطبایی IV

طیبه رستگار V

فرزانه محمدزاده V

چکیده

زمینه و هدف: استرودیدهای مادری، اثرات گوناگونی بر روی تکامل مغز دارند. تاموکسیفن، به عنوان آنتاگونیست استروژن در مغز باعث مرگ سلولی در سلولهای هیپوکامپ در حال تکامل موش صحرایی می‌گردد. استروژن تاثیر مهمی بر روند اعمال شناخت، یادگیری، پیری، آنژیوژنزیس، نوروژنزیس و حفاظتی نورون‌ها دارد. در این مطالعه، اثر تاموکسیفن به عنوان آنتاگونیست استروژن بر فرا ساختمان و مورفولوژی هیپوکامپ در حال تکامل موش صحرایی بررسی شد.

روش بررسی: در این بررسی که از نوع تجربی بوده است، ۱۲ دسته موش صحرایی، در ۳ گروه کنترل، تجربی و sham مورد مطالعه قرار گرفتند که در هر گروه، ٤ رده سنی، شامل جنین فول ترم(E_{22})، نوزاد یک روزه(P_1)، یک هفته(P_7) و سه هفته(P_{21}) مورد آزمایش قرار گرفت. تزریق تاموکسیفن در حلال پروپیلن گلیکول، ۲ روز قبل از زایمان، روزی ۲ بار انجام گرفت و پس از طی پروسه‌های لازم، نواحی مختلف Subiculum، D.G، CA_3 و CA_1 هیپوکامپ، به وسیله میکروسکوپ نوری و الکترونی مطالعه گردید. جهت آنالیز داده‌ها از آزمون آماری ANOVA و T-Test استفاده گردید که Pvalue<۰/۰۵ اختلاف آماری معنی‌داری را نشان می‌دهد.

یافته‌ها: نتایج مشخص می‌سازد که تراکم سلولی در نواحی CA_1 و سابیکولوم هیپوکامپ، کاهش می‌یابد و الکترومیکروگراف‌ها، پیکنوزه شدن هسته، متراکم شدن و حاشیه‌ای شدن کروماتین‌ها، پارگی غشا هسته، متورم شدن میتوکندری‌ها و تغییر ساختار کریستا در میتوکندری را، عمدتاً در نواحی CA_1 و سابیکولوم نشان می‌دهند. بیش‌ترین میزان تغییرات در مراحل اولیه تکامل یعنی جنین فول ترم و نوزاد یک روزه مشاهده می‌گردد.

نتیجه‌گیری: با توجه به اثر استروژن روی نوروژنزیس، تزریق تاموکسیفن باعث تغییراتی در رشد سلولهای پیرامیدال هیپوکامپ می‌گردد. زمان پایداری تاثیر تاموکسیفن، نقش موثری در این مطالعه داشته است که با توجه به رشد حداکثر این سلولها در روزهای آخر جنینی و روز اول تولد، بیش‌ترین تغییرات در این روزها حاصل می‌گردد.

کلیدواژه‌ها: ۱ – هیپوکامپ ۲ – تاموکسیفن ۳ – تکامل ۴ – استروژن ۵ – موش صحرایی

تاریخ دریافت: ۸٤/۵/۱٦، تاریخ پذیرش: ۸۵/۳/۲۸

مقدمه

هورمون‌ها و فاکتورهای رشد و نوروترانسمیترها، سلولهای مغز را تحت تأثیر قرار می‌دهند. بررسی انجام شده، حاکی از تاثیر بسیار مهم هورمون‌های گنادی بر مغز می‌باشد. در این میان، استروژن نقش مهمی را در هیپوکامپ ایفاء می‌کند. تاموکسیفن، به عنوان آنتاگونیست استروژن، واکنشهای تحت تاثیر استروژن را در بسیاری از بافتها کاهش داده یا بلوکه می‌نماید که به عنوان تنظیم کننده رسپتور انتخابی استروژن عمل می‌کند[۱-۳] و اثرات

I) دانشجوی دکترای گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران، تهران، ایران.

II) دانشیار گروه بافت‌شناسی، دانشکده پزشکی، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران، تهران، ایران(*مؤلف مسؤول).

III) استادیار گروه آناتومی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران، تهران، ایران.

IV) کارشناس بیولوژی، بخش میکروسکوپ الکترونی مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران، تهران، ایران.

V) کارشناس ارشد گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران، تهران، ایران.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

آنتی‌استروژنیک آن شامل ساپرس کردن رشد سلولها در سرطان سینه، بلوکه کردن رشد سلولهای رحم موش صحرایی و هامستر و بلوکه کردن رشد سلولها در لوله رحم در جوجه و بلدرچین، می‌باشد.[۲-۵] مکانیسم عمل تاموکسیفن در بافتهای مختلف، متفاوت است؛ اثر آنتاگونیستی یا آگونیستی تاموکسیفن به نوع بافت بستگی دارد که در بافت مغز، به عنوان آنتاگونیست عمل می‌کند. با توجه به اثر محافظتی استروژن، تاموکسیفن عمدتاً بر روی سلولهای هرمی و اینترنورون‌های هیپوکامپ که دارای رسپتور استروژن هستند، اثر دارد.[۶ و ۷] با توجه به اینکه بررسی اثر استروژن، تاموکسیفن و آنتاگونیست‌های استروژن روی نورون‌های هیپوکامپ در طی تکامل، موضوع بسیار مهمی در بررسی‌های علوم اعصاب محسوب می‌شود[۵ و ۸-۱۰]، در این مطالعه تاثیر تاموکسیفن بر روی تراکم تعداد نورون‌ها در نواحی D.G، CA_3، CA_1 و سابیکولوم از دیدگاه میکروسکوپ نوری بررسی گردید. همچنین با مطالعات الکترومیکروگراف، تغییرات ناشی از هسته و میتوکندری، در سلولهای نواحی CA_1 در سنین مختلف مورد ارزیابی قرار گرفتند. مطالعات انجام شده بر روی استروژن، به عنوان فاکتور اساسی در مراحل تکاملی در دوران جنینی، اهمیت استروژن و تاموکسیفن را مطرح می‌سازند.

روش بررسی

تاموکسیفن از شرکت ایران هورمون تهیه شد. جهت مطالعه in vivo از پروپیلن گلیکول به عنوان حلال استفاده شد. تمام مواد شیمیایی استفاده شده از نوع معرفهای آنالیتیکی بوده و آب دیونیزه سه بار تقطیر، در این مطالعه استفاده شد. محلول استوک با حل کردن یک گرم تتراکسید اسمیوم در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر در یک فلاسک بدست آمد. محلول کار در ۱۰۰ میلی‌لیتر سیترات بافر رقیق تهیه شد که در ظرف تیره و دور از نور نگهداری می‌شد. مواد شیمیایی جهت پرفیوژن مثل تتراکسید اسمیوم، گلوتارآلدیید، پارافرمالدیید، اورانیل استات و پاراپلاست از شرکت Aldrich-Sigma خریداری شدند.

در این مطالعه که از نوع تجربی بوده است، از ۶۰ رت نژاد Wistar نر و ماده استفاده شد که بین ۱۸۰ تا ۲۵۰ گرم وزن داشتند و به مدت ۲۴ ساعت در سیکل شبانه‌روزی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند و آب و غذای کافی در دسترس داشتند، حیوانات به ۳ دسته کنترل، تجربی و sham تقسیم شدند، هر دسته به ۴ گروه ۶ ساعت بعد از تزریق(E_{22})، ۱۶ ساعت بعد از تولد(P_1)، یک هفته(P_7) و ۳ هفته بعد از تولد(P_{21}) تقسیم شدند که در هر گروه، ۵ عدد جنین(در E_{22}) و یا ۵ سر نوزاد(در P_1، P_7 و P_{21}) مورد استفاده قرار گرفتند.

جهت بررسی اثرات استروژن روی تغییرات دوره حاملگی، حیوانات فول‌ترم، ۴ دوز تاموکسیفن به صورت داخل صفاقی دریافت کردند(۳۵۰ میکروگرم تاموکسیفن(که بلوک کننده رسپتوراستروژن است)، ۲ بار در روز) و مغز جنین‌ها، ۶ ساعت بعد از آخرین تزریق و مغز نوزادان، ۱۶ ساعت، یک هفته و ۳ هفته بعد از تولد خارج گردید. مغز حیوانات با سنین مشابه، یعنی مغز جنین‌ها، ۶ ساعت بعد از آخرین تزریق و مغز نوزادان ۱۶ ساعت، یک هفته و ۳ هفته بعد از تولد، به عنوان کنترل(بدون تزریق تاموکسیفن) انتخاب شدند.

نمونه‌های بافتی، ۶ ساعت بعد از آخرین تزریق، ۱۶ ساعت بعد از تولد، یک هفته و ۳ هفته بعد از تولد، جدا شدند. نوزادان با پنتوباربیتال داخل صفاقی به میزان ۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن و مادر آنها با ۲۰ میلی‌گرم پنتوباربیتال داخل صفاقی به ازای هر کیلوگرم از وزن بیهوش شدند و با سرعت ۳۰-۲۰ میلی‌لیتر محلول رینگر حاوی یک واحد هپارین در هر میلی‌لیتر، در هر دقیقه، به مدت ۵ دقیقه پرفیوژ شدند. به دنبال آن، از محلول کارنوسکی به مقدار ۳۰-۲۰ میلی‌لیتر در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. مغز جنین‌ها و نوزادان از جمجمه خارج گردید و بعد از جداسازی هیپوکامپ، نمونه‌ها جهت رنگ‌آمیزی تولوییدین بلو، نیسل و میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفتند.

برای بررسی میکروسکوپ نوری، کل مغز در محلول

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

کارنوسکی قرار داده شد و سپس در محلول‌های با خلوص بیش‌تر اتانول، آبگیری شد و بعد از تهیه بلوکها، برشهای سریال کورونال با ضخامت ۱۰ میکرومتر تهیه گردیدند و در روی اسلایدهای ژلاتینه قرار داده شدند و پس از رنگ‌آمیزی با کرزیل ویولت، جهت بررسی با میکروسکوپ نوری (Olympus) انتخاب گردیدند، با برنامه Olysia تصاویر گرفته شده، گرید بندی شدند و برای شمارش تعداد سلولها، به صورت تصادفی از چندین گرید استفاده شد.

نمونه‌های هیپوکامپ با ابعاد یک میلی‌متری، تهیه و به مدت یک شب در محلول کارنوسکی قرار داده شدند، سپس از تتراکسید اسمیوم ۲٪ به عنوان فیکساتیو ثانویه استفاده شد. سپس با آبگیری توسط استن در رزین Epon 812، قالب‌گیری و پلیمریزه گردیدند. برشهای نیمه ضخیم با ضخامت ۰/۳-۰/۱ میکرومتر، تهیه و با تولوییدین بلو، رنگ‌آمیزی شدند و توسط میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند. برشهای کاملاً نازک به ضخامت ۸۰-۶۰ نانومتر با اورانیل استات و سیترات سرب رنگ‌آمیزی شدند و با میکروسکوپ الکترونی Leo 906 Zeiss مورد بررسی قرار گرفتند.

تراکم سلولی در ٤ ناحیه، با توجه به ٤ رده سنی، مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از روشهای مورفومتری، جهت تعیین تراکم سلولی، تعداد سلولها در ۲۰۰۰۰ میکرومتر مربع شمارش گردید. میانگین، همراه با خطای استاندارد به تفکیک محاسبه گردید، یعنی آزمون T جهت مقایسه بین دو گروه کنترل و تجربی برای هر یک از گروه‌های P_{21}، P_7، P_1 و E_{22} جداگانه انجام شده و میزان معنی‌دار بودن آماری و آنالیز نهایی با استفاده از برنامه آماری (SPSS (version 11 SYSTAT و عمدتاً با Independent Sample T-Test در تمام گروه‌ها، انجام گردید.

لازم به ذکر است که برای جلوگیری از احتمال بروز خطا، آماده‌سازی و رنگ‌آمیزی نمونه‌ها، توسط یک نفر و بررسی نمونه‌ها و تفسیر الکترومیکروگراف‌ها، توسط یک فرد انجام گردید.

یافته‌ها

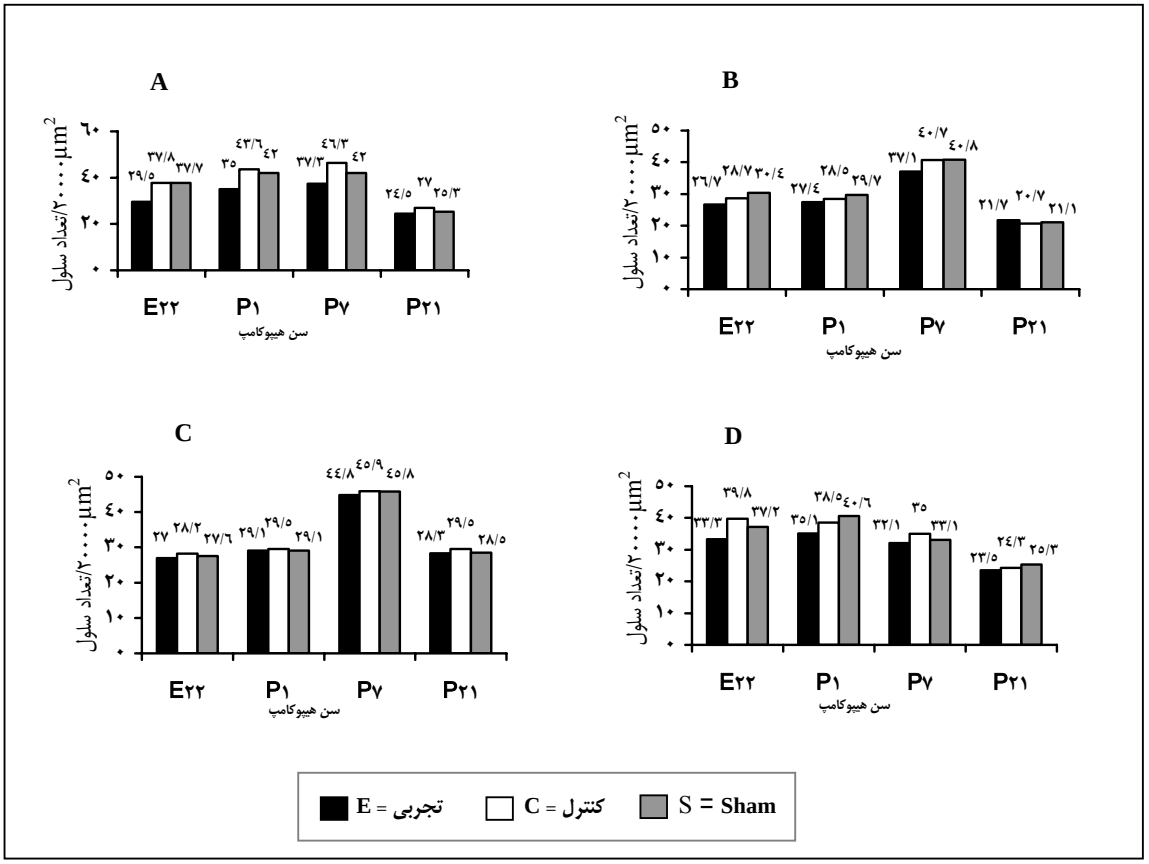
در بررسی مورفومتریک با استفاده از آنالیز کمی، در این مطالعه کاهش قابل ملاحظه‌ای در تعداد سلولهای پیرامیدال CA_1 و سابیکولوم در گروه‌های تجربی E_{22}، P_7، P_1 مشاهده شد، در حالی که در هفته سوم، تأثیر محسوسی مشاهده نشد؛ بنابراین رابطه قابل ملاحظه‌ای بین روند رشد و استفاده از تاموکسیفن دیده شد و تأثیر تاموکسیفن بر تعداد سلولهای پیرامیدال CA_1 تنها تا هفته اول بعد از تولد قابل مشاهده بود، بنابراین تاموکسیفن از افزایش تعداد سلولهای القا شده با استروژن جلوگیری می‌کند. همچنین این تأثیر بر ناحیه سابیکولوم هم قابل مشاهده است اما کاهش تراکم نورونی در ناحیه سابیکولوم کمتر می‌باشد(شکل شماره ۱و جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱- میانگین تعداد سلولها(±SD) در نواحی Subiculum، D.G، CA_3 و CA_1 هیپوکامپ در سنین مختلف تکامل،

c: کنترل e: تجربی s: sham

		CA_1			CA_3			D.G.			Sub.		
		Mean±SD	SE	Pvalue	Mean±SD	SE	Pvalue	Mean±SD	SE	Pvalue	Mean±SD	SE	Pvalue
	C	۳۷/۸ ± ۵/۵	۱/۲	۰/۰۰۰	۲۸/۷ ± ۵/۵	۱/۲	۰/۲۲	۲۸/۲ ± ٤/۵	۱/۰	۰/٤۹	۳۹/۸ ± ۲/۹	۱/۳	۰/۰۰۰
E_{22}	E	۲۹/۵ ± ٤/۰	۰/۹	۰/۰۰۰	۲٦/۷ ± ٤/٦	۱/۰	۰/۲۲	۲۷/۰ ± ۵/۵	۱/۲	۰/٤۹	۳۳/۳ ± ۲/۸	۰/٦	۰/۰۰۰
	S	۳۷/۷ ± ۵/۲	۱/۲	۰/۰۰۰	۳۰/٤ ± ٤/۲	۰/۹	۰/۲۲	۲۷/٦ ± ۵/۳	۱/۲	۰/٤۹	۳۷/۲ ± ٤/۲	۰/۹	۰/۰۰۰
	C	٤۳/٦ ± ۳/٦	۰/۸	۰/۰۰۰	۲۸/۵ ± ٤/۰	۰/۹	۰/٤۱	۲۹/۵ ± ۵/۱	۱/۱	۰/۸	۳۸/۵ ± ٤/۵	۱/۰	۰/۰٤۵
P_1	E	۳۵/۰ ± ۵/۵	۱/۲۷	۰/۰۰۰	۲۷/٤ ± ٤/۲	۰/۹	۰/٤۱	۲۹/۱ ± ۵/٤	۱/۲	۰/۸	۳۵/۱ ± ۵/۳	۱/۲	۰/۰٤۵
	S	٤۲/۰ ± ٦/۷	۱/۰	۰/۰۰۰	۲۹/۷ ± ۳/۱	۰/۷	۰/٤۱	۲۹/۱ ± ۵/۰	۱/۱	۰/۸	٤۰/٦ ± ٤/۹	۱/۱	۰/۰٤۵
	C	٤٦/۳ ± ٦/۷	۱/۵	۰/۰۰۰	٤۰/۷ ± ۵/۵	۱/۲	۰/٤	٤۵/۹ ± ۸/۱	۱/۸	۰/٤	۳۵/۰ ± ٤/۰	۰/۹	۰/۰۳۸
P_7	E	۳۷/۳ ± ٦/۳	۱/٤	۰/۰۰۰	۳۷/۱ ± ۳/٦	۰/۸	۰/٤	٤٤/۸ ± ۹/۰	۲/۰	۰/٤	۳۲/۱ ± ٤/۱	۰/۹	۰/۰۳۸
	S	٤۲/۰ ± ٤/۹	۱/۱	۰/۰۰۰	٤۰/۸ ± ٤/۳	۰/۹	۰/٤	٤۵/۸ ± ٦/٦	۱/۵	۰/٤	۳۳/۱ ± ۳/۹	۰/۹	۰/۰۳۸
	C	۲۷/۰ ± ٤/۲	۰/۹۷	>۰/۰۵	۲۰/۷ ± ٤/۳	۰/۹	۰/٤۹	۲۹/۵ ± ۱۱/٦	۱/۳	۰/٤٦	۲٤/۳ ± ۳/۹	۰/۹	۰/۰۵۸
P_{21}	E	۲٤/۵ ± ۳/٦	۰/۸۳	>۰/۰۵	۲۱/۷ ± ٤/۵	۱/۰	۰/٤۹	۲۸/۳ ± ٤/۲	۰/۸	۰/٤٦	۲۳/۵ ± ٤/۲	۰/۹	۰/۰۵۸
	S	۲۵/۳ ± ۳/۱	۰/۷۲	>۰/۰۵	۲۱/۱ ± ۳/۲	۰/۷	۰/٤۹	۲۸/۵ ± ۳/٦	۰/۸	۰/٤٦	۲۵/۳ ± ۳/٤	۰/۷	۰/۰۵۸

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]



شکل شماره ۱–آنالیز کمی اثرات مراحل تکامل و تزریق تاموکسیفن روی تعداد سلولها.

تعداد سلولها در ارتباط با نواحی و سنین مختلف شمارش شده است:

A) تاموکسیفن تعداد سلولها را در ناحیه CA_1 تا هفته اول کاهش داده و هیچ اثری در هفته سوم نداشته است. Pvalue در P_1، E_{22} و P_7 کمتر از ۰/۰۵ بود.

B) تاموکسیفن تاثیری بر تعداد سلولها در ناحیه CA_3 نداشته است(Pvalue<۰/۰۵).

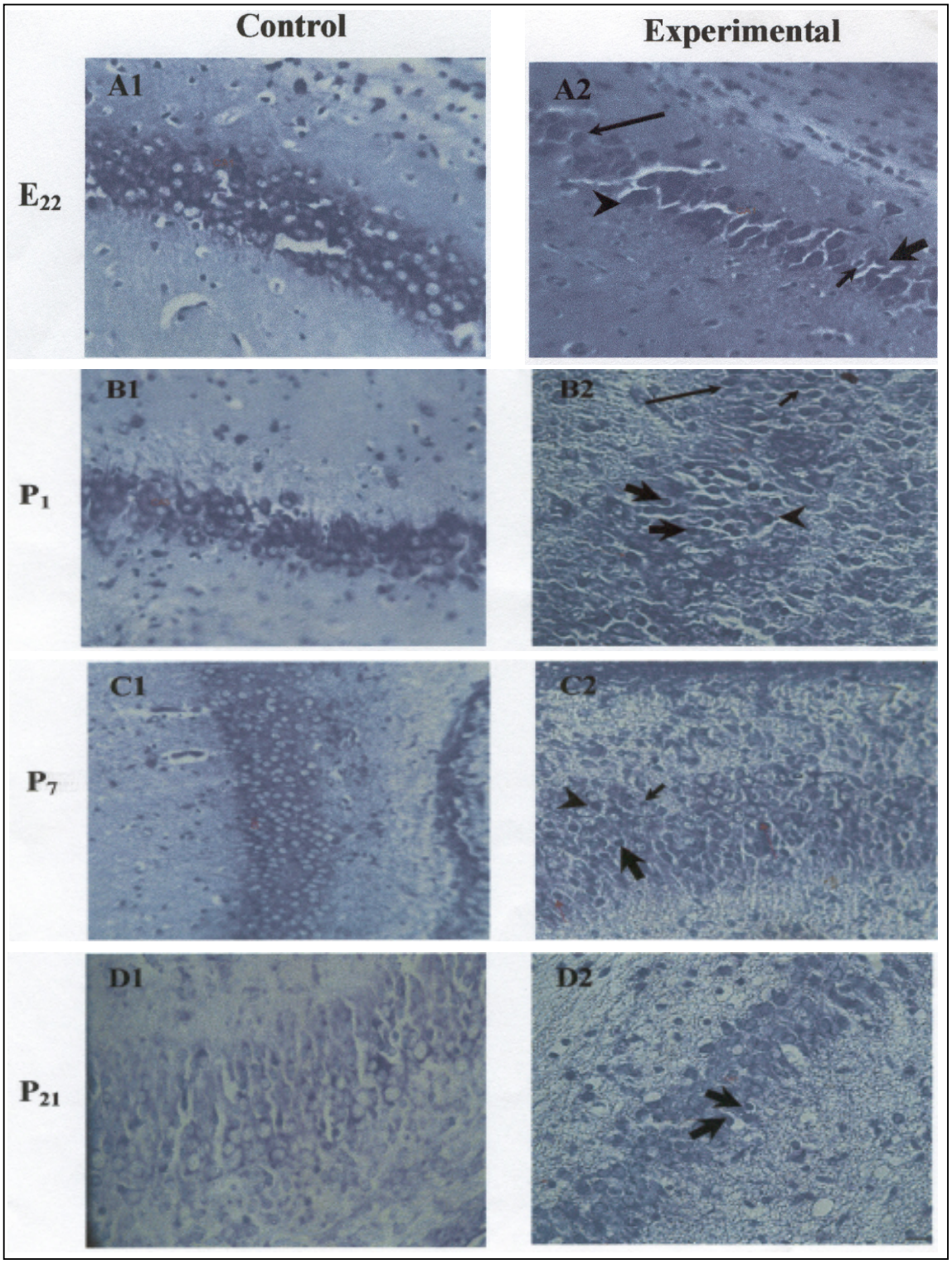
C) تاموکسیفن تاثیری بر تعداد سلولها در ناحیه D.G نداشته است(Pvalue<۰/۰۵).

D) تاموکسیفن تعداد سلولها را در ناحیه Subiculum تا هفته اول کاهش داده و هیچ اثری در هفته سوم نداشته است. Pvalue در P_1، E_{22} و P_7 کمتر از ۰/۰۵ بوده است.

همچنین بررسی‌های کیفی، بیانگر تغییراتی در هسته و میتوکندری گروه‌های تجربی P_7، P_1 و E_{22} بود، در حالی که تغییرات پاتولوژیکی در هفته سوم شاهده نگردید. همچنین تراکم نورونی در ناحیه سابیکولوم، کاهش کمی را نشان داد. میتوکندری و هسته سلولهای CA_1 در گروه کنترل و sham نرمال بودند(شکل شماره ۲و ۳).

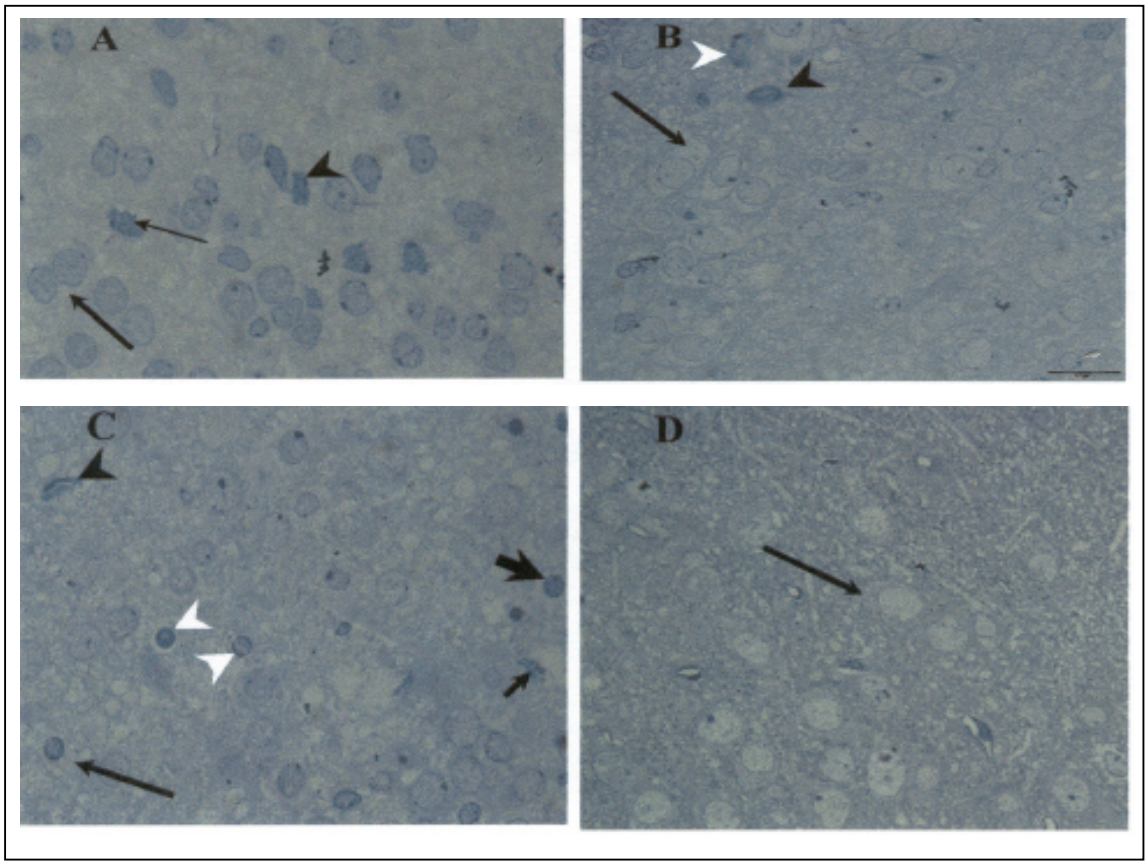
در رنگ‌آمیزی نیسل با رنگ‌پذیری هسته‌ها، ضخامت لایه‌ها از E_{22} به P_{21} افزایش می‌یابد که منتج از بلوغ نورون‌ها است. تغییرات پاتولوژیک حاصله در نمونه‌های تجربی، نورون‌های صدمه دیده‌ای هستند که هسته آنها چروکیده، متراکم و هتروکروماتین با پوشش هسته‌ای نامنظم است. قابل توجه است که این تغییرات در P_{21} کاهش می‌یابد.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]



شکل شماره ۲- فتوگراف نورون‌های نواحی CA_1 در $P_7(C_1, C_2)$، $P_1(B_1, B_2)$، $E_{22}(A_1, A_2)$ و $P_{21}(D_1, D_2)$ هیپوکامپ با رنگ‌آمیزی نیسل: ضخامت لایه‌ها در گروه‌های کنترل از E_{22} به سمت P_{21} افزایش می‌یابد و همزمان نورون‌ها بالغ می‌گردند، در گروه‌های تجربی، نورون‌های آسیب دیده(نوک پیکان تیره) شدیداً رنگ شده، هسته‌های متراکم(پیکان ضخیم) با غشاء نامنظم(پیکان نازک)، همراه فشرده شدن هسته(پیکان کوتاه)، توده‌ای شدن کروماتین(پیکان بلند) در E_{22}، P_7 و P_1 مشاهده می‌شود. در گروه P_{21} حداقل اثرات مشاهده می‌شود و اجسام نورونی فشرده و مثلثی شکل دیده می‌شوند که از لحاظ مورفولوژیکی بدون تغییر باقی مانده‌اند و از لحاظ شکل و رنگ پذیری، مشابه بافت کنترل هستند.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

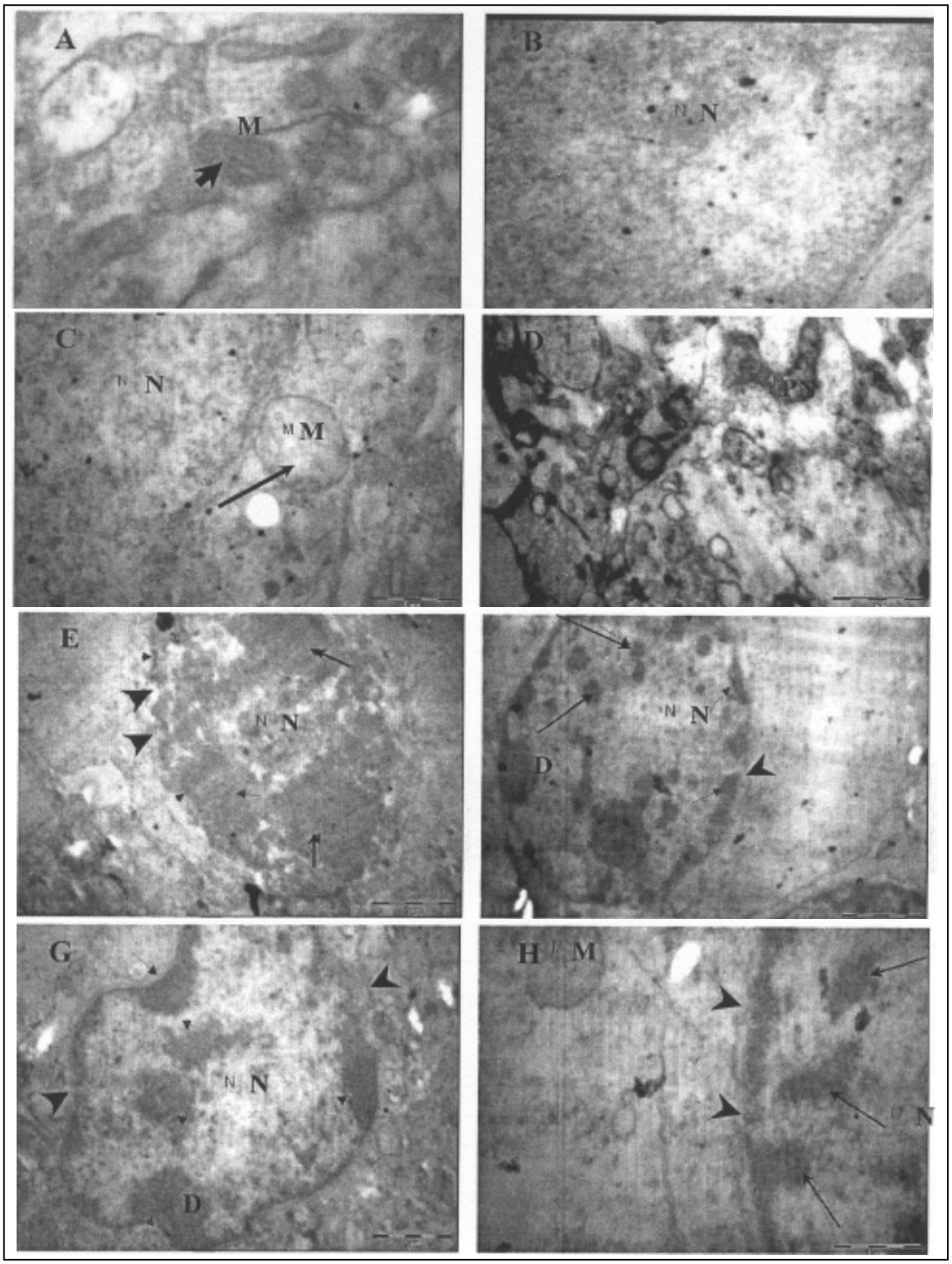


شکل شماره ۳- فتومیکروگراف از برشهای نیمه نازک رنگ‌آمیزی شده با تولوییدین بلو: این نمونه‌ها یعنی نورون‌های CA_1 در E_{22}(A)، P_1(B)، P_7(C) و P_{21}(D) فقط نمونه‌های تجربی می‌باشند که تغییرات در جنین فول ترم نسبت به روز اول و هفته اول بعد از تولد بیش‌تر بوده است. در بعضی نورون‌ها هسته‌های متراکم(پیکان ضخیم) و یا توده‌های هتروکروماتین(پیکان بلند) و غشاء نامنظم(پیکان نازک) مشاهده شد و سیتوپلاسم به صورت واکوئله(پیکان کوتاه) نمایان گردید که این تغییرات در P_{21} بسیار کم بود. این مشاهدات یافته‌های حاصل از رنگ‌آمیزی نیسل را تأیید می‌کنند و چون اساس تهیه نمونه‌های اولتراستراکچر می‌باشد، نیازی به کنترل ندارد.

با استفاده از بلوکهای رزینی، برشهای نیمه ضخیم با رنگ‌آمیزی تولوییدین بلو، تغییرات بیش‌تری تا هفته اول نشان می‌دهند، که این تغییرات در هفته سوم به حداقل می‌رسد. این تغییرات شامل هتروکروماتین شدن هسته، نامنظم شدن پوشش هسته‌ای، توده‌ای شدن کروماتین و واکوئله شدن سیتوپلاسم است که یافته‌های رنگ‌آمیزی نیسل را تأیید می‌نماید.

الکترومیکروگراف‌های ناحیه CA_1 در هیپوکامپ در روزهای P_1، P_7، P_{21} و E_{22} بررسی گردیده است. در گروه کنترل، هیچ نشانه‌ای از تخریب نورونی مشاهده نشد، در اکثر سلولهای نورون، میتوکندری به صورت اجسام متراکم حاوی کریستاها بود و ساختار سیتوپلاسم و هسته به صورت نرمال مشاهده شد. بعد از تجویز تاموکسیفن، تغییرات واضح دژنراتیو در ناحیه CA_1، طی روزهای P_{21}، P_1، P_7 و E_{22} مشاهده گردید. تغییرات مورفولوژیکی در ساختمان هسته و میتوکندری عمدتاً حاصل شده است که به صورت پیکنوزه شدن هسته، فشردگی هسته، توده‌ای شدن کروماتین‌های هسته و تخریب غشاء هسته مشخص می‌شود و افزایش اندازه میتوکندری و متورم شدن آن، نمای کروی به میتوکندری داده است و باعث شده است تا میتوکندری شکل میله‌ای و یا بیضوی خود را از دست بدهد(شکل شماره ٤) و نمای متسع کریستاها آرایش نرمال میتوکندری را مختل کرده است. این تغییرات عمدتاً تا هفته اول مشاهده شد و در هفته سوم، این تغییرات بسیار نامشخص بوده است.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]



شکل شماره ۴- الکترومیکروگراف‌های ناحیه CA_1 هیپوکامپ در روزهای P_{21}، P_7، P_1 و E_{22}: در نمونه‌های کنترل(A)، نورون‌های CA_1 دارای میتوکندری بیضی شکل(M) و با کریستاهای منظم(پیکان ضخیم) و هسته(N) با تراکم نسبی کروماتین(پیکان نازک) می‌باشند، اما بعد از استفاده از تاموکسیفن، اتساع میتوکندری(C) همراه با کاهش کریستاها(پیکان بلند)، توده‌ای شدن کروماتین(D)، حاشیه‌ای شدن کروماتین و در نهایت پارگی غشاء هسته مشاهده گردید. در این الکترومیکروگراف‌ها، فراگمانتاسیون هسته(E)، نامنظم بودن و پارگی غشای هسته(F)، توده‌ای شدن کروماتین هسته(H) و فشردگی هسته(G) در روزهای P_1، P_7 و E_{22} مشاهده شده است.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

بحث

نتایج نشان داد که استفاده از تاموکسیفن در موش صحرایی باردار باعث تغییراتی در شکل هیپوکامپ جنین‌ها و نوزادان می‌شود. سه یافته مهم در این مطالعه وجود دارد:

۱- تاموکسیفن باعث تغییرات نورودژنراتیو می‌گردد.

۲- تعداد نورون‌ها در نواحی مختلف هیپوکامپ شامل CA_1، CA_3، D.G و Subiculum در سنین مختلف، متفاوت می‌باشد.

۳- تغییرات مورفولوژیکی به دنبال تزریق تاموکسیفن احتمالاً ماهیت نکروتیک دارند.

توضیحی که می‌توان برای آسیب سلولی به دنبال تزریق تاموکسیفن داشت، این است که تاموکسیفن باعث حذف استرون به عنوان فاکتور تکاملی می‌شود. این نتایج با یافته‌های محققان دیگر که روی هیپوکامپ کار کرده بودند، سازگار است.[۱۳-۱۱]

در ناحیه CA_1، تغییرات داخل سلولی در سلولهای تخریب شده با میکروسکوپ نوری و الکترونی مشاهده شد. در میتوکندری و هسته تغییرات واضحی دیده شد. هسته‌ها در بعضی از نورون‌ها بشدت فشرده شده و یا تیره شده بودند و گاهی کلامپ شدن و به حاشیه رانده شدن کروماتین هم مشاهده شد. در ناحیه CA_1 تغییرات آپوپتوز دیده شد و وجود تغییرات تخریبی، ٦ ساعت بعد از آخرین تزریق تاموکسیفن در این مطالعه مشاهده شد. فرآیند تخریبی در طی یک دوره کوتاه است و تا هفته اول بعد از تولد ادامه دارد. بعضی نورون‌ها تحت تاثیر انواع مختلف مرگ سلولی قرار می‌گیرند و مراحل مختلف مرگ سلولی هم در این تحقیق دیده شد که در سایر مطالعات هم دیده شده است.[۱٦-۱٤]

یافته‌های این مطالعه در مورد اثر استروژن بر تشکیل نواحی مختلف هیپوکامپ، موافق با سایر تحقیقات است.[۱۷] در این تحقیق با مهار اثرات استروژن، تعداد سلولها چندین ساعت بعد از تزریق کاهش یافته، این کاهش در تعداد سلولها وابسته به رسپتور استروژن است. شباهت قابل ملاحظه‌ای در بین نتایج تحقیقات قبلی که مشابه مطالعه حاضر بودند، دیده می‌شود. همچنین تغییراتی در نواحی مختلف هیپوکامپ با تزریق پروژستین و استرادیول در رت‌ها گزارش شده است.[۱۸و ۱۹] تعداد نورون‌ها در ناحیه CA_1 و سابیکولوم به صورت قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت، استفاده از استروژن از این تغییرات جلوگیری می‌کند.[۲۰و ۲۱] نتایج بعضی مطالعات نشان دادند که تعداد نورون‌ها در نواحی مختلف هیپوکامپ در بین سنین مختلف، متفاوت است.[۲۲] برای مثال، چندین مطالعه در این زمینه نشان داده است که محدودیت‌های سنی در نورون‌های تمام نواحی هیپوکامپ وجود دارد.[۲۳و ۲٤] در حالی که سایر تحقیقات، تعداد نورون‌های ثابتی را در کل دوره زندگی[۲۵] در ناحیه CA_3 گزارش کرده‌اند.[۲٦]

در این مطالعه مشخص شد که تاموکسیفن در in vivo باعث پاتولوژی هسته و میتوکندری سلولهای هیپوکامپ می‌شود. تاموکسیفن به تنهایی این تغییرات پاتولوژیک را در هیپوکامپ باعث می‌شود؛ به عبارت دیگر تاموکسیفن به تنهایی کافی است که تا باعث ناهنجاری‌های هسته و میتوکندری شود. تغییرات میتوکندری که در این تحقیق دیده شد، نشان دهنده آسیب میتوکندری است. این تغییرات در میتوکندری، مشابه ناهنجاری‌هایی است که توسط Song(۲۰۰٤)[۱۹، ۲۵، ۲۷و ۲۸] گزارش شده است: میتوکندری سلولهای CA_1 هیپوکامپ متورم شده بودند و کریستای خود را از دست داده بودند و غشاء خارجی میتوکندری همچنان که در مطالعات دیگر دیده شد، تخریب شده بود.[۲۹و ۳۰]

بررسی روی مدلهای حیوانی و تزریق تاموکسیفن، متورم شدن میتوکندری همراه با تخریب کریستای میتوکندری را نشان داده است و این یافته‌ها دقیقاً با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد و با مطالعه روی نواحی مختلف هیپوکامپ مشخص شد که تغییرات میتوکندری در گروه P_{21}، متفاوت از گروه‌های دیگر است و اغلب یافته‌های این مطالعه شامل متراکم شدن هسته، فشرده شدن، توده‌ای شدن و به حاشیه

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

رانده شدن کروماتین، تخریب غشاء و متورم شدن میتوکندری همراه با از دست رفتن کریستا بود، که نشان دهنده مرگ سلولی است.[۲۷و ۳۱]

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر مشخص شد که تاموکسیفن، بیش‌ترین اثر را بر روی سلولهای ناحیه CA_1 دارد و دامنه این تغییرات در ناحیه CA_1 در جنین ۲۲ روزه و نوزاد یک روزه، بیش‌تر است و با تکامل هیپوکامپ، این تغییرات به حداقل می‌رسد. با توجه به مکانیسم عمل تاموکسیفن، این ماده به صورت رقابتی به رسپتور استروژن اتصال می‌یابد و کمپلکس: [تاموکسیفن ـ رسپتور استروژن ـ عنصر پاسخ به استروژن (Estrogen Receptor Element=ERE)] به استروژن می‌چسبد. غیرفعال شدن پروتئین فعال کننده نسخه‌برداری AF2، باعث کاهش نسخه‌برداری ژنهای حساس به استروژن و محل اتصال coactivator می‌شود. بنابراین تاموکسیفن، فاز G1 سیکل سلولی را بلوک می‌کند و باعث کاهش تکثیر می‌شود.

فهرست منابع

1- McEwen BS. Genome and hormones: Gender differences in physiology invited review: Estrogen effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. J Appl Physiol 2001; 91(6): 2785-801.

2- Clemons M, Denson S, Howell A. Tamoxifen (NOLVEDEX): A review. Cancer treat Rev 2002; 28(4): 165-80.

3- Weiland NG, Orchinik M. Specific subunit mRNA of the GABA receptor are regulated by progesterone in subfields of the hippocampus. Mol Brain Res 1995; 32: 271-8.

4- Poe HB, Linville C, Riddle DR, Sonntag WE, Brunso-Bechtold JK. Effects of age and insulin-like growth factor-1 on neuron and synapse number in area CA3 of hippocampus. Neuroscience 2001; 107: 231-8.

5- Wise PM, Dubal DB, Wilson ME, Rau SW, Bottner M. Mini review: neuroprotection effects of estrogen-new insights into mechanisms of actions. Neuroendocrinology 2001; 142: 969-73.

6- Meaney MJ, Aitken DH, Bahatnagar S, Sapolsky RM. Postnatal handling attenuates certain neuroendocrine, anatomical, and cognitive dysfunctions associated with aging in female rats. Neurobiol Aging 1991; 12: 31-8.

7- Sapolsky RM, Kery LC, McEwen BS. Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: implication for aging. J Neurosci 1985; 5: 1222-7.

8- Devaney KO, Johnson HA. Changes in cell density within the human hippocampal formation as a function of age. Gerontology 1984; 30: 100-8.

9- Kadar T, Silbermann M, Brandeis R, Levy A. Age-related structural changes in the rat hippocampus: correlation with working memory deficiency. Brain Res 1990; 512: 113-20.

10- Luine VN, McEwen BS. Effects of stradiol on turnover of type-A monoamine-oxidase in brain. J Neurochem 1977; 28: 1221-7.

11- Silva I, Mello EAM, Freymuller E, Haidar MA, Baracat EC. Estrogen, progestron and tamoxifen increase synaptic density of the hippocampus of ovaractomized rats. Neuroscience letters 2000; 291: 183-6.

12- Weiland NG. Glutamic acid decarboxylase messenger ribonucleic acid is regulated by estradiol and progesterone in the hippocampus. Endocrinology 1992; 131: 2697-702.

13- Peters A, Rosene DL, Moss MB, Kemper TL, Abraham CR, Tigges J, et al. Neurobiological bases of age-related cognitive decline in the rhesus monkey. J Neuropathol Exp Neurol 1996; 55: 861-74.

14- Shughrue PJ, Merchenthaler I. Estrogen prevents the loss of CA1 hippocampal neurons in gerbils after ischemic injury. Neuroscience 2003; 116: 851-61.

15- Curcio CA, Hinds JW. Stability of synaptic density and spine volume in dentate gyrus of aged rats. Neurobiol Aging 1983; 4: 77-87.

16- Landfield PW, Braun LD, Pitler TA, Lindsey JD, Lynch G. Hippocampal aging in rats: a morphometric study of multiple variables in semithin sections. Neurobiol Aging 1981; 2: 265-75.

17- Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I. The comparative distribution of estrogen receptor-α and mRNA in the rat central nervous system. J Comp Neurol 1997; 388(4): 507-25.

18- Weiland NG, Orikasa C, Hayashi S, McEwen BS. Distribution and hormone regulation of estrogen receptor immunoreactive cells in the hippocampus of male and female rats. J Comp Neurol 1997; 388(4): 603-12.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

19- Song DD, Shults CW, Sisk SA, Rockenstein E, Masliah E. Enhanced substantia nigra mitochondrial pathology in human α-synuclein transgenic mice after treatment with MPTP. Exp Neurol 2004; 186: 158-72.

20- Shughrue PJ, Merchenthaler I. Evidence for novel estrogen binding sites in the rat hippocampus. Neuroscience 2000; 99: 605-12.

21- Anglade P, Vyas S, Jovoy-Agid F, Herrero MT, Michel PP, Marques J, et al. Appoptosis and autophagy in nigra neurons of patients with Parkinson's disease. J Histochem Cytochem 1997; 12: 25-31.

22- Shughrue PJ, Merchenthaler I. The distribution of estrogen receptor β immunoreactivity in the rat central nervous system. J Comp Neurol 2001; 436: 64-81.

23- Weiner CP, Lizasonia I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthase by sex hormones. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 5212-6.

24- Clarke PGH. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. Anat Embryol 1990; 181: 195-213.

25- MacGregor JI, Jordan VC. Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. Pharmacol Rev 1998; 50: 151-96.

26- Islam A, Westman J, Bogdanovic N, Suliman I, Lindell I, Winblad B, et al. Ultrastructural analysis of the hippocampus of adult rats after long-term adrenalectomy. Brain Res 1999; 849: 226-30.

27- Wilcox BJ, Applegate MD, Portera-Caillau C, Koliatsos VE. Nerve growth factor prevents apoptotic cell death in injured central cholinergic neurons. J Comp Neurol 1995; 395: 573-85.

28- Pliss L, Balcar VJ, Bubenikova V, Pokorny J, Fitzgibbon T, Stastny F. Morphology and ultrastructure of rat hippocampal formation after I.C.V. administration of n-Acetyl-L-Aspartyl-L-Glutamate. Neuroscience 2003; 122: 93-101.

29- Geinisman Y, Detoledo-Morrell L, Morrell F, Heller RE. Hippocampal markers of age-related memory dysfunction; behavioral electrophysiological and morphological perspectives. Prog Neurobiol 1995; 45: 223-52.

30- Wood GE, Young LT, Reagan LP, Chen B, McEwen BS. Stress-induced structural remodeling in hippocampus: Prevention by lithium treatment. Neuroscience 2004; 101: 3973-8.

31- Galceran J, Miyashita-Lin EM, Devaney E, Rubenstein JLR, Grosschedi R. Hippocampus development and generation of dentate gyrus granule cells is regulated by LEF1. Development 2000; 127: 469-82.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]

The Effects of Tamoxifen on Ultrastructure and the Number of Hippocampal Cells in Rat's Fetus and Neonate

N. Najafzadeh, MS [I] ***M. Nobakht, PhD** [II] **S.B. Jameii, PhD** [III]
P. Tabatabaii, BS [IV] **T. Rastgar, MS** [V] **F. Mohammadzadeh, MS** [V]

Abstract

Background & Aim: Maternal steroids modulate various functions in the brain. However, tamoxifen(TAM) treatment, as an estrogen antagonist, induces cell death in the hippocampus formation of a prenatal and postnatal rat. Estrogen influences cognitive functions, learning process, aging, vasodilation, angiogenesis, neurogenesis and neuroprotection. The present study deals with the effects of tamoxifen on ultrastructure and morphology of developing hippocampus in rats.

Material & Method: In this experimental study, we examined twelve bands of rats in three groups of control, experimental and sham. In each group, there were four age ranges: full-term embryo(E22), one-day newborn(P1), seven-day newborn (P7), and three-week newborn(P21). Full-term animals received four doses of tamoxifen in propylene glycol and their brains were removed 6 hours after the last injection. We studied hippocampal regions such as CA1, CA3, D.G. and subiculum through light and electron microscopy. Statistical significance of the differences was assessed by ANOVA and t-test using SPSS program. A value of $P<0.05$ was considered significant.

Results: The obtained findings reveal a decrease in the density of cells in various regions such as CA1 and subiculum. Electron microscopy showed pyknosis, increased nucleus density, chromatin clumping, mitochondrial inflammation and changes in mitochondria crista, mostly in CA1 and subiculum.

Conclusion: Maximum changes have been seen in E22 and P1 groups. Considering the effect of estrogen on neurogenesis, tamoxifen injection can bring about changes in hippocampal pyramidal cells. The novel finding of this study is the difference in the density of cells at various stages of development. Also, the results show that tamoxifen effects on full-term embryos and one-day newborns are significantly great.

Key Words: 1) Hippocampus 2) Tamoxifen 3) Development 4) Estrogen 5) Rat

***I*)** *PhD Student of Anatomy. Faculty of Medicine. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.*
***II*)** *Associate Professor of Histology. Faculty of Medicine. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.(*Corresponding Author)*
***III*)** *Assistant Professor of Anatomy. Cellular and Molecular Research Center. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.*
***IV*)** *BS in Biology. Cellular and Molecular Research Center. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.*
***V*)** *MS in Anatomy. Faculty of Medicine. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.*

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-03-29]