بررسی اثر تاموکسیفن بر روی فعالیت آنزیم نیتریک اکسید سینتاز(NOS) در تکامل هیپوکامپ موش صحرایی

*دکتر ملیحه نوبخت I
دکتر معصومه شفیعی II
پروانه طباطبایی III
طیبه رستگار IV

چکیده

زمینه و هدف: استروئیدهای مادری اثرات گوناگونی بر روی تکامل مغز دارند. تاموکسیفن، بعنوان آنتاگونیست استروژن در مغز، باعث مرگ سلولی در سلولهای هیپوکامپ در حال تکامل موش صحرائی می‌گردد. استروژن تاثیر مهمی بر روند اعمال شناختی، یادگیری، پیری، آنژیوژنزیس، نوروژنزیس و حفاظت نورون‌ها دارد. هدف از این مطالعه بررسی اثر تاموکسیفن به عنوان آنتاگونیست استروژن بر فعالیت آنزیم نیتریک اکسید سینتاز(Nitric oxide synthase=NOS) موجود در نورون‌های پیرامیدال هیپوکامپ در حال تکامل موش صحرائی بود.

روش بررسی: در این مطالعه که از نوع تجربی(experimental) بوده است، ۱۲ دسته موش صحرائی در ۳ گروه کنترل، تجربی و Sham بررسی شدند که در هر گروه ۴ رده سنی جنین فول‌ترم(E_{22})، نوزاد یک روزه(P_1)، یک هفته(P_7) و سه هفته(P_{21}) مورد آزمایش قرار گرفت. تزریق تاموکسیفن به میزان ۳۵۰ میکروگرم در حلال پروپیلن گلیکول، ۲ روز قبل از زایمان، بصورت داخل صفاقی، روزی ۲ بار انجام گرفت. پس از تهیه نمونه و برش انجمادی، واکنش هیستوشیمی بر روی ناحیه CA1 هیپوکامپ انجام گردید و میزان واکنش NADPH-diaphorase(Reduced form of Nicotinamide adenine-dinucleotide phosphate) بوسیله میکروسکوپ نوری مطالعه گردید. آنالیز نهایی توسط برنامه آماری (SPSS version 11.0) و Independent-Samples T Test در تمام گروه‌ها انجام گردید.

یافته‌ها: نتایج مشخص می‌سازد که در مراحل اولیه تکامل، تراکم سلولی کم بوده و بتدریج ضخامت لایه سلولی افزایش می‌یابد، بطوری که در هفته سوم بعد از تولد بیش‌ترین ضخامت مشاهده می‌شود. با توجه به نیمه عمر کوتاه تاموکسیفن، دیده شد که این ماده قادر است بیش‌ترین اثر را بر گروه E22 و P1 و همچنین P7 بگذارد و رسپتور استروژن را بلوک کند. در این مطالعه در نمونه‌هایی که تاموکسیفن دریافت نکردند، به دلیل وجود استروژن، میزان واکنش NADPH-diaphorase که بیانگر میزان فعالیت NOS می‌باشد، بیش‌تر بود و در نمونه‌هایی که تاموکسیفن دریافت نمودند، در مراحل اولیه دریافت، یعنی قبل از تولد و ۱۶ ساعت بعد از تولد به دلیل بلوکه شدن رسپتور استروژن، میزان واکنش NADPH-diaphorase کاهش یافت و با گذشت زمان، این پاسخ رو به زوال گذاشت. از طرفی تعداد سلولهای عصبی در ناحیه CA1 هیپوکامپ متناسب با کاهش فعالیت NOS در این ناحیه، کاهش نشان داد. کاهش فعالیت NOS و نیز کاهش سلولهای هیپوکامپ در گروه‌های جنین ۲۲ روزه(فول ترم) و نوزاد یک روزه و یک هفته‌ای مشاهده شد که به نظر می‌رسد که به علت کوتاه بودن عمر تاموکسیفن باشد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از مطالعه حاضر، نشان می‌دهد که هورمون استروژن بر رشد و تکامل سلولهای پیرامیدال هیپوکامپ که با واسطه نیتریک اکسید صورت می‌گیرد، موثر می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: ۱ – تاموکسیفن ۲ – نیتریک اکسید ۳ – ان آ دی پی اچ ـ دی ۴ – هیپوکامپ

مقدمه

با پیشرفت زمان بارداری، میزان استروژن افزایش می‌یابد و افزایش استروژن، موجب فعالیت بیش‌تر نیتریک اکسید سینتاز(Nitric oxide synthase=NOS) می‌گردد.[۱و۲] از طرفی آنزیم NOS در شکل‌گیری و تکامل ارگان‌های مختلف

I) دانشیار و PhD بافت شناسی در جنین شناسی، دانشکده پزشکی، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران، تهران، ایران(*مؤلف مسؤول).
II) دانشیار و PhD فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران،دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران، تهران، ایران.
III) کارشناس بیولوژی، دانشکده پزشکی، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران، تهران، ایران.
IV) کارشناس ارشدآناتومی، دانشکده پزشکی، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران، تهران، ایران.

بدن در دوران جنینی، بعد از تولد و قبل از بلوغ، اهمیت ویژه‌ای دارد و روند افزایش NOS در دوران جنینی برای تکامل ارگان‌ها ملاحظه می‌گردد[۳]؛ لذا در مطالعه حاضر با استفاده از یک آنتاگونیست گیرنده استروژن مانند تاموکسیفن(Tamoxifen) اثر مسدود شدن گیرنده‌های استروژن را بر روی فعالیت NOS و در نتیجه نقش استروژن در ارتباط با NOS در روند تکامل بررسی شد. این بررسی بر روی هیپوکامپ موش صحرائی انجام گردید.

تاکید بر ناحیه هیپوکامپ در این مطالعه به لحاظ اهمیت این ارگان در نشان دادن پاسخ‌های مناسب متابولیکی و نیز نقش مؤثر آن در حافظه می‌باشد. به علت رشد و تکامل سلولهای پیرامیدال هیپوکامپ موش صحرایی در روزهای آخر جنینی، تزریق در روزهای ۲۱ و ۲۲ موش باردار فول ترم انجام شده است. ساختمان هیپوکامپ از دو ناحیه پریموردیا(primordial) در تلانسفال بوجود می‌آید و در E_{18} قابل تشخیص است؛ اولین پریموردیا، شاخ آمون، .D.G و بخشی از سابیکولوم (subiculum) را می‌سازد و دومین پریموردیا، کورتکس انتورینال(anthorinal cortex) و بخشی از پارا سابیکولوم (parasubiculum) و پره سابیکولوم (presubiculum) را می‌سازد.[۴] ناحیه انتورینال اولیه در روز E_{17} و لایه لایه شدن آن در E_{22} شکل می‌گیرد.[۵]

هیپوکامپ حقیقی یا شاخ آمون، از یک لایه سلولی پیرامیدال تشکیل شده که لایه‌های مجاور آن به صورت شبکه‌ای می‌باشند.[۶]

شاخ آمون به سه ناحیه CA1، CA2 و CA تقسیم می‌شود که CA1، مجاور سابیکولوم و CA3، مجاور .D.G و CA2، متراکم‌ترین لایه شاخ آمون است. CA1، بخش پیچیده‌ای است که از ۳۰-۱۰ لایه سلولی تشکیل شده است و ۱۰٪ سلولهای آن از اینترنورون‌ها تشکیل شده است. انتخاب ناحیه CA1 به دلیل حساسیت آن به تغییرات حاصله بوده است که نورون‌های پیرامیدال حاوی NO از ناحیه سابیکولوم به CA1 ختم می‌شوند.[۷] با توجه به ناپدید شدن نوروآپیتلیوم در روز E18، لایه سلولی پیرامیدال در بین روزهای E21 و P1 رشد محسوسی دارد.[۸] اکسید نیتریک(NO) به عنوان یک گاز قابل انتشار با خواص رادیکال توسط نیترک اکسید سنتاز(NOS) از L- آرژینین تولید می‌شود. NO، مهم‌ترین نقش را در تکامل نورون‌ها و مدلهای ارتباطی آنها دارد.[۹] مطالعات نشان می‌دهد که NO در دوران جنینی، در ارتباط با فرایند بلوغ، نحوه شکل‌گیری و تکامل مغز مانند سازماندهی لایه‌های(lamination) مغزی و مهاجرت و رشد رشته‌ها[۱، ۲و ۱۰]، جریان خون مغزی[۱۴-۱۱]، شکل‌پذیری سیناپسی(Synaptic plasticity) و حافظه[۱۵و ۱۶]، بلوغ زودرس مغز[۱۷]، تنظیم مغزی[۳]، تنظیم جوانه‌های عروق و سازماندهی مویرگ[۱۹]، رگ‌زایی جنینی(vasculargenesis) در تومور مغزی[۲۰]، نوسازی رگ‌های(neovascularization) مغزی[۲۱و ۲۲] و رگ‌زایی(angiogenesis) اهمیت دارد.[۲۳]

در دوران جنینی، همزمان با پیشرفت زمان بارداری، افزایش ترشح استروژن باعث تغییراتی در روند فعالیت NOS[۲۴] می‌گردد. به عبارت دیگر، تنظیم NOS بویژه در بافت مغز توسط استروژن صورت می‌گیرد.[۲۵-۲۷] با توجه به نقش استروژن در دوران بارداری و اهمیت میزان NOS در روند تکامل، استفاده از یک آنتاگونیست استروژن در بافت مغز، موضوع مورد مطالعه حاضر می‌باشد.

تاموکسیفن به عنوان یک ترکیب سنتتیک آنتی استروژن غیراستروئیدی، مهم‌ترین دارو جهت درمان سرطان پستان محسوب می‌گردد. این دارو از سال ۱۹۷۷ در امریکا جهت بکارگیری در سرطان‌های پیشرفته پستان در زنان بعد از یائسگی (Postmenpausal) مورد استفاده قرار گرفت.[۲۸و ۲۹] هم‌اکنون این دارو در درمان سیستمیک برای سرطان اولیه پستان در قبل از یائسگی و بعد از یائسگی کاربرد دارد. تجویز این دارو برای پیشگیری از سرطان پستان، در زنان دارای خطر بالا، نیز مورد تأیید قرار گرفته است.[۳۰]

مکانیسم عمل تاموکسیفن، به عنوان آنتاگونیست استروژن مورد مطالعه قرار گرفته است.[۳۱] با توجه به مکانیسم عمل تاموکسیفن در طی بارداری و ارتباط آن با ویژگی‌های جنسیتی، این دارو از نظر فیزیولوژیکی و پاتوفیزیولوژیک، از اهمیت بسزائی برخوردار است.[۲۴و ۳۲]

در این مطالعه، نقش NOS در شکل‌گیری ساختمان هیپوکامپ در گروه‌های مختلف موش صحرائی در دوران جنینی(فول ترم) و نوزاد تازه متولد شده و قبل از بلوغ، بررسی شد که با توجه به وجود استروژن بطور نرمال در دوران بارداری و نقش تنظیم‌کنندگی آن در فعالیت NOS، با استفاده از تاموکسیفن به عنوان یک آنتاگونیست استروژن، اهمیت مطلب مشخص شد. در مطالعه حاضر، با بکارگیری

روش رنگ‌آمیزی NADPH-diaphorase که می‌تواند شاخصی برای ارزیابی فعالیت NOS در سیستم عصبی باشد، میزان فعالیت این آنزیم در مراحل تکاملی هیپوکامپ در شرایط طبیعی و هنگام تجویز تاموکسیفن بررسی شده است. لازم به ذکر است در این مطالعه صرفاً به میزان فعالیت NOS در مراحل تکاملی هیپوکامپ توجه شده و ساختار سلولی در این مراحل ملاک نبوده است.

روش بررسی

این مطالعه از نوع تجربی(Experimental) بود. جامعه مورد مطالعه شامل نوزادان موش صحرایی بود و نمونه مورد مطالعه را سلولهای ناحیه CA1 هیپوکامپ تشکیل می‌دادند. تعداد ۲۰ موش باردار انتخاب شد. همه موشها ۲ روز قبل از زایمان، تاموکسیفن به میزان ۳۵۰ میکروگرم در حلال پروپیلن گلیکول(روز قبل از زایمان، ۲ بار و روز زایمان هم ۲ بار)، به صورت داخل صفاقی، دریافت نمودند و نمونه‌ها به شرح زیر تهیه گردید:

الف) تعداد ۲۵ جنین، ۶ ساعت بعد از آخرین تزریق برداشته شد.

ب) تعداد ۲۰ نوزاد تازه متولد شده ۱۶ ساعته، تهیه شد.

ج) تعداد ۲۰ نوزاد یک هفته‌ای، تهیه شد.

د) تعداد ۲۰ نوزاد سه هفته‌ای، تهیه شد.

در این مطالعه ۱۲ گروه حیوان مورد بررسی قرار گرفتند که نمونه‌ها از Rat نژاد Wistar بودند و طبق روش زیر دسته‌بندی شدند:

الف: به طور کلی این ۱۲ گروه به سه دسته تقسیم گردیدند:

ـ دسته اول: موشهای بارداری که قبل از زایمان، ۴ دوز TAM(۲ روز قبل از زایمان به میزان ۳۵۰ میکروگرم داخل صفاقی و ۲ بار در روز) دریافت نمودند.

ـ دسته دوم: موشهای بارداری که قبل از زایمان هیچ ماده‌ای دریافت ننمودند و به عنوان گروه کنترل محسوب شدند.

ـ دسته سوم: مادران بارداری که قبل از زایمان پروپیلن گلیکول دریافت نمودند و به عنوان گروه sham محسوب شدند.

ب: در هر دسته، چهار گروه سنی به شرح زیر مورد استفاده قرار می‌گرفتند:

* ۶ ساعت بعد از آخرین تزریق
* ۱۶ ساعت بعد از تولد
* یک هفته بعد از تولد
* سه هفته بعد از تولد

حیوانات بوسیله سدیم پنتوباربیتال با دوز داخل صفاقی ۱۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن برای موشهای باردار و ۳۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن برای نوزادان، بیهوش می‌گردیدند.

حیوانات بعد از بیهوشی توسط محلول ۲۰/۲۰۰ میلی‌لیتر محلول سالین ۰/۹٪ و بدنبال آن با محلول ۴۰/۸۰۰ میلی‌لیتر فیکساتیوهای پارافرمالدئید ۴٪ و گلوتارالدئید ۰/۱٪ در فسفات بافر ۰/۱ مولار با pH=۷/۴، مورد پرفیوژن قرار گرفتند. بعد از پرفیوژن، مغزها خارج شده و در همان فیکساتیو به مدت یک شب نگهداری شدند. نمونه‌ها به مدت ۳ روز در محلول حاوی سوکروز ۲۰٪ نگهداری شده و سپس برشهای انجمادی به ضخامت ۴۰ میکرون تهیه گردید.

جهت بررسی واکنش‌های NADPH-diaphorase و بدنبال آن بررسی NOS، آزمایش‌های هیستوشیمیایی به شرح زیر انجام شدند:

نمونه‌ها در فسفات بافر ذخیره شده و در محلول تازه تهیه شده حاوی ۲ میلی‌مولار βNADP و ۰/۳ میلی‌مولار NBT (Nitro blue tetrazolium) در بافر Tris ۱۰۰ میلی‌مولار با pH=۸ و تریتون X–۱۰۰ ۰/۲٪ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. بعد از مانت شدن، نمونه‌ها بر روی اسلایدهای با پوشش الوم کروم به مدت یک شب نگهداری شدند. نمونه‌ها با رنگ افتراقی Cresyl Violet، دهیدراته و مانت گردیدند.

میزان واکنش NOS در معیار مقایسه‌ای فعالیت شدید، متوسط، ضعیف و بسیار ضعیف آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. میانگین همراه با خطای استاندارد به تفکیک محاسبه گردید و میزان معنی‌دار بودن آماری و آنالیز نهایی توسط برنامه آماری SPSS(version 11.0) و Independent-Samples T Test در تمام گروه‌ها انجام گردید.

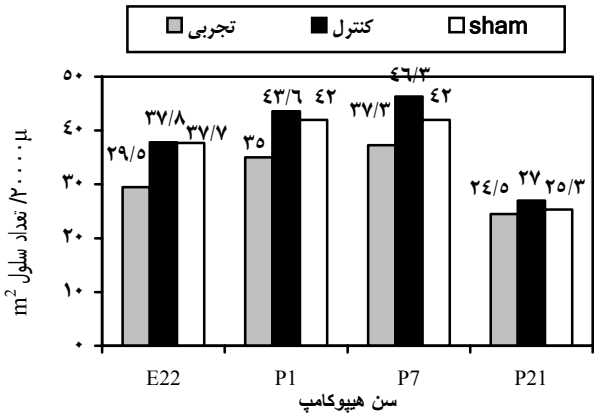
یافته‌ها

در این مطالعه، به منظور بررسی روند تکامل هیپوکامپ، ۶۰ نمونه(۵ نمونه در هر ۴ رده سنی و ۳ مرحله کنترل،

تجربی و نرمال) در روزهای قبل از تولد تا هفته سوم رشد و تکامل مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصله نشان می‌دهد که ضخامت و تعداد سلولها قبل از تولد، کم بوده و بتدریج بیش‌تر شده، بطوری که در هفته سوم، ضخامت قابل توجهی یافته است(جدول شماره ۱ و نمودار شماره ۱).

جدول شماره ۱- میانگین ± انحراف معیار تراکم سلولها(±SD) در ناحیه CA1 هیپوکامپ در سنین مختلف تکامل. C: گروه کنترل، E: گروه تجربی، S: گروه Sham

		CA1		
		Mean±SD	SE	P value
E22	C	۳۷/۸±۵/۵	۱/۲	۰/۰۰۰
	E	۲۹/۵±۴/۰	۰/۹	۰/۰۰۰
	S	۳۷/۷±۵/۲	۱/۲	۰/۰۰۰
P1	C	۴۳/۶±۳/۶	۰/۸	۰/۰۰۰
	E	۳۵/۰±۵/۵	۱/۲۷	۰/۰۰۰
	S	۴۲/۰±۶/۷	۱/۰	۰/۰۰۰
P7	C	۴۶/۳±۶/۷	۱/۵	۰/۰۰۰
	E	۳۷/۳±۶/۳	۱/۴	۰/۰۰۰
	S	۴۲/۰±۴/۹	۱/۱	۰/۰۰۰
P21	C	۲۷/۰±۴/۲	۰/۹۷	>۰/۰۵
	E	۲۴/۵±۳/۶	۰/۸۳	>۰/۰۵
	S	۲۵/۳±۳/۱	۰/۷۲	>۰/۰۵

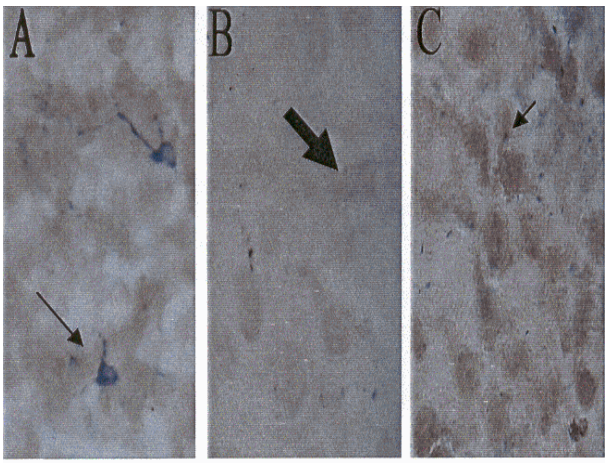


نمودار شماره ۱- آنالیز کمی اثر تاموکسیفن بر تراکم سلولها در ناحیه CA1 هیپوکامپ در جنین ۲۲ روزه و نوزاد موش صحرائی

با توجه به اینکه استروژن نقش مهمی در روند تکامل هیپوکامپ بعهده دارد، با استفاده از یک آنتاگونیست استروژن در دستگاه عصبی مرکزی، روند تکامل مختل می‌شود. یافته‌های بیان می‌دارند که تاموکسیفن به عنوان آنتاگونیست استروژن به علت نیمه عمر کوتاه خود (۱۴-۷ ساعت)، بلافاصله بعد از تزریق اثر خود را نشان می‌دهد.

واکنش بسیار مختصر نورون‌های پیرامیدال نسبت به NADPH ۶ ساعت بعد از تزریق، بیانگر تاثیر شدید تاموکسیفن بر عملکرد استروژن است.

شکل شماره ۱ ناحیه CA1 هیپوکامپ را ۶ ساعت بعد از آخرین تزریق تاموکسیفن (E22) نشان می‌دهد که به علت اینکه در مراحل اولیه تکامل قرار دارند، واکنش هیستوشیمیایی ضعیف مشاهده می‌شود که بیانگر مکانیسم عمل تاموکسیفن می‌باشد که به عنوان آنتی‌استروژن، مانع از واکنش NOS گردیده است و در نمونه‌های کنترل که بدون استفاده از βNADP تهیه شده‌اند هیچ رسوبی که بیانگر واکنش هیستوشیمیایی باشد، مشاهده نمی‌گردد و نورون‌ها واکنشی را نشان نمی‌دهند(شکل شماره ۲).



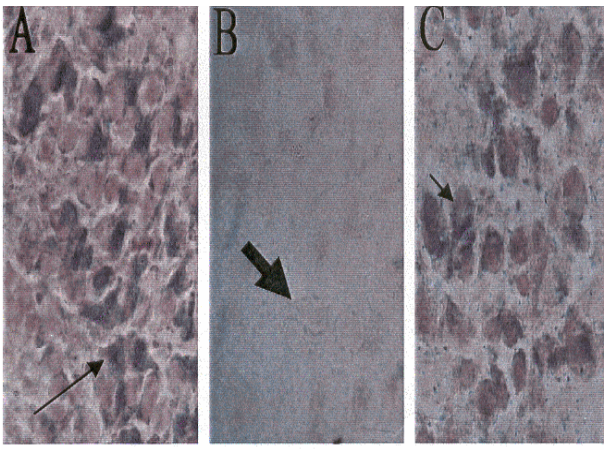
شکل شماره ۱- برش عرضی کرایوستات از ناحیه CA1 هیپوکامپ موش صحرایی قبل از تولد، ۶ ساعت بعد از آخرین تزریق تاموکسیفن(E22) - مقیاس اندازه ۱۰۰ میکرومتر

A) در نمونه‌های نرمال که هیچ دارویی دریافت ننموده‌اند، به علت اینکه در مراحل اولیه تکامل قرار دارند، تعداد نورون‌ها کم است و واکنش هیستوشیمیایی NADPH-d در آنها به شدت(فلش نازک) مشاهده می‌گردد.

B) در نمونه‌های کنترل که بدون استفاده از βNADP تهیه شده‌اند، هیچ رسوبی که بیانگر واکنش هیستوشیمیایی باشد، مشاهده نمی‌گردد و نورون‌ها واکنشی را نشان نمی‌دهند(فلش ضخیم)

C) در نمونه‌های تجربی که تاموکسیفن دریافت نموده بودند، واکنش

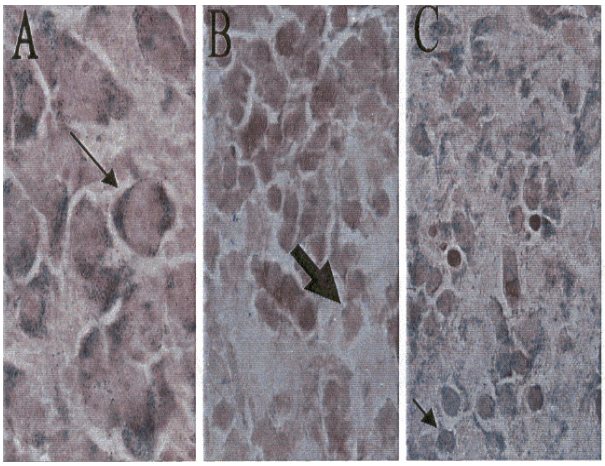
هیستوشیمیایی ضعیف مشاهده می‌شود(نوک فلش) که بیانگر مکانیسم عمل تاموکسیفن می‌باشد که به عنوان آنتی‌استروژن، مانع از واکنش NOS گردیده است.



شکل شماره ۲- برش عرضی کرایوستات از ناحیه CA1 هیپوکامپ موش صحرایی ۱۶ ساعت بعد از تولد(P_1)- مقیاس اندازه=۱۰۰ میکرومتر
A) در نمونه‌های نرمال، که هیچ دارویی دریافت ننموده‌اند، تعداد نورون‌ها بیش‌تر(در مرحله تکاملی پیشرفته‌تر) و واکنش هیستوشیمیایی NADPH-d در آنها زیاد است اما از مرحله قبلی(E22)، کمتر می‌باشد (فلش نازک).
B) در نمونه‌های کنترل که بدون استفاده از βNADP تهیه شده است، هیچ رسوبی که بیانگر واکنش هیستوشیمیایی باشد، مشاهده نمی‌گردد و نورون‌ها واکنشی را نشان نمی‌دهند(فلش ضخیم).
C) نمونه‌های تجربی که تاموکسیفن دریافت نموده بودند، واکنش هیستوشیمیایی کمی نشان می‌دهند(نوک فلش) که بیانگر مکانیسم عمل تاموکسیفن می‌باشد که با توجه به نیمه عمر آن، اثر تخریبی خود را کاهش داده است.

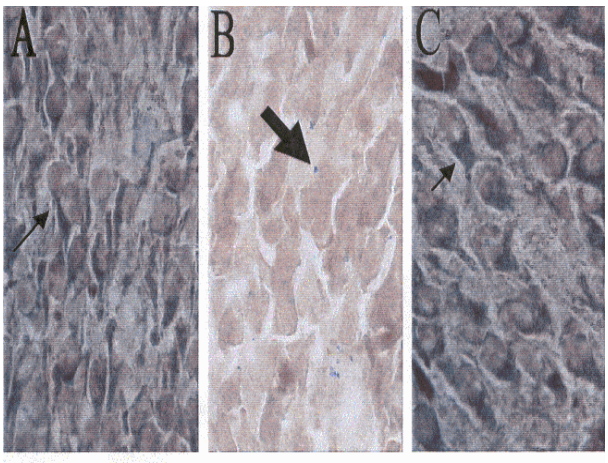
۱۶ ساعت بعد از تولد(P1) در نمونه‌های تجربی که تاموکسیفن دریافت نموده بودند، واکنش هیستوشیمیایی کمی مشاهده شد که بیانگر مکانیسم عمل تاموکسیفن می‌باشد که با توجه به نیمه عمر آن، اثر مهاری خود را کاهش داده است.

در هفته اول بعد از تولد(P7) در نمونه‌های تجربی که تاموکسیفن دریافت نموده بودند، واکنش هیستوشیمیایی ضعیف‌تر و پراکنده‌تری مشاهده شد و نورون‌ها با آرایش پراکنده بدون نظم خاص، ساختار نامنظمی را به علت تغییر در عملکرد استروژن، نشان دادند که بیانگر مکانیسم عمل تاموکسیفن می‌باشد(شکل شماره ۳).



شکل شماره ۳- برش عرضی کرایوستات از ناحیه CA1 هیپوکامپ موش صحرایی یک هفته بعد از تولد(P_7) ـ مقیاس اندازه=۱۰۰ میکرومتر
A) در نمونه‌های نرمال، که هیچ دارویی دریافت ننموده‌اند، به علت افزایش سن جاندار، تعداد نورون‌ها، بیش‌تر و واکنش هیستوشیمیایی NADPH-d در آنها زیاد(فلش نازک) است.
B) در نمونه‌های کنترل که بدون استفاده از βNADP تهیه شده است، هیچ رسوبی که بیانگر واکنش هیستوشیمیایی باشد، مشاهده نمی‌گردد و نورون‌ها واکنشی نشان نمی‌دهند(فلش ضخیم).
C) نمونه‌های تجربی که تاموکسیفن دریافت نموده بودند، واکنش هیستوشیمیایی ضعیف و نامنظمی مشاهده می‌دهند(نوک فلش) و نورون‌ها ساختار نامنظمی را به علت تغییر در عملکرد استروژن، نشان می‌دهند که بیانگر مکانیسم عمل تاموکسیفن می‌باشد.

همچنین مطالعه حاضر نشان می‌دهد که به دلیل از بین رفتن اثر تاموکسیفن، در هفته سوم حداقل واکنش مشاهده می‌شود که در شکل شماره ۴ نشان داده شده است.



شکل شماره ۴- برش عرضی کرایوستات از ناحیه CA1 هیپوکامپ موش صحرایی سه هفته بعد از تولد(P_{21}) ـ مقیاس اندازه=۱۰۰ میکرومتر

A) در نمونه‌های نرمال، که هیچ دارویی دریافت ننموده‌اند، به علت تکامل سلولی بیش‌تر، تعداد نورون‌ها افزایش یافته و واکنش هیستوشیمیایی NADPH-d در آنها بسیار کمتر(فلش نازک) مشاهده می‌گردد.
B) در نمونه‌های کنترل که بدون استفاده از βNADP تهیه شده‌اند، هیچ رسوبی که بیانگر واکنش هیستوشیمیایی باشد مشاهده نمی‌گردد و نورون‌ها واکنش کمتری را نشان می‌دهند(فلش ضخیم).
C) نمونه‌های تجربی که تاموکسیفن دریافت نموده بودند، واکنش هیستوشیمیایی شدیدتری نشان می‌دهند(نوک فلش) که بیانگر از بین رفتن اثر تاموکسیفن و مکانیسم عمل استروژن در رشد، تکامل و بیان واکنش NOS می‌باشد.

بحث

استفاده از تاموکسیفن، از دیدگاه‌های مختلف اهمیت دارد. انتخاب دوز تزریقی، نوع تاموکسیفن مصرفی، زمان تزریق و نحوه تزریق از ویژگی‌های این مطالعه می‌باشد.[۳۳] در این بررسی از ۳۷۰ میکروگرم تاموکسیفن سیترات به صورت داخل صفاقی استفاده شده است که دوز معادل ۲۵۰ میکروگرم تاموکسیفن می‌باشد که در سایر مطالعات هم بکار گرفته شده است.[۳۴]

با توجه به اینکه می‌دانیم هورمون استروژن در دوران جنینی، در روند تکامل، از اهمیت بسزایی برخوردار است و همچنین مطالعات متعددی[۳۵-۳۷] نشان داده‌اند که در طی بارداری رهاسازی نیتریک اکسید از عروق افزایش می‌یابد، پس مسیر استروژن و نیتریک اکسید در موازات هم می‌باشد و ضرورت وجود آنها در دوران بارداری محرز است. تاموکسیفن به عنوان آنتاگونیست استروژن در دستگاه عصبی[۲۵] مانع از عملکرد استروژن می‌گردد که تزریق آن در روزهای آخر بارداری، موجب اختلالاتی در تکامل هیپوکامپ گردیده است. مطالعات دیگر ۲۰۰-۴۰ میکروگرم تاموکسیفن به ازای هر کیلوگرم وزن به مدت ۹۰ روز برای موش صحرایی جهت بررسی جزئیات ساختمانی بافت بیضه استفاده کردند.[۳۸] همچنین اثر استفاده از ترکیب رتینوییید و دوز ۲۰-۱۰ میکروگرم تاموکسیفن بر سرطان پستان به صورت تزریق زیرجلدی به مدت ۱۸۰ روز مطرح بوده است.[۳۹]

مطالعه حاضر نشان می‌دهد که NOS ها ممکن است در بافت هیپوکامپ در جنین فول ترم و در نوزاد تازه متولد شده و تا سه هفته بعد از تولد، بوسیله استرادیول القاء شوند. تحقیقات انجام شده نشان می‌دهد که در طی بارداری رهاسازی NO از عروق افزایش می‌یابد.[۴۰-۴۲]

به علت رشد و تکامل سلولهای پیرامیدال هیپوکامپ موش صحرایی در روزهای آخر جنینی، تزریق در روزهای ۲۱ و ۲۲ موش باردار فول ترم انجام شده و نشان داده شد که تاموکسیفن، موجب کاهش فعالیت NOS شده است. در مطالعه‌ای دیگر[۲۲و ۲۴]، کاهش فعالیت NOS با استفاده از تاموکسیفن در انتهای بارداری در مخچه، بیان می‌شود. این مطالعات نشان می‌دهند که افزایش در فعالیت NOS وابسته به کلسیم در طی بارداری، بوسیله استروژن تنظیم می‌شود. همچنین، آزادسازی NO در دوران بارداری در اتساع عروق، برون ده قلبی، شریان رحمی، شریان مزانتریک و شریان‌های کلیوی نقش بسزائی دارد.[۲۴] علاوه بر این، شیوع رفلکس‌های مری مانند برگرداندن غذا در طی بارداری، قبلاً به اثر مستقیم پروژسترون استناد می‌شد[۲۲و ۴۳] در حالیکه NO یک متسع کننده قوی عضلات صاف معدی روده‌ای محسوب می‌گردد و نقش مهمی را در این ارتباط بعهده دارد.[۴۴و ۴۵] بنابراین با توجه به القای NOS وابسته به کلسیم به وسیله استروژن، تقسیم‌بندی انواع NOS به ساختمانی و القائی، باید بازبینی شود، چون آنزیم‌های eNOS و nNOS هر دو ساختمانی و القائی هستند. لازم به یادآوری است که بطور کلی nNOS و eNOS به عنوان آنزیم وابسته به کلسیم و ساختمانی و iNOS در گروه آنزیم مستقل از کلسیم و القائی، طبقه‌بندی می‌شوند.[۴۶]

مطالعه حاضر تاثیر حداکثر تاموکسیفن را در روزهای E22 و P1 نشان می‌دهد که ناشی از حداکثر متوسط غلظت پلاسمایی تاموکسیفن است که ۵ ساعت بعد از تزریق ایجاد می‌شود و از طرفی چون رشد حداکثر سلولهای پیرامیدال CA1 در بین روزهای E22 و P1 است، بنابراین حداکثر تاثیر در E22 و P1 می‌باشد و نظر به اینکه حداکثر دوز تجویز شده طی ۲ فته بعد از تزریق، دفع می‌شود، در P21 حداقل تغییرات مشاهده شد که مطالعات دیگر هم موید این نظر هستند.[۴۷]

در مطالعه‌ای که بر روی خوکچه هندی انجام شده، حداقل فعالیت NOS در مخچه در روز ۳۱ بارداری(طول ترم ۶۳ روز) بوده است که در روز ۳۹ به افزایش قابل توجه و تا ۶ روز بعد از تولد به حداکثر می‌رسد، اما در موش صحرائی تا

روز ۱۶ بارداری(طول ترم ۲۱ روز)، حداقل بوده و بتدریج افزایش یافته و بعد از هفته سوم بعد از تولد سیر نزولی را طی نموده است.[۲۶] قابل توجه است که فرایند بلوغ در روز ۳۱ برای خوکچه هندی و در روز ۱۶ برای موش صحرائی شروع نمی‌شود، اما فعالیت NOS مطرح می‌باشد.

مکانیسم عمل تاموکسیفن در ایجاد آسیب سلولی، حذف استروژن بعنوان فاکتور تکاملی است که یافته‌های محققان دیگر که روی هیپوکامپ کار کرده بودند، موید این امر است.[۲۶و ۴۶-۴۴] با توجه به اهمیت سن در این پروژه، تشخیص سن بارداری، تزریق در ۲ روز پایانی دوران جنینی و نمونه برداری قبل از تولد، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. دقت در زمان‌های مورد نظر مهم می‌باشد؛ در این ارتباط مطالعه حاضر از دقت لازم برخوردار بوده و محدودیتی برای ایجاد ننموده است.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصله بیانگر این نکته است که وجود استروژن برای تکامل هیپوکامپ ضروری است و در این دوره NOS هم نقش کلیدی در تکامل دارد. با استفاده از تاموکسیفن به عنوان آنتاگونیست استروژن، در عملکرد استروژن اختلالی پیش می‌آید که تکامل هیپوکامپ، سیر نرمال خود را طی نمی‌کند. همچنین به دلیل نیمه عمر کوتاه تاموکسیفن، زمان دریافت دارو و زمان بررسی هیپوکامپ، به شکل‌گیری و تکامل ارگان مورد مطالعه بستگی دارد، که در این راستا، جهت بررسی تکامل هیپوکامپ، زمان‌های قبل از تولد، ۱۶ ساعت بعد از تولد، یک هفته بعد از تولد و ۳ هفته بعد از تولد در نظر گرفته شد.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با استفاده از حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران در قالب طرح تحقیقاتی(شماره ثبت: ۵۱۷) انجام گردیده است که بدین وسیله نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسؤولین آن مرکز ابراز می‌دارند.

فهرست منابع

1- Keilhoff G, Seidel B, Noach H, Tischmeyer W, Stanek D, Wolf G. Patterns of nitric oxide synthase at the messenger RNA and protein levels during early rat brain development. Neuroscince 1996; 75: 1193-201.

2- Northington FJ, Koehler RC, Traystman RJ, Martin LJ. Nitric oxide synthase I and nitric oxide synthase 3 protein expression is regionally and temporally regulated in fetal brain. Dev Brain Res 1996; 95: 1-14.

3- Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. Stroke 1997; 28: 1283-8.

4- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. Nature medicine 1998; 4: 1323-17.

5- 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.

6- MC Ewen BS. The molecular and neuroanatomical basis for estrogen effects in the central nervous system. J Clinic Endocr 1999; 84: 1790-7.

7- Audesirk T, Cabell L, Kern M, Audesirk G. β-Estratiol Influences differentiation of hippocampal neurons in vitro through an estrogen receptor mediated process. Neuroscience 2003; 21: 927-34.

8- Lei DL, Long JM, Hengemihle J, O'Neill J, Manaye DK, Ingram DK, et al. Effects of estrogen and raloxifene on neuroglia number and morphology in the hippocampus of aged female mice. Neuroscience 2003; 121: 659-66.

9- Hara H, Huang PL, Panahian N, Fishman MC, Moskowitz MA. Reduced brain edema and infarction volume in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide synthase after transient MCA occlusion. J Cereb Blood Flow Metab 1996; 16: 605-11.

10- Bertini G, Peng ZC, Bentivoglio M. The chemical heterogeneity of cortical interneurons: nitric oxide synthase Vs. calbindin and parvalbumin immunoreactivity in the rat. Brain Res. Bull 1996; 39: 261-6.

11- Ladecola C, Pelligrino DA, Moskowitz MA, Lassen NA. Nitric oxide synthase inhibition and cerebrovascular regulation. J Cereb Blood Flow Metab 1994; 14: 175-92.

12- Dinerman JL, Dawson TM, Schell MJ, Snowman A, Snyder SH. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 4214-8.

13- Miyawaki T, Sohma O, Mizuguchi M, Takashima S.

Development of endothelial nitric Oxide synthase in endothelial cells in the human cerebrum. Dev Brain Res 1995; 89: 161-6.

14- Schmidt HH, Walter U. No at work. Cell 1994; 78: 919-25.

15- Szabo S. Physiological and Pathophysiological roles of nitric oxide in central nervous system. Brain Res Bull 1996; 41: 131-41.

16- Faraci FM, Brian JE. Nitric oxide and the cerebral circulation. Stroke 1994; 25: 697-703.

17- Huang Z, Huang PL, Panahian N Dalkara T, Fishman MC, Moskowitz MA. Effects of cerebral Ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. Science 1994; 265: 1883-5.

18- Panahian N, Yoshida T, Huang PL, Hedley-Whyte ET, Dalkara T, Fishman MC, et al. Attenuated hippocampal damage after global cerebral ischemia in mice mutant in neuronal nitric oxide synthase. Neurescience 1996; 72: 343-54.

19- Ladecola C, Beitz AJ, Renno W, Xu X, Mayer B, Zhang F. Nitric oxide synthase-containing neuronal processes on large cerebral arteries and cerebral microvessels. Brain Res 1993; 606: 148-55.

20- Kalb RG, Agostini J. Molecular evidence for nitric oxide-mediated motor neuron development. Neuroscience 1993; 57: 1-8.

21- Kowall NW, Mueller MP. Morphology and distribution of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(reduced form) diaphorase reactive neurons in human brain stem. Neuroscience 1998; 26: 645-54.

22- Shigeyoshi Y, Ogura T, Esumi H, Chihara K, Idata Y, Okamura H. Lesion-induced neuronal nitric oxide synthase in purkinje cells of the rat cerebellar cortex: Histochemical and in situ hybridization study. Mol Brain Res 1997; 44: 229-37.

23- Simonian SX, Herbison AE. Location of neural nitric oxide synthase-immunoreactivity within sub-populations of noradrenergic A1 and A2 neurons in the rat. Brain Res 1996; 732: 247-52.

24- Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91(11): 5212-6.

25- Nishizuka M, Arai Y. Synapse formation in response to estrogen in the medial amygdala developing in the eye. Proc Natl Acad Sci USA 1982; 79(22): 7024-6.

26- Lizasoain I, Weiner CP, Knowles RG, Moncada S. The ontogeny of cerebral and cerebellar nitric oxide synthase in the guinea pig and rat. Pediatr Res 1996; 39(5): 779-86.

27- McKenna SE, Simon NG, Cologer-Clifford A. An Assesement of agonist or antagonist effects of tamoxifen in the female mouse brain. Horm Behav 1992; 26: 536-44.

28- Robert NJ. Clinical efficacy of tamoxifen. Oncology 1997; 11(2 suppl): 15-20.

29- Clemons M, Danson S, Howell A. Tamoxifen(Novaden): a review. Cancer Treat Res 2002; 28(4): 165-80.

30- Bao T, Prowell T, Stearns V. Chemoprevention of breast cancer: tamoxifen, raloxifene, and beyond. Am J Ther 2006; 13(4): 337-48.

31- Gray JM, Raley-Susman KM. Effects of tamoxifen, fluphenazine and estradiol an ATP levels in preoptic area and hypothalamic slices from ovariectomized rats. Brain Res 1998; 798(1-2): 223-31.

32- Lustig RH, Sudol M, Pfaff DW, Federoff HJ. Estrogenic regulation and sex dimorphism of growth-associated proteins 43 KDa GAD-43 messenger RNA in the rat. Brain Res Mol Brain 1991; 11: 125-32.

33- Patricia A ganz, Steven A Castellon, Daniel HS Silverman. Estrogen, tamoxifen, and the brain. J of the national Cancer Institute 2002; 94(8): 547-9.

34- Silva I, Mello LE, Freymuller E, Haidar MA, Baracat EC. Estrogen, progestron and tamoxifen increase synaptic density of the hippocampus of ovariectomized rats. Neuroscience letters 2000; 291: 182-6.

35- Loi S, Haibe-Kains B, Desmedt C, Wirapati P, Lallemand F, Tutt AM, et al. Predicting prognosis using molecular profiling in estrogen receptor-positive breast cancer treated with Tamoxifen. BMC Genomics 2008; 9: 239-245.

36- Martinez-cerden V, Noctor SC, Kriegstein AR. Estradiol stimulates progenitor cell division in the ventricular and subventricular zones of the embryonic neocortex European Journal of Neuro Science. 2006; 24(12): 3475-88.

37- Liu Y, Chen D, Goldstein RS, Cui S. Effects of male and female sex stroids on the development of normal and the transient froriep's dorsal root ganglia of the chick embryo. Brain Res Dev Brain Res 2005; 155(1): 14-25.

38- Gopalkrishnan K, Gill – sharma M K, Balasinor N, Padwal V,D Souza S, Parte P, et al. Tamoxifen – induced light and electron microscopic changes in the rat tedticular

morphology and serum hormonal profile of the reproductive hormones. Contraception 1998; 57 (4): 261 – 9

39- Ratco TA, Detrisac CJ, Dinger NM, Thomas CF, Kelloff GJ, Moon RC. Chemopreventive efficacy of combined retinoid and tamoxifen treatment following surgical excision of a primary mammary cancer in female rats. Cancer Res 1989; 49 (16): 4472 – 6.

40- Naden R P, Rosenfeld C R. Systemic and uterine responsiveness to angiotensin II and norepinephrine in estrogen – treated nonpregnant sheep. Am J Obstet Gynecol 1985; 153: 417 – 25.

41- Weiner CP, Martinez E, Chestnut DH, Ghodsi A. Effect of pregnancy on uterine and carotid artery response to norepinephrine, epinephrine, and phenylephrine in vessels with documented functional endothelium. J Obstet Gynecol 1989; 161: 1605 – 10.

42- Weiner CP, Zhu LK, Thompson L, Herrig J, chestnut DH, Ghodsi A. Effect of pregnancy on endothelium and smooth muscle: their role in reduced adrenergic sensitivity. Am J Physiol 1991; 261: H 1275-H1283.

43- Ryan JP, Bhojwani A. Colonic transit in rats: effect of ovariectomy, sex steroid hormones, and pregnancy. Am J Physiol 1986; 251 (1Pt 1): G46-G50.

44- Ryan JP, Pellechia D. Effect of progesterone preatment on guinea pig gallbladder motility in vitro. Am J Physiol 1982; 83: 81- 3.

45- Sanders KM, Ward SM. Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. Am J Physiol 1992; 262: G379-G392.

46- Badimon L, Badimon JJ, Penny W, Webster MW, Chesebro JH, Fuster VJ. Endothelium and atherosclerosis. Hypcrtens Suppl 1992; 10: S43-S50.

Assessment of Tamoxifen Effects on Nitric Oxide Synthase (NOS) in Rat's Developing Hippocampus

**** M. Nobakht,PhD*** [I] ***M.Shafiee ,PhD*** [II] ***P.Tabatabaee, BS*** [III]
T.Rastegar, MS [IV]

Abstract

Background & Aim: Maternal steroids modulate various functions in the developing brain. Tamoxifen (TAM) treatment, as an estrogen antagonist, induces cell death in rat's developing hippocampus. Estrogen has a variety of physiological effects on the nervous system, including regulation of cognitive functions, learning, aging, angiogenesis, neurogenesis, and neuroprotective effects. In the present study, we demonstrated the effects of TAM as an estrogen antagonist on nitric oxide synthase activity in rat's developing hippocampal pyramidal neurons.

Material and Method: The present experimental study was conducted on twelve groups of adult rats. The animals were divided randomly into control, experimental and sham groups. Each group contained full term embryo (E_{22}), one-day neonate (P_1), one-week neonate (P_7), and three -week neonate (P_{21}). The experimental group received a total of four doses of TAM,i.e. 250 mg/kg TAM in propylene glycole was injected intraperitoneally twice a day for two days. Their hippocampus was removed 6 hours after the last injection. Animals at the same gestational age were used as shams and controls. The latter received only propylene glycole. The hippocampus was dissected out and stored in fixative and sucrose. Cryostat sections were thaw-mounted on gelatin slides. The sections were incubated for NADPH-diaphorase histochemistry by light microscope. Independent sample t-test and SPSS version 11.0 were used to analyze the data.

Results: We found that in the early stage of development cellular density decreases and gradually cellular thickness increases so that the most thickness is seen in the third week after birth. Considering the short half-time of TAM, it was observed that tamoxifen had its greatest effects on E_{22}, P_1 and P_7 groups and blockaded estrogen receptors. In the group that didn't receive tamoxifen, due to the presence of estrogen NADPH-diaphorase activity, which indicates NOS activity level, strengthened. On the other hand, the animals which received tamoxifen in the early stage showed a decrease in NADPH-diaphorase activity owing to estrogen receptor blockade. Furthermore, the number of neural cells in CA1 hippocampal region showed a decrease in proportion to the reduction in NOS activity level in this region. The decreased number of neural cells and NOS activity, which was seen in E_{22}, P_1 , P_7 groups, seems to be due to the short half-time of tamoxifen.

Conclusion: These findings indicate that estrogen and selective estrogen modulators can influence nitric oxide-mediated growth and development of hippocampal pyramidal cells.

Key Words: 1)Tamoxifen 2)Nitric Oxide 3)NADPH-d 4)Hippocampus

I) *Associate Professor of Embryology and Histology. Department of Anatomy, Histology and Neuroscience. Faculty of Medicine. Shahid Hemmat Expressway. Shahid Chamran Crossroads. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran. (*Corresponding Author)*
II) *Associate Professor of Pharmacology. Faculty of Medicine. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.*
III) *BS in Biology. Faculty of Medicine. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.*
IV) *MS in Anatomy. Faculty of Medicine. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.*