

# اثرات تاموکسیفن بر فراساختار و تعداد سلولهای هیپوکامپ جنین و نوزاد

## موش صحرایی

### چکیده

زمینه و هدف: 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، پیدری، آنژیوژنیس، نوروژنیس و حفاظتی نورون‌ها دارد. در این مطالعه، اثر تاموکسیفن به عنوان آنتاگونیست استروژن بر فرا ساختمان و مورفوگلوبولی 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، ۴ رده سنی، شامل جنین فول ترم (E<sub>22</sub>), نوزاد یک روزه (P<sub>1</sub>), یک هفت‌ه (P<sub>7</sub>) و سه هفت‌ه (P<sub>21</sub>) مورد آزمایش قرار گرفت. تزریق تاموکسیفن در حال پروریبلن گلیکول، ۲ روز قبل از زایمان، روزی ۲ بار انجام گرفت و پس از طی پروسه‌های لازم، نواحی مختلف CA<sub>1</sub>, CA<sub>3</sub>, D.G, Subiculum و CA<sub>4</sub> هیپوکامپ، به وسیله میکروسکوپ نوری و الکترونی مطالعه گردید. جهت آنالیز داده‌ها از آزمون آماری ANOVA و T-Test استفاده گردید که  $P < 0.05$  اختلاف آماری معنی‌داری را شناس می‌دهد.

یافته‌ها: نتایج مشخص می‌سازد که تراکم سلولی در نواحی CA<sub>1</sub> و سابیکولوم هیپوکامپ، کاهش می‌یابد و الکترونیکوگراف‌ها، پیکتوژن شدن هسته، متراکم شدن و حاشیه‌ای شدن کروماتین‌ها، پارگی غشا هسته، متورم شدن میتوکندری‌ها و تغییر ساختار کریستال در میتوکندری را، عددتاً در نواحی CA<sub>1</sub> 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 نوروژنیس، 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 حداقل 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

نوروز نجفزاده I

\*دکتر ملیحه نوبخت II

دکتر سید بهنام الدین جامعی III

پروانه طباطبایی IV

طیبه رستگار V

فرزانه محمدزاده V

تاریخ دریافت: ۸۴/۵/۱۶ تاریخ پذیرش: ۸۵/۳/۲۸

### مقدمه

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<sup>(۱-۲)</sup> و اثرات

هورمون‌ها و فاکتورهای رشد و نوروتانسیمیترها، 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

(I) دانشجوی دکتری گروه علوم تشریعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران، ایران.

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

(III) استادیار گروه آناتومی، دانشکده پرایزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران، ایران.

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

(V) کارشناس ارشد گروه علوم تشریعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران، ایران.

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<sub>22</sub>، E<sub>21</sub>) ۱۶ ساعت بعد از تولد (P<sub>1</sub>، P<sub>7</sub>) و ۳ هفتۀ بعد از تولد (P<sub>21</sub>) تقسیم شدند که در هر گروه، ۵ عدد جنین (در E<sub>22</sub>) و یا ۵ سر نوزاد (در P<sub>1</sub>، P<sub>7</sub> و P<sub>21</sub>) 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 بلوك کننده رسپتور استروژن است)، ۲ بار در روز) و مفرز جنین‌ها، ۶ ساعت بعد از آخرین تزریق و مفرز نوزادان، ۱۶ ساعت، یک هفته و ۳ هفتۀ بعد از تولد خارج گردید. مفرز حیوانات با سنین مشابه، یعنی مفرز جنین‌ها، ۶ ساعت بعد از آخرین تزریق و مفرز نوزادان ۱۶ ساعت، یک هفته و ۳ هفتۀ 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 هفتۀ بعد از تولد، جدا شدند. نوزادان با پتوباربیتال داخل صفاقی به میزان ۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن و مادر آنها با ۲۰ میلی‌گرم پتوباربیتال داخل صفاقی به ازای هر کیلوگرم از وزن بیهوش شدند و با سرعت ۲۰-۳۰ میلی‌لیتر محلول رینگر حاوی یک واحد هپارین در هر میلی‌لیتر، در هر دقیقه، به مدت ۵ دقیقه پرفیوژ شدند. به دنبال آن، از محلول کارنوکسکی به مقدار ۲۰-۳۰ میلی‌لیتر در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. مفرز 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 مفرز در محلول

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.<sup>(۲-۵)</sup> مکانیسم عمل تاموکسیفن در بافت‌های مختلف، متفاوت است؛ اثر آنتاگونیستی یا آگونیستی تاموکسیفن به نوع بافت بستگی دارد که در بافت مفرز، به عنوان آنتاگونیست عمل می‌کند. با توجه به اثر محافظتی استروژن، تاموکسیفن عمدها بر روی سلولهای هرمی و ایترنورون‌های هیپوکامپ که دارای رسپتور استروژن هستند، اثر دارد.<sup>(۶-۷)</sup> 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.<sup>(۸-۱۰)</sup> در این مطالعه تاثیر تاموکسیفن بر روی تراکم تعداد نورون‌ها در نواحی G, CA<sub>1</sub>, CA<sub>3</sub> و سایکولوم از دیدگاه میکروسکوپ نوری بررسی گردید. همچنین با مطالعات الکترومیکروگراف، تغییرات ناشی از هسته و میتوکندری، در سلولهای نواحی CA<sub>1</sub> 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 حلal استفاده شد. تمام مواد شیمیایی استفاده شده از نوع معروف‌های آنالیتیکی بوده و آب دیونیزه سه بار تقطیر، در این مطالعه استفاده شد. محلول استوک با حل کردن یک گرم تتراکسید اسپیروم در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر در یک فلاسک بdest آمد. محلول کار در ۱۰۰ میلی‌لیتر سیترات بافر رقیق تهیه شد که در ظرف تیره و دور از نگهداری می‌شد. مواد شیمیایی جهت پرفیوژن مثل تتراکسید اسپیروم، گلوتارآلدیید، پارافرمالدیید، اورانیل استات و پاراپلاست از شرکت Aldrich-Sigma خریداری شدند.

تفکیک محاسبه گردید، یعنی آزمون T جهت مقایسه بین دو گروه کنترل و تجربی برای هر یک از گروههای P<sub>21</sub>, P<sub>7</sub> و E<sub>22</sub> جدالگانه انجام شده و میزان معنی دار بودن آماری و آنالیز نهایی با استفاده از برنامه آماری SPSS (version 11) Independent Sample T-Test و عمدتاً با SYSTAT لازم به ذکر است که برای جلوگیری از احتمال بروز خطا، آماده سازی و رنگ آمیزی نمونه ها، توسط یک نفر و بررسی نمونه ها و تفسیر الکترومیکروگرافها، توسط یک فرد انجام گردید.

#### یافته ها

در بررسی مورفو متريک با استفاده از آنالیز کمی، در اين مطالعه کاهش قابل ملاحظه ای در تعداد سلولهای پيراميدال CA<sub>1</sub> و سابيکولوم در گروههای تجربی P<sub>1</sub>, P<sub>7</sub>, E<sub>22</sub> مشاهده شد، در حالی که در هفته سوم، تأثير محسوسی مشاهده نشد؛ بنابراین رابطه قابل ملاحظه ای بین روند رشد و استفاده از تاموکسیفن دیده شد و تأثير تاموکسیفن بر تعداد سلولهای پيراميدال CA<sub>1</sub> تنها تا هفته اول بعد از تولد قابل مشاهده بود، بنابراین تاموکسیفن از افزایش تعداد سلولهای القا شده با استروژن جلوگیری می کند. همچنین این تأثير بر ناحیه سابيکولوم هم قابل مشاهده است اما کاهش تراکم نورونی در ناحیه سابيکولوم كمتر می باشد (شکل شماره ۱ و جدول شماره ۱).

**جدول شماره ۱** - ميانگين تعداد سلولها (±SD) در نواحي CA<sub>1</sub>, CA<sub>3</sub>, D.G, Subiculum در سنتين مختلف تکامل.

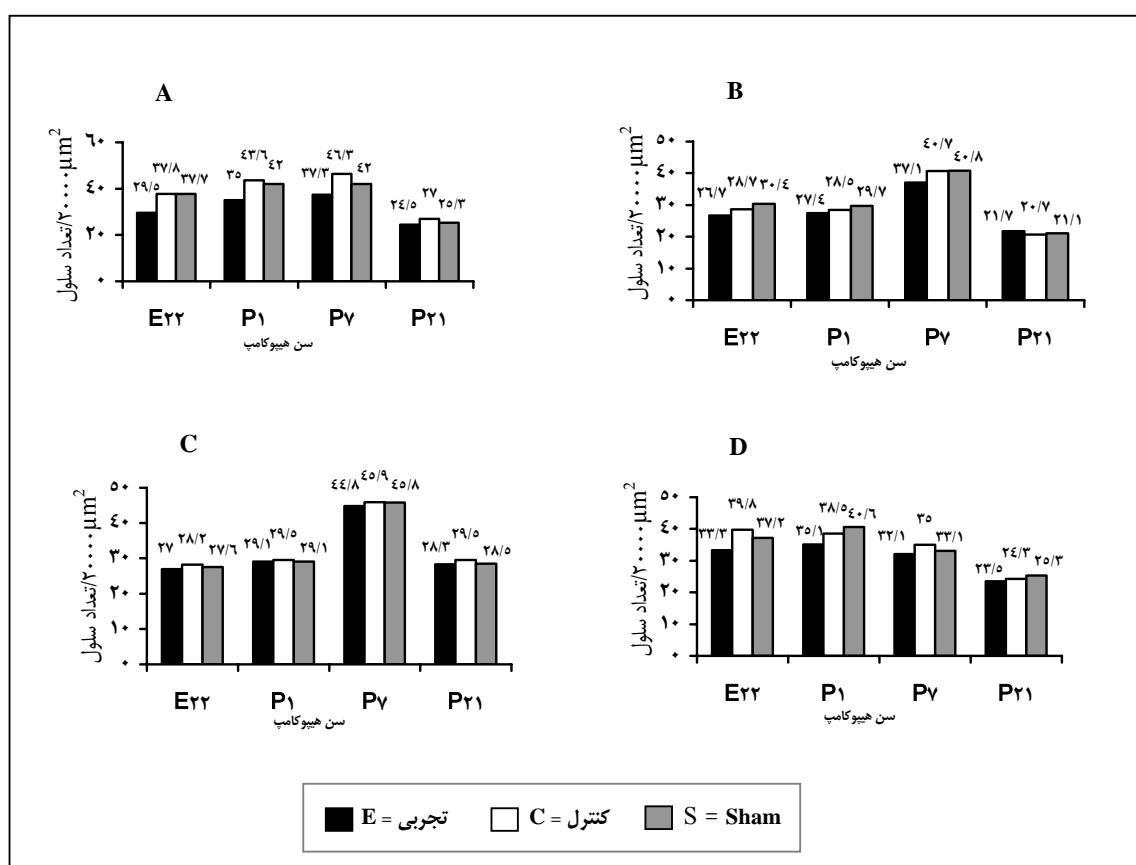
تجربی e: کنترل c: sham

	CA <sub>1</sub>			CA <sub>3</sub>			D.G.			Sub.			
	Mean±SD	SE	Pvalue	Mean±SD	SE	Pvalue	Mean±SD	SE	Pvalue	Mean±SD	SE	Pvalue	
E <sub>22</sub>	C	27/8 ± 5/0	1/2	>0.000	28/7 ± 5/0	1/2	>0.22	28/2 ± 4/0	1/0	>0.49	29/8 ± 2/9	1/3	>0.000
	E	29/5 ± 4/0	0/9	>0.000	27/7 ± 4/1	1/0	>0.22	27/0 ± 5/0	1/2	>0.49	22/3 ± 2/8	0/6	>0.000
	S	27/7 ± 5/2	1/2	>0.000	30/4 ± 4/2	0/9	>0.22	27/6 ± 5/2	1/2	>0.49	27/2 ± 4/2	0/9	>0.000
P <sub>1</sub>	C	42/6 ± 3/6	0/8	>0.000	28/0 ± 4/0	0/9	>0.41	29/5 ± 5/1	1/1	>0.8	38/5 ± 4/5	1/0	>0.045
	E	35/0 ± 5/0	1/27	>0.000	27/4 ± 4/2	0/9	>0.41	29/1 ± 5/4	1/2	>0.8	35/1 ± 5/3	1/2	>0.045
	S	42/0 ± 7/7	1/0	>0.000	29/7 ± 2/1	0/7	>0.41	29/1 ± 5/0	1/1	>0.8	40/6 ± 4/9	1/1	>0.045
P <sub>7</sub>	C	42/3 ± 7/7	1/5	>0.000	40/7 ± 5/0	1/2	>0.4	45/9 ± 8/1	1/8	>0.4	35/0 ± 4/0	0/9	>0.038
	E	37/2 ± 7/2	1/4	>0.000	37/1 ± 2/1	0/8	>0.4	44/8 ± 9/0	2/0	>0.4	32/1 ± 4/1	0/9	>0.038
	S	42/0 ± 4/9	1/1	>0.000	40/8 ± 4/3	0/9	>0.4	45/8 ± 7/6	1/0	>0.4	33/1 ± 3/9	0/9	>0.038
P <sub>21</sub>	C	27/0 ± 4/2	0/97	>0.05	20/7 ± 4/3	0/9	>0.49	29/0 ± 11/7	1/3	>0.46	24/3 ± 2/9	0/9	>0.058
	E	24/5 ± 3/6	0/83	>0.05	21/7 ± 4/0	1/0	>0.49	28/3 ± 4/2	0/8	>0.46	23/5 ± 4/2	0/9	>0.058
	S	25/3 ± 3/1	0/72	>0.05	21/1 ± 2/2	0/7	>0.49	28/0 ± 2/6	0/8	>0.46	25/3 ± 3/4	0/7	>0.058

كارنوسکی قرار داده شد و سپس در محلول های با خلوص بيشتر اتانول، آبگيري شد و بعد از تهيه بلوکها، برشهای سریال کوروئال با ضخامت ۱۰ میکرومتر تهیه گردیدند و در روی اسلایدهای ژلاتینه قرار داده شدند و پس از رنگ آمیزی با کرزیل ویولت، جهت بررسی با میکروسکوپ نوری (Olympus) انتخاب گردیدند، با برنامه Olyvia تصاویر گرفته شده، گرید بندی شدند و برای شمارش تعداد سلولها، به صورت تصادفی از چندین گرید استفاده شد.

نمونه های هیپوکامپ با ابعاد یک میلی متری، تهیه و به مدت یک شب در محلول کارنوسکی قرار داده شدند، سپس از تراکسید اسمیوم ۲٪ به عنوان فیکساتیو ثانویه استفاده شد. سپس با آبگيري توسط استن در رزین 812 Epon قالب گيري و پلیمریزه گردیدند. برشهای نیمه ضخیم با ضخامت ۳/۰ میکرومتر، تهیه و با تولوییدین بلو، رنگ آمیزی شدند و توسط میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند. برشهای کاملاً نازک به ضخامت ۶۰-۸۰ نانومتر با اورانیل استات و سیترات سرب رنگ آمیزی شدند و با میکروسکوپ الکترونی Leo 906 Zeiss مورد بررسی قرار گرفتند.

تراکم سلولی در ۴ ناحیه، با توجه به ۴ رده سنی، مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از روش های مورفو متريک، جهت تعیین تراکم سلولی، تعداد سلولها در ۲۰۰۰ میکرومتر مربع شمارش گردید. ميانگين، همراه با خطاي استاندارد به



شکل شماره ۱- آنالیز کمی اثرات مراحل تکامل و تزریق تاموکسیفین روی تعداد سلولها.

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

(A) تاموکسیفین تعداد سلولها را در ناحیه CA1 تا هفته اول کاهش داده و هیچ اثری در هفته سوم نداشته است. Pvalue در P1 و P7 کمتر از ۰/۰۵ بود.

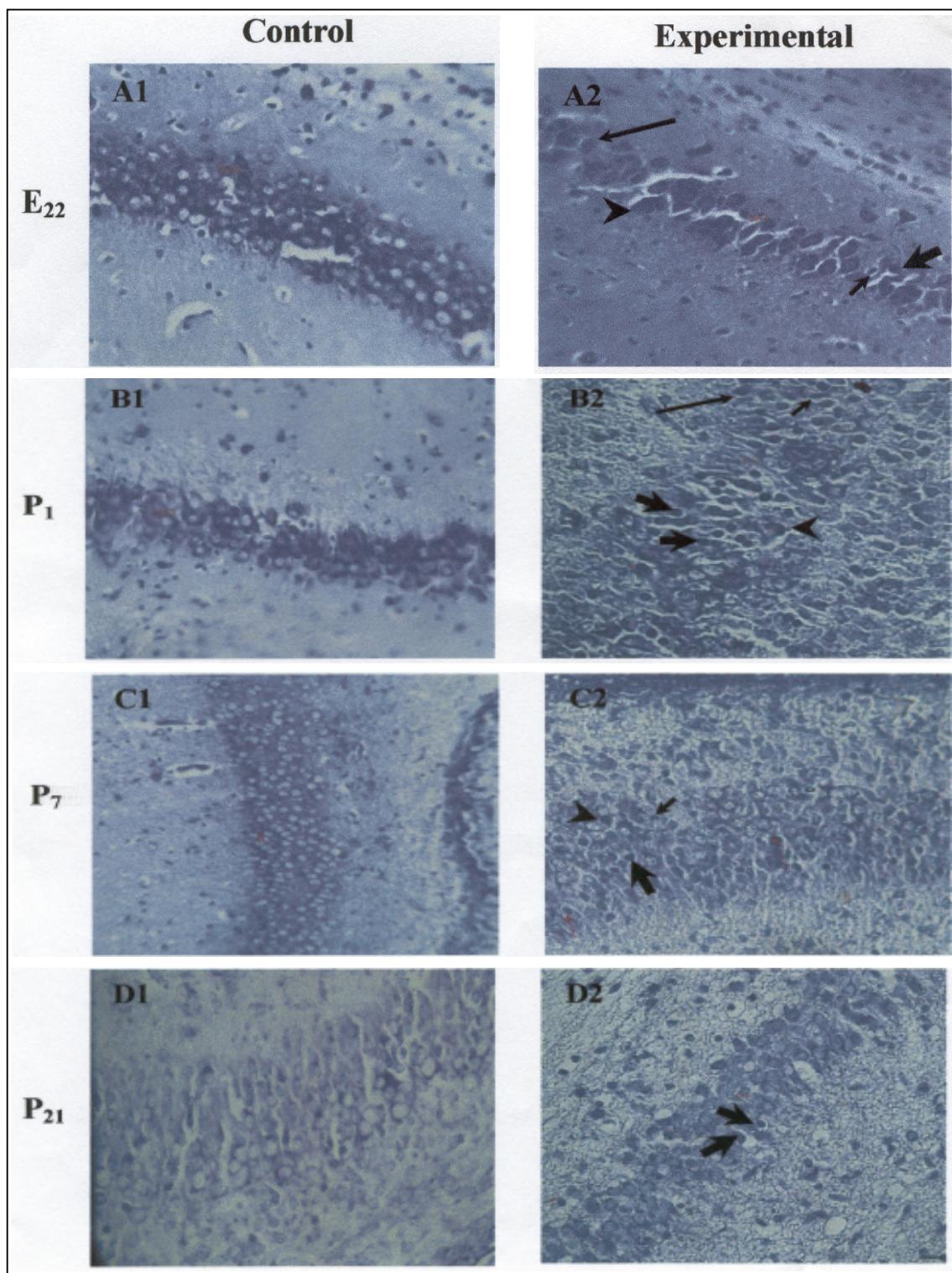
(B) تاموکسیفین تاثیری بر تعداد سلولها در ناحیه CA3 نداشته است (Pvalue<۰/۰۵).

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

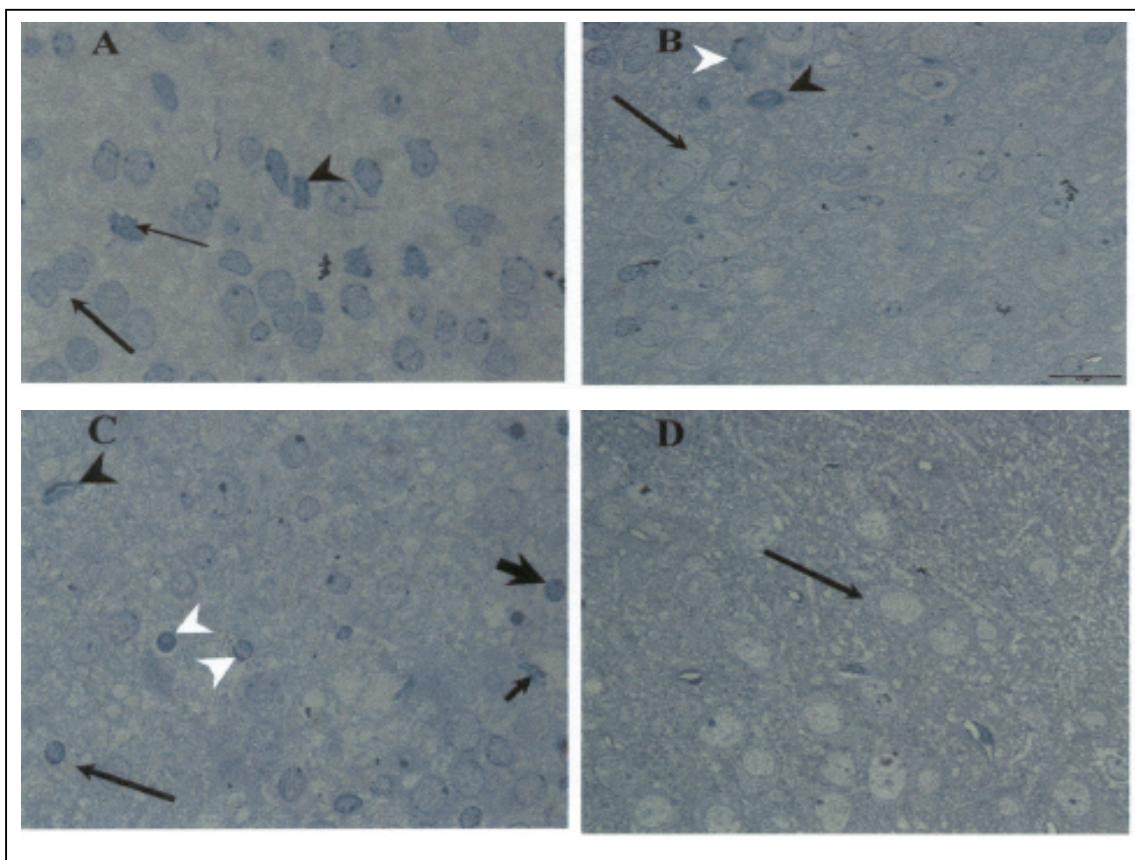
(D) تاموکسیفین تعداد سلولها را در ناحیه Subiculum تا هفته اول کاهش داده و هیچ اثری در هفته سوم نداشته است. در P1، P7 و E22 کمتر از ۰/۰۵ بوده است.

در رنگآمیزی نیسل با رنگپذیری هسته‌ها، ضخامت لایه‌ها از E<sub>22</sub> به P<sub>21</sub> 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<sub>21</sub> کاهش می‌یابد.

همچنین بررسی‌های کیفی، بیانگر تغییراتی در هسته و میتوکندری گروههای تجربی P<sub>1</sub>, P<sub>7</sub> و E<sub>22</sub> 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 CA1 در گروه کنترل و sham نرمال بودند(شکل شماره ۲ و ۳).



**شکل شماره ۲** - فتوگراف نورون‌های نواحی CA<sub>1</sub> در (P<sub>21</sub>(D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>) .P<sub>1</sub>(B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>) .P<sub>7</sub>(C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>) و E<sub>22</sub>(A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>) .P<sub>21</sub>(D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>) با رنگ‌آمیزی نیسل: ضخامت لایه‌ها در گروه‌های کنترل از E<sub>22</sub> به سمت P<sub>21</sub> افزایش می‌یابد و همزمان نورون‌ها بالغ می‌گردند، در گروه‌های تجربی، نورون‌های آسیب دیده (نوك پیکان تیره) شدیداً رنگ شده، هسته‌های متراکم (پیکان ضخیم) با غشاء نامنظم (پیکان نازک)، همراه شرده شدن هسته (پیکان کوتاه)، توهدای شدن کروماتین (پیکان بلند) در P<sub>7</sub> و E<sub>22</sub> مشاهده می‌شود. در گروه P<sub>21</sub> 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.

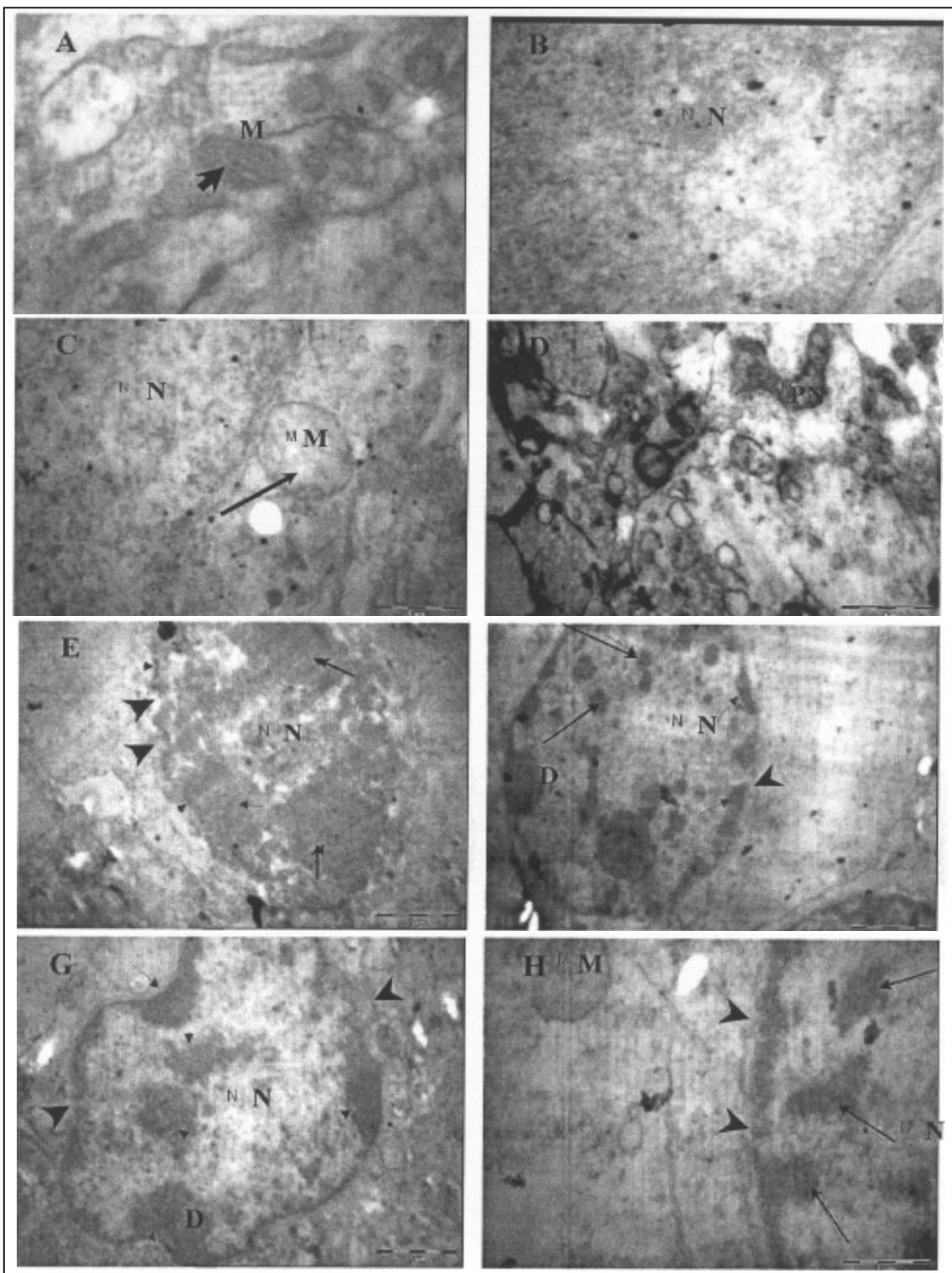


**شکل شماره ۳**- فتو میکرو گراف از برشهای نیمه نازک رنگ آمیزی شده با تولوییدین بلو: این نمونه‌ها یعنی نورون‌های CA<sub>1</sub> در E<sub>22</sub> (A), CA<sub>1</sub> در P<sub>7</sub> (B), CA<sub>2</sub> در P<sub>7</sub> (C) و CA<sub>2</sub> در P<sub>21</sub> (D) فقط نمونه‌های تجربی می‌باشند که تغییرات در جنین فول ترم نسبت به روز اول و هفت‌های 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<sub>21</sub> بسیار کم بود. این مشاهدات یافته‌های حاصل از رنگ آمیزی نیسل را تأیید می‌کنند و چون اساس تهیه نمونه‌های اولتراسناراکچر می‌باشد، نیازی به کنترل ندارد.

به صورت نرم‌الملو مشاهده شد. بعد از تجویز تاموکسیفون، تغییرات واضح دژنراتیو در ناحیه CA<sub>1</sub>، طی روزهای P<sub>21</sub>, P<sub>7</sub> و E<sub>22</sub> مشاهده گردید. تغییرات مورفو‌ولوژیکی در ساختمان هسته و میتوکندری عمدها 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 ۴) و نمای متسع کریستال‌ها آرایش نرم‌الملو میتوکندری را مختل کرده است. این تغییرات عمدها تا هفته اول مشاهده شد و در هفته سوم، این تغییرات بسیار نامشخص بوده است.

با استفاده از بلوكهای رزینی، برشهای نیمه ضخیم با رنگ آمیزی 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 رنگ آمیزی نیسل را تأیید می‌نماید.

الکترو میکرو گراف‌های ناحیه CA<sub>1</sub> در هیپوکامپ در روزهای P<sub>7</sub>, P<sub>21</sub> و E<sub>22</sub> بررسی گردیده است. در گروه کنترل، هیچ نشانه‌ای از تخریب نورومنی مشاهده نشد، در اکثر سلولهای نورون، میتوکندری به صورت اجسام متراکم حاوی کریستال‌ها بود و ساختار سیتوپلاسم و هسته



**شکل شماره ۴** - الکترومیکروگرافهای ناحیه ۱ هیپوکامپ در روزهای P<sub>1</sub>, P<sub>7</sub>, P<sub>21</sub> و E<sub>22</sub>: در نمونههای کنترل (A)، نورونهای CA<sub>1</sub> دارای میتوکندری بیضی شکل (M) و با کریستالهای منظم (پیکان ضخیم) و هسته (N) با تراکم نسبی کروماتین (پیکان نازک) میباشد، اما بعد از استفاده از تاموکسیفن، اتساع میتوکندری (C) همراه با کاهش کریستالها (پیکان بلند)، تودهای شدن کروماتین (D)، حاشیهای شدن کروماتین و دردیافت پارگی غشاء هسته مشاهده گردید. در این الکترومیکروگرافها، فراغماتانتاسیون هسته (E)، نامنظم بودن و پارگی غشای هسته (F)، تودهای شدن کروماتین هسته (G) و فشردگی هسته (H) مشاهده شده است.

## بحث

وابسته به رسپتور استروژن است. شباهت قابل ملاحظه ای در بین نتایج تحقیقات قبلی که مشابه مطالعه حاضر بودند، دیده می شود. همچنین تغییراتی در نواحی مختلف هیپوکامپ با تزریق پروژستین و استرادیول در رت‌ها گزارش شده است.<sup>(۱۸) و (۱۹)</sup> تعداد نورون‌ها در ناحیه CA<sub>1</sub> و ساییکولوم به صورت قابل ملاحظه ای کاهش یافت، استفاده از استروژن از این تغییرات جلوگیری می کند.<sup>(۲۰) و (۲۱)</sup> نتایج بعضی مطالعات نشان دادند که تعداد نورون‌ها در نواحی مختلف هیپوکامپ در بین سنین مختلف، متفاوت است.<sup>(۲۲)</sup> برای مثال، چندین مطالعه در این زمینه نشان داده است که محدودیت‌های سنی در نورون‌های تمام نواحی هیپوکامپ وجود دارد.<sup>(۲۳) و (۲۴)</sup> در حالی که سایر تحقیقات، تعداد نورون‌های ثابتی را در کل دوره زندگی<sup>(۲۵)</sup> در ناحیه CA<sub>3</sub> گزارش کردند.<sup>(۲۶)</sup>

در این مطالعه مشخص شد که تاموکسیفن در vivo باعث پاتولوژی هسته و میتوکندری سلولهای هیپوکامپ می شود. تاموکسیفن به تنها یکی این تغییرات پاتولوژیک را در هیپوکامپ باعث می شود؛ به عبارت دیگر تاموکسیفن به تنها یکی 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 سلولهای CA<sub>1</sub> هیپوکامپ متورم شده بودند و کریستالی خود را از دست داده بودند و غشاء خارجی میتوکندری همچنان که در مطالعات دیگر دیده شد، تخریب شده بود.<sup>(۲۷) و (۲۸)</sup>

بررسی روی مدل‌های حیوانی و تزریق تاموکسیفن، متورم شدن میتوکندری همراه با تخریب کریستالی 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<sub>21</sub>، متفاوت از گروه‌های دیگر است و اغلب یافته‌های این مطالعه شامل متراکم شدن هسته، فشرده شدن، توده‌ای شدن و به حاشیه

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

۱- تاموکسیفن باعث تغییرات نورودئنراتیو می گردد.

۲- تعداد نورون‌ها در نواحی مختلف هیپوکامپ شامل CA<sub>1</sub>, CA<sub>3</sub>, CA<sub>4</sub> و Subiculum در سنین مختلف، متفاوت می باشد.

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

توضیحی که می توان برای آسیب سلولی به دنبال تزریق تاموکسیفن داشت، این است که تاموکسیفن باعث حذف استروژن به عنوان فاکتور تکاملی می شود. این نتایج یافته‌های محققان دیگر که روی هیپوکامپ کار کرده بودند، سازگار است.<sup>(۱۱) و (۱۲)</sup>

در ناحیه CA<sub>1</sub>، 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<sub>1</sub> تغییرات آپوپتوز دیده شد و وجود تغییرات تخریبی، ۶ 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 می گیرند و مراحل مختلف مرگ سلولی هم در این تحقیق دیده شد که در سایر مطالعات هم دیده شده است.<sup>(۱۴) و (۱۶)</sup>

یافته‌های این مطالعه در مورد اثر استروژن بر تشکیل نواحی مختلف هیپوکامپ، موافق با سایر تحقیقات است.<sup>(۱۷)</sup> در این تحقیق با مهار اثرات استروژن، تعداد سلولها چندین ساعت بعد از تزریق کاهش یافته، این کاهش در تعداد سلولها

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 estradiol 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, progesterone and tamoxifen increase synaptic density of the hippocampus of ovariectomized 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- $\alpha$  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.

رانده شدن کروماتین، تخریب غشاء و متورم شدن میتوکندری همراه با از دست رفتن کریستا بود، که نشان دهنده مرگ سلولی است.<sup>(۳۱ و ۳۲)</sup>

### نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر مشخص شد که تاموکسیفن، بیشترین اثر را بر روی سلولهای ناحیه CA<sub>1</sub> دارد و دامنه این تغییرات در ناحیه CA<sub>1</sub> 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 - رسپتور استروژن - عنصر پاسخ 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.

- 19- Song DD, Shults CW, Sisk SA, Rockenstein E, Masliah E. Enhanced substantia nigra mitochondrial pathology in human  $\alpha$ -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. Apoptosis 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  $\beta$  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, Grosschedl R. Hippocampus development and generation of dentate gyrus granule cells is regulated by LEF1. *Development* 2000; 127: 469-82.

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

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

## *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.