

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

## موش صحرایی

### چکیده

زمینه و هدف: استروئیدهای 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، آنژیوژنیز، نوروژنیز و حفاظتی نوروژن‌ها دارد. در این مطالعه، اثر تاموکسیفن به عنوان آنتاگونیست استروژن بر فراساختار 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، ۴ رده سنی، شامل جنین فول ترم (E22)، نوزاد یک روزه (P1)، یک هفته (P7) و سه هفته (P21) 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 CA<sub>1</sub>، CA<sub>3</sub>، D.G، Subiculum و هیپوکامپ، به وسیله میکروسکوپ نوری و الکترونی مطالعه گردید. جهت آنالیز داده‌ها از آزمون آماری ANOVA و T-Test استفاده گردید که  $Pvalue < 0.05$  اختلاف آماری معنی‌داری را نشان می‌دهد.

یافته‌ها: نتایج مشخص می‌سازد که تراکم سلولی در نواحی CA<sub>1</sub> و سابیکولوم هیپوکامپ، کاهش می‌یابد و الکترومیکروگراف‌ها، پیکنوز شده هستند، متراکم شدن و حاشیه‌ای شدن کروماتین‌ها، پارگی غشا هسته، متورم شدن میتوکندری‌ها و تغییر ساختار کریستا در میتوکندری را، عمدتاً 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 نوروژنیز، 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

نوروز نجف‌زاده I

\*دکتر ملیحه نوبخت II

دکتر سید بهنام‌الدین جامعی III

پروانه طباطبایی IV

طیبه رستگار V

فرزانه محمدزاده V

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

### مقدمه

هورمون‌ها و فاکتورهای رشد و نوروترانسمیترها، سلولهای مغز را تحت تاثیر 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<sup>(۱-۳)</sup> و اثرات

(I) دانشجوی دکترای گروه علوم تشریح، 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 پیراپزشکی، 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 تشریح، 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>)، ۱۶ ساعت بعد از تولد (P<sub>1</sub>)، یک هفته (P<sub>7</sub>) و ۳ هفته 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 بلوک کننده رسپتور استروژن 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 پنتوباریتال داخل صفاقی به میزان ۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن و مادر آنها با ۲۰ میلی‌گرم پنتوباریتال 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 مجمه خارج گردید و بعد از جداسازی هیپوکامپ، نمونه‌ها جهت رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو، نیسل و میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفتند.

برای بررسی میکروسکوپ نوری، کل مغز 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>(۳-۵)</sup> 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.<sup>(۷ و ۶)</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 CA<sub>1</sub>، CA<sub>3</sub>، D.G و ساییکولوم 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 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، گلو تار آلدیید، پارافرمالیدیید، 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  $P_1$ ,  $P_7$ ,  $P_{21}$  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 ساییکولوم 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 ساییکولوم هم قابل مشاهده است اما کاهش تراکم نورونی در ناحیه ساییکولوم کمتر می‌باشد (شکل شماره ۱ و جدول شماره ۱).

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

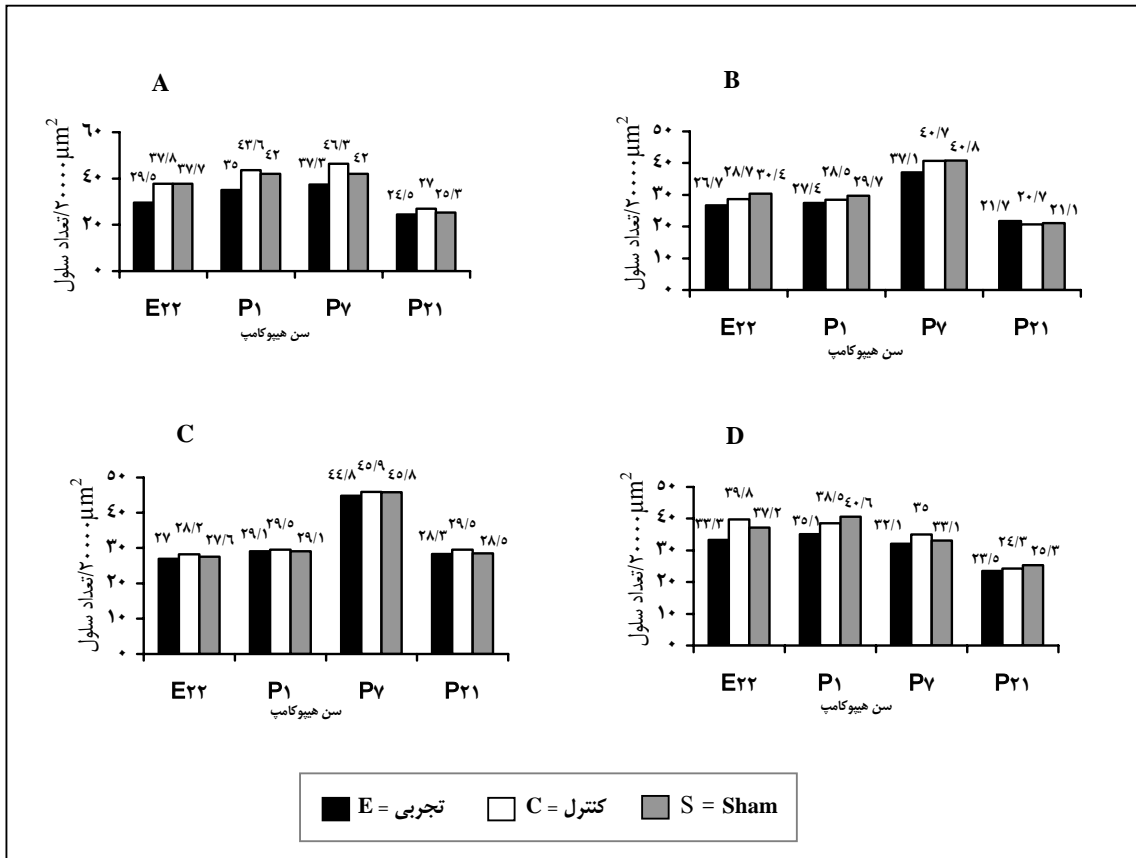
c: کنترل e: تجربی s: sham

		$CA_1$			$CA_3$			D.G.			Sub.		
		Mean $\pm$ SD	SE	Pvalue	Mean $\pm$ SD	SE	Pvalue	Mean $\pm$ SD	SE	Pvalue	Mean $\pm$ SD	SE	Pvalue
E <sub>22</sub>	C	۳۷/۸ ± ۵/۵	۱/۲	۰/۰۰۰	۲۸/۷ ± ۵/۵	۱/۲	۰/۲۲	۲۸/۲ ± ۴/۵	۱/۰	۰/۴۹	۳۹/۸ ± ۲/۹	۱/۳	۰/۰۰۰
	E	۲۹/۵ ± ۴/۰	۰/۹	۰/۰۰۰	۲۶/۷ ± ۴/۶	۱/۰	۰/۲۲	۲۷/۰ ± ۵/۵	۱/۲	۰/۴۹	۲۳/۳ ± ۲/۸	۰/۶	۰/۰۰۰
	S	۳۷/۷ ± ۵/۲	۱/۲	۰/۰۰۰	۳۰/۴ ± ۴/۲	۰/۹	۰/۲۲	۲۷/۶ ± ۵/۳	۱/۲	۰/۴۹	۳۷/۲ ± ۴/۲	۰/۹	۰/۰۰۰
P <sub>1</sub>	C	۴۳/۶ ± ۳/۶	۰/۸	۰/۰۰۰	۲۸/۵ ± ۴/۰	۰/۹	۰/۴۱	۲۹/۵ ± ۵/۱	۱/۱	۰/۸	۳۸/۵ ± ۴/۵	۱/۰	۰/۰۴۵
	E	۳۵/۰ ± ۵/۵	۱/۲۷	۰/۰۰۰	۲۷/۴ ± ۴/۲	۰/۹	۰/۴۱	۲۹/۱ ± ۵/۴	۱/۲	۰/۸	۳۵/۱ ± ۵/۳	۱/۲	۰/۰۴۵
	S	۴۲/۰ ± ۶/۷	۱/۰	۰/۰۰۰	۲۹/۷ ± ۳/۱	۰/۷	۰/۴۱	۲۹/۱ ± ۵/۰	۱/۱	۰/۸	۴۰/۶ ± ۴/۹	۱/۱	۰/۰۴۵
P <sub>7</sub>	C	۴۶/۳ ± ۶/۷	۱/۵	۰/۰۰۰	۴۰/۷ ± ۵/۵	۱/۲	۰/۴	۴۵/۹ ± ۸/۱	۱/۸	۰/۴	۳۵/۰ ± ۴/۰	۰/۹	۰/۰۳۸
	E	۳۷/۳ ± ۶/۳	۱/۴	۰/۰۰۰	۳۷/۱ ± ۳/۶	۰/۸	۰/۴	۴۴/۸ ± ۹/۰	۲/۰	۰/۴	۳۳/۱ ± ۴/۱	۰/۹	۰/۰۳۸
	S	۴۲/۰ ± ۴/۹	۱/۱	۰/۰۰۰	۴۰/۸ ± ۴/۳	۰/۹	۰/۴	۴۵/۸ ± ۶/۶	۱/۵	۰/۴	۳۳/۱ ± ۳/۹	۰/۹	۰/۰۳۸
P <sub>21</sub>	C	۲۷/۰ ± ۴/۲	۰/۹۷	>۰/۰۵	۲۰/۷ ± ۴/۳	۰/۹	۰/۴۹	۲۹/۵ ± ۱۱/۶	۱/۳	۰/۴۶	۲۴/۳ ± ۳/۹	۰/۹	۰/۰۵۸
	E	۲۴/۵ ± ۳/۶	۰/۸۳	>۰/۰۵	۲۱/۷ ± ۴/۵	۱/۰	۰/۴۹	۲۸/۳ ± ۴/۲	۰/۸	۰/۴۶	۲۳/۵ ± ۴/۲	۰/۹	۰/۰۵۸
	S	۲۵/۳ ± ۳/۱	۰/۷۲	>۰/۰۵	۲۱/۱ ± ۳/۲	۰/۷	۰/۴۹	۲۸/۵ ± ۳/۶	۰/۸	۰/۴۶	۲۵/۳ ± ۳/۴	۰/۷	۰/۰۵۸

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 ۰/۱-۰/۳ میکرومتر، تهیه و با تولویدین 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 ۴ ناحیه، با توجه به ۴ 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



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<sub>1</sub> تا هفته اول کاهش داده و هیچ اثری در هفته سوم نداشته است. P<sub>1</sub> در P<sub>7</sub> و E<sub>22</sub> کمتر از ۰/۰۵ بود.

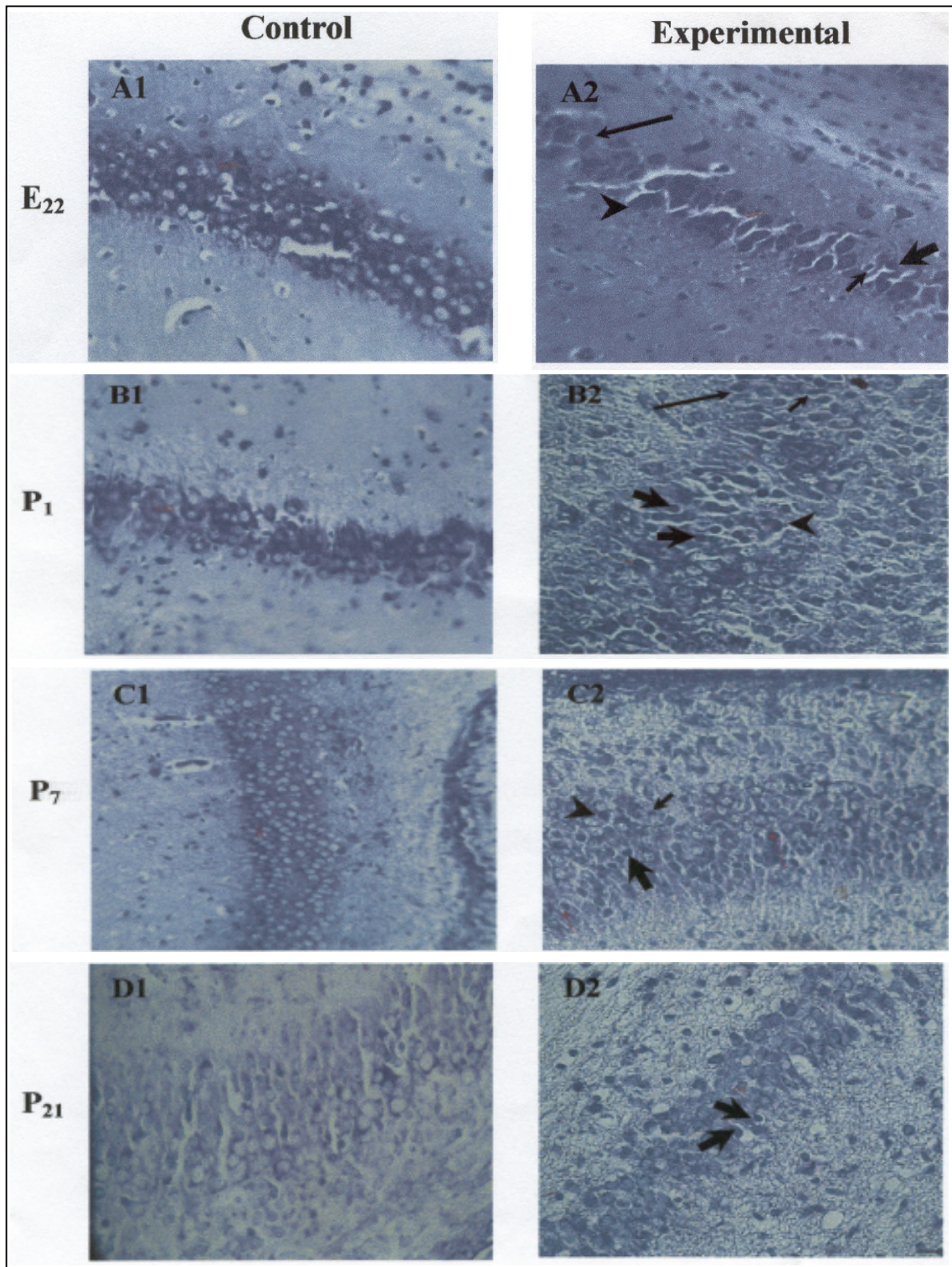
(B) تاموکسیفن تاثیری بر تعداد سلولها در ناحیه CA<sub>3</sub> نداشته است (P<sub>value</sub> < ۰/۰۵).

(C) تاموکسیفن تاثیری بر تعداد سلولها در ناحیه DG نداشته است (P<sub>value</sub> < ۰/۰۵).

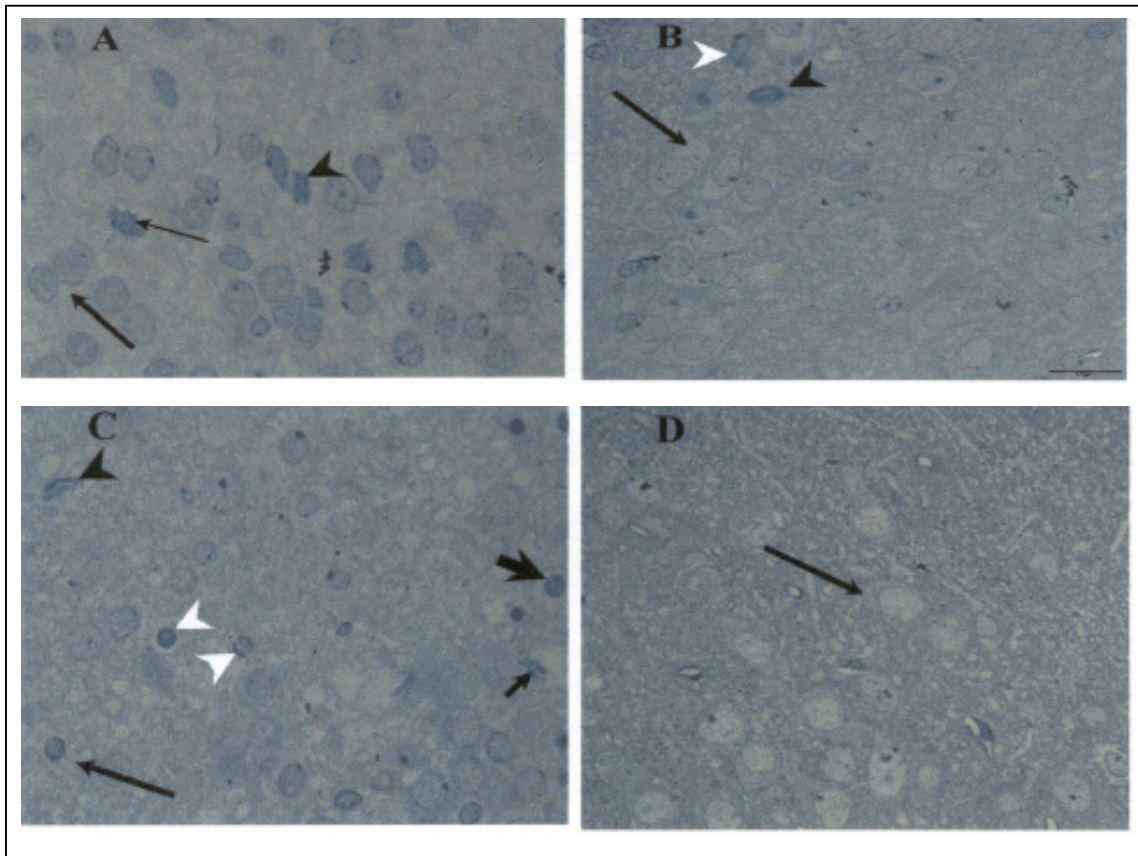
(D) تاموکسیفن تعداد سلولها را در ناحیه Subiculum تا هفته اول کاهش داده و هیچ اثری در هفته سوم نداشته است. P<sub>1</sub> در E<sub>22</sub> و P<sub>7</sub> کمتر از ۰/۰۵ بوده است.

در رنگ آمیزی نیسل با رنگ پذیری 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>7</sub>، P<sub>1</sub> و E<sub>22</sub> بود، در حالی که تغییرات پاتولوژیک در هفته سوم مشاهده نگردید. همچنین تراکم نورونی در ناحیه سایکولوم، کاهش کمی را نشان داد. میتوکندری و هسته سلولهای CA<sub>1</sub> در گروه کنترل و sham نرمال بودند (شکل شماره ۲ و ۳).



**شکل شماره ۲-** فتوگراف نورون‌های نواحی CA<sub>1</sub> در E<sub>22</sub>(A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>) و 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 P<sub>21</sub>(D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>) هیپوکامپ با رنگ آمیزی 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 (نوک پیکان تیره) شدیداً رنگ شده، هسته‌های متراکم (پیکان ضخیم) با غشاء نامنظم (پیکان نازک)، همراه فشردگی هسته (پیکان کوتاه)، توده‌ای شدن کروماتین (پیکان بلند) در E<sub>22</sub>، P<sub>7</sub> و P<sub>1</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.

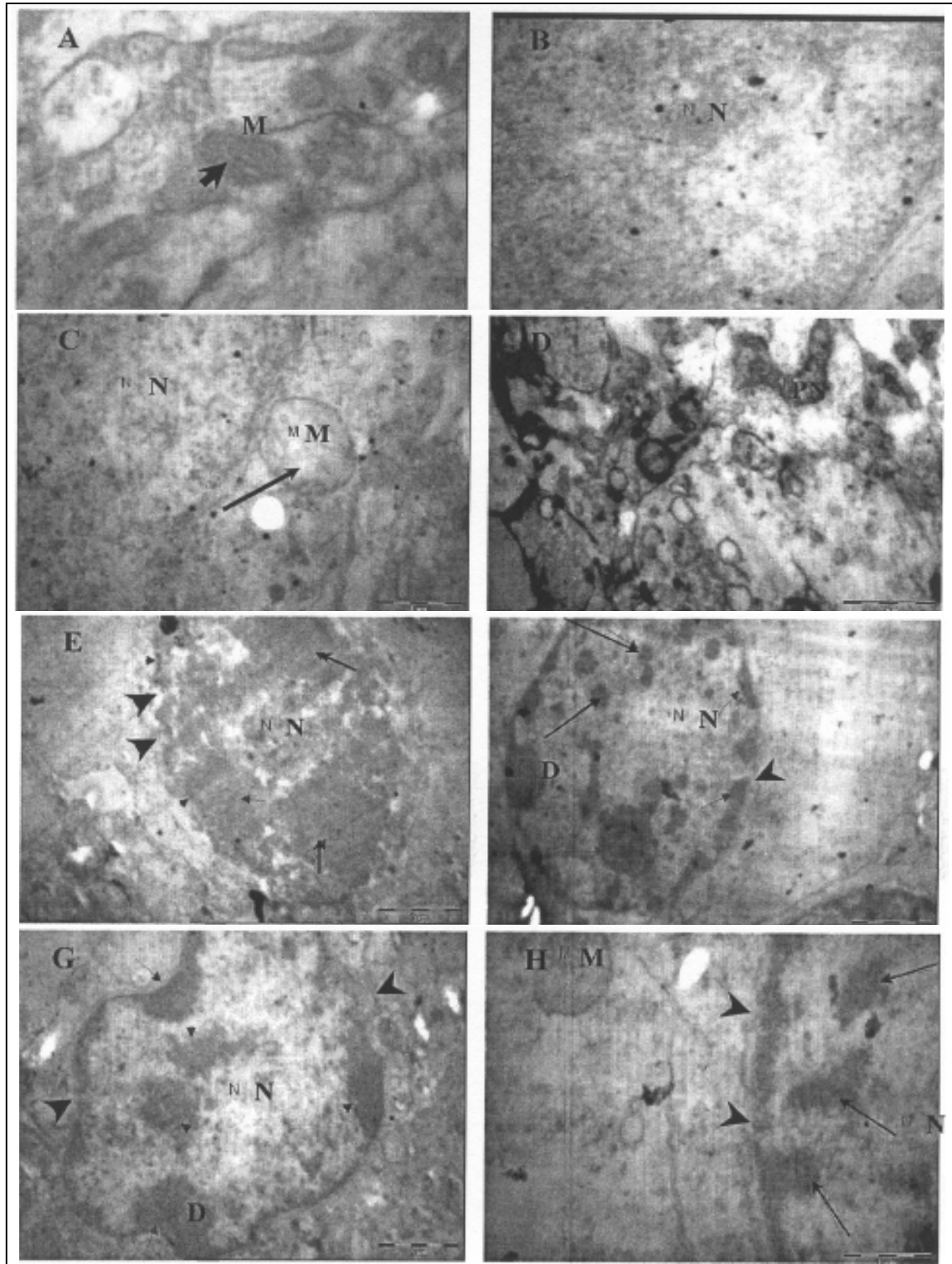


**شکل شماره ۳-** فتومیکروگراف از برشهای نیمه نازک رنگ‌آمیزی شده با تولویدین بلو: این نمونه‌ها یعنی نورون‌های CA<sub>1</sub> در (A)E<sub>22</sub>، (B)P<sub>1</sub>، (C)P<sub>7</sub> و (D)P<sub>21</sub> فقط نمونه‌های تجربی می‌باشند که تغییرات در جنین فول ترم نسبت به روز اول و هفته اول بعد از تولد بیشتر 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 واکنله (پیکان کوتاه) نمایان گردید که این تغییرات در P<sub>21</sub> بسیار کم بود. این مشاهدات یافته‌های حاصل از رنگ‌آمیزی نیسل را تأیید می‌کنند و چون اساس تهیه نمونه‌های اولتراستراکچر می‌باشد، نیازی به کنترل ندارد.

به صورت نرمال مشاهده شد. بعد از تجویز تاموکسیفن، تغییرات واضح دژنراتیو در ناحیه CA<sub>1</sub> طی روزهای P<sub>21</sub>، P<sub>7</sub>، P<sub>1</sub> و E<sub>22</sub> 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 ۴) 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.

با استفاده از بلوکهای رزینی، برشهای نیمه ضخیم با رنگ‌آمیزی تولویدین 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 واکنله شدن سیتوپلاسم است که یافته‌های رنگ‌آمیزی نیسل را تأیید می‌نماید.

الکترومیکروگراف‌های ناحیه CA<sub>1</sub> در هیپوکامپ در روزهای P<sub>1</sub>، P<sub>7</sub>، P<sub>21</sub> و E<sub>22</sub> 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



**شکل شماره ۴-** الکترومیکروگرافهای ناحیه CA<sub>1</sub> 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 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 کریستاهای (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<sub>1</sub>, P<sub>7</sub> و E<sub>22</sub> مشاهده شده است.

## 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<sub>1</sub>، CA<sub>3</sub>، 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. (۱۱-۱۳)

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 می‌گیرند و مراحل مختلف مرگ سلولی هم در این تحقیق دیده شد که در سایر مطالعات هم دیده شده است. (۱۴-۱۶)

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. (۱۸ و ۱۹) تعداد نورون‌ها در ناحیه CA<sub>1</sub> و ساییکولوم به صورت قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت، استفاده از استروژن از این تغییرات جلوگیری می‌کند. (۲۰ و 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. (۲۳ و ۲۴) در حالی که سایر تحقیقات، تعداد نورون‌های ثابتی را در کل دوره زندگی (۲۵) در ناحیه CA<sub>3</sub> گزارش کرده‌اند. (۲۶)

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 (۲۰۰۴) (۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳) گزارش شده است: میتوکندری سلولهای CA<sub>1</sub> 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. (۲۹ و 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<sub>21</sub>، متفاوت از گروه‌های دیگر است و اغلب یافته‌های این مطالعه شامل متراکم شدن هسته، فشرده شدن، توده‌ای شدن و به حاشیه



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 Neurobiol* 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. (۲۷ و ۳۱)

### نتیجه گیری

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 (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.

- 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, Detolledo-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.

