Archive of SID

Resrarch Paper

The Effect of NO System on Ethidium Bromide-Induced Oxidative Stress in the Hippocampal Formation of Male Rats

Zahedeh Rhimluoye Marjani[1], Ali Reza Alihemati[2], Homeira Hatami Nemati[1], *Hatam Ahmadi[3]

1. Department of Animal Biology, Faculty of Natural Sciences, Tabriz University, Tabriz, Iran.
2. Department of Histology & Embryology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
3. Department of Basic Sciences, Farhangian University, Tehran, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Rhimluoye Marjani Z, Ali hemati AR, Hatami Nemati H, Ahmadi H. The Effect of NO System on Ethidium Bromide-Induced Oxidative Stress in the Hippocampal Formation of Male Rats. The Journal of Qazvin University of Medical Sciences. 2019; 23(3):190-201. https://doi.org/10.32598/JQUMS.23.3.190

https://doi.org/10.32598/JQUMS.23.3.190

CC BY NC

Received: 28 Feb 2019
Accepted: 11 Jun 2019
Available Online: 01 Aug 2019

Keywords:
Ethidium bromide, Nitric oxide, Oxidative stress

ABSTRACT

Background Acute and chronic effects of nitric oxide on oxidative stress and neuronal demyelination have been reported in human and animal models.

Objective Oxidative stress is involved in the pathogenesis of demyelinated animals; thus, this study investigated the effects of nitric oxide system and ethidium bromide on oxidative stress in the hippocampal formation.

Methods This experimental study was performed on eight groups of male rats, as follows: control, control, ethidium bromide, L-Arginine, L-NAME, ethidium bromide + L-Arginine, ethidium bromide + L-NAME, and ethidium bromide + L-Arginine + L - NAME. Three days after the injection of drugs into the hippocampal CA1 area, hippocampal biopsy was performed, and oxidative stress parameters were measured in this area. One-way analysis of variance (ANOVA) and posthoc tests were used for data analysis.

Findings Injection of 3 µL ethidium bromide into the CA1 region increased oxidative stress parameters ($P<0.01$). Injection of 15.3 µg/rat L-Arginine in this region stopped the response of ethidium bromide ($P<0.05$, $P<0.01$); while, the injection of 15.1 µg/rat L-NAME failed to return the effects of the ethidium bromide. Moreover, the combination of 15.3 µg/rat L-Arginine and 15.1 µg/rat L-NAME only returned lipid peroxidation caused by the injection of 3 µL of ethidium bromide to normal ($P<0.05$); this process failed to improve antioxidant enzymes.

Conclusion The obtained results suggested the excitatory effect of the nitric oxide system on alleviating oxidative stress induced by ethidium bromide in the CA1 region of male rats.

Extended Abstract

1. Introduction

The mechanism of tissue damage in demyelinating diseases of the central nervous system is ill-defined; however, a wealth of evidence supports the role of oxidative stress and lipid peroxidation in the absence of equilibrium between the production of free radicals and intrinsic antioxidant mechanisms [2, 3]. The antioxidant enzymes expressed in brain cells protect the neurons against reactive oxygen species and nitrogen [7]. Ethidium bromide (EB) causes the death of oligodendrocytes by producing free radicals and inducing oxidative stress, but this neurological

* *Corresponding Author:*
Hatam Ahmadi
Address: Department of Basic Sciences, Farhangian University, Tehran, Iran.
Tel: +98 (413) 5557199
E-Mail: hahmadi@cfu.ac.ir

www.SID.ir

damage may be restored to the physiological capacity of the central nervous system (CNS) [3].

The nitric oxide (NO) produced by nitric oxide synthesis, has beneficial effects in low amounts, but harmful effects in pathologic conditions [9]. The harmful effects of NO are due to lipid peroxidation, as well as decreasing antioxidant activity, causing oxidative stress [10]. NO level increases in the serum of patients with multiple sclerosis [12]. Previous studies have reported the antioxidant effects of NO [13].

The present study aimed to investigate the effect of injections of EB, L-arginine, and L-NAME (as well as their interaction) on the oxidative stress condition in the CA1 region of the hippocampus in male rats.

2. Materials and Methods

In this study, male wistar rats were used (Mean±SD weight: 200±50 g). The drugs used in this study were EB (for demyelination), L-NAME (nitric oxide inhibitor), and L-arginine (nitric oxide stimulant). Ketamine and xylazine were used for anesthesia.

First, the animals were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine and xylazine. Then, the rats were placed in stereotactic devices, and the left CA1 region of the hippocampus was cannulated. During the five to seventh days of post-surgical recovery, the rats were ready for injection and test. All injections were administered on the left side of the hippocampus CA1 region.

Eight experimental groups of 7 male rats in each were selected: Control group, Control group, and five experimental groups that received EB, L-arginine, L-NAME, EB + L-arginine, EB + L-NAME, and the EB + L-arginine + L-NAME. Drug injection per microgram for each rat was based on previous studies [16, 17]. The hippocampus was isolated from the brain of rats and the homogeneous tissues from the hippocampus used for biochemical analyses [13].

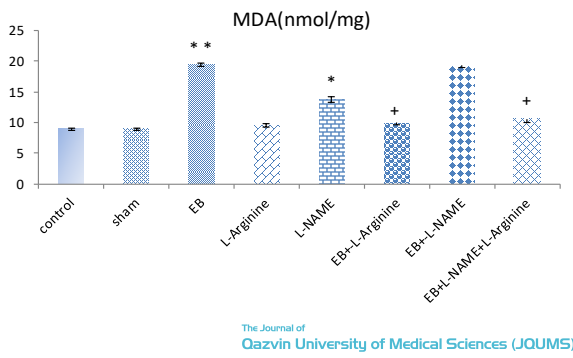
Lipid peroxidation by measuring the level of malondialdehyde (MDA), the activity of enzymes of glutathione peroxidase (GPX), and super oxide dismutase (SOD) in the homogenized tissue of the hippocampus was measured [19, 20]. The one-way ANOVA test and Tukey post hoc test were used to compare the differences between the experimental groups. The significant difference was set at P<0.05.

3. Results

One-way ANOVA and post hoc Tukey analysis showed that injection of 3 µL of EB in the CA1 region of the hippocampus significantly increased the MDA level (Figure 1; P<0.01) and decreased the activity of GPX (Figure 2; P<0.01) and SOD (Figure 3; P<0.01). Applying a dose of 0.15 µg L-NAME in the CA1 region of the hippocampus resulted in a significant increase in the MDA level (Figure 1; P<0.05), and a decrease in the activity of the GPX (Figure 2; P<0.05) and SOD (Figure 3; P<0.05).

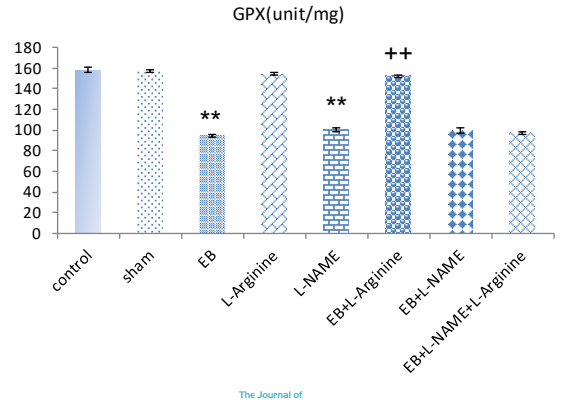
The injection of the dose of 15.3 µg of L-arginine in the CA1 region of the hippocampus decreased the response of EB on the MDA (Figure 1; P<0.05), GPX (Figure 2; P<0.01) and SOD (Figure 3; P<0.05).

The injection of the combination dose of 15.3 µg of L-arginine and 15.1 µg of L-NAME in the CA1 region of the hippocampus reduced the response of ethidium bromide to the MDA parameter (Figure 1; P<0.05).



The Journal of
Qazvin University of Medical Sciences (JQUMS)

Figure 1. The effect of ethidium bromide, L-arginine and L-NAME injection alone and in combination on the left side of the CA1 hippocampus on lipid peroxidation (malondialdehyde) in male rats



The Journal of
Qazvin University of Medical Sciences (JQUMS)

Figure 2. The effect of ethidium bromide, L-arginine and L-NAME injection alone and in combination on the left side of the CA1 hippocampus on glutathione peroxidase in male rats

www.SID.ir

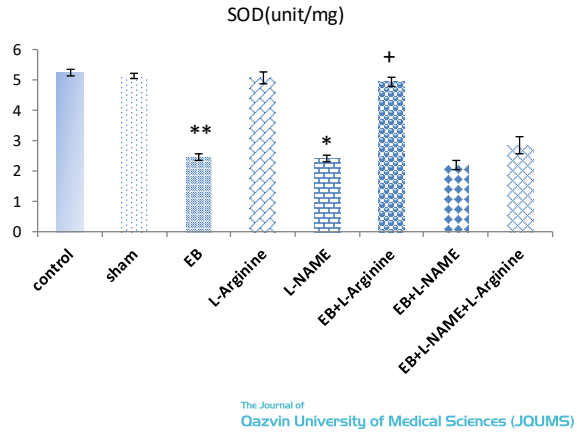


Figure 3. The effect of ethidium bromide, L-arginine and L-NAME injection and their combination on the left side of the CA1 hippocampus on superoxide dismutase in male rats

4. Conclusion

Based on previous study, EB injection in the CA1 region of the hippocampus in male rat decreases antioxidant enzymes [21]. The study showed that injection of EB as a cause of demyelination significantly increased oxidative stress in the injection site (CA1 region of the hippocampus) in adult male rats.

The data obtained in this study showed that L-NAME (nitric oxide inhibitor) injection decreases the activity of antioxidant GPX and SOD, and increases MDA, which suggest reducing oxidative stress. Also, the use of L-arginine as a stimulant for the production of NO in the CA1 region of the hippocampus does not affect the activity of antioxidant enzymes [7]. The findings of the study showed that the amount of these enzymes decreases in the presence of NO inhibition.

The results of this study are consistent with some previous reports, but inconsistent with some others [21, 22]. They showed that L-arginine injection stopped the response of EB to oxidative stress. Pre-treatment using NO donors can reduce the oxidative stress induced by the injection of EB by increasing the amount of antioxidant enzyme (GSH) [30]. Besides, the present study showed that L-NAME injection does not significantly alter the antioxidant enzymes in EB-induced demyelinated rats.

The results also indicated that co-administration of L-arginine and L-NAME in the CA1 region of the hippocampus of EB-induced demyelinated rats, although reducing the response of EB to lipid peroxidation is not capable of improving the activity of the antioxidant enzymes SOD and GSH.

Based on the results of this study, the local and acute injection of NO into the CA1 region of the hippocampus has reduced the parameters of oxidative stress (increased antioxidant status). Therefore, NO increase in this area from myelin degradation rats recovers the neurons in the region.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

All ethical standards for working with laboratory animals have been observed.

Funding

The present paper is derived from the MSc. thesis of the first author, Zahedeh Rhimluoye Marjani, in the Animal Biology Department of Tabriz University.

Authors' contributions

Conceptualization, methodology, and supervision: Alireza Alihemati, Homeira Hatami Nemati; Research: Zahedeh Rahimluoye Marjani; Drafting: Hatam Ahmadi.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors appreciate the close cooperation of the Research Assistant of Tabriz University for providing the funding.

www.SID.ir

بررسی اثر سیستم نیتریک‌اکساید بر استرس اکسیداتیو ناشی از اتیدیوم بروماید در تشکیلات هیپوکامپ موش صحرایی نر

زاهده رحیملوی مرجانی[۱]، علی رضا علی همتی[۲]، حمیرا حاتمی نعمتی[۱]، *حاتم احمدی[۳]

۱- گروه زیست جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۲- گروه بافت‌شناسی و جنین‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.
۳- گروه علوم پایه، دانشگاه فرهنگیان، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۲۰ اسفند ۱۳۹۷
تاریخ پذیرش: ۲۱ خرداد ۱۳۹۸
تاریخ انتشار: ۱۰ مرداد ۱۳۹۸

چکیده

زمینه نقش حاد و مزمن نیتریک‌اکساید بر استرس اکسیداتیو و موارد دمیلیناسیون نورونی در انسان و مدل‌های حیوانی گزارش شده است.

هدف با توجه به اینکه استرس اکسیداتیو در بیماری‌زایی مدل‌های دمیلین‌شده دخیل است، این مطالعه تداخل اثر سیستم نیتریک‌اکساید و اتیدیوم بروماید بر استرس اکسیداتیو در تشکیلات هیپوکامپ را بررسی کرده است.

مواد و روش‌ها این مطالعه تجربی روی هشت گروه موش‌های صحرایی نر شامل: کنترل، شاهد، اتیدیوم بروماید، L-Arginine، L-NAME، اتیدیوم بروماید+ L-Arginine، اتیدیوم بروماید+ L-NAME و اتیدیوم بروماید+ L-NAME + L-Arginine صورت گرفته است. سه روز پس از تزریق داروها به ناحیه CA1 هیپوکامپ، نمونه‌برداری از هیپوکامپ انجام و شاخص‌های استرس اکسیداتیو در این ناحیه سنجیده شد. از آزمون‌های آماری آنووای یک‌طرفه و post hoc برای بررسی داده‌ها استفاده شد.

یافته‌ها تزریق دُز سه میکرولیتر اتیدیوم بروماید به ناحیه CA1 موجب افزایش شاخص‌های استرس اکسیداتیو شد ($P<0/01$). تزریق دُز ۱۵/۳ میکروگرم L-Arginine برای هر رت در این ناحیه، پاسخ ناشی از اتیدیوم بروماید را متوقف کرد ($P<0/05$ و $P<0/01$)، در صورتی که تزریق دُز ۱۵/۱ میکروگرم L-NAME برای هر رت اثرات ناشی از تزریق اتیدیوم بروماید را برگشت نداد. همچنین تزریق توأمان دُزهای ۱۵/۳ میکروگرم L-Arginine و ۱۵/۱ میکروگرم L-NAME برای هر رت منحصراً پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از دُز سه میکرولیتر اتیدیوم بروماید را به حالت طبیعی برگرداند ($P<0/05$)، در حالی که قادر به بهبودی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نشد.

نتیجه‌گیری نتایج بیانگر اثر تحریکی سیستم نیتریک‌اکساید بر بهبودی استرس اکسیداتیو القاشده از اتیدیوم بروماید در ناحیه CA1 موش‌های صحرایی نر است.

کلیدواژه‌ها:
اتیدیوم بروماید، نیتریک‌اکساید، استرس اکسیداتیو

مقدمه

مالتیپل اسکلروزیس[1] بیماری خودایمنی است که در آن میلین اطراف اکسون‌های عصبی، محیطی و مرکزی تخریب شده و موجب اختلال در سیستم عصبی مرکزی می‌شود. علاوه بر این، تخریب میلین نورون‌ها (دمیلیناسیون)[2] در شرایط دیگری مانند ایسکمی مغزی و در معرض توکسین قرارگرفتن رخ می‌دهد [۱]. مکانیسم آسیب بافتی در بیماری‌های دژنراتیو سیستم عصبی مرکزی کاملاً مشخص نشده است، اما شواهد زیادی نقش استرس اکسیداتیو و نیتروزاتیو را به دلیل عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی درون‌زاد در این باره پشتیبانی می‌کند [۲،۳].

تولید رادیکال‌های آزاد به پراکسیداسیون لیپیدی در مغز بیماران مبتلا به آلزایمر، پارکینسون و مالتیپل اسکلروزیس منجر می‌شود[۴]. بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس تولید بالاتری از رادیکال‌های آزاد را در خون دارند [۵]. گزارش مربوط به بررسی پلاک‌های مالتیپل اسکلروز نشان‌دهنده افزایش اکسیداسیون لیپیدها و DNA است [۶]. مهم‌ترین دفاع

1. Multiple Sclerosis
2. Demyelination

* **نویسنده مسئول:**
حاتم احمدی
نشانی: تبریز، دانشگاه فرهنگیان، گروه علوم پایه.
تلفن: ۵۵۵۷۱۹۹ (۴۱۳) ۹۸+
رایانامه: hahmadi@cfu.ac.ir

www.SID.ir

آنتی‌اکسیدانی با سوپراکسید دسموتاز[3]، کاتالاز و گلوتاتیون احیاشده[4] شکل می‌گیرد. این آنزیم‌ها در سلول‌های مغزی به منظور حفاظت از نورون‌ها در برابر گونه‌های واکنشی اکسیژن و نیتروژن بیان می‌شوند [۷]. اتیدیوم بروماید[5] به عنوان یک داروی تخریب‌کننده DNA، به طور گسترده به منظور دمیلیناسیون در ایجاد مدل‌های تجربی جوندگان استفاده می‌شود [۳]. اتیدیوم بروماید[6] با تولید رادیکال‌های آزاد و القای استرس اکسیداتیو موجب مرگ سلول‌های الیگودندروسیت می‌شود، اما این آسیب عصبی ممکن است با ظرفیت فیزیولوژیک سیستم عصبی مرکزی ترمیم شود [۳].

نیتریک‌اکساید[7] مولکولی گازی است که عمدتاً توسط آنزیم نیتریک‌اکسید سنتاز[8] موجود در سلول‌های دیواره عروق، نوروگلیا و نورون‌ها از اکسیداسیون ال‌آرژنین سنتز می‌شود و به‌سهولت به بافت‌های مجاور منتشر می‌شود [۸]. NO تولید شده توسط NOS ممکن است هر دو نقش دوست و دشمن را برای بدن داشته باشد؛ به طوری‌که به مقدار کم در بافت‌ها دارای اثرات مفید و تحت شرایط پاتولوژیک دارای اثرات مضر و نامناسب است [۹]. اثرات مضر NO بر پاتوژن‌ها یا حتی سلول‌های سالم به علت ترکیب آن با سوپراکسید (O_2^-) و ایجاد فراورده ثانویه آن یعنی آنیون پروکسی‌نیتریت[9] است که از گونه‌های واکنشی نیتروژن[10] است و با تخریب DNA، پروتئین‌ها و پراکسیداسیون لیپیدها و نیز کاهش فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی باعث بروز استرس اکسیداتیو می‌شود [۱۰]. شواهد فراوانی به نقش NO در بیماری مالتیپل اسکلروزیس و ارتباطش با فرایندهای مختلف از جمله: اختلال التهابی، آسیب الیگودندروسیت‌ها، تغییر در انتشار سیناپسی، انحطاط اکسونی و مرگ عصبی در انسان و مدل‌های حیوانی دلالت دارد [۱۱]. اکسیدنیتریک در سرم بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروز افزایش می‌یابد [۱۲]. اثرات آنتی‌اکسیدانی برای اکسیدنیتریک در گزارش محققین قبلی آمده است [۱۳].

با توجه به تغییر در شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی و بروز استرس اکسیداتیو در شرایط تخریب میلین نورونی و نقش‌های متضاد NO در این زمینه و همچنین نبود پیشینه مطالعاتی مبنی بر بررسی اثر مستقیم تجویز توأم L-Arginine و L-NAME به عنوان تحریک‌کننده و مهارکننده سیستم نیتریک‌اکساید در مدل‌های آزمایشگاهی دمیلین‌شده، هدف پژوهش حاضر بررسی اثر تزریق اتیدیوم بروماید، L-Arginine و L-NAME و نیز تداخل اثر آن‌ها بر وضعیت استرس اکسیداتیو در ناحیه CA هیپوکامپ رت‌های نر است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی از ۵۶ موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۵۰±۲۰۰ گرم استفاده شد. به منظور کاهش استرس و عادت به شرایط آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری در دانشکده زیستی دانشگاه تبریز، جانوران به مدت دو هفته در گروه‌های پنج‌تایی در شرایط دمای ثابت محیطی (۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد) و تنظیم نور با دوره تاریکی روشنایی ۱۲ساعته (روشنایی از ساعت هفت صبح) نگهداری می‌شدند. هنگام کار با رت‌ها موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد. علت انتخاب موش‌های نر، ساده تربودن سیستم هورمونی و نیز تداخل کمتر هورمون‌های جنسی با داروها بود.

داروهای موردبررسی در این پژوهش عبارت بودند از: اتیدیوم بروماید (به منظور دمیلیناسیون)، L-NAME، مهارکننده و L-Arginine، تحریک‌کننده سیستم نیتریک‌اکساید. داروهای تزریقی ذکرشده از شرکت Sigma, St Louis, MO, USA خریداری شده بودند. داروها بلافاصله قبل از آزمایش‌ها در محلول سالین استریل ۰/۹ درصد حل شدند. برای بیهوش‌کردن حیوانات از داروهای بیهوشی کتامین و زایلازین متعلق به شرکت Alfasan Chemical Co, Woerden, and Holland استفاده شد.

جانوران ابتدا با تزریق درون‌صفاقی ۰/۱ میلی‌لیتر از مایع بیهوشی (۱۰۰ کیلوگرم / میلی‌گرم از وزن کتامین و پنج کیلوگرم / میلی‌گرم زایلازین) برحسب کیلوگرم از وزن رت‌ها بیهوش و سپس در دستگاه استریوتاکسی قرار داده شدند. با استفاده از اطلس پاکسینوس و واتسون مختصات مغز رت، مشخصات طرف چپ ناحیه CA1 هیپوکامپ را به دست آمد و کانول‌گذاری صورت گرفت (شکل شماره ۱). در پنج تا هفتمین روز دوره بهبودی بعد از جراحی، موش‌ها آماده تزریق و آزمون بودند. برای تزریق دارو، در روز اجرای آزمون از سرنگ همیلتون ۱۰ میکرولیتری استفاده شد.

حجم تزریق برای تمام داروها در هر نوبت سه میکرولیتر به مدت سه دقیقه (یک میکرولیتر در هر دقیقه) بود. الگوی حجم تزریق و مدت‌زمان آن بر پایه تحقیقات قبلی و نیز پاسخ دُز دارویی بوده است [۳، ۱۴، ۱۵]. تمام تزریق‌های دارویی در طرف چپ ناحیه CA1 هیپوکامپ صورت گرفت.

در این مطالعه گروه‌های آزمایشی هفت‌تایی به شرحی که در ادامه می‌آید انتخاب شدند: گروه کنترل که هیچ‌گونه تیماری نشد. گروه شاهد که یک میکرولیتر سالین در هر نوبت یک‌دقیقه‌ای را به مدت پنج روز دریافت کردند. گروه اتیدیوم بروماید، که تک‌دز سه میکرولیتر اتیدیوم بروماید ۰/۰۱ را پنج روز دریافت کردند. گروه ال‌آرژنین، که دُز ۱۵/۳ میکروگرم L-Arginine برای هر رت را پنج روز دریافت کردند. گروه L-NAME، که دُز ۱۵/۱ میکروگرم L-NAME برای هر رت را پنج روز دریافت کردند. گروه

3. Super oxide dismutase (SOD)
4. Reduced glutathione (GSH)
5. Ethidium bromide
6. EB
7.Nitric oxide (NO)
8. NOS
9. Peroxynitrite
10. Reactive nitrogen species (RNS)

www.SID.ir

اتیدیوم بروماید+ L-Arginine ، که یک هفته بعد از دریافت دُز سه میکرولیتر از اتیدیوم بروماید، دُز ۱۵/۳میکروگرم L-Arginine را پنج روز دریافت کردند. گروه اتیدیوم بروماید +L-NAME، یک هفته بعد از دریافت دُز سه میکرولیتر اتیدیوم بروماید، دُز ۱۵/۱ میکروگرم L-NAME برای هر رت را به مدت پنج روز دریافت کردند و در گروه هشتم، اتیدیوم بروماید + L-Arginine + L-NAME، یک هفته بعد از دریافت دُز سه میکرولیتر اتیدیوم بروماید، دُز ۱۵/۳ میکروگرم L-Arginine و با فاصله زمانی پنج دقیقه بعد از آن، دُز ۱۵/۱ میکروگرم L-NAME را پنج روز دریافت کردند. تزریق دارویی برحسب میکروگرم برای هر رت بر اساس منابع قبلی است [۱۶، ۱۷].

سپس موش‌ها با پنبه آغشته به اِتر، بیهوش و سر حیوان توسط گیوتین جدا می‌شد. سپس هیپوکامپ از مغز جدا می‌شد و بلافاصله در نیتروژن مایع ۸۰- درجه سانتی‌گراد به صورت فریزر نگهداری شدند. به منظور تهیه هموژن بافتی از هیپوکامپ، روی هریک از نمونه‌ها محلول سرد کلرید پتاسیم[11] ۰/۰۱۵ با نسبت (وزنی‌حجمی ۱:۱۰) اضافه شد. هموژن بافتی با استفاده از هموژنایزر مکانیکی تهیه شد. بعد از سانتریفیوژکردن در دور سه هزار به مدت ۱۰ دقیقه[12] در دمای چهار درجه سانتی‌گراد، محلول شفاف رویی از رسوب زیرین جدا شد تا برای تحلیل‌های بیوشیمیایی استفاده شود [۱۳]. به منظور تأیید محل تزریق داروها، ابتدا از هر گروه آزمایشی یک موش به طور تصادفی انتخاب و توسط کلروفرم کشته می‌شد و مغز جانور توسط دستگاه میکروتوم ویبرواسلایس برش داده و تصاویر این برش‌ها با اطلس پاکسینوس و واتسون مقایسه می‌شد (شکل شماره ۱) [۱۸].

لیپید پراکسیداسیون با سنجش میزان مالون دی آلدئید[13] در بافت هموژنیزه هیپوکامپ بررسی می‌شود. پراکسیداسیون لیپیدی بر پایه میزان واکنش MDA با تیوباربیتوریک اسید و ایجاد TBARS[14] در بافت هموژن‌شده اندازه‌گیری شد. میزان واکنش با TBARS در محلول رویی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر تعیین شد. نتایج به صورت نانومول در میلی‌گرم پروتئین بیان شد [۱۹]. فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز[15] با استفاده از روش پاگلیا[16] و والنتین[17] اندازه‌گیری شد. مقادیر به‌دست‌آمده به صورت واحد در میلی‌گرم پروتئین بیان شدند. همچنین برای سنجش فعالیت آنزیم SOD از روش اتواکسیداسیون پیروگالول بر اساس روش Delmas و Beau-viex در سال ۱۹۹۵ استفاده شد. فعالیت SOD در طول موج ۵۰۵ نانومتر از طریق طیف‌سنجی محلول رویی اندازه‌گیری شد. فعالیت اختصاصی آنزیم SOD به صورت واحد در میلی‌گرم پروتئین بیان شد [۲۰].

سنجش مقدار MDA و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی GPx و SOD در بین گروه‌های مختلف به کمک آزمون آنووای یک‌طرفه و با استفاده از نسخه ۱۶ نرم‌افزار SPSS انجام شد. بعد از معنی‌داربودن تفاوت‌ها، برای مقایسه تفاوت گروه‌های آزمایشی از آزمون Post hoc Tukey استفاده شد. سطح معنی‌داربودن تفاوت گروه‌ها P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد. نمودارها با استفاده از نسخه 2010 نرم افزار Excel رسم شد.

یافته‌ها

تزریق دُز سه میکرولیتر اتیدیوم بروماید در ناحیه CA1 هیپوکامپ (شکل شماره ۱)، موجب افزایش معنی‌دار میزان MDA و نیز کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گلوتاتیون پراکسیداز و SOD رت‌ها نسبت به گروه کنترل می‌شود(P<۰/۰۱) (شکل‌های شماره ۴-۲) . تزریق دُز ۱۵/۳ میکروگرم L-Arginine به این ناحیه از مغز موش صحرایی در شاخص‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو تغییر معنی‌داری ایجاد نمی‌کند (شکل‌های شماره ۴، ۳، ۲).

همچنین نتایج تحقیق نشان داد اعمال دُز ۱۵/۱ میکروگرم L-NAME در ناحیه CA1 هیپوکامپ موجب افزایش معنی‌دار میزان MDA (P<۰/۰۵) و نیز کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گلوتاتیون پراکسیداز (P<۰/۰۱) و SOD (P<۰/۰۵) نسبت به گروه کنترل شد (شکل‌های شماره ۴، ۳، ۲). نتایج نشان داد تزریق اتیدیوم بروماید و L-NAME در ناحیه CA1 هیپوکامپ مغز موش‌های صحرایی، با کاهش مقدار NO مغزی موجب افزایش میزان لیپید پراکسداسیون و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود، در صورتی که افزایش حاد مقدار NO ناشی از تزریق L-Arginine در این ناحیه از مغز رت‌ها، تأثیری بر شاخص‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو ندارد.

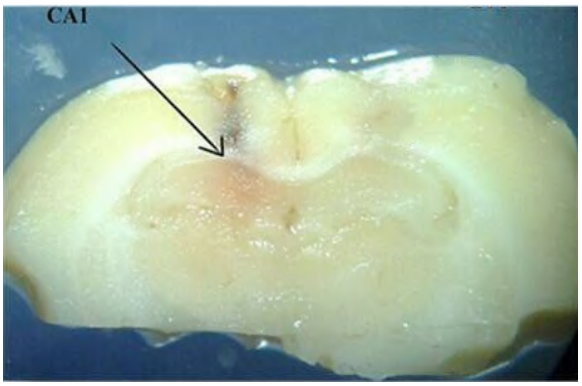
تزریق دُز بی‌اثر ۱۵/۳میکروگرم L-Arginine در ناحیه CA1 هیپوکامپ موجب توقف پاسخ اتیدیوم بروماید بر مقدار MDA (P<۰/۰۵)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) (P<۰/۰۱) و سوپراکسید دسموتاز (SOD) (P<۰/۰۵) در گروه اتیدیوم بروماید+ L-Arginine می‌شود (شکل‌های شماره ۴، ۳، ۲). نتایج بیانگر اثر اکسیدانی اتیدیوم بروماید در ناحیه CA1 هیپوکامپ و همچنین اثر آنتاگونیستی تزریق L-Arginine بر پاسخ اتیدیوم بروماید و بهبودی اکسیداسیون لیپیدی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در این ناحیه از مغز است.

نتایج نشان داد تزریق دُز ۱۵/۱ میکروگرم L-NAME در ناحیه CA1 هیپوکامپ تغییری معنی‌دار روی پاسخ اتیدیوم بروماید بر

11. Potassium chloride
12. Revolution per minute
13. Malondialdehyde (MDA)
14. Thiobarbituric acid reactive substance
15. Glutathione peroxidase
16. Paglia
17. Valentine

www.SID.ir

Archive of SID



مجله‌علمی
دانشگاه‌علوم‌پزشکی قزوین

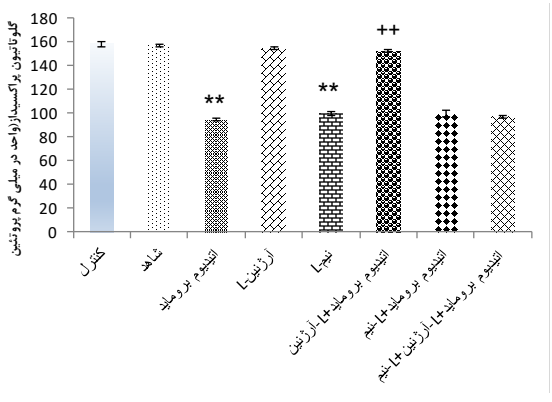
شکل ۱. جایگاه تقریبی محل کانول واردشده به طرف چپ ناحیه CA1 هیپوکامپ

هیچ‌کدام از شاخص‌های MDA، SOD و گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) ایجاد نکرد. نتایج نشان داد کاهش مقدار NO ناشی از تزریق L-NAME در ناحیه CA1 هیپوکامپ اثر معنی‌دار تقویتی یا کاهشی بر افزایش شاخص‌های استرس اکسیداتیو ناشی از تزریق اتیدیوم بروماید در این ناحیه ندارد.

همچنین تزریق توأمان دُز بی‌اثر ۱۵/۳ میکروگرم L-Arginine و ۱۵/۱ میکروگرم L-NAME در ناحیه CA1 هیپوکامپ موجب کاهش پاسخ ناشی از اتیدیوم بروماید بر شاخص MDA می‌شود (P<۰/۰۵)، اما تغییر معنی‌داری در کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ناشی از تزریق اتیدیوم بروماید یا L-NAME ایجاد نشد (شکل‌های شماره ۴، ۳، ۲).

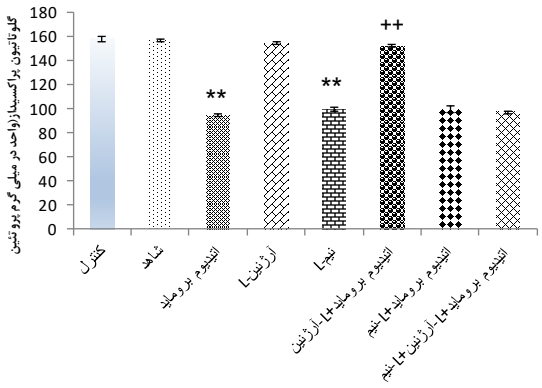
بحث و نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد تزریق اتیدیوم بروماید در



مجله‌علمی
دانشگاه‌علوم‌پزشکی قزوین

شکل ۳. اثر تزریق اتیدیوم بروماید، L- Arginine و L-NAME و برهم کنش آن‌ها در طرف چپ ناحیه CA1 هیپوکامپ بر میزان فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) در موش صحرایی نر (P<۰/۰۱)** در مقایسه با گروه کنترل و P<۰/۰۱++ در مقایسه با گروه اتیدیوم بروماید)

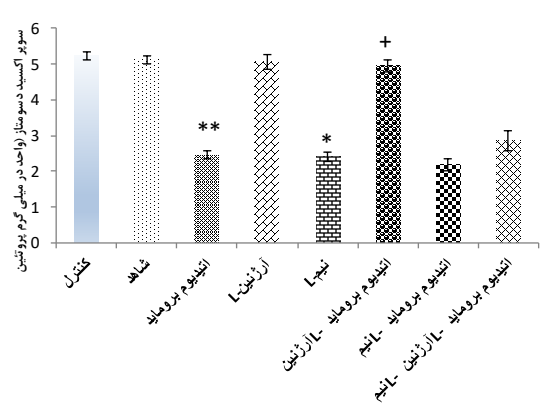


مجله‌علمی
دانشگاه‌علوم‌پزشکی قزوین

شکل ۲. اثر تزریق اتیدیوم بروماید، L- Arginine و L-NAME و برهم کنش آن‌ها در طرف چپ ناحیه CA1 هیپوکامپ بر میزان پراکسیداسیون لیپیدی (MDA) در موش صحرایی نر (P<۰/۰۵* و P<۰/۰۱** در مقایسه با گروه کنترل و P<۰/۰۵++ در مقایسه با گروه اتیدیوم بروماید)

ناحیه CA1 هیپوکامپ مغز رت‌ها موجب پراکسیداسیون لیپیدی و استرس اکسیداتیو می‌شود که با نتایج تحقیقات قبلی همسو است. اثر تزریق مهارکننده‌ها و تحریک‌کننده‌های ساخت نیتریک اکسید بر شاخص‌های ذکرشده با نتایج برخی محققان قبلی همسو و با نتایج دیگر محققین در تضاد است [۲۱، ۲۲]. همچنین تداخل اثر این داروها تا به حال در تحقیقات قبلی کار نشده است.

تزریق موضعی اتیدیوم بروماید به مغز رت‌ها موجب افزایش استرس اکسیداتیو می‌شود [۲۳، ۲۴]. گزارش شده تزریق اتیدیوم بروماید در ناحیه CA1 هیپوکامپ رت‌های نر میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را کاهش می‌دهد [۲۵]. داده‌های این پژوهش با نتایج تحقیقات قبلی همخوانی دارد. نتایج



مجله‌علمی
دانشگاه‌علوم‌پزشکی قزوین

شکل ۴. اثر تزریق اتیدیوم بروماید، L- Arginine و L-NAME و برهم کنش آنها در طرف چپ ناحیه CA1 هیپوکامپ بر میزان فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی سوپر اکسید دسموتاز (SOD) در موش صحرایی نر (P<۰/۰۱ ** در مقایسه با گروه کنترل و P<۰/۰۵+ در مقایسه با گروه اتیدیوم بروماید)

www.SID.ir

به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر نشان داد تزریق اتیدیوم بروماید به عنوان عامل دمیلیناسیون، به طور معنی‌داری به افزایش استرس اکسیداتیو در محل تزریق (ناحیه CA1 هیپوکامپ) در موش‌های صحرایی نر بالغ منجر می‌شود. مقدار گلوتاتیون پراکسیداز اندازه‌گیری‌شده به وسیله رزونانس مغناطیسی در مغز موش‌های مبتلا به MS در مقایسه با گروه‌های شاهد کمتر است [۲۶]. در مطالعات قبلی اثر اتیدیوم بروماید بر پراکسیداسیون لیپیدی نیز گزارش شده است. تزریق اتیدیوم بروماید سبب افزایش میزان MDA شد [۲۷]. کاهش میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌تواند بیانگر وضعیت دمیلیناسیون در مدل‌های تجربی باشد. ممکن است کاهش فعالیت آنزیم‌ها به علت استفاده بیش از حد از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی برای مقابله با رادیکال‌های آزاد تولیدشده ناشی از تزریق اتیدیوم بروماید باشد [۲۱].

نیتریک‌اکسید به عنوان یک عامل آنتی‌اکسیدانی بالقوه عمل می‌کند. همچنین با تولید پروکسی نیتریت می‌تواند نقش اکسیدانی داشته باشد [۲۸]. داده‌های به‌دست‌آمده در این مطالعه نشان داد تزریق L-NAME (مهارکننده تولید نیتریک‌اکساید) موجب کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دسموتاز و نیز افزایش میزان MDA می‌شود که می‌توان آن را به عنوان بروز استرس اکسیداتیو تفسیر کرد. همچنین اعمال دُز استفاده‌شده L-Arginine (تحریک‌کننده ساخت نیتریک‌اکساید) در ناحیه CA1 هیپوکامپ اثری بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ندارد. نتایج تحقیق نشان داد در صورت مهار نیتریک‌اکساید ، میزان این آنزیم‌ها کاهش می‌یابد، درصورتی که در گروه‌های دریافت‌کننده محرک نیتریک‌اکساید تغییری نمی‌یابد [۷]. نتایج این پژوهش با برخی از گزارش‌های قبلی نیز همخوانی دارد و در برخی موارد هم همخوانی ندارد. گزارش شده که استفاده از L-NAME به عنوان مهارکننده نیتریک‌اکساید سبب تشدید اثرات اکسیداتیو ناشی از آهن می‌شود و کاربرد L-Arginine به عنوان پیش‌ساز نیتریک‌اکساید از اثرات اکسیداتیو ناشی از آهن جلوگیری می‌کند [۲۲]. در مطالعه روی سلول‌های کشت‌داده‌شده کلیوی، اثر سمی از ال‌آرژنین مشاهده نشد [۲۱]. عدم اثر L-Arginine بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو در این تحقیق ممکن است به علت نقش فیزیولوژیک ضعیف این ماده برای تولید NO در ناحیه CA1 هیپوکامپ در کاهش استرس اکسیداتیو باشد [۷، ۲۹].

نتایج داده‌های مطالعه حاضر از بررسی برهم‌کنش تزریق دُز بی‌اثر L-Arginine در ناحیه CA1 هیپوکامپ مغز موش‌های صحرایی نشان داد تزریق L-Arginine به عنوان آگونیست تولیدکننده NO، موجب توقف پاسخ دُز به‌کاررفته اتیدیوم بروماید در بروز استرس اکسیداتیو می‌شود. افزایش نیتریک‌اکسید در مدل‌های دمیلیناسیون ناشی از تزریق سم اتیدیوم بروماید در مغز موش موجب بهبودی شاخص‌های استرس اکسیداتیو می‌شود [۲۱]. پیش‌درمان با استفاده از دهنده‌های NO، با افزایش میزان آنزیم آنتی‌اکسیدانی GSH می‌تواند استرس اکسیداتیو القاشده ناشی از تزریق با اتیدیوم بروماید را کاهش دهد [۳۰]. همچنین تحقیق حاضر نشان داد تزریق L-NAME موجب تغییر معنی‌دار میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در رت‌های دمیلین‌شده ناشی از اتیدیوم بروماید نمی‌شود.

نتایج حاصل از پژوهش حاضر از تداخل اثر داروها نشان داد تجویز توأم L-Arginine و L-NAME در ناحیه CA1 هیپوکامپ مغز رت‌های دمیلین‌شده ناشی از اتیدیوم بروماید، اگرچه موجب کاهش پاسخ اتیدیوم بروماید بر میزان پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود، اما قادر به بهبودی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD و GSH نیست. عدم تغییر معنی‌دار میزان فعالیت آنزیم‌های SOD و GSH در تزریق توأمان L-Arginine، L-NAME روی پاسخ ناشی از اتیدیوم بروماید نسبت به گروه دریافت‌کننده اتیدیوم بروماید ممکن است ناشی از برتری اثر اکسیداسیونی دو ماده L-NAME و اتیدیوم بروماید نسبت به اثر آنتی‌اکسیدانی L-Arginine در این ناحیه از مغز موش‌های صحرایی باشد.

بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش (تزریق موضعی و حاد تحریک‌کننده نیتریک‌اکساید در ناحیه CA1 هیپوکامپ رت‌های دچار تخریب میلین نورونی ناشی از اتیدیوم بروماید، موجب کاهش شاخص‌های استرس اکسیداتیو می‌شود)، می‌توان چنین فرض کرد که افزایش نیتریک‌اکساید در این ناحیه از مغز می‌تواند موجب بهبودی میلین نورون‌ها شود. بنابراین با توجه به گزارش‌های متفاوت شیوه‌های مختلف تجویز داروها به صورت حاد و مزمن جهت تأیید مطلب پیشنهاد می‌شود.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

کلیه موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی در این مطالعه رعایت شده است.

حامی مالی

مقاله حاضر از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد خانم زاهده رحیملوی مرجانی به شماره ۵۲/۱۳۲۹۷/د در گروه زیست‌شناسی جانوری دانشگاه تبریز استخراج شده است.

www.SID.ir

مشارکت نویسندگان

مفهوم‌سازی، روش‌شناسی و نظارت: علیرضا علی همتی، حمیرا حاتمی نعمتی؛ تحقیق و بررسی: زاهده رحیملوی مرجانی؛ نگارش پیش‌نویس: حاتم احمدی.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تبریز بابت تأمین اعتبار لازم قدردانی می‌شود.

www.SID.ir

References

[1] Lassmann H. Classification of demyelinating diseases at the interface between etiology and pathogenesis. Curr Opin Neurol. 2001; 14(3):253-8. [DOI:10.1097/00019052-200106000-00001]

[2] Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: The need for effective antioxidant therapy. J Neurol. 2004; 251(3):261-8. [DOI:10.1007/s00415-004-0348-9] [PMID]

[3] Abdel-Salam OM, Khadrawy YA , Mohammed NA. Neuroprotective effect of nitric oxide donor isosorbide-dinitrate against oxidative stress induced by ethidium bromide in rat brain. Excll J. 2012; 11: 125-41. [PMID] [PMCID]

[4] Lovell MA, Ehmann WD, Butler SM, Markesbery WR. Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. Neurol. 1995; 45(8):1594-601. [DOI:10.1212/WNL.45.8.1594] [PMID]

[5] Glabinski A, Tawsek NS, Bartosz G. Increased generation of superoxide radicals in the blood of MS patients. Acta Neurol Scand. 1993; 88(3):174-7. [DOI:10.1111/j.1600-0404.1993.tb04212.x] [PMID]

[6] Haider L, Fischer MT, Frischer JM, Bauer J, Höftberger R, Botond G, et al. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. Brain. 2011; 134(7):1914-24. [DOI:10.1093/brain/awr128] [PMID] [PMCID]

[7] Picón-Pagès P, Garcia-Buendia J, Francisco JM. Functions and dysfunctions of nitric oxide in brain. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2019; 1865(8):1949-67. [DOI:10.1016/j.bbadis.2018.11.007] [PMID]

[8] Tajes M, Ill-Raga G, Palomer E, Ramos-Fernández E, Guix FX, etal. Nitro-oxidative stress after neuronal ischemia induces protein nitrotyrosination and cell death. Oxid Med Cell Longev. 2013; 2013:826143. [DOI:10.1155/2013/826143] [PMID] [PMCID]

[9] Buskila Y, Amitai Y. Astrocytic iNOS-dependent enhancement of synaptic release in mouse neocortex. J Neurophysiol. 2010; 103(3):1322-8. [DOI:10.1152/jn.00676.2009] [PMID]

[10] Tajes M, Guivernau B, Ramos-Fernández E, Bosch-Morató M, Palomer E, Guix FX, et al. The pathophysiology of triose phosphate isomerase dysfunction in Alzheimer's disease. Histol Histopathol. 2013; 28(1):43-51. [DOI: 10.14670/HH-28.43]

[11] Bernhard B, Andreas von K, Katrin B. Sandau Nitric oxide and its role in apoptosis. Eur J Pharmacol. 1998; 351(3):261-72. [DOI:10.1016/S0014-2999(98)00274-X]

[12] Ibragic S, Sofic E, Suljic E, Avdagic N, Ba-jraktarevic A, Tahirovic I. Serum nitric oxide concentrations in patients with multiple sclerosis and patients with epilepsy. J Neural Transm. 2012; 119(1):7-11. [DOI:10.1007/s00702-011-0686-6] [PMID]

[13] Hummel SG, Fischer AJ, Martin SM, Schafer FQ, Buetner GR. Nitric oxide as a cellular antioxidant: A little goes a long way. Free Radic Biol Med. 2006; 40(3):501-6. [DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2005.08.047] [PMID] [PMCID]

[14] Goudarzvand M, Javan M, Mirnajafi-Zadeh J, Mozafari S, Tiraihi T. Vitamins E and D3 attenuate demyelination and potentiate remyelination processes of hippocampal formation of rats following local injection of ethidium bromide. Cell Mol Neurobiol. 2010; 30(2):289-99. [DOI:10.1007/s10571-009-9451-x] [PMID]

[15] Anna K L, Jere HM, Scott AS. Treatment of muscle mechanoreflex dysfunction in hypertention: Effects of L-arginine dialysis in the nucleus tractus solitari. Exp Physiol. 2013; 98(9):1337-48. [DOI:10.1113/expphysiol.2012.071563] [PMID] [PMCID]

[16] Vaseghi S, Babapour V, Nasehi M, Zarrindast MR. The role of CA1 CB1 receptors on lithium-induced spatial memory impairment in rats. EXCLI J. 2018; 17:916-34. [DOI: 10.17179/excli2018-1511]

[17] Nasehi M, Hasanvand S, Khakpai F, Zarrindast MR. The effect of CA1 dopaminergic system on amnesia induced by harmane in mice. Acta Neurologica Belgica. 2019; 119(3):369-77. [DOI:10.1007/s13760-018-0926-8] [PMID]

[18] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition. Amsterdam: Elsevier; 2006.

[19] Kuloghi M, Ustundag B, Atmaca M, Canatan H, Tezean AE, Cinkiline N. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia and bipolar disorder. Cell Biochem Funct. 2002; 20(2):171-5. [DOI:10.1002/cbf.940] [PMID]

[20] Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med 1967; 70(1):158-69. [PMID]

[21] Mitosek-Szewczyk K, Gordon-Krajcer W, Walendzik P, Stelmasiak Z. Free radical pe-roxidation products in cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis after glucocorticoid therapy. Folia Neuropathol. 2010; 48(2):116-22. [PMID]

[22] Abbasnejad M, Gol A, Shirpoor A, Eskandari M. Measuring of renal Vitamin E for the Assessment of Iron and Nitric Oxide Interaction in Rats. J Kerman Univ Med Sci. 2004; 11(1):7-13. [In Persian]

[23] Abdel-Salam, OM E, Khadrawy YA, Salem NA, Sleem AA. Oxidative stress in a model of toxic demyelination in rat brain: The effect of piracetam and vinpocetine. Neurochem Res. 2011; 36(6):1062-72. [DOI:10.1007/s11064-011-0450-1][PMID]

[24] Spanevello R, Mazzanti CM, Schmatz R, Bagatini M, Stefanello N, Correa M, et al. Effect of vitamin E on ectonucleotidasea ctivities in synaptosomes and platelets and parameters of oxidative stress in rats experimentally demyelinated. Brain Res Bull. 2009; 80(1):45-51. [DOI:10.1016/j.brainresbull.2009.05.015] [PMID]

[25] Fathimoghadam H, Farbod Y, Ghadiri A, Fatemi R. Moderating effects of crocin on some stress oxidative markers in rat brain following demyelination with ethidium bromide. Heliyon. 2019; 5(2):e01213. [DOI:10.1016/j.heliyon.2019.e01213] [PMID] [PMCID]

[26] Choi IY, Lee SP, Denney DR, Lynch SG. Lower levels of glutathione in the brains of secondary progressive multiple sclerosis patients measured by 1H magnetic resonance chemical shift imaging at 3T. Mult Scler. 2011; 17(3):289-96. [DOI:10.1177/1352458510384010] [PMID] [PMCID]

www.SID.ir

[27] Abdel-Salam OM, Khadrawy YA, Mohammed NA, Youness ER. The effect of gabapentin on oxidative stress in a model of toxic demyelination in rat brain. J Basic Clin Physiol Pharmacol. 2012; 23(2):61-8. [DOI:10.1515/jbcpp-2012-0004] [PMID]

[28] Achiron A, Gabbay U, Gilad R, Hassin-Baer S, Barak Y, Gornish M, et al. Intravenous immunoglobulin treatment in multiple sclerosis, effect on relapses. Neurology. 1998; 50(2):398-402. [DOI:10.1111/cns.12985] [PMID] [PMCID]

[29] Ahmadi H, Nasehi M, Rostami P, Zarrindast MR. Involvement of the nucleus accumbens shell dopaminergic system in prelimbic NMDA-induced anxiolytic-like behaviors. Neuropharmacology. 2013; 71:112-23. [DOI:10.1016/j.neuropharm.2013.03.017] [PMID]

[30] Goss SP, Hogg N, Kalyanaraman B. The effect of nitric oxide release rates on the oxidation of human low density lipoprotein. J Biol Chem. 1997; 272(34):21647-53. [DOI:10.1074/jbc.272.34.21647] [PMID]

www.SID.ir

Archive of SID

This Page Intentionally Left Blank

www.SID.ir