

اثر تیمار ۱۷- بتا استرادیول بر نورون‌زایی هیپوکامپ

موش کوچک آزمایشگاهی اوارکتومی شده

مریم آذری^۱، دکتر محمدتقی قربانیان*^۲، محمود اله دادی سلمانی^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد رشته بافت شناسی، دانشکده زیست شناسی و پژوهشکده علوم زیستی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران. ۲- استادیار گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده زیست شناسی و پژوهشکده علوم زیستی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران. ۳- دانشیار گروه زیست شناسی عمومی، دانشکده زیست شناسی و پژوهشکده علوم زیستی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: نورون‌زایی در بزرگسالان بسیاری از گونه‌های پستانداران در دو ناحیه مغزی تحت بطنی و شکنج دندان‌های هیپوکامپ رخ می‌دهد. این مطالعه به منظور تعیین اثر تیمار ۱۷- بتا استرادیول بر نورون‌زایی هیپوکامپ موش کوچک آزمایشگاهی اوارکتومی شده انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی ۳۵ سر موش کوچک آزمایشگاهی ماده بالغ از نژاد NMRI در ۵ گروه ۷ تایی تقسیم شدند. گروه‌ها شامل گروه شام، گروه کنترل، گروه تیمار اول با یک دوز استرادیول دو هفته پس از اوارکتومی و نمونه برداری پس از ۲۴ ساعت، گروه تیمار دوم با یک دوز استرادیول دو هفته پس از اوارکتومی و نمونه‌برداری پس از ۴۸ ساعت و گروه تیمار سوم با یک دوز روغن کنجد دو هفته پس از اوارکتومی و نمونه‌برداری پس از ۲۴ ساعت بودند. حیوانات پس از طی دوره تیمار، بی‌هوش و با پارافرمالین پرفیوژن شدند و مغز آنها برای تهیه مقاطع میکروسکوپی خارج شد. شمارش سلولی و مورفومتری مقاطع رنگ‌آمیزی شده با کریستال فاست ویوله و ایمونوهیستوشیمی آنتی GFAP انجام گردید.

یافته‌ها: تعداد نورون‌ها در ناحیه CA1 و تکثیر سلول‌های اجدادی هیپوکامپ تا ۲۴ ساعت پس از درمان با استرادیول افزایش آماری معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). تعداد سلول‌های گلیا و به‌طور ویژه آستروسیت‌ها در مناطق مختلف هیپوکامپ پس از درمان با استرادیول کاهش آماری معنی‌داری داشت ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: تعداد نورون‌ها در ناحیه CA1 هیپوکامپ تحت تأثیر استروژن قرار دارد. همچنین استروژن بر تعداد و مورفولوژی سلول‌های گلیا به‌طور ویژه آستروسیت‌ها در هیپوکامپ موثر است.

کلید واژه‌ها: ۱۷- بتا استرادیول، نورون‌زایی، هیپوکامپ، آستروسیت، موش

* نویسنده مسؤول: دکتر محمدتقی قربانیان، پست الکترونیکی ghorbanian@du.ac.ir

نشانی: دامغان، دانشگاه دامغان، دانشکده زیست شناسی و پژوهشکده علوم زیستی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی

تلفن ۱۲-۱۱-۰۲۳-۳۵۲۲۰۱۱، نمابر ۰۲۳-۳۵۲۲۰۹۳

وصول مقاله: ۱۳۹۶/۳/۱۶، اصلاح نهایی: ۱۳۹۶/۵/۹، پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۶/۸

مریم آذری <https://orcid.org/0000-0001-8730-7061>، دکتر محمدتقی قربانیان <https://orcid.org/0000-0001-8173-5508>

مقدمه

شکنج دندان‌های (Dantate Gyrus) در داخل هیپوکامپ رخ می‌دهد (۲-۷)۴.

عوامل متعددی نورون‌زایی را تحت تأثیر قرار می‌دهند که شامل عامل رشد، محیط مثل شرایط پاتولوژیک (بیماری‌هایی مانند آلزایمر و هانگتینتون) و هورمون‌های جنسی است. هورمون‌های جنسی تکامل، رشد، تمایز، بلوغ و عملکرد سیستم عصبی مرکزی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. به‌شکل ویژه‌ای استروژن (یکی از هورمون‌های مهم در جنس ماده) نقش مهمی در تکامل سیستم عصبی مرکزی بازی می‌کند (۲). استروژن در نورون‌زایی، فعالیت

توانایی سلول‌های بنیادی عصبی در تکثیر نورونی و جایگزینی سلول‌های عصبی از بین رفته یا آسیب دیده را نورون‌زایی گویند (۱). نورون‌زایی در تمام طول عمر پستانداران در مغز بزرگسالان اتفاق می‌افتد. نورون‌زایی شامل فرآیندهای مختلفی است که شامل تکثیر، تعیین سرنوشت سلولی (Cell Fate)، تمایز، مهاجرت و ادغام (Integration) (۲ و ۳) است. در شرایط عادی نورون‌زایی در بالغین به‌طور واضح در دو منطقه مغزی زیر بطنی (SVZ) در دیواره کناری بطن جانبی و منطقه زیر گرانولی (Sub Granular Zone: SGZ) در

اوارکتومی دو طرفه و تیمار با ۱۷- بتا استرادیول: پس از تعیین چرخه استروس موش‌هایی که در فاز دی‌استروس بودند؛ انتخاب شدند. علت انتخاب مرحله دی‌استروس آن بود که در این مرحله ترکیب سلولی شبیه به مدل اوارکتومی است و سطح هورمون‌های تخمدانی در پایین‌ترین میزان خود است. حیوانات براساس وزن با مخلوطی از داروهای بیهوشی کتامین (alfasan) (۱۰۰ mg/kg) و زایلازین (alfasan) (۱۰ µg/kg) به صورت درون صفاقی بی‌هوش و به شکم خوابانیده شدند (۱۵۵). پس از تراشیدن موها با تیغ اسکالپل برش کوچکی بر روی پوست ناحیه میانی کمر ایجاد و جداسازی بافت و تعیین موقعیت تخمدان انجام و تخمدان‌ها به‌طور کامل با قیچی داغ جدا شدند. محل برش را با نخ بخیه دوخته و در نهایت بر روی آن پنی‌سیلین ریخته شد. قبل و بعد از جراحی وزن موش اندازه‌گیری شد. دو هفته بعد از اوارکتومی تزریق ۱۷- بتا استرادیول (sigma) به مقدار ۱۰ میکروگرم و به صورت زیرجلدی انجام گردید. حیوانات در ۵ گروه ۷ تایی به شرح زیر قرار گرفتند. گروه شم: جراحی بدون خارج کردن تخمدان؛ گروه کنترل: اوارکتومی بدون تیمار؛ گروه تیمار اول: با یک دوز استرادیول دو هفته پس از اوارکتومی و نمونه‌برداری پس از ۲۴ ساعت؛ گروه تیمار دوم: با یک دوز استرادیول دو هفته پس از اوارکتومی و نمونه‌برداری پس از ۴۸ ساعت؛ گروه تیمار سوم: با یک دوز روغن کنجد دو هفته پس از اوارکتومی و نمونه‌برداری پس از ۲۴ ساعت.

بافت‌شناسی و مورفومتری: حیوانات توسط تزریق داخل صفاقی مخلوط ۱۰۰ میلی‌گرم کتامین و ۱۰ میلی‌گرم زایلازین به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت عمیق بیهوش شدند. با تزریق داخل قلبی محلول فسفات بافر (Phosphate buffered saline: PBS) و به‌دنبال آن محلول پارافرمالید ۴ درصد سرد، پرفیوژن صورت گرفت و مغزها از جمجمه خارج شدند. مراحل ثبوت و پردازش بافتی انجام شد و بافت‌ها با پارافین مذاب ۶۰ درجه سانتی‌گراد قالب‌گیری شدند. سپس با استفاده از میکروتوم روتاری برش‌های ۵ میکرومتری کروئال با توجه به اطللس پاکسینوس در محدوده مناطق CA1، CA3، DG تهیه شد. رنگ‌آمیزی کرزیل ویوله، اجسام نیسل سلول‌های عصبی را به رنگ بنفش و یا آبی لاجوردی نشان می‌دهد (۱۶). سلول‌های هر می‌نواحی CA1 هیپوکامپ موش در گروه‌های مختلف شمارش شدند. به منظور شمارش سلولی، هفت برش متوالی (سریال) کروئال به ضخامت ۵ میکرومتر برای ۷-۵ سر حیوان در هر گروه (با عدسی 100X و با کمک eyepiece micrometer grid در مربع به مساحت ۱۰۰ میکرومتر مربع) شمارش شدند. به کمک امکانات مورفومتری نصب بر سیستم تصویربرداری دوربین دیجیتال (Nikon, DXM120, USA) انجام شد.

مطالعه ایمنوهیستوشیمی: به‌منظور شمارش آستروسیت‌های

ضد آپاتوزی، تولیدمثل، ازدیاد و حفظ سلول‌های جدید در شکنج دندانه‌ای هیپوکامپ نقش دارد. این اثرات متنوع وابسته به زمان، مقدار استروژن و میزان بیان گیرنده استروژن است (۶۵).

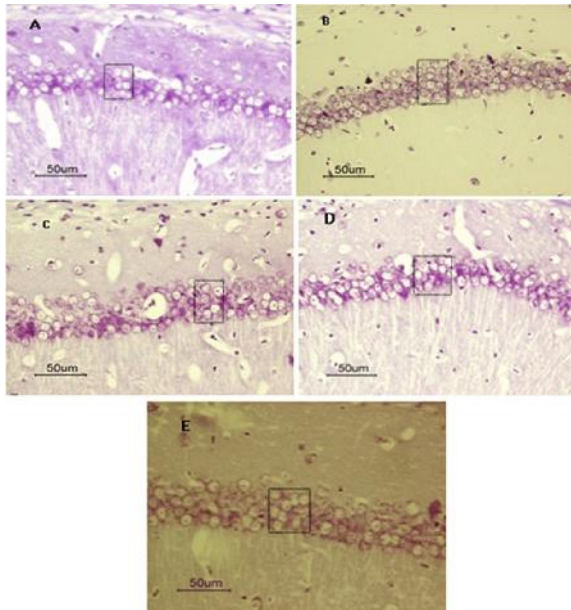
آستروسیت‌ها با سلول بنیادی عصبی تعامل دارند که این تعامل برای نورون‌زایی بسیار مهم محسوب می‌شود (۹۸). آستروسیت‌های هیپوکامپ پیام‌هایی را که سبب تکثیر و تعیین سرنشت عصبی سلول بنیادی عصبی می‌شود را تولید می‌کنند. علاوه بر این، عوامل مشتق از آستروسیت ممکن است باعث تحریک سینیپتورژن نورون‌های تازه تولید شود (۸ و ۱۰). آستروسیت‌های هیپوکامپ تخصصی هستند و مجموعه‌ای بی‌نظیر از پیام‌هایی تولید می‌کنند که برای حفظ نورون‌زایی در طول دوران بلوغ بسیار مهم است (۸). نوسانات رخ داده در هورمون‌های گنادی، به‌طور طبیعی در سراسر چرخه استروس، نورون‌زایی هیپوکامپ ماده باکره بزرگسال را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۱۱). هیپوکامپ یکی از نواحی مغزی است که عملکرد آن با شناخت، حافظه و یادگیری مربوط است و هدف مشترک چندین بیماری مربوط به آسیب مغزی و مرتبط با سن نظیر افسردگی، آلزایمر و پارکینسون است (۱۲).

با افزایش سن به علت تغییرات متعدد در شرایط فیزیولوژیک بدن به خصوص تغییرات هورمونی، تعداد نورون‌های جدید کاهش می‌یابد و به دنبال آن نقص در یادگیری، حافظه، تغییر در نوروترنسمیترها، تغییر در گیرنده‌های استروئیدی و تغییرات هیپوکامپ رخ می‌دهد (۱۳). به‌نظر می‌رسد با جایگزینی هورمون‌های استروئیدی به خصوص استرادیول در جنس ماده می‌توان تا حدودی از تغییرات دژنراتیو پیشگیری و یا در صورت وقوع درمان نمود. با توجه به اثر هورمون‌های جنسی بر ساختار و عملکرد هیپوکامپ (۱۴) و وظایف متعدد آستروسیت‌ها در دستگاه عصبی مرکزی و نیز دخالت این سلول‌ها در نورون‌زایی، مطالعه حاضر به منظور تعیین اثر تیمار ۱۷- بتا استرادیول بر نورون‌زایی هیپوکامپ موش کوچک آزمایشگاهی اوارکتومی شده انجام شد.

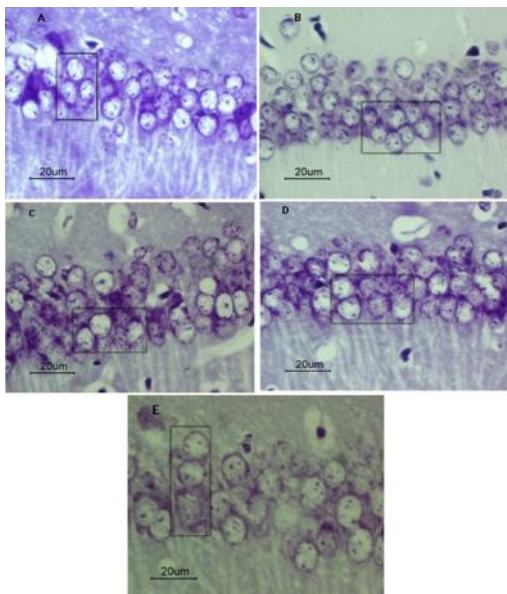
روش بررسی

این مطالعه تجربی در گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه دامغان در سال ۱۳۹۲ انجام شد.

حیوانات آزمایشگاهی: تعداد ۳۵ سر موش کوچک آزمایشگاهی ماده بالغ نژاد NMRI ماده با سن تقریبی ۸-۶ هفته مورد استفاده قرار گرفتند. موش‌ها از مؤسسه تحقیقاتی واکنس و سرم‌سازی رازی تهیه و به محل نگهداری حیوانات آزمایشگاهی در دانشگاه دامغان منتقل شدند. حیوانات در شرایط مناسب ۱۲ ساعت روشنایی - تاریکی، دمای ۲۴-۲۰ درجه سانتی‌گراد و دسترسی آزادانه به آب و غذای کافی نگهداری شدند. اصول اخلاقی کار بر روی حیوانات براساس دستور کار کمیته اخلاقی (شماره ۱۰۸۰۹۱۴) دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه دامغان رعایت گردید.



شکل ۱: تصاویر رنگ‌آمیزی کریزل ویوله با بزرگ‌نمایی ۴۰ از برش‌های ناحیه CA1 تراکم سلول‌های گرانولی در ناحیه CA1 هیپوکامپ در گروه‌های (A) شام، (B) کنترل، (C) تزریق ۲۴ ساعته، (D) تزریق ۴۸ ساعته، (E) تزریق روغن کنجد



شکل ۲: تصاویر رنگ‌آمیزی کریزل ویوله با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ از برش‌های ناحیه CA1 تراکم سلول‌های گرانولی در ناحیه CA3 هیپوکامپ در گروه‌های (A) شام، (B) کنترل، (C) تزریق ۲۴ ساعته، (D) تزریق ۴۸ ساعته، (E) تزریق روغن کنجد

لایه مولکولی آستروسیت‌های دور عروقی به صورت یک حلقه کامل عروق را فرا گرفته و از طریق یک زائده بلند با آستروسیت‌های پیرامون مربوط هستند. در لایه مولکولی، آستروسیت‌های با زواید بلند و منشعب هستند که انشعابات ثانویه آنها نیز قابل مشاهده است (جدول یک و شکل‌های ۵-۲).

هیپوکامپ و تعیین شدت واکنش ایمنواستینینگ به نشانگر GFAP (Glial fibrillary acidic protein) از روش ایمنوستوشیمی و نرم‌افزار Image استفاده شد. مراحل انجام کار شامل پارافین‌زدایی و آب‌دهی در الکل‌های صعودی و شستشوی نمونه‌ها با آب بود. سپس برای بازیابی آنتی‌ژن، مقاطع بافتی در بافر سترات سدیم قرار گرفت و نمونه‌ها در مایکروویو با شدت ۱۸۰، ۳۶۰، ۷۲۰ وات هر کدام به مدت پنج دقیقه قرار داده شدند. انکوباسیون نمونه‌ها با محلول بلاک‌کننده سرم بز ۱۰ درصد و تریتون ۰/۳ درصد به مدت یک ساعت انجام گردید. انکوباسیون با آنتی‌بادی اولیه (GFAP رقیق شده با PBS به نسبت ۱:۲۰۰) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و سپس شستشو با محلول PBS و انکوباسیون با آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با رودامین (رقیق شده به نسبت ۱:۲۰۰) به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در پایان شستشو با PBS و چسباندن با چسب گلیسرول فسفات و مشاهده با میکروسکوپ فلورسنت صورت گرفت. از DAPI برای رنگ‌آمیزی هسته استفاده شد. تصاویر میکروسکوپی با میکروسکوپ فلورسنت (Nikon Eclipse, E 600, Japan) و به کمک سیستم تصویربرداری دوربین دیجیتال (Nikon, DXM 120, USA) انجام شد. ارزیابی شدت و میزان بیان GFAP هیپوکامپ با نرم‌افزار Image بررسی شد.

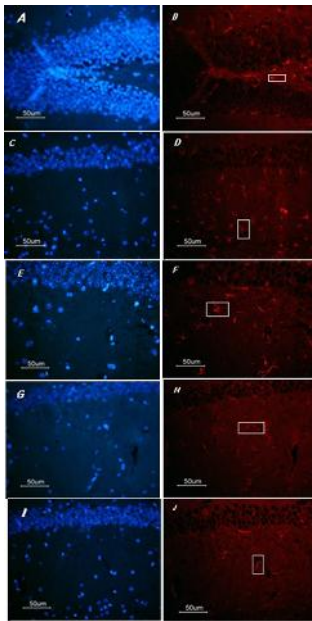
آنالیز آماری: داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS-16 و آزمون‌های واریانس یک‌طرفه و به‌دنبال آن آزمون تکمیلی Tukey انجام در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

نتایج بررسی مقاطع میکروسکوپی با رنگ‌آمیزی کریزل ویوله: با توجه به شکل‌های ۱ و ۲ سلول‌های هرمی شکل منطقه CA1 هیپوکامپ به خوبی قابل مشاهده هستند. هسته یوکروماتین با هستک مشخص به انضمام سیتوپلاسم بنفش رنگ مشخص است. شمارش سلولی ناحیه CA1 هیپوکامپ نشان از افزایش آماری معنی‌دار تکثیر سلولی در گروه تیمار اول داشت (جدول یک) ($P < 0/05$).

نتایج بررسی ایمنوستوشیمی برای نشانگر GFAP: مقاطع میکروسکوپی رنگ شده برای نشانگر GFAP نشان داد که در نواحی مختلف هیپوکامپ پاسخ ایمنوفلورسانس متفاوت بوده و کاهش آماری معنی‌دار در گروه تیمار دوم مشاهده شد (جدول یک).

علاوه بر اثر تیمار هورمونی مورفولوژی آستروسیت‌ها نیز با یکدیگر تفاوت مشهودی نشان دادند. سلول‌های GFAP مثبت در SGZ هیپوکامپ با رنگ‌پذیری زیاد، دارای زواید بلند و شعاعی در بین سلول‌های گرانولی امتداد یافته و پس از طی نمودن این لایه در ناحیه مولکولی شاخه می‌شوند. سلول‌های آستروسیتی دور عروق فراوان ناحیه مولکولی و SGZ به وضوح دیده می‌شوند. در



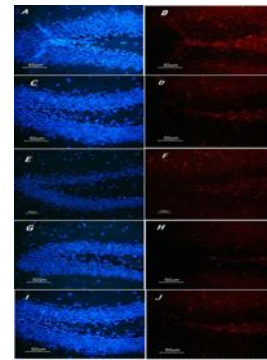
شکل ۵: تصاویر ایمنو هیستوشیمی سلول‌های GFAP مثبت در ناحیه CA1

گروه شم (A) و (B)، گروه کنترل (C) و (D) گروه تزریق ۲۴ ساعته (E) و (F)، گروه تزریق ۴۸ ساعته (G) و (H)، گروه تزریق روغن کنجد (I) و (J) تصاویر سمت راست هسته‌های آبی، رنگ شده با DAPI و تصاویر سمت چپ مشاهده همان منطقه با فیلتر رودامین (طیف قرمز)

بحث

به دلیل افزایش بیماری‌های با منشأ عصبی در قرن بیست و یکم و نیز افزایش آمار سالمندان و میانگین سن جمعیت‌ها به اثر هورمون جنسی بر مغز توجه شده است. نقش مهم هورمون‌های جنسی بر عملکرد دستگاه‌های عصبی به خصوص در جنس ماده ما را بر آن داشت تا تاثیر هورمون ۱۷-بتا استرادیول در موش‌های اوارکتومی شده بر تکثیر سلول‌های هرمی CA1 هیپوکامپ و میزان آستروسیت‌ها بررسی نمایم. نورون‌زایی بالغین توسط تعدادی از عوامل داخلی و خارجی تنظیم می‌شود (۱۷). استرادیول پس از تولید از طریق گردش خون برای اثر بر بافت‌های مختلف مانند مغز به سراسر بدن منتقل می‌شود. مطالعات بالینی، شواهدی برای نقش محافظت عصبی استرادیول بر بیماری‌های تحلیل برنده عصبی (نورودژنراتیو) نظیر سکنه و آلزایمر ارایه می‌دهد (۱۸). به دلیل آسیب‌پذیری جنس زن در ابتلا به بیماری‌های عصبی به سبب نوسانات هورمونی در دوران قاعدگی، بارداری و پس از زایمان و به خصوص یائسگی، این مطالعه به بخشی از نقش استرادیول بر سیستم عصبی پرداخته است.

هر دو نوع گیرنده‌های استروژن، ER و ER در ساختمان هیپوکامپ بیان می‌شود. ER بر روی آستروسیت‌های هیپوکامپ قابل ردیابی است. این نشان می‌دهد که ممکن است آستروسیت‌ها توانایی تقسیم و تولید نورون‌های جدید را داشته باشند (۸). در میان مناطق مغز که به لحاظ جنسی دی‌مورفیسم هستند؛ هیپوکامپ یک منطقه ویژه است که در حافظه و یادگیری نقش دارد. تفاوت‌های

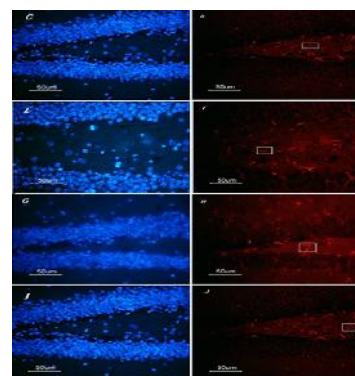


شکل ۳: تصاویر ایمنو هیستوشیمی سلول‌های GFAP مثبت در ناحیه شکنج دندان‌های؛ گروه شم (A) و (B)، گروه کنترل (C) و (D)، گروه تزریق ۲۴ ساعته (E) و (F)، گروه تزریق ۴۸ ساعته (G) و (H)، گروه تزریق روغن کنجد (I) و (J) تصاویر سمت راست هسته‌های آبی، رنگ شده با DAPI و تصاویر سمت چپ مشاهده همان منطقه با فیلتر رودامین (طیف قرمز)

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار تراکم نورون‌ها در ناحیه CA1 در گروه‌های مورد مطالعه و تراکم آستروسیت‌ها و شدت پاسخ به نشانگر GFAP در همان گروه‌ها

گروه‌ها	میانگین و انحراف معیار	شمارش سلولی ناحیه CA1
شم	۲۱۵/۲±۳/۱۱	شمارش سلولی ناحیه CA1
کنترل	۱۹۸±۱۳/۰۴	
تیمار اول	۲۵۰/۶±۶/۶۲*	
تیمار دوم	۱۹۷/۴±۹/۳۷	
تیمار سوم	۲۲۹/۴±۵/۲۷	
شم	۳۵±۲/۵۵	تراکم آستروسیت‌ها و شدت بیان GFAP
کنترل	۴۵/۶±۳/۳۶	
تیمار اول	۴۱/۲±۱/۷۹	
تیمار دوم	۲۰/۲±۲/۸۶*	
تیمار سوم	۵۴/۴±۱/۱۴	

گروه شم: جراحی بدون خارج کردن تخمدان؛ گروه کنترل: اوارکتومی بدون تیمار؛ گروه تیمار اول: با یک دوز استرادیول دو هفته پس از اوارکتومی و نمونه‌برداری پس از ۲۴ ساعت؛ گروه تیمار دوم: با یک دوز استرادیول دو هفته پس از اوارکتومی و نمونه‌برداری پس از ۴۸ ساعت؛ گروه تیمار سوم: با یک دوز روغن کنجد دو هفته پس از اوارکتومی و نمونه‌برداری پس از ۲۴ ساعت
 $P < 0.05^*$



شکل ۴: تصاویر ایمنو هیستوشیمی سلول‌های GFAP مثبت در ناحیه Hillus

گروه شم (A) و (B)، گروه کنترل (C) و (D) گروه تزریق ۲۴ ساعته (E) و (F)، گروه تزریق ۴۸ ساعته (G) و (H)، گروه تزریق روغن کنجد (I) و (J) تصاویر سمت راست هسته‌های آبی، رنگ شده با DAPI و تصاویر سمت چپ مشاهده همان منطقه با فیلتر رودامین (طیف قرمز)

کرد در مرحله پرواستروس، بیان GFAP در مناطق CA1، CA3 و شکنج دندانه‌ای هیپوکامپ، نسبت به مرحله دی‌استروس و نیز جنس نر بیشتر بود. تفاوت در مورفولوژی آستروسیت‌ها از نکات قابل توجه اینگونه تحقیقات است. آستروسیت‌ها با جسم سلولی گرد و زواید کوتاه و متعدد به‌طور عمده در فاز پرواستروس مشاهده می‌شوند. در حالی که آستروسیت‌ها با جسم سلولی ستاره‌ای شکل و زواید طویل و کم در ماده‌های دی‌استروس مشاهده می‌شود (۱۹).

آنالیز داده‌های مربوط به شدت بیان GFAP در ناحیه شکنج دندانه‌ای نشان داد که گروه‌های تزریق روغن، کنترل و تیمار ۲۴ ساعته افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه شم نشان دادند. در حالی که گروه تیمار ۴۸ ساعته کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه شم نشان داد. در مطالعه دیگر نشان داده شد که بیان GFAP در هیپوکامپ موش کوچک آزمایشگاهی در طول سیکل فحلی نوسان دارد. در فاز پرواستروس که میزان هورمون‌های جنسی افزایش می‌یابد؛ تراکم پاسخ مثبت نیز افزایش می‌یابد (۱۹). در مطالعه دیگری نشان دادند که سطح استرادیول اندوژن به محض اوارکتومی افزایش می‌یابد. پس احتمالاً تولید استروژن از طریق منابع خارج گنادی می‌تواند یکی از دلایلی باشد که چرا مدت زمان طولانی بعد از اوارکتومی به‌طور دایم سبب کاهش در تکثیر سلولی نمی‌شود. این یافته‌ها حاکی از آن است که در مدت زمان طولانی بعد از اوارکتومی توانایی سلول‌های اجدادی در هیپوکامپ برای پاسخ به استرادیول از طریق تغییر در تراکم گیرنده‌های استروژن کاهش می‌یابد (۶). در مطالعه دیگر نشان داده شد که در طول چرخه استروس، علاوه بر تفاوت مورفولوژی آستروسیت‌ها ناحیه هیپوکامپ مغز موش ماده به‌صورت وابسته به غلظت استروژن، میزان بیان GFAP نیز تغییر می‌یابد (۲۵).

استروئیدهای جنسی به روش‌های مختلف می‌توانند فیزیولوژی مغز را تغییر دهد و هورمون‌های گنادی بر مراحل مختلف نوروزن اثر دارد. استروژن‌ها بر مناطق مختلف مغز عمل می‌کنند تا رفتارهای باروری و غیرباروری و عملکرد عصبی، شامل خلق و خوی، شناخت، درد، تشنج و انحطاط عصبی را کنترل کنند (۲۶ و ۲۷).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که تعداد نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ موش‌های اورکتومی طی تیمار با ۱۷-بتا استرادیول افزایش می‌یابد. همچنین استروژن بر بیان نشانگر اختصاصی آستروسیت‌ها GFAP در مناطق مختلف هیپوکامپ تأثیر دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه (شماره ۲۱۶۴۶۰۹) خانم مریم آذری برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته بافت‌شناسی از دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه دامغان بود. بدین وسیله از دانشگاه دامغان به‌خاطر تامین هزینه‌های مطالعه سپاسگزاری می‌گردد.

جنسی متعدد در مورفولوژی، عملکرد و تنظیم بیان ژن در هیپوکامپ مشخص شده است. هورمون‌های جنسی در تنظیم فعالیت و عملکرد هیپوکامپ و همچنین بر روی نورون‌ها و سلول‌های گلیال خصوصاً آستروسیت‌ها موثر است. استروژن و تستوسترون تعداد آستروسیت‌ها در هیپوکامپ موش صحرایی و عملکرد آستروسیت‌ها بعد از آسیب مغزی را تنظیم می‌کنند (۱۹). در مطالعه حاضر ناحیه CA1 تمامی گروه‌ها تفاوت معنی‌داری را با گروه تیمار ۲۴ ساعته نشان دادند. دو گروه تیمار نیز تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نشان دادند. افزایش سلول‌های هرمی CA1 پس از ۲۴ ساعت تیمار، نشان‌دهنده اثر این هورمون بر نورون‌زایی و تفاوت آن با گروه تیمار ۴۸ ساعت، نشان‌دهنده سرعت اثر این هورمون می‌باشد. در موش صحرایی اوارکتومی شده درمان با استرادیول موجب افزایش نورون‌زایی می‌شود. همچنین در موش‌های جوان و پیر، استرادیول موجب محافظت از آسیب‌های ایسکمیک هیپوکامپ می‌شود (۶).

نتایج ایمنوستوشیمی مطالعه حاضر نشان داد که تیمار با استرادیول بر بیان نشانگر GFAP در هیپوکامپ اثر دارد. تغییرات مورفولوژی آستروسیت‌ها از طریق تنظیم ارتباطات سیناپسی در عملکرد نورونی نقش دارد (۱۵). علاوه بر نقش حمایت متابولیکی و ساختمانی سلول‌های گلیال در ارتباطات نورونی، آستروسیت‌ها در پاسخ به استروئیدهای جنسی دچار تغییرات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی می‌شوند (۲۰). استرادیول مسیرهایی که منجر به تغییر در ترجمه پروتئین‌های سیناپسی، شکل‌گیری مجدد اکتین، شکل‌گیری سیناپس و خار دندریتی می‌شود را فعال می‌کند (۲۱). تغییر در مورفولوژی آستروسیت‌ها به‌واسطه استروئیدهای جنسی با ارزیابی بیان GFAP که یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های ساختاری آستروسیت‌ها است؛ انجام می‌گردد (۲۲). علاوه بر نورون‌ها، سلول‌های گلیال نیز هدف هورمون‌های جنسی مانند استروژن و تستوسترون هستند. در موش صحرایی ماده آستروسیت‌های GFAP مثبت منطقه CA1 بیشتر از نرها و برعکس ناحیه CA3 موش‌های نر دارای آستروسیت‌های بیشتر از ماده‌ها است (۲۳). در چرخه استروس چونندگان ماده، میزان ۱۷ بتا استرادیول در مرحله دی‌استروس به آرامی افزایش می‌یابد تا این که در پرواستروس به بالاترین حد رسیده و سریع افت می‌کند. پایین‌ترین میزان ۱۷-بتا استرادیول در مرحله استروس است (۲۴).

با توجه به تصاویر ایمنوستوشیمی GFAP مشاهده شد که مورفولوژی آستروسیت‌ها در گروه تیمار در ناحیه CA1 شبیه به آستروسیت‌های پروتوپلاسمیک است (جسم سلولی گرد با زواید کوتاه و منشعب)؛ اما در سایر گروه‌ها در ناحیه CA1 آستروسیت‌ها ستاره‌ای شکل هستند. در نواحی CA3 و شکنج دندانه‌ای در تمام گروه‌ها آستروسیت‌ها ستاره‌ای شکل هستند. محقق دیگری گزارش

References

- Alenzi FQB, Bahkali AH. Stem cells: biology and clinical potential. *Afr J Biotechnol.* 2011; 10(86): 19929-40. doi: 10.5897/AJBX11.046
- Kordower JH, Chen EY, Morrison JH. Long-term gonadal hormone treatment and endogenous neurogenesis in the dentate gyrus of the adult female monkey. *Exp Neurol.* 2010 Jul; 224(1): 252-57. doi: 10.1016/j.expneurol.2010.03.027
- Pino A, Fumagalli G, Bifari F, Decimo I. New neurons in adult brain: distribution, molecular mechanisms and therapies. *Biochem Pharmacol.* 2017 Oct; 141: 4-22. doi: 10.1016/j.bcp.2017.07.003
- Lenington JB, Yang Z, Conover JC. Neural stem cells and the regulation of adult neurogenesis. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003 Nov; 1: 99. doi: 10.1186/1477-7827-1-99
- Brock O, Keller M, Veyrac A, Douhard Q, Bakker J. Short term treatment with estradiol decreases the rate of newly generated cells in the subventricular zone and main olfactory bulb of adult female mice. *Neuroscience.* 2010 Mar; 166(2): 368-76. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.12.050
- Wnuk A, Korol DL, Erickson KI. Estrogens, hormone therapy, and hippocampal volume in postmenopausal women. *Maturitas.* 2012 Nov; 73(3): 186-90. doi: 10.1016/j.maturitas.2012.07.001
- Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell.* 2008 Feb; 132(4): 645-60. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.033
- Pawluski JL, Brummelte S, Barha CK, Crozier TM, Galea LA. Effects of steroid hormones on neurogenesis in the hippocampus of the adult female rodent during the estrous cycle, pregnancy, lactation and aging. *Front Neuroendocrinol.* 2009 Aug; 30(3): 343-57. doi: 10.1016/j.yfrne.2009.03.007
- Seki T. Microenvironmental elements supporting adult hippocampal neurogenesis. *Anat Sci Int.* 2003 Jun; 78(2): 69-78. doi: 10.1046/j.0022-7722.2003.00043.x
- Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature.* 2000 Jun; 405(6789): 951-55. doi: 10.1038/35016083
- Gould E, Gross CG. Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. *J Neurosci.* 2002 Feb; 22(3): 619-23.
- Taupin P. Neurogenesis in the adult central nervous system. *C R Biol.* 2006 Jul; 329(7): 465-75. doi: 10.1016/j.crvi.2006.04.001
- Saravia F, Beauquis J, Pietranera L, De Nicola AF. Neuroprotective effects of estradiol in hippocampal neurons and glia of middle age mice. *Psychoneuroendocrinology.* 2007 Jun; 32(5): 480-92. doi: 10.1016/j.psyneuen.2007.02.012
- Sauerzweig S, Baldauf K, Braun H, Reymann KG. Time-dependent segmentation of BrdU-signal leads to late detection problems in studies using BrdU as cell label or proliferation marker. *J Neurosci Methods.* 2009 Feb; 177(1): 149-59. doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.10.009
- Ormerod BK, Lee TT, Galea LA. Estradiol initially enhances but subsequently suppresses (via adrenal steroids) granule cell proliferation in the dentate gyrus of adult female rats. *J Neurobiol.* 2003 May; 55(2): 247-60. doi: 10.1002/neu.10181
- Horner PJ, Palmer TD. New roles for astrocytes: the nightlife of an 'astrocyte'. *La vida loca! Trends Neurosci.* 2003 Nov; 26(11): 597-603. doi: 10.1016/j.tins.2003.09.010
- Faigle R, Song H. Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Feb; 1830(2): 2435-48. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.09.002
- Ying Zhu, Quanguang Zhang, Wenli Zhang, Ning Li, Yongxin Dai, Jingyi Tu, et al. Protective effect of 17 β -Estradiol upon hippocampal spine density and cognitive function in an animal model of vascular dementia. *Sci Rep.* 2017; 7: 42660. doi: 10.1038/srep42660
- Lie DC, Song H, Colamarino SA, Ming GL, Gage FH. Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004; 44:399-421. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121631
- Sriraksa N, Wattanathorn J, Muchimapura S, Tiamkao S, Brown K, Chaisiwamongkol K. Cognitive-enhancing effect of quercetin in a rat model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* Volume 2012, Article ID 823206. doi: http://dx.doi.org/10.1155/2012/823206
- Suhonen JO, Peterson DA, Ray J, Gage FH. Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. *Nature.* 1996 Oct; 383(6601): 624-27. doi: 10.1038/383624a0
- Song H, Stevens CF, Gage FH. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature.* 2002 May; 417(6884): 39-44. doi: 10.1038/417039a
- Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol.* 2000 Oct; 425(4): 479-94.
- Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N, et al. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science.* 2004 May; 304(5675): 1338-40. doi: 10.1126/science.1095505
- Sadrollahi M, Ghorbanian M T, Zavareh S. [Hippocampal neurogenesis in mice at different phases of the estrous cycle]. *Feyz.* 2014; 18(4): 336-44. [Article in Persian]
- Heberden C. Sex steroids and neurogenesis. *Biochem Pharmacol.* 2017 Oct; 141: 56-62. doi: 10.1016/j.bcp.2017.05.019
- Etgen AM. Estrogen regulation of neurotransmitter and growth factor signaling in the brain. *Hormones, Brain and Behavior.* 2002; 3: 381-440. doi: https://doi.org/10.1016/B978-012532104-4/50048-2

Original Paper

Effect of exogenous estrogen treatment on hippocampal neurogenesis in ovariectomized mice

Maryam Azari (M.Sc)¹, Mohammad Taghi Ghorbanian (Ph.D)^{*2}
Mahmoud Elah Dadi Salmani (Ph.D)³

¹M.Sc in Histology, School of Biology and Institute of Biological Sciences, Damghan University, Damghan, Iran.

²Assistant Professor, Department of Cellular and Molecular Biology, School of Biology and Institute of Biological Sciences, Damghan University, Damghan, Iran. ³Associate Professor, Department of Biology, School of Biology and Institute of Biological Sciences, Damghan University, Damghan, Iran.

Abstract

Background and Objective: Adult neurogenesis occurs in most mammalian species in two main areas of brain: 1- subventricular zone 2- the dentate gyrus of the hippocampus. Many factors such as 17-B estradiol affect neurogenesis in the hippocampus. The aim of this study was to investigate the effect of exogenous 17-B estradiol on neurogenesis and astrocyte functions in the ovariectomized mice.

Methods: In this experimental study; NMRI mice were allocated into five experimental groups including Sham, Control, Treatment with single dose of 17-B estradiol two weeks after ovariectomy (OVX) and were sacrificed 24 hours later, Treatment with single dose of 17-B estradiol two weeks after Ovx and were sacrificed 48 hours later and treatment with single dose of Sesame Oil 2 weeks after OVX and were sacrificed after 24 hours. Animals were transcardially perfused with paraformaldehyde. Brains were removed and its sections for cresyl fast violet staining and GFAP immunohistochemistry were prepared. Cells were counted and investigated.

Results: Neuronal density and Proliferation of hippocampal progenitor cells in the CA1 region of 17-B estradiol treated mice significantly increased up to 24 hours ($P<0.05$). Density of glia and particularly astrocytes in different regions of the hippocampus significantly reduced after treatment with 17-B estradiol ($P<0.05$).

Conclusion: Density of hippocampal CA1 neurons are influenced by 17-B estradiol. Also, density and morphology of glia cells, especially astrocytes in different regions of the hippocampus are affected by 17-B estradiol.

Keywords: 17-B estradiol, Neurogenesis, Hippocampus, Astrocyte, Mouse

* **Corresponding Author:** Ghorbanian MT (Ph.D), E-mail: ghorbanian@du.ac.ir

Received 6 Jun 2017

Revised 31 Jul 2017

Accepted 30 Aug 2017

Maryam Azari (<https://orcid.org/0000-0001-8730-7061>), Mohammad Taghi Ghorbanian (<https://orcid.org/0000-0001-8173-5508>)