Archive of SID

Original Article

Effect of Coumarin on Memory Retention, Tissue Index, and GABAA Receptor Gene Expression in the Hippocampus of Gonadectomized Adult Male Rats

Maryam Najafifard[1], *Nasrin Heidarieh*[2]*, *Ali Haeri Rohani*[1], *Akram Eidi*[1]

[1] *Department of Biology, Faculty of Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.*

[2] *Department of Biology, Faculty of Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.*

*Corresponding Author:
Nasrin Heidarieh;
Department of Biology, Faculty of Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

Email:
n_heidarieh@qom-iau.ac.ir,
nheidarieh@yahoo.com

Received: 31 Oct, 2020
Accepted: 30 Jan, 2021

Abstract

Background and Objectives: Learning is essential for understanding mental disorders, normal behavior, and forgetfulness. In this regard, the hippocampus plays an important role in the learning process. It has been reported that gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors in the hippocampus are involved in learning and memory mechanisms and some diseases, such as epilepsy and Alzheimer's. This study aimed to investigate the effect of coumarin on retention, tissue index, and GABA type A receptor gene expression in the hippocampus of male gonadectomy rats.

Methods: The population of this study consisted of 40 Wistar rats, which were randomized into 5 groups (n=8 each). These groups included healthy without treatment, gonadectomized without treatment, gonadectomized receiving solvent or Dimethyl sulfoxide, and gonadectomized receiving coumarin at a dose of 3.5 mg/kg. The treatment was administered intraperitoneally once daily in 2 weeks. A shuttle box was used to test the memory retention of the rats. At the end of the research process, the rats were exterminated in accordance with research ethics. After removing the brains of rats, in each group, in four brains histology test was implemented with Niels staining, and in four other brains, the hippocampus was removed quickly. The hippocampi were placed inside the micro type and frozen with liquid nitrogen. Finally, a gene expression test was taken from the hippocampus using a real-time polymerase chain reaction.

Results: Based on the findings, in the memory retention test of initial latency to enter the dark room (step through latency), the gonadectomy group showed a reduction, compared to the healthy group. Moreover, a significant decrease was observed in the number of healthy hippocampal pyramidal neurons; however, GABAA gene expression showed no significant difference. In the gonadectomy groups receiving treatments with different doses of coumarin, the amount of STL (Step Through Latency) and number of healthy pyramidal neurons in the memory retention test showed a significant decrease, compared to the gonadectomy group receiving solvent; nonetheless, a significant increase was revealed in the GABAA-α2 gene expression.

Conclusion: It can be concluded that Gonadectomy caused memory impairment and coumarin affects memory impairment by increasing the GABAA-α2 gene expression and decreasing the number of healthy hippocampal neurons.

Keywords: Coumarins; Gene expression; Gonadectomy; Hippocampus; Memory retention.

DOI: 10.29252/qums.14.11.1

International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره چهاردهم، شماره یازدهم، بهمن ۹۹
صفحه ۱ الی ۱۰

مقاله پژوهشی
(Original Article)

بررسی اثر کومارین بر یادآوری‌حافظه (Memory Retention)، شاخص بافتی و بیان ژن گیرنده GABAA در هیپوکامپ موش‌های صحرایی نر گنادکتومی شده

مریم نجفی فرد[۱]، نسرین حیدریه[۲*]، سید علی حائری روحانی[۱]، اکرم عیدی[۱]

[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران.

[۲] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:
نسرین حیدریه؛ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، قم، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:
n_heidarieh@qom-iau.ac.ir,
nheidarieh@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: یادگیری برای فهم اختلالات روانی، رفتار طبیعی و همچنین فراموشی ضروری است. هیپوکامپ نقش مهمی در فرایند یادگیری دارد. گیرنده‌های گاما آمینوبوتریک اسید (GABA: Gamma aminobutyric acid) موجود در هیپوکامپ در مکانیسم‌های یادگیری و حافظه و در برخی از بیماری‌ها از جمله صرع و آلزایمر دخیل هستند. در این راستا، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر کومارین بر به یادآوری حافظه، شاخص بافتی و بیان ژن گیرنده GABAA در هیپوکامپ موش صحرایی نر گنادکتومی انجام شد.

روش بررسی: در این پژوهش از ۴۰ سر موش صحرایی نژاد ویستاراستفاده شد که به طور تصادفی به پنج گروه هشت نفره تقسیم شدند. این گروه‌ها شامل: گروه‌های سالم بدون تیمار، گنادکتومی بدون تیمار، گنادکتومی دریافت‌کننده حلال یا دی‌متیل سولفوکسید (DMSO: Dimethyl sulfoxide) و گنادکتومی‌های دریافت‌کننده کومارین با دوز ۳/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم بودند. تیمار به صورت داخل صفاقی به مدت دو هفته و روزی یک بار انجام شد. برای آزمون به یادآوری حافظه، موش‌ها توسط جعبه شاتل مورد استفاده قرار گرفتند. در انتهای دوره، موش‌ها با رعایت ضوابط اخلاق پژوهش معدوم شدند. پس از جداسازی مغز موش‌ها، در هر گروه چهار عدد از مغزها برای آزمون هیستولوژی با رنگ‌آمیزی نیسل مورد استفاده قرار گرفت و برای چهار عدد مغز دیگر، به سرعت جداسازی هیپوکامپ انجام شد. هیپوکامپ‌ها در داخل میکروتیوپ قرار گرفتند و با کمک نیتروژن مایع فریز شدند. در نهایت، آزمون بیان ژن با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی (Real time PCR) از هیپوکامپ‌ها گرفته شد.

یافته‌ها: یافته‌های مطالعه حاضر نشان دادند که گروه گنادکتومی نسبت به گروه سالم در آزمون به یادآوری حافظه، کاهش تأخیر اولیه ورود به اتاق تاریک (STL: Step. Through Latency) را داشتند. همچنین در تعداد نورون‌های هرمی سالم هیپوکامپ، کاهش معناداری مشاهده گردید؛ اما در بیان ژن GABAA تفاوت معناداری وجود نداشت. بر مبنای نتایج، در گروه‌های گنادکتومی تیمار شده با دوزهای مختلف کومارین نسبت به گروه گنادکتومی دریافت‌کننده حلال در آزمون به یادآوری حافظه، میزان STL و تعداد نورون‌های هرمی سالم کاهش معناداری داشت؛ اما در بیان ژن GABAA-α2 افزایش معناداری مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: گنادکتومی باعث تخریب حافظه می‌شود و کومارین با افزایش بیان ژن GABAA-α2 و کاهش تعداد نورون‌های سالم هیپوکامپ بر تخریب حافظه اثر می‌گذارد.

کلیدواژه‌ها: به یادآوری حافظه؛ بیان ژن؛ کومارین‌ها؛ گنادکتومی؛ هیپوکامپ.

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Najafifard M, Heidarieh N, Haeri Rohani A, Eidi A. Effect of Coumarin on Memory Retention, Tissue Index, and GABAA Receptor Gene Expression in the Hippocampus of Gonadectomized Adult Male Rats. Qom Univ Med Sci J 2021;14(11):1-10. [Full Text in Persian]

www.SID.ir

International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

مقدمه

یادگیری روندی است که به‌وسیله آن درباره دنیای اطراف خود اطلاعات کسب می‌کنیم (تجربه)؛ درحالی که حافظه فرآیندی است که توسط آن، این اطلاعات، رمزبندی و ذخیره شده و سپس به خاطر آورده می‌شوند. یکی از مهم‌ترین سطوح عملکردی سیستم عصبی مرکزی، یادگیری و حافظه می‌باشد. هیپوکامپ یکی از اولین مناطق مغز است که در بیماری‌های مغزی مانند آلزایمر، هانتیگتون و صرع دخالت دارد. بسیاری از اختلالات حافظه‌ای ناشی از آسیب به هیپوکامپ، ماهیت فضایی دارند (۱).

یافته‌های مطالعات گذشته نشان‌دهنده تراکم بالای گیرنده‌های گابا در هیپوکامپ بوده و بیانگر این هستند که فعال‌سازی گیرنده‌های گابا، فرایند حافظه و یادگیری را کنترل می‌کند (۲). گاما آمینو بوتیریک اسید (GABA) یک نوروترانسمیتر مهاری اصلی مغز است. اتصال گابا بر گیرنده‌های GABAA باعث باز شدن کانال کلری در وسط گیرنده شده و موجب هیپرپلاریزاسیون می‌شود (۳). تقریباً ۸۰ درصد از کل گیرنده‌های GABAA حاوی یک جایگاه اتصال بنزودیازپین واقع در بین زیرواحد $\gamma 2$ و زیرواحد α مربوطه ($\alpha 2$، $\alpha 5$) می‌باشند (۴).

ثابت شده است که حذف بیضه‌ها که منبع اصلی تولیدکننده هورمون جنسی تستوسترون می‌باشند، باعث ایجاد اختلالات حافظه و یادگیری می‌شود (۵). برخی از استروئیدها مانند آلفا هیدروکسی استروئیدها با اتصال به گیرنده غشایی گابا A می‌توانند این گیرنده را به طور مستقیم فعال نمایند (۶،۷). برخی از مواد فنلی در گیاهان مانند کومارین با اتصال به گیرنده‌های GABAA دارای اثرات ضد اضطراب، خواب‌آور، آرام‌بخش و ضد صرع می‌باشند (۸).

کومارین ترکیبی از خانواده مواد فنلی رایج در گیاهان است که خواص فیزیولوژیک متعددی از قبیل ضد انعقاد خون، ضد میکروب و آنتی‌اکسیدان دارد و کمپلکس‌های آن‌ها با خاصیت دارویی ضد سرطان مورد توجه بسیاری از شیمی‌دانان و داروسازان قرار گرفته است. باید خاطرنشان ساخت که کومارین در کاهش تشنج از طریق اتصال به جایگاه بنزودیازپین گیرنده‌های گابا A مؤثر می‌باشد (۸).

Muke و همکاران در سال ۲۰۱۸ در مطالعه‌ای نشان دادند که کومارین دارای اثرات آرام‌بخش و ضد استرس می‌باشد که احتمالاً از طریق اثر بر گیرنده GABAA باعث افزایش رها شدن گاما- آمینوبوتریک اسید در مغز می‌شود (۹).

محمدی و همکاران نیز در سال ۲۰۱۹ طی پژوهشی نشان دادند که تزریق کومارین به رت‌ها، اثرات آرام‌بخشی و ضد تشنج را به همراه داشت و باعث افزایش رها شدن GABA و مهار نورون‌های مغزی گردید. شایان ذکر است که کومارین از سه محل به جایگاه بنزودیازپین رسپتور GABA متصل شده و به عنوان یک داروی ضد تشنج، فعالیت این گیرنده را افزایش می‌دهد (۱۰).

پژوهش‌های انجام شده در ارتباط با کومارین به عنوان ماده مؤثر بسیاری از گیاهان اغلب در زمینه بررسی اثرات ضد درد، ضد تشنج و ضد اضطراب با استفاده از روش‌های رفتاری انجام شده‌اند و تاکنون مطالعه‌ای در زمینه یادگیری و حافظه در مورد این ماده با استفاده از روش‌های مولکولی به ثبت نرسیده است؛ از این رو با توجه به اهمیت روش‌های مولکولی و بافتی در خصوص به یادآوری حافظه، مطالعه حاضر با بهره‌گیری از روشی نوین، تأثیرات کومارین بر حافظه و یادگیری را به صورت مولکولی در هیپوکامپ بیان می‌کند.

با توجه به مطالب بیان شده، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر کومارین بر به یادآوری حافظه، بیان ژن گیرنده GABAA و تعداد نورون‌های هرمی سالم هیپوکامپ موش‌های صحرایی نر گنادکتومی انجام شد.

روش بررسی

در این پژوهش ۴۰ سر موش صحرایی نر ویستار با وزن ۲۲۰ تا ۲۳۰ گرم از مؤسسه پاستور ایران تهیه شد. موش‌ها در شرایط استاندارد دمایی ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۴۵-۴۰ درصد با دسترسی آزاد به پلت و آب شیرین قرار گرفتند (۱۱). موش‌ها به طور تصادفی به پنج گروه هشت نفره تقسیم شدند که شامل: گروه‌های سالم بدون تیمار (intact)، گنادکتومی بدون تیمار (-control)، گنادکتومی دریافت‌کننده حلال به میزان ۰/۵ سی‌سی (-control) و گنادکتومی دریافت‌کننده ۳/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کومارین بود. تیمار به صورت داخل صفاقی، یک بار در روز به مدت ۱۵ روز انجام شد (۱۲). ماده کومارین و کریستال ویوله از شرکت سیگما آلدریچ خریداری شدند. پارافرمالدهید، ژلاتین، کلروفرم، گزیلازین، الکل ۹۶ درصد، الکل مطلق، گزیلل،

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

فرمامید، آب مقطر و DMSO از شرکت Merck آلمان تهیه شدند. (Cat No:K-3032) Accuprep Genomic DNA xtraction kit نیز از شرکت Abcam و AccuPower® 2X Greenstar qPCR Master Mix از شرکت BIONEER خریداری گردید. شایان ذکر است که پروتکل این پژوهش براساس قوانین بین‌المللی درباره حیوانات آزمایشگاهی تنظیم گشته و در کمیته اخلاق دانشگاه با شماره IR.IAU.SRB.REC.1397.127 به تصویب رسیده است.

حیوانات با استفاده از تزریق داخل صفاقی مخلوطی از کتامین (۱۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند. سپس با ثابت نمودن حیوان روی تخته تشریح، پوست ناحیه اسکروتوم برش داده شد و با کمی فشار، بیضه‌ها نمایان گشته و بیرون کشیده شدند. در انتها، طناب‌های اسپرمی با نخ بخیه بسته و قطع شدند و سپس محل جراحی با نرمال سالین استریل شستشو گردید و پوست بخیه زده شد. پس از جراحی، حیوان برای بهبودی به مدت دو هفته در قفس انفرادی نگهداری شد. پس از طی دوران نقاهت، آزمایشات لازم روی حیوان صورت گرفت (۱۳).

به منظور سنجش یادآوری حافظه از دستگاه یا جعبه شاتل که دارای دو محفظه روشن و تاریک (۳۰ × ۲۰ × ۳۰ سانتی‌متر) و یک درب گیوتینی (۷ × ۹ سانتی‌متر) می‌باشد، استفاده گردید. کف هر دو محفظه از فولاد ضد زنگ (قطر ۲/۵ میلی‌متر) ساخته شده و به یک استیمولاتور متصل شده است. به منظور آموزش ابتدایی، حیوان در بخش روشن دستگاه قرار گرفت و پس از ۵ ثانیه در گیوتینی باز شد. مدت زمانی که طول کشید حیوان وارد اتاق تاریک شود، ثبت گردید و سپس حیوان از آن خارج شد. ۳۰ دقیقه بعد، این عمل تکرار گردید؛ با این تفاوت که پس از ورود حیوان به بخش تاریک، بلافاصله شوکی با فرکانس ۵۰ هرتز و ولتاژ ۰/۶-۰/۵ میلی‌آمپر به مدت ۹ ثانیه از ناحیه پا به حیوان وارد گشته و در نهایت پس از ۵ ثانیه حیوان از دستگاه خارج می‌شد. ۲۴ ساعت پس از آموزش جهت انجام آزمون به یادآوری، حیوان در بخش روشن دستگاه قرار گرفت. پس از ۳۰ ثانیه در گیوتینی باز شد و مدت زمان برای ورود به بخش تاریک به عنوان زمان به یادآوری ثبت گردید. شایان ذکر است که کل زمان آزمون ۶۰۰ ثانیه بود (۱۴).

به منظور انجام آزمایش هیستولوژی، بلافاصله پس از آزمون سنجش یادآوری حافظه با دستگاه شاتل باکس، حیوانات با کلروفرم بیهوش گردیدند. سپس سر آن‌ها بریده شد و مغز آن‌ها به سرعت خارج گردید. در هر گروه، چهار عدد از مغزها برای مطالعه بافت‌شناسی و چهار عدد دیگر برای مطالعه مولکولی مورد استفاده قرار گرفت. به منظور مطالعه بافت‌شناسی، مغزها در محلول فرمالین ۱۰ درصد ثابت شدند و پس از اینکه ۱/۳ میانی مغزها جدا شدند و فیکساتیو ۲۴ ساعت بعد تعویض شد و تحت پروسس بافتی قرار گرفتند، آبگیری و قالب‌گیری صورت گرفت. ۱۰ لام با برش‌های سریالی ۷-۵ میکرومتری تهیه شد و به وسیله رنگ‌آمیزی نیسل، رنگ‌آمیزی گردید. سپس به طور کاملاً تصادفی، پنج مقطع از مقاطع بافتی از گروه‌های مختلف تحت بررسی میکروسکوپی قرار گرفتند. جهت شمارش سلول‌ها از میکروسکوپ OLYMPUS, AX70 استفاده شد و تصاویر نمونه‌ها با بزرگنمایی ۴۰ ثبت گردید. پس از آن شمارش سلولی با استفاده از نرم‌افزار Olysia bio report انجام شد. نورون‌های هرمی شکل در این بررسی در مقطع ۳/۶-۳/۳ (نسبت به برگما) با توجه به اطلس پاکسینوس انتخاب شدند (۱۵).

برای انجام عمل RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction) ابتدا منطقه هیپوکامپ از مغز موش‌ها خارج شد و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد گردید. نمونه‌های هیپوکامپ به یخچالی با دمای ۸۴- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند و تا زمان استخراج RNA (Ribonucleic acid) در آن نگهداری گردیدند. به منظور تعیین بیان ژن a2 و a5 در گیرنده‌های GABA هیپوکامپ، ابتدا بافت مورد نظر هموژنیزه شد و در ادامه کل RNA موجود در بافت‌ها با کمک محلول استخراج RNX+ و پروتکل کلروفرم- الکل استخراج گردید. آزمایش غلظت‌سنجی RNA برای نشان دادن درجه خلوص قابل قبول از آن انجام شد. سنجش غلظت به کمک دستگاه نانودراپ اسپکتروفتومتری (ساخت شرکت Nanolytik، کشور آلمان) صورت گرفت. سپس cDNA (complementary DNA) ساخته شد. به منظور تکثیر قطعه از cDNA مربوط به ژن‌های فوق از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) استفاده گردید. فرایند PCR با استفاده از AceQ ™ RT_PCR SYBR Green Master با کمک آنزیم پلیمراز Taq و پرایمرهای اختصاصی برای ژن GABAAa2 F(5'-GAACAGAGAATCGGTGCCAGCAAGA-3')،

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

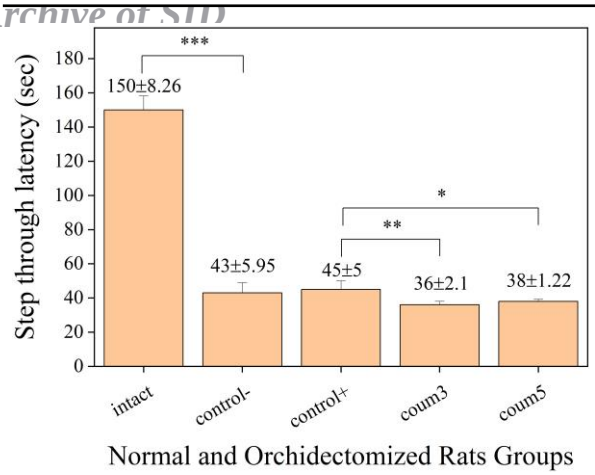
5'-TGCAAATTCAATTAGGGCAGAGAACACAA-)
5'-TGCTATGCATTTGTCTTCT) GABAAa5 ژن ،R(3'
5′-GATTAGACCCGTTACCA) ،F(CTGCTCTGATT-3'
5′-CCCAGCCATGT) β-Actin و ژن R(TCGAGAT-3′
5′-CGTCTCCGGAGTCCATCAC-) ،F(ACGTAGCCA3′
R(3′ بیان شد. شرایط PCR از نظر دمای اتصال پرایمرها، تعداد سیکل و میزان PCR در آزمایشات جداگانه بهینه‌سازی گردید و با استفاده از برنامه Stepone software مورد ارزیابی قرار گرفت. مشخصات چرخه حرارتی به شرح زیر بود: ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۶۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۴۰ سیکل. در ادامه، میانگین Ct ژن‌های مرجع و هدف در هر نمونه محاسبه گردید. تفاوت بین سیکل آستانه ژن‌های هدف و مرجع در نمونه کنترل مورد مطالعه به صورت ΔCt محاسبه شد و تفاوت بین آن‌ها به صورت ΔΔCt بیان گردید (۱۶).

آنالیز آماری

تمامی اطلاعات به صورت میانگین±انحراف معیار استاندارد بیان شده‌اند. برای آنالیز آماری، آزمون‌های به خاطرآوری و هیستولوژی از روش ANOVA (one-way analysis of variance) استفاده گردید. در تمامی محاسبات، اختلاف (P<۰/۰۵) به عنوان سطح معناداری لحاظ گردید. داده‌های بخش بیان ژن توسط ΔΔCt محاسبه گشته و تجزیه و تحلیل شدند. اختلاف سطح ΔΔCt بیش از ۱ به عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد.

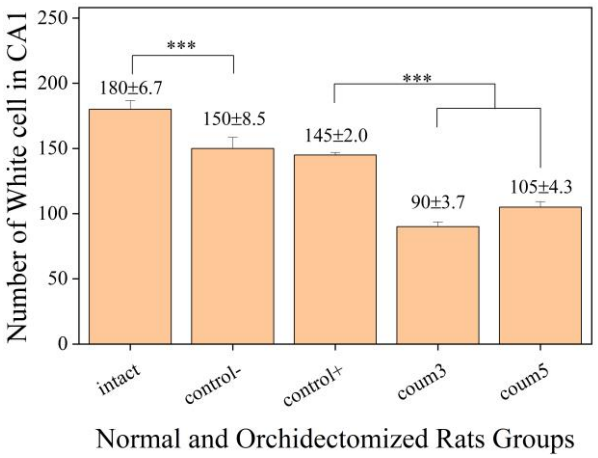
یافته‌ها

گروه گنادکتومی بدون تیمار نسبت به گروه سالم بدون تیمار، کاهش معناداری را در به یادآوری حافظه و تعداد نورون‌های هرمی سالم هیپوکامپ نشان دادند (شکل ۱). گروه گنادکتومی دریافت‌کننده حلال DMSO نسبت به گروه گنادکتومی بدون تیمار در به یادآوری حافظه، تعداد نورون‌ها و بیان ژن GABAA تفاوت معناداری را نشان ندادند. در مقابل، گروه‌های گنادکتومی دریافت‌کننده ۳/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کومارین نسبت به گروه گنادکتومی دریافت‌کننده حلال در به یادآوری حافظه (شکل ۱) کاهش معناداری داشتند.



شکل شماره ۱: اثر گنادکتومی و کومارین بر تأخیر ورود به قسمت تاریک دستگاه شاتل باکس در روز آزمون در رت‌های گنادکتومی شده
نمودارها نشان‌دهنده میانگین±انحراف معیار استاندارد (Mean±SEM) می‌باشند. داده‌ها به روش تجزیه و تحلیل واریانس یک‌طرفه و به دنبال آن آزمون توکی تجزیه و تحلیل شدند.
(P<۰/۰۰۱*)، (P<۰/۰۱**)، (P<۰/۱*)، n=۸**

نتایج مطالعات هیستولوژی نشان دادند که گروه‌های گنادکتومی دریافت‌کننده ۳/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کومارین نسبت به گروه گنادکتومی دریافت‌کننده حلال، کاهش معناداری را در تعداد نورون‌های سالم هیپوکامپ (اشکال ۲ و ۳) نشان دادند.
نتایج بیان ژن نشان دادند که گروه گنادکتومی دریافت‌کننده

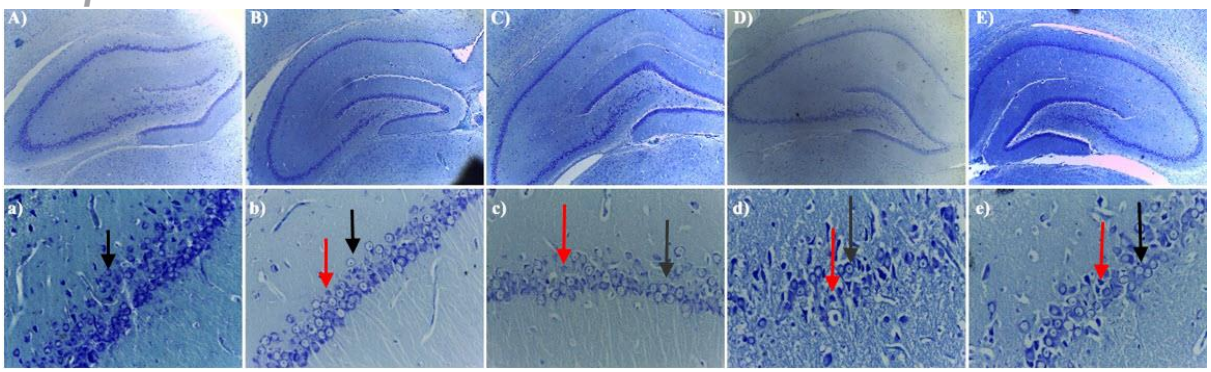


شکل شماره ۲: اثر گنادکتومی و کومارین بر تعداد نورون‌های هرمی سالم در منطقه Cornu Ammonis (CA1) هیپوکامپ (مطالعه کمی هیستولوژی) در رت‌های گنادکتومی شده
نمودارها نشان‌دهنده میانگین±انحراف معیار استاندارد (Mean±SEM) می‌باشند. داده‌ها به روش تجزیه و تحلیل واریانس یک‌طرفه و به دنبال آن آزمون توکی تجزیه و تحلیل شدند.
(P<۰/۰۰۱*)، (P<۰/۱**)، n=۸**

www.SID.ir

International License Creative Commons Attribution License 4.0

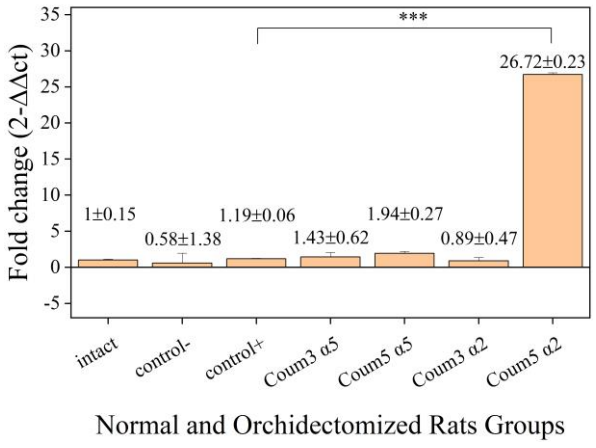
Archive of SID



شکل شماره ۳: تصاویر (مطالعه کیفی) هیستولوژی نیسل از منطقه CA1 هیپوکامپ در رت‌های گنادکتومی شده

A) مقطع بافتی ناحیه CA1 هیپوکامپ با بزرگنمایی ٤ در گروه سالم بدون تیمار که هیچ ماده‌ای را دریافت نکردند؛ a) مقطع بافتی ناحیه CA1 هیپوکامپ با بزرگنمایی ٤٠ در گروه سالم بدون تیمار که هیچ ماده‌ای را دریافت نکردند (Intact). در این گروه هیچ‌گونه انحطاط یا نکروز سلول‌های عصبی وجود ندارد. تعداد زیاد سلول‌های هرم سالم (White cell) با هسته روشن و هستک واضح با نماد پیکان سیاه قابل مشاهده است؛ B) مقطع بافتی ناحیه CA1 هیپوکامپ با بزرگنمایی ٤ در گروه گنادکتومی بدون تیمار که هیچ ماده‌ای را دریافت نکردند؛ b) مقطع بافتی ناحیه CA1 هیپوکامپ با بزرگنمایی ٤٠ در گروه گنادکتومی بدون تیمار که هیچ ماده‌ای را دریافت نکردند (-Control). در این گروه انحطاط یا نکروز سلول‌های عصبی نسبت به گروه سالم به میزان زیادی وجود دارد. سلول‌های هرمی سالم (White cell) با هسته روشن و هستک واضح با نماد پیکان سیاه قابل مشاهده است. همچنین نکروز سلول‌های هرمی (Dark cell) با هسته پیکنوز شده با نماد پیکان قرمز قابل مشاهده می‌باشد؛ C) مقطع بافتی ناحیه CA1 هیپوکامپ با بزرگنمایی ٤ در گروه گنادکتومی که با حلال کومارین تیمار شده است؛ c) مقطع بافتی ناحیه CA1 هیپوکامپ با بزرگنمایی ٤٠ در گروه گنادکتومی تیمار با حلال کومارین (+Control). در این گروه انحطاط یا نکروز سلول‌های عصبی نسبت به گروه (-Control) به میزان ناچیزی وجود دارد؛ D) مقطع بافتی ناحیه CA1 هیپوکامپ با بزرگنمایی ٤ در گروه گنادکتومی که با دوز ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم کومارین تیمار شده است؛ d) مقطع بافتی ناحیه CA1 هیپوکامپ با بزرگنمایی ٤٠ در گروه گنادکتومی تیمار با دوز ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم کومارین (Coum3). در این گروه انحطاط یا نکروز سلول‌های عصبی نسبت به گروه (+Control) به میزان بسیار زیادی وجود دارد؛ E) مقطع بافتی ناحیه CA1 هیپوکامپ با بزرگنمایی ٤ در گروه گنادکتومی که با دوز ٥ میلی‌گرم بر کیلوگرم کومارین تیمار شده است؛ e) مقطع بافتی ناحیه CA1 هیپوکامپ با بزرگنمایی ٤٠ در گروه گنادکتومی تیمار با دوز ٥ میلی‌گرم بر کیلوگرم کومارین (Coum5). در این گروه انحطاط یا نکروز سلول‌های عصبی نسبت به گروه (+Control) به میزان زیادی وجود دارد.

۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کومارین نسبت به گروه گنادکتومی دریافت‌کننده حلال در بیان ژن GABAA-a2 (شکل ۴) افزایش معناداری داشته است.



شکل شماره ٤: سطح نسبی mRNA ژن‌های GABAA-α5 و GABAA- α2 در هیپوکامپ موش‌های صحرایی نر گنادکتومی شده تیمار با دوز ۳/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کومارین در مقایسه با گروه کنترل

نمودارها نشان‌دهنده میانگین±انحراف معیار استاندارد (Mean±SEM) می‌باشند.

اختلاف سطح ΔΔCt بیش از یک سطح معنادار در نظر گرفته شد. n=۸

بحث

حافظه یک عملکرد مهم زیست‌شناختی است که بدون آن زندگی امکان‌پذیر نمی‌باشد. ذخیره اطلاعات با عملکرد هماهنگ شبکه‌های عصبی در مغز انجام می‌شود. بیماری‌های عصبی به طور برجسته‌تر، عملکردهای مغز را تحت تأثیر قرار می‌دهند؛ به ویژه یادگیری و پردازش حافظه که منجر به اختلال در حافظه و زوال عقل می‌شود، عملکرد شناختی و فکری مغز را به دلیل آسیب عصبی مختل می‌کند (۱۷). در مطالعات متعددی نشان داده شده است که هورمون‌های جنسی در رفتار یادگیری و حافظه دخالت دارند و کمبود یا عدم این هورمون اثرات مهمی را بر هیپوکامپ بر جای می‌گذارد (۱۸). از سوی دیگر، تشکیلات هیپوکامپ نقش عمده‌ای را در محاسبه و ذخیره‌سازی اطلاعات فضایی ایفا می‌کند. بسیاری از اختلالات حافظه‌ای ناشی از آسیب به هیپوکامپ، ماهیت فضایی دارند. میزان این اختلالات با حجم تخریب بافت هیپوکامپ، ارتباط مستقیمی دارد. سلول‌های هرمی ناحیه CA1 هیپوکامپ بسیار حساس بوده و از اولین نورون‌هایی

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

هستند که در شرایط پاتولوژیک و بیماری‌های دژنراتیو مغز از بین می‌روند (۱۹). در هیپوکامپ، زیرواحدهای گیرنده GABAA غالباً α2 و α5 هستند که در سراسر مناطق CA1 و CA3 قرار دارند (۲۰). گیرنده GABAA-α2 و GABAA-α5، محل اتصال با میل بالا برای بنزودیازپین‌ها می‌باشند (۴). این دو ساب‌یونیت در مکانیسم‌های یادگیری و حافظه اهمیت دارند (۲۱).

در پژوهش حاضر آزمون رفتاری شاتل باکس جهت بررسی یادگیری و حافظه مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان دادند که میزان STL در گروه گنادکتومی نسبت به گروه سالم کاهش معناداری داشته است. این مهم حاکی از آن است که گنادکتومی، تراکم گیرنده‌های آندروژنی را در هیپوکامپ کاهش می‌دهد. این مهم با نتایج مطالعات مقدمی و همکاران در سال ۲۰۱۶ (۲۲) همخوانی دارد.

در مطالعات متعدد نشان داده شده است که هورمون‌های جنسی در رفتار یادگیری و حافظه دخالت داشته و کمبود یا عدم آن‌ها اثرات مهمی را بر هیپوکامپ بر جای می‌گذارد که نقش بسزایی در حافظه و یادگیری دارند (۱۸). تستوسترون با تأثیر بر رشد خارهای دندریتیک و تراکم سیناپس در سلول‌های هرمی هیپوکامپ باعث تشکیل و نگهداری حافظه و یادگیری می‌گردد. گنادکتومی موجب تغییرات فیزیولوژیکی در سطوح تستوسترون می‌شود که با کاهش خارهای دندریتی و تراکم سیناپسی در نواحی CA1 و CA3 هیپوکامپ همراه می‌باشد (۲۳). این خارهای دندریتی، محل مناسبی برای حافظه طولانی‌مدت هستند و افزایش فعالیت آن‌ها باعث افزایش خارهای جدید می‌شود (۲۳)؛ از این رو احتمالاً کاهش حافظه در موش‌های گنادکتومی در پژوهش حاضر می‌تواند از طریق کاهش تراکم گیرنده‌های آندروژنی، خارهای دندریتی و تراکم سیناپسی در نواحی CA1 و CA3 هیپوکامپ ایجاد شده باشد.

از سوی دیگر، یافته‌های مطالعات پیشین وجود یک رابطه نزدیک بین سیستم گابائرژیک و استروئیدها را در مغز نشان می‌دهند (۲۴). کورتیکواستروئیدها می‌توانند اثرات خود را از طریق تنظیم جایگاه‌های خاصی روی سابیونیت‌های گیرنده GABAA به انجام برسانند (۲۵). این احتمال وجود دارد که در پژوهش حاضر، افزایش بیان ژن GABAA-α2 در گروه گنادکتومی دریافت‌کننده دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کومارین با احتمال افزایش برخورد بیشتر نورواستروئیدهای مغزی با گیرنده GABAA همراه شود که این مهم می‌تواند تحریک این گیرنده را افزایش دهد، اثرات مهاری بیشتری را اعمال کند و سبب اختلال حافظه در این گروه شود.

در مطالعه حاضر گروه گنادکتومی نسبت به گروه گنادکتومی دریافت‌کننده حلال از نظر میزان STL تفاوت معناداری نداشت. این مهم حاکی از آن می‌باشد که حلال عصاره (DMSO) بر فرایند حافظه و یادگیری در موش‌های گنادکتومی تأثیر چندانی نداشته است. از سوی دیگر، نتایج نشان دادند که میزان STL در گروه گنادکتومی تیمار شده با دوز ۳/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کومارین نسبت به گروه دریافت‌کننده حلال، تفاوت معناداری داشته است که این کاهش احتمالاً ناشی از اثر مستقیم یا غیر مستقیم بر گیرنده GABAA می‌باشد.

Jarogniew و همکاران نیز در سال ۲۰۱۰ با استفاده از روش کیندلینگ الکتریکی، تشنج را در موش‌ها ایجاد کردند و سپس با تزریق درون صفاقی کومارین به موش‌ها متوجه شدند که کومارین، آستانه تشنج را به شدت کاهش داده و احتمالاً این عمل از طریق اتصال کومارین به رسپتور GABA و افزایش فعالیت آن ایجاد شده است (۲۶).

در مقایسه نتایج ذکر شده با پژوهش حاضر، احتمالاً کومارین با اتصال به جایگاه بنزودیازپین در رسپتورهای GABAA باعث افزایش فعالیت این گیرنده شده و با باز شدن کانال کلری این گیرنده موجب تقویت هیپرپلاریزاسیون گردیده و در نهایت سبب تشدید اختلال در حافظه موش‌های نر گنادکتومی شده است.

در پژوهش حاضر به منظور بیان ژن از آزمون Real time PCR استفاده شد. نتایج نشان دادند که در آزمون RT-PCR، بیان ژن GABAA-a5 و GABAA-α2 در گروه گنادکتومی با گروه سالم و همچنین گروه گنادکتومی دریافت‌کننده حلال، تفاوت معناداری وجود ندارد؛ از این رو احتمالاً گنادکتومی تأثیر چندانی بر بیان این دو ژن نداشته و اثرات کاهش حافظه در این دو گروه بیشتر ناشی از تأثیر گنادکتومی بر تعداد نورون‌های هرمی سالم هیپوکامپ می‌باشد؛ اما بیان ژن GABAA-α2 در گروه گنادکتومی تیمار شده با دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کومارین،

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

افزایش معناداری را نشان داد. از آنجایی که تراکم بالای گیرنده‌های GABAA در هیپوکامپ بیانگر این هستند که فعال‌سازی این گیرنده‌ها فرایند حافظه و یادگیری را کنترل می‌کنند (۲۷)؛ بنابراین، این احتمال وجود دارد که اختلال حافظه در این گروه به علت افزایش بیان ژن GABAA-α2، افزایش تعداد سیناپس‌های مهاری GABA، افزایش مدت زمان این سیناپس‌ها و حساسیت بیشتر این گیرنده‌ها به GABA باشد. این مهم نشان‌دهنده همپوشانی آزمون‌های هیستولوژی و RT-PCR در پژوهش حاضر می‌باشد. این نتایج با یافته‌های مطالعات پیشین همخوانی دارد.

در این راستا، Hofmann و همکاران نشان دادند که تجویز دیازپام به موش‌های وحشی و جهش‌یافته ژن GABAA-α2 باعث تغییر الگوهای فعالیت الکتریکی خود به خود در قشر مغز با استفاده از بنزودیازپین می‌شود؛ به طوری که افزایش کم فرکانس γ تولید شده توسط دیازپام ممکن است منعکس‌کننده افزایش هماهنگی داخل قشر مغزی باشد. در افزایش بالای باند فرکانس γ، دیازپام قدرت فرکانس را از طریق گیرنده‌های GABAA-α2 کاهش می‌دهد (۲۸).

Nomura و همکاران نیز در مطالعه‌ای متوجه شدند که تقویت زیرواحد α2 حاوی گیرنده‌های GABAA در مدل سندروم Dravet (صرع شدید میوکلونیک در دوران نوزادی)، موش‌ها را در برابر تشنج محافظت می‌کند (۲۹).

در پژوهش حاضر آزمون هیستولوژی با رنگ‌آمیزی نیسل جهت بررسی تراکم نورونی سلول‌های هرمی سالم هیپوکامپ مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان دادند که گنادکتومی سبب کاهش سلول‌های هرمی سالم هیپوکامپ و اختلال حافظه در موش‌ها گردیده است. کاهش تعداد سلول‌های هرمی سالم در گروه گنادکتومی تیمار شده با دوز ۳/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کومارین، احتمالاً نشان از تخریب سلول‌های هرمی هیپوکامپ دارد که مؤید نتایج مطالعات Kowalczyk و همکاران در سال ۲۰۲۰ است. این پژوهشگران بیان نمودند که کومارین دارای اثرات ضد سرطانی و ضد میکروبی می‌باشد. با این وجود، مصرف بیش از حد کومارین ممکن است تأثیر منفی بر سلامت سلول زنده بگذارد و حتی باعث تخریب سلول‌های کبد و ریه شود. علاوه‌براین، کومارین با داشتن اثرات سمی باعث تخریب سلول‌های زنده از جمله باکتری‌ها می‌شود (۳۰،۳۱). این نتایج با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی دارد؛ بنابراین به نظر می‌رسد سمیت کومارین به صورت وابسته به دوز بر روند تکثیر سلول‌های هرمی در هیپوکامپ اثر گذاشته است.

نتیجه‌گیری

گنادکتومی باعث اختلال حافظه و کاهش تعداد نورون‌های هیپوکامپ می‌شود. کومارین از طریق افزایش بیان ژن GABAA-a2 سبب ایجاد هیپرپلاریزاسیون بیشتر شده و با کاهش تعداد نورون‌های هرمی سالم در هیپوکامپ موش‌های گنادکتومی باعث اختلال در حافظه می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مسئولین دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم و نیز دانشگاه علوم پزشکی قم که در راستای انجام این پژوهش با پژوهشگران همکاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

References:

1. Byrne JH. Learning and memory: a comprehensive reference. Massachusetts: Academic Press; 2017. Link
2. Helm K, Haberman R, Dean S, Hoyt E, Melcher T, Lund P, et al. GABAB receptor antagonist SGS742 improves spatial memory and reduces protein binding to the cAMP response element (CRE) in the hippocampus. Neuropharmacology 2005;48(7):956-64. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2005.01.019
3. Leite JF, Cascio M. Structure of ligand-gated ion channels: critical assessment of biochemical data supports novel topology. Mol Cell Neurosci 2001;17(5):777-92. DOI: 10.1006/mcne.2001.0984
4. Nelson TS, Holstein SE, Baird JP, Pittman DW. Selective stimulation of central GABAAα2, 3, 5 receptors increases intake and motivation to consume sucrose solution in rats. Neuroscience 2019;409:111-9. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2019.04.040

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

5. Pourrabi SR, Mohajjel Nayebi AR, Hossini SE. Role of the androgen receptors in memory impairment in mature male rats. Exper Anim Biol 2012;1(2):25-32. Link

6. Harlow SD, Gass M, Hall JE, Lobo R, Maki P, Rebar RW, et al. Executive summary of the stages of reproductive aging workshop +10 :addressing the unfinished agenda of staging reproductive aging. J Clin Endocrinol Metab 2012;97(4):1159-68. DOI: 10.1210/jc.2011-3362

7. Kittler JT, Moss SJ. Modulation of $GABA_A$ receptor activity by phosphorylation and receptor trafficking: implications for the efficacy of synaptic inhibition. Curr Opin Neurobiol 2003;13(3):341-7. DOI: 10.1016/s0959-4388(03)00064-3

8. Skalicka-Woźniak K, Orhan IE, Cordell GA, Nabavi SM, Budzyńska B. Implication of coumarins towards central nervous system disorders. Pharmacol Res 2016;103:188-203. DOI: 10.1016/j.phrs.2015.11.023

9. Muke SA, Peshattivar VV, Kaikini AA, Bagle SR, Dighe V, Sathaye S. Neuroprotective effect of coumarin nasal formulation: kindling model assessment of epilepsy. Front Pharmacol 2018;9:992. DOI: 10.3389/fphar.2018.00992

10. Jahani R, Khaledyan D, Jahani A, Jamshidi E, Kamalinejad M, Khoramjouy M, et al. Evaluation and comparison of the antidepressant-like activity of *Artemisia dracunculus* and *Stachys lavandulifolia* ethanolic extracts: an in vivo study. Res Pharm Sci 2019;14:(6) 544-53. DOI: 10.4103/1735-5362.272563

11. Alaghemandan Motlagh N, Rouhani AH, Zarindast MR, Nasehi M. Analysis and identification of fungal skin infection Caspian salmon Salmo trutta caspius on farms Mazandaran province aquaculture. J Anim Biol 2014;6(4):51-9. Link

12. Cheriyan BV Sr, Kadhirvelu P Sr, Nadipelly J Jr, Shanmugasundaram J, Sayeli V Sr, Subramanian V Sr. Anti-nociceptive effect of 7-methoxy coumarin from *Eupatorium Triplinerve* vahl (Asteraceae). Pharmacogn Mag 2017;13(49):81-4. DOI: 10.4103/0973-1296.197650

13. Ebrahimzadeh M, Shahabi P, Mohaddes G, Babri S, Mohammadi M, Moslem A, et al. Effect of testosterone on memory and BDNF levels of hippocampus in gonadectomized diabetic rats. Biosci Biotechnol Res Asia 2015;12(3):2433-40. Link

14. Alipour M, Adineh F, Mosatafavi H, Aminabadi A, Monirinasab H, Jafari MR. Effect of chronic intraperitoneal aminoguanidine on memory and expression of Bcl-2 family genes in diabetic rats. Can J Physiol Pharmacol 2015;94(6):669-75. DOI: 10.1139/cjpp-2015-0357

15. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum S, Hudspeth AJ, Mack S. Principles of neural science. New York: McGraw-Hill; 2000. Link

16. Annovazzi L, Mellai M, Caldera V, Valente G, Schiffer D. SOX2 expression and amplification in gliomas and glioma cell lines. Cancer Genomics Proteomics 2011;8(3):139-47. Link

17. Morris RG, Moser EI, Riedel G, Martin SJ, Sandin J, Day M, et al. Elements of a neurobiological theory of the hippocampus: the role of activity-dependent synaptic plasticity in memory. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2003;358(1432):773-86. DOI: 10.1098/rstb.2002.1264

18. Ghahramani P, Harooni HE, Fatemi Tabatabaei SR, Moazedi AA. Effects of zinc chloride on passive avoidance memory of male rats, in gonadectomized peri-pubertaly. Stud Med Sci 2018;28(11):708-14. Link

19. Whittle S, Yap MB, Sheeber L, Dudgeon P, Yücel M, Pantelis C, et al. Hippocampal volume and sensitivity to maternal aggressive behavior: a prospective study of adolescent depressive symptoms. Dev Psychopathol 2011;23(1):115-29. DOI: 10.1017/S0954579410000684

20. Sperk G, Schwarzer C, Tsunashima K, Fuchs K, Sieghart W. GABA(A) receptor subunits in the rat hippocampus I: immunocytochemical distribution of 13 subunits. Neuroscience 1997;80(4):987-1000. DOI: 10.1016/s0306-4522(97)00146-2

21. Myers JF, Comley RA, Gunn RN. Quantification of [^{11}C] Ro15-4513 $GABA_A\alpha5$ specific binding and regional selectivity in humans. J Cereb Blood Flow Metab 2017;37(6):2137-8. DOI: 10.1177/0271678X16661339

22. Moghadami S, Jahanshahi M, Sepehri H, Amini H. Gonadectomy reduces the density of androgen receptor-immunoreactive neurons in male rat's hippocampus: testosterone replacement compensates it. Behav Brain Funct

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

2016;12(1):5. DOI: 10.1186/s12993-016-0089-9

23. Deutsch SI, Mastropaolo J, Hitri A. GABA-active steroids: endogenous modulators of GABA-gated chloride ion conductance. Clin Neuropharmacol 1992;15(5):352-64. Link

24. Narenji SA, Naghdi N, Azadmanesh K, Edalat R. 3α-diol administration decreases hippocampal PKA (II) mRNA expression and impairs Morris water maze performance in adult male rats. Behav Brain Res 2015;280:149-59. DOI: 10.1016/j.bbr.2014.11.038

25. Orchinik M, Weiland NG, McEwen BS. Adrenalectomy selectively regulates GABAA receptor subunit expression in the hippocampus. Mol Cell Neurosci 1994;5(5):451-8. DOI: 10.1006/mcne.1994.1055

26. Łuszczki JJ, Andres-Mach M, Gleńsk M, Skalicka-Woźniak K. Anticonvulsant effects of four linear furanocoumarins, bergapten, imperatorin, oxypeucedanin, and xanthotoxin, in the mouse maximal electroshock-induced seizure model: a comparative study. Pharmacol Rep 2010;62(6):1231-6. DOI: 10.1016/s1734-1140(10)70387-x

27. Stolt AC, Schröder H, Neurath H, Grecksch G, Höllt V, Meyer MR, et al. Behavioral and neurochemical characterization of kratom (Mitragyna speciosa) extract. Psychopharmacology 2014;231(1):13-25. DOI: 10.1007/s00213-013-3201-y

28. Hofmann JI, Schwarz C, Rudolph U, Antkowiak B. Effects of diazepam on low-frequency and high-frequency electrocortical γ-power mediated by α1-and α2-$GABA_A$ receptors. Intl J Mol Sci 2019;20(14):3486. DOI: 10.3390/ijms20143486

29. Nomura T, Hawkins NA, Kearney JA, George AL Jr, Contractor A. Potentiating α_2 subunit containing perisomatic $GABA_A$ receptors protects against seizures in a mouse model of Dravet syndrome. J Physiol 2019;597(23):4293-307. DOI: 10.1113/JP277651

30. Kowalczyk P, Madej A, Paprocki D, Szymczak M, Ostaszewski R. Coumarin derivatives as new toxic compounds to selected K12, R1–R4 *E. coli* Strains. Materials 2020;13(11):2499. DOI: 10.3390/ma13112499

31. Lončar M, Jakovljević M, Šubarić D, Pavlić M, Buzjak Služek V, Cindrić I, et al. Coumarins in food and methods of their determination. Foods 2020;9(5):645. DOI: 10.3390/foods9050645

www.SID.ir

International License Creative Commons Attribution License 4.0