TUMJ مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، آبان ۱۳۹۴، دوره ۷۳، شماره ۸، صفحه‌های ۵۶۱ تا ۵۶۸ مقاله اصیل

اثر حفاظتی تستوسترون بر بهبود نقایص شناختی القا شده توسط اتیدیوم بروماید در مدل حیوانی مالتیپل اسکلروزیس

صلاح‌الدین فیض‌اله
شیوا خضری *

گروه علوم زیستی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه.

چکیده

دریافت: ۱۳۹۴/۰۱/۱۹ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۶/۰۲ آنلاین: ۱۳۹۴/۰۷/۱۶

زمینه و هدف: مالتیپل اسکلروزیس یک بیماری تحلیل برنده سیستم عصبی می‌باشد. هیپوکامپ مرکز اصلی حافظه بوده و در بیماری‌های نورودژنراتیو بسیار آسیب‌پذیر است. هورمون‌های جنسی مردانه می‌توانند خاصیت حفاظت عصبی داشته باشند. در مطالعه حاضر اثر تستوسترون بر روی حافظه فضایی در ناحیه هیپوکامپ موش صحرایی نر پس از القای دمیلیناسیون با اتیدیوم بروماید مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: این پژوهش تجربی، بر روی موش‌های سالم در آزمایشگاه دانشکده علوم دانشگاه ارومیه در فاصله زمانی مهر ۱۳۹۲ تا بهمن ۱۳۹۳، انجام گرفت. برای القای دمیلیناسیون در موش‌ها، ۳ µl اتیدیوم بروماید در ناحیه CA1 هیپوکامپ تزریق شد. حیوانات تحت درمان، روزانه ۱ µl تستوسترون ۶ µg/ml از طریق کانول‌های گذاشته شده در هیپوکامپ به مدت ۲۰ روز پس از القای دمیلیناسیون دریافت کردند. حافظه فضایی توسط دستگاه ماز شعاعی بررسی شد. دمیلیناسیون و رمیلیناسیون با کمک رنگ‌آمیزی اختصاصی میلین بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج بافتی نشان داد که تجویز تستوسترون، رمیلیناسیون را تسریع نموده است. درصد سلول‌های پیکنوتیک شده در روز ۲۰ پس از القای دمیلیناسیون در گروه تحت درمان با تستوسترون نسبت به گروه اتیدیوم بروماید کاهش معناداری را نشان داد (P=۰/۰۰۸). مطالعات رفتاری نشان داد که زمان یافتن غذا در گروه دریافت‌کننده اتیدیوم بروماید در مقایسه با گروه‌های کنترل افزایش معناداری داشت (P=۰/۰۰۱). به‌علاوه تیمار با تستوسترون میزان دمیلیناسیون را کاهش داده و اختلالات یادگیری و حافظه‌ی القا شده توسط اتیدیوم بروماید را به‌طور معناداری بهبود بخشید (P=۰/۰۰۱).

نتیجه‌گیری: تستوسترون می‌تواند به‌عنوان یک عامل نوروپروتکتیو عمل کند و وسعت دمیلیناسیون و تعداد سلول‌های پیکنوتیک شده را کاهش دهد، همچنین اختلالات یادگیری القا شده توسط اتیدیوم بروماید را بهبود بخشد.

کلمات کلیدی: مالتیپل اسکلروزیس، اتیدیوم بروماید، تستوسترون، حافظه فضایی، رمیلیناسیون، موش صحرایی.

* نویسنده مسئول: ارومیه، جاده سرو، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه علوم زیستی
تلفن: ۰۴۴-۳۲۷۵۲۷۴۱
E-mail: sh.khezri@urmia.ac.ir

مقدمه

مالتیپل اسکلروزیس (Multiple Sclerosis, MS) شایع‌ترین بیماری دمیلینه‌کننده اکتسابی در انسان و یکی از ناتوان‌کننده‌ترین بیماری‌ها در ابتدای بزرگسالی (۵۰-۱۵ سال) می‌باشد. این بیماری با التهاب مزمن و تخریب انتخابی میلین در سیستم عصبی مرکزی شناخته می‌شود. دمیلیناسیون یک علت عمده ناتوانی نورولوژیکی در جمعیت انسانی و محصول نهایی شمار زیادی از پروسه‌های پاتولوژیکی مثل MS می‌باشد.[1] جهت مطالعه فرضیات مختلف در رابطه با مکانیسم‌های ترمیمی در MS از مدل‌های حیوانی استفاده می‌شود. برخی مدل‌ها به‌ویژه برای فهم سلولی و مولکولی دمیلیناسیون و رمیلیناسیون مورد استفاده‌اند، مانند مدل موضعی

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-16]

کوچک که جداسازی مشخص و مناسب مکانیسم‌های خاص بیماری را ممکن می‌سازند و بر پایه تزریق مستقیم به داخل ماده سفید جهت از بین بردن گلیاهای میلین‌ساز ایجاد می‌شوند.[۱و۲] بیماری MS با نفوذ سلول‌های التهابی به ویژه سلول‌های T و ماکروفاژهای برگرفته از مونوسیت‌ها به داخل سیستم عصبی مرکزی ایجاد می‌شود.[۳] اتیدیوم بروماید دارویی است که به‌عنوان یک ماده‌ی دمیلینه‌کننده برای شبیه‌سازی پروسه‌ی پاتوفیزیولوژیک بیماری‌های دمیلینه‌کننده نظیر MS کاربرد دارد. در واقع، دمیلیناسیون سمی توسط اتیدیوم بروماید یکی از مدل‌هایی است که به‌طور معمول برای بررسی ظرفیت ترمیمی سیستم اعصاب مرکزی کاربرد دارد.[۴] تزریق مستقیم اتیدیوم بروماید مدل ساده و قابل تکراری است که با آن می‌توان فرآیندهای دمیلیناسیون، رمیلیناسیون و ترمیم عصبی را بررسی کرد.[۵]

آسیب الیگودندروسیتی ناشی از اتیدیوم بروماید موجب یک دمیلیناسیون اولیه در محل تزریق می‌گردد.[۴و۶] در واقع اتیدیوم بروماید موجب مرگ سلولی می‌گردد.[۷] هیپوکامپ از نواحی مهم سیستم عصبی در تشکیل حافظه فضایی می‌باشد و گزارش شده دارای گیرنده‌های آندروژنی و استروییدی می‌باشد.[۸] هیپوکامپ به‌عنوان ساختاری از دستگاه لیمبیک، به بیماری‌های نورودژنراتیو از جمله MS بسیار حساس و آسیب‌پذیر می‌باشد.[۹] یادگیری فضایی نوعی یادگیری لحظه‌ای است که در این نوع یادگیری لوب گیجگاهی میانی، هیپوکامپ و نواحی از قشر جلویی پیشانی دخالت دارد.[۱۰]

در مغز رسپتورهای آندروژنی به‌وسیله نورون‌ها و سلول‌های گلیا بیان می‌شوند و به‌طور عمده در تالاموس، هیپوتالاموس، هیپوکامپ، آمیگدال و قشر مغز یافت می‌شوند.[۱۱] تراکم بالای گیرنده‌های آندروژنی در مراکز اساسی یادگیری و حافظه در مغز مثل هیپوکامپ وجود دارد که به‌احتمال بیانگر ارتباط میان گیرنده‌های آندروژنی و جنبه‌های مختلف شناختی در مغز می‌باشد.[۱۲]

آندروژن‌ها به‌طور مستقیم عمل نوروپروتکتیو در مغز را انجام می‌دهند و بیماری‌هایی با آسیب نورونی را خنثی می‌کنند.[۱۳] در حال حاضر، نقش گیرنده‌های آندروژنی در هیپوکامپ مشخص نیست اما نشان داده شده است که آندروژن‌ها بعضی از رفتارهای وابسته به هیپوکامپ را مثل یادگیری و حافظه تعدیل می‌کند.[۱۴] شواهد فراوانی نیز دال بر نقش تستوسترون در پاسخ‌های ایمنی و تاثیر بر ترمیم سلول‌های عصبی به‌دنبال آسیب وجود دارد.[۱۵] هدف از مطالعه حاضر بررسی یادگیری و حافظه فضایی تستوسترون بر هیپوکامپ موش صحرایی به دنبال القای دمیلیناسیون با اتیدیوم بروماید می‌باشد.

روش بررسی

این پژوهش تجربی، بر روی موش‌های سالم در آزمایشگاه دانشکده علوم دانشگاه ارومیه در فاصله زمانی مهر ۱۳۹۲ تا بهمن ۱۳۹۳، انجام گرفت. در این مطالعه از موش‌های صحرایی نر که همگی از نژاد ویستار بودند به وزن gr ۲۹۰-۲۴۰ استفاده شد. رژیم غذایی استاندارد و آب بدون محدودیت در نظر گرفته شد. شرایط اتاق ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۲۵ تا ۳۰٪ با دمای بین $^{\circ}C$ ۲۰ تا ۲۵ بود.

در این مطالعه، کلیه موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی بر اساس قوانین مصوب کمیته اخلاق دانشگاه ارومیه در پژوهش‌های پزشکی رعایت شد.

حیوانات به‌طور تصادفی در پنج گروه هفت تایی قرار گرفتند که عبارتند از: ۱- گروه کنترل که تحت عمل استریوتاکسی قرار گرفتند ولی هیچ تیماری دریافت نکردند. ۲- گروه کنترل سالین که پس از جراحی استریوتاکسی و قرار دادن کانول راهنما در ناحیه CA1 هیپوکامپ، به مدت ۲۰ روز µl ۳ سالین ۰/۹٪ (حلال اتیدیوم بروماید) در هر دو طرف مغز تزریق شد. ۳- گروه کنترل اتانول که پس از جراحی استریوتاکسی و قراردادن کانول راهنما در ناحیه CA1 هیپوکامپ، به مدت ۲۰ روز، µl ۱ اتانول ۹۶٪ (حلال تستوسترون) در هر دو طرف مغز تزریق شد. ۴- گروه بیمار اتیدیوم بروماید که پس از جراحی استریوتاکسی و قرار دادن کانول راهنما در ناحیه CA1 هیپوکامپ، به منظور القای دمیلیناسیون، µl ۳ اتیدیوم بروماید[۱۶]، (از محلول ۰/۰۱٪ اتیدیوم بروماید در سالین ۰/۹٪) در ناحیه CA1 هیپوکامپ دریافت کردند. این گروه در روز ۲۰ پس از تزریق اتیدیوم بروماید بررسی شد. ۵- گروه تحت درمان که پس از جراحی استریوتاکسی و قراردادن کانول راهنما در ناحیه CA1 هیپوکامپ و تزریق اتیدیوم بروماید، به مدت ۲۰ روز، µl ۱ تستوسترون با دوز µg/µL ۶ در هر کانول دریافت نمودند.[۱۷]

در ابتدا برای حذف منبع درون‌زاد تستوسترون تمام رت‌ها مورد جراحی گنادکتومی قرار گرفتند. برای انجام عمل جراحی گنادوکتومی

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-16]

و استریوتاکسی و کانول‌گذاری، حیوانات به‌وسیله تزریق داخل صفاقی کتامین (۱۰ mg/kg) و زایلازین (۲ mg/kg)[۱۸،۱۹] بیهوش شده و در دستگاه استریوتاکسی (SR-6, Narishige, Japan) در موقعیت جمجمه مسطح قرار گرفتند. کانول‌های به‌کار رفته از سر سوزن‌های شماره ۲۲G ساخته شده و به صورت دو طرفه در ناحیه CA1 هیپوکامپ قرار گرفتند. مختصات مورد استفاده بر اساس اطلس واتسون و پاکسینوس عبارتنداز: AP=-۳/۸، ML=±۲/۲، DV=-۳/۲).[۲۰] پس از دوره بهبودی، تزریق دارو آغاز گردید.

بررسی یادگیری و حافظه فضایی توسط دستگاه ماز شعاعی هشت بازویی انجام شد. این دستگاه یک رادیال ماز ساخته شده از چوب بود (با عرض بازوها=۱۰ cm، طول بازوها=۵۰ cm و ارتفاع دیواره‌ها=۱۳ cm). ظروف غذا در کف هر بازو قرار داده شد تا تکه‌های غذا در آنجا ریخته شود که این امر به منظور کم کردن قابلیت دید از مرکز است. یک ورود به بازو زمانی ثبت می‌شود که چهار اندام حرکتی حیوان وارد بازو شود. وقتی حیوان بازوی محتوی غذا را پیدا کرد به حیوان اجازه داده می‌شود تا کمی غذا بخورد و سپس از ماز برداشته می‌شود.

آزمایشات رفتاری در گروه‌های کنترل و گروه تحت درمان ۳۰ دقیقه[۲۱] پس از تزریق حلال تستوسترون (اتانول)، سالین و تستوسترون از طریق کانول‌های راهنما، انجام گرفت. در روز اول به حیوان اجازه داده شد تا پنج دقیقه به‌منظور آشنایی با محیط، دستگاه ماز را آزادانه بگردد که به این مرحله، مرحله خونگیری گویند. در این مرحله هیچگونه غذایی در دسترس حیوان قرار نگرفت. روزهای دوم و سوم به‌عنوان جلسات آموزش شامل دو جلسه در هر روز بود که در دو نوبت صبح و عصر انجام شد. در پایان این دو روز مرحله آموزش، رت‌ها به ۹۰٪ معیار یادگیری رسیدند، به این ترتیب که همه موش‌ها قبل از اتمام پنج دقیقه تست به بازوی مورد نظر می‌رسیدند. پس از اتمام جلسات آموزش، جلسات تست با قرار دادن غذا در بازوی ثابت شامل یک جلسه در هر روز طی روزهای ۲۰-۱۷ بعد القای دمیلیناسیون توسط اتیدیوم بروماید انجام شد.[۲۲]

داده‌ها به وسیله یک دوربین دیجیتال نصب شده در بالای رادیال ماز ثبت شد. پس از اتمام تست‌های رفتاری فیلم به رایانه منتقل شد و داده‌های ثبت شده شامل زمان سپری شده جهت یافتن بازوی محتوی غذا به عنوان معیاری جهت بررسی میزان یادگیری یادداشت گردید.[۲۳] به دلیل اینکه تفاوت معناداری در زمان سپری شده برای یافتن غذا بین گروه‌های کنترل سالم، کنترل سالین (حلال اتیدیوم بروماید) و کنترل اتانول (حلال تستوسترون) مشاهده نشد، میانگین داده‌های آنها به‌عنوان گروه کنترل در نتایج وارد شد.

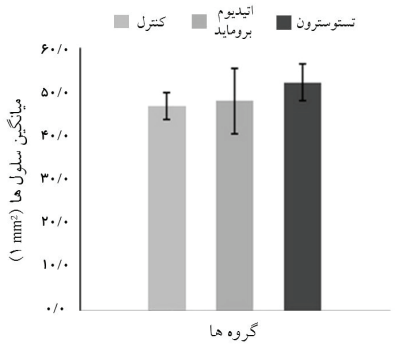
پس از اتمام آزمایش‌ها، حیوانات توسط تزریق کتامین و زایلزین بیهوش شدند. سپس سر حیوان جدا شده و مغز حیوان خارج شد و به منظور فیکس شدن در پارافرمالدهید (PFA) ۴٪ در دمای $4\ ^{\circ}C$ به مدت ۲۴ قرار داده شد. سپس نمونه پس از ۲۴ ساعت فیکس اولیه، مورد پردازش بافتی قرار گرفت.[۲۴] پس از پاساژ نمونه بلوک‌های پارافینی تهیه و برش‌های کرونال ۵ میکرونی از نمونه‌ها تهیه شد. سپس برش‌ها با رنگ‌آمیزی اختصاصی میلین Luxol fast blue و Cresyl violet رنگ‌آمیزی شدند. برای اثبات دمیلیناسیون ناحیه CA1 هیپوکامپ توسط اتیدیوم بروماید، از این نوع رنگ‌آمیزی استفاده شد و لام‌ها با میکروسکوپ نوری مشاهده شدند.[۲۵] آنالیز رفتاری داده‌ها با استفاده از SPSS software, version 19 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) انجام گرفت. از آنالیز واریانس تکراری برای تجزیه تحلیل مطالعات رفتاری استفاده شد. داده‌ها به‌صورت میانگین± خطای استاندارد میانگین (Mean±SEM) ارایه شد.

برای رسم نمودارها از Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) استفاده شد. برای آنالیز لام‌های تهیه شده از مقاطع بافتی ناحیه CA1 از AxioVision software, version 4.5 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Gottingen, Germany) و لنز مشبک با مقیاس $1\ mm^2$ استفاده شد و تفاوت بین گروه‌ها توسط One-way ANOVA بررسی شد. $P<0/05$ به‌عنوان حداقل سطح معناداری در نظر گرفته شد.

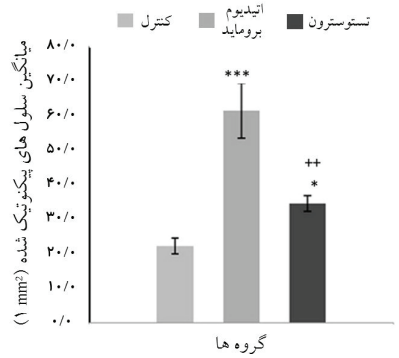
یافته‌ها

داده‌های حاصل از بررسی لام‌ها نشان داد که تزریق تستوسترون به ناحیه CA1 هیپوکامپ باعث ترمیم میلین می‌شود. تغییرات در ضخامت غلاف میلین در بافت به دنبال رنگ‌آمیزی اختصاصی میلین (Luxol fast blue- Cresyl violet)، به‌صورت تغییر در شدت رنگ‌آمیزی نمایان گشت (شکل ۱). پراکندگی سلول‌های نرمال و سلول‌های غیرنرمال (پیکنوتیک شده) در $1\ mm^2$ در ناحیه CA1

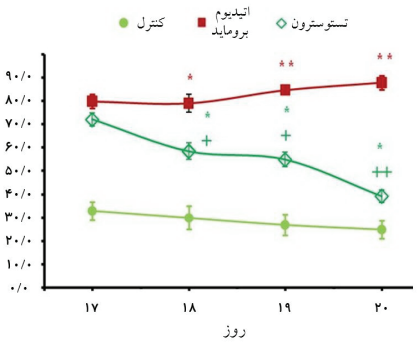
[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-16]



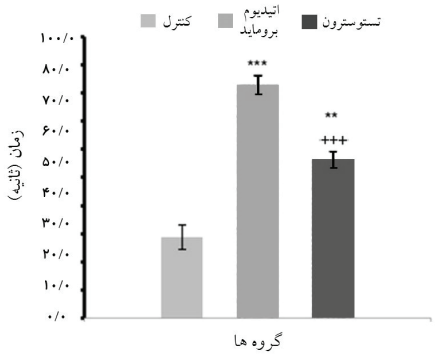
نمودار ۱: مقایسه میانگین کل سلول‌ها در گروه‌های مختلف در روز ۲۰. نتایج به صورت میانگین± خطای استاندارد میانگین بیان شده است.



نمودار ۲: مقایسه درصد سلول‌های پیکنوتیک شده در گروه‌های مختلف در روز ۲۰. نتایج به صورت میانگین± خطای استاندارد میانگین بیان شده است. *P<۰/۰۵، ***P<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل و ++ P<۰/۰۱ در مقایسه با گروه اتیدیوم بروماید در نظر گرفته شده است.



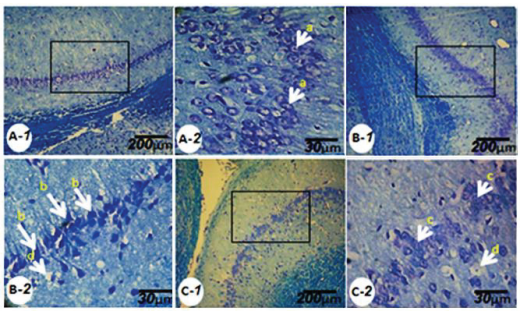
نمودار ۳: مقایسه زمان پیدا کردن غذا در گروه‌های مختلف طی روزهای ۲۰-۱۷ بعد از القای دمیلیناسیون. نتایج به صورت میانگین± خطای استاندارد میانگین بیان شده است. *P<۰/۰۵ و **P<۰/۰۱ در مقایسه با گروه کنترل و +P<۰/۰۵، ++P<۰/۰۱ در مقایسه با گروه اتیدیوم بروماید در نظر گرفته شده است.



نمودار ٤: مقایسه میانگین زمان پیدا کردن غذا در گروه‌های مختلف در کل روزهای ۲۰-۱۷ بعد از القای دمیلیناسیون. نتایج به صورت میانگین± خطای استاندارد میانگین بیان شده است. **P<۰/۰۱، ***P<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل +++ P<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه اتیدیوم بروماید در نظر گرفته شده است.

هیپوکامپ مورد ارزیابی قرار گرفت، سپس نتایج بین گروه‌ها مقایسه گردید. بررسی نتایج میانگین کل سلول‌ها در روز ۲۰ پس از القای دمیلیناسیون نشان داد که تعداد کل سلول‌ها (نرمال و غیرنرمال) در گروه‌های مختلف اختلاف معناداری با هم ندارند (نمودار ۱). بررسی نتایج درصد سلول‌های پیکنوتیک شده در روز ۲۰ پس از القای دمیلیناسیون در گروه تحت درمان با تستوسترون نسبت به گروه اتیدیوم بروماید کاهش معناداری را نشان داد (P=۰/۰۰۸) و نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری را داشت (P=۰/۰۴۱). در گروه اتیدیوم بروماید نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری در درصد سلول‌های پیکنوتیک شده مشاهده شد (P=۰/۰۰۱) (نمودار ۲). تجزیه و تحلیل آماری به تفکیک روزها نشان داد که در روز ۱۷ پس از القای دمیلیناسیون، زمان پیدا کردن غذا در گروه اتیدیوم بروماید نسبت به گروه‌های کنترل و همچنین در گروه تحت درمان با تستوسترون نسبت به گروه‌های کنترل و گروه اتیدیوم بروماید اختلاف داشت اما

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-16]



شکل ۱: برش‌های انتخابی از ناحیه CA1 هیپوکامپ: نورون و میلین در گروه‌های کنتـرل نرمـال مـی‌باشـند (A1-A2). در گـروه اتیـدیوم بروماید ۲۰ روز پـس از القـای دمیلیناسیون، سلول‌ها پیکنوتیک شده‌اند (B1-B2). در گـروه تـستوسترون ۲۰ روز پـس از القـای دمیلیناسیون، این هورمون باعث کاهش سلول‌های پیکنوتیک شده است (C1-C2). (رنـگ‌آمیـزی لوکـسول فـست بلـو و کریـزل ویولـت). A: کنتـرل، B: اتیـدیوم بروماید، C: تـستوسترون. a: سلول‌های سالم b: سلول‌های پیکنوتیک شده، c: سلول‌های رمیلینه شده، d: سلول‌های دمیلینه شده) (×۸۰۰، ×۴۰۰).

معنادار نبود.

در روز ۱۸ پس از القای دمیلیناسیون، زمـان پیـدا کـردن غـذا در گروه اتیدیوم بروماید نـسبت بـه گـروه کنتـرل (P=۰/۰۴۵) افـزایش معناداری نـشان داد کـه نـشان‌دهنـده اخـتلال در یـادگیری بـه دلیـل دمیلیناسیون هیپوکامپ است. در گروه تحت درمان با تـستوسترون در همین روز نسبت به گروه اتیدیوم بروماید (P=۰/۰۴) کاهش معناداری در زمان پیداکردن غذا مشاهده گردید.

در روز ۱۹ پس از القای دمیلیناسیون، زمـان پیـدا کـردن غـذا در گروه اتیدیوم بروماید نـسبت بـه گـروه کنتـرل (P=۰/۰۰۸) افـزایش معناداری را نشان داد. در گروه تحت درمان با تـستوسترون در همـین روز نسبت به گروه اتیدیوم بروماید (P=۰/۰۳۸) کاهش معنـاداری در زمان پیدا کردن غذا مشاهده گردید. زمان پیدا کـردن غـذا در روز ۲۰ پس از القای دمیلیناسیون در گروه اتیدیوم بروماید نسبت به گروه‌های کنترل افزایش معناداری داشت (P=۰/۰۰۹). در حالیکه در گروه‌هـای درمان شده با تـستوسترون در همـین روز نـسبت بـه گـروه اتیـدیوم بروماید کـاهش معنـاداری در زمـان پیـداکردن غـذا مـشاهده گردیـد (P=۰/۰۰۸) (نمودار ۳).

به‌طور کلی مقایسه میانگین تغییرات زمان در گروه‌هـای مختلـف در روزهای تست (روزهای ۲۰-۱۷ پس از القای دمیلیناسیون) نـشان داد که زمان پیـدا کـردن غـذا در گـروه اتیـدیوم بروماید نـسبت بـه گروه‌های کنترل افزایش معناداری داشت (P=۰/۰۰۱). همچنین گـروه دریافت‌کننده‌ی تـستوسترون نـسبت بـه گـروه‌هـای کنتـرل، افـزایش معناداری در زمان پیدا کردن غذا داشت (P=۰/۰۰۸).

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که تزریق اتیدیوم بروماید در ناحیه CA1 باعث القای فرآیند دمیلیناسیون و در پی آن باعث ایجاد اخـتلال در حافظه و یـادگیری فـضایی مـی‌شـود. بررسـی نتـایج رفتـاری در گروه‌های درمان شده با تـستوسترون نـسبت بـه گـروه‌هـای اتیـدیوم بروماید نشان داد که پارامترهای یادگیری در روزهای ۲۰-۱۷ افـزایش معناداری دارند و درمان طولانی مدت با تستوسترون تغییرات رفتـاری ایجاد شده توسط اتیدیوم بروماید را بهبود می‌بخشد.

اتیدیوم بروماید دارویی است که به‌عنوان یک ماده‌ی دمیلینه‌کننـده برای شبیه‌سازی پروسه‌ی پاتوفیزیولوژیک بیماری‌هـای دمیلینـه‌کننـده نظیر MS کاربرد دارد.[۷]

Goudarzvand و همکاران نشان دادند که تزریق داخل هیپوکامپی آن موجـب دمیلیناسـیون موضـعی مـی‌شـود.[۱۶] در پـژوهش حاضـر، مطالعات هیستولوژیکی با استفاده از رنـگ‌آمیـزی اختـصاصی میلـین نشان داد کـه در روز ۲۰ پـس از تزریـق اتیـدیوم بروماید، آثـاری از دمیلینه شدن هیپوکامپ در مقایسه با گروه کنترل مشاهده مـی‌شـود و این نتایج با یافته‌های پیشین مطابقت دارد.

Hammond و همکاران نشان دادند که غلظت‌هـای فیزیولـوژیکی تستوسترون بر روی کشت سلول‌های نورون خاصـیت نوروپروتکتیـو دارد و این خاصیت را از طریق محافظـت آنهـا در برابـر آپوپتـوزیس انجام مـی‌دهـد.[۲۶] Ahlbom و همکـاران نـشان دادنـد کـه درمـان بـا تستوسترون، سلول‌های گرانـولای مخچـه را از اسـترس اکـسیداتیو و مرگ سلولی القا شده با هیدروژن پراکسید، به وسـیله یـک مکانیـسم آندروژن-گیرنده (AR)، محافظت کرده و منجـر بـه افـزایش فعالیـت آنزیم آنتی‌اکسیدانی کاتالاز می‌شود.[۲۷]

Ramsden و همکـــارانش در ســـال ۲۰۰۳ نـــشان دادنـــد کـــه دی‌هیدروتستسترون (DHT) جایگزین شده در رت‌های نر گنـادوکتومی شده، شدت آسیب نورونی القا شده با Kainate را کاهش می‌دهد کـه

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-16]

این یافته نشان از خاصیت نوروپروتکتیو DHT می‌باشد.[۲۸] مطالعه حاضر در بخش هیستوپاتولوژی نشان داد که شدت دمیلیناسیون در روز ۲۰ پس از تزریق اتیدیوم بروماید افزایش می‌یابد. همچنین تعداد سلول‌های نرمال در گروه بیمار (گروه اتیدیوم بروماید) در روز ۲۰ به‌طور معناداری کاهش یافته و تعداد سلول‌های پیکنوتیک شده هم افزایش می‌یابد (P=۰/۰۰۱) اما در گروه تحت درمان با تستوسترون در روز ۲۰ کاهش معناداری در سلول‌های پیکنوتیک شده نسبت به گروه بیمار دیده می‌شود (P=۰/۰۰۸) که این یافته نشان می‌دهد تستوسترون به‌عنوان یک عامل محافظ عصبی عمل کرده است و نتایج این بخش با یافته‌های مطالعات پیشین همخوانی دارد. یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که تزریق اتیدیوم بروماید در CA1 هیپوکامپ افزون بر تخریب میلین، باعث تخریب حافظه و یادگیری در حیوانات شده و زمان سپری شده برای رسیدن به غذا را در ماز شعاعی به‌طور معناداری افزایش می‌دهد.

تزریق تستوسترون به مدت ۱۷ تا ۲۰ روز باعث کاهش زمان لازم برای پیدا کردن غذا شد و این کاهش در روز ۲۰ پس از القای دمیلیناسیون نسبت به روزهای دیگر بیشتر بود و نشان دهنده اثر بهتر تستوسترون در طولانی‌مدت است. در واقع تستوسترون باعث افزایش میزان یادگیری و ترمیم ناحیه دمیلینه شده می‌شود.

بر اساس پژوهش‌های موجود هورمون‌های استرویدی از جمله دی‌هیدروتستوسترون می‌توانند از طریق افزایش قابلیت اتصال نوروترانسمیترها به گیرنده‌ها بر فعالیت عصبی تاثیر گذارند.[۲۹] از طرف دیگر نشان داده شده است که تستوسترون در مغز به رسپتورهای آندروژنی متصل شده و از طریق ترمیم اولیگودندروسیت‌ها باعث ترمیم میلین می‌شود.[۳۰]

به نظر می‌رسد تستوسترون از طریق افزایش ناقلان عصبی و افزایش میزان اتصال نوروترانسمیتر به گیرنده‌ها باعث افزایش حافظه و یادگیری شده و با ترمیم اولیگودندروسیت‌های آسیب دیده باعث ترمیم میلین می‌شود. بنابراین تستوسترون می‌تواند در درمان بیماری‌های نورولوژیکی از جمله MS و بیماری‌هایی که با اختلالات شناختی همراه است، موثر واقع گردد.

سپاسگزاری: این مقاله بخشی از پایان‌نامه مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه می‌باشد که بدین وسیله نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسؤولین آن دانشگاه ابراز می‌دارند.

References

1. Pourabdolhossein F, Javan M, Mirnajafi-Zadeh S, Dehghan S, Sherafat M, Mozafari S et al . PKC Mediates endogenous inhibition of myelin repair in the context of local demyelination induced in mice Optic chiasm. *KAUMS J (FEYZ)* 2011;14(4):369-379.
2. Pourabdolhossein F, Mozafari S, Javan M, Mirnajafizadeh S, Ahmadiani A. Electrophysiological and histological study of lysolecithin-induced local demyelination in adult mice optic chiasm. *Physiol Pharmacol* 2011;14(4):324-36.
3. van Horssen J, Schreibelt G, Drexhage J, Hazes T, Dijkstra CD, van der Valk P, et al. Severe oxidative damage in multiple sclerosis lesions coincides with enhanced antioxidant enzyme expression. *Free Radic Biol Med* 2008;45(12):1729-37.
4. Bondan EF, Lallo MA, Sinhorini IL, Pereira LA, Graça DL. The effect of cyclophosphamide on brainstem remyelination following local ethidium bromide injection in Wistar rats. *J Submicrosc Cytol Pathol* 2000;32(4):603-12.
5. Levine JM, Reynolds R. Activation and proliferation of endogenous oligodendrocyte precursor cells during ethidium bromide-induced demyelination. *Exp Neurol* 1999;160(2):333-47.
6. Bondan EF, Lallo MA, Trigueiro AH, Ribeiro CP, Sinhorini IL, Graça DL. Delayed Schwann cell and oligodendrocyte remyelination after ethidium bromide injection in the brainstem of Wistar rats submitted to streptozotocin diabetogenic treatment. *Braz J Med Biol Res* 2006;39(5):637-46.
7. Guazzo EP. A technique for producing demyelination of the rat optic nerves. *J Clin Neurosci* 2005;12(1):54-8.
8. Lauber AH, Whalen RE. Muscarinic cholinergic modulation of hypothalamic estrogen binding sites. *Brain Res* 1988;443(1-2):21-6.
9. Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, et al. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 2002;110(4):429-41.
10. Pike CJ, Nguyen TV, Ramsden M, Yao M, Murphy MP, Rosario ER. Androgen cell signaling pathways involved in neuroprotective actions. *Horm Behav* 2008;53(5):693-705.
11. Patchev VK, Schroeder J, Goetz F, Rohde W, Patchev AV. Neurotropic action of androgens: principles, mechanisms and novel targets. *Exp Gerontol* 2004;39(11-12):1651-60.
12. Kerr JE, Allore RJ, Beck SG, Handa RJ. Distribution and hormonal regulation of androgen receptor (AR) and AR messenger ribonucleic acid in the rat hippocampus. *Endocrinology* 1995;136(8):3213-21.
13. Creta M, Riccio R, Chiancone F, Fusco F. Androgens exert direct neuroprotective effects on the brain: a review of pre-clinical evidences. *J Androl Sci* 2010;17:49-55.
14. Lumia AR, Thorner KM, McGinnis MY. Effects of chronically high doses of the anabolic androgenic steroid, testosterone, on intermale aggression and sexual behavior in male rats. *Physiol Behav* 1994;55(2):331-5.
15. Shuster EA. Hormonal influences in multiple sclerosis. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008;318:267-311.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-16]

16. 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.
17. Naghdi N, Majlessi N, Bozorgmehr T. The effect of intrahippocampal injection of testosterone enanthate (an androgen receptor agonist) and anisomycin (protein synthesis inhibitor) on spatial learning and memory in adult, male rats. *Behav Brain Res* 2005;156(2):263-8.
18. Sherafat MA, Javan M, Mozafari S, Mirnajafi-Zadeh J, Motamedi F. Castration attenuates myelin repair following lysolecithin induced demyelination in rat optic chiasm: an evaluation using visual evoked potential, marker genes expression and myelin staining. *Neurochem Res* 2011;36(10):1887-95.
19. Dehghan S, Javan M, Pourabdolhossein F, Mirnajafi-Zadeh J, Baharvand H. Basic fibroblast growth factor potentiates myelin repair following induction of experimental demyelination in adult mouse optic chiasm and nerves. *J Mol Neurosci* 2012;48(1):77-85.
20. Majlessi N, Kadkhodaee M, Parviz M, Naghdi N. Serotonin depletion in rat hippocampus attenuates L-NAME-induced spatial learning deficits. *Brain Res* 2003;963(1-2):244-51.
21. Assadiannarenji S, Naghdi N, Oryan S, Azadmanesh K. Intrahippocampal Injection of 3α Diol (a Testosterone Metabolite) and Indomethacin (3α-HSD Blocker), Impair Acquisition of Spatial Learning and Memory in Adult Male Rats. *Iran J Pharm Res* 2013;12(3):457-69.
22. McGurk SR, Levin ED, Butcher LL. Radial-arm maze performance in rats is impaired by a combination of nicotinic-cholinergic and D2 dopaminergic antagonist drugs. *Psychopharmacology (Berl)* 1989;99(3):371-3.
23. Tarragon E, Lopez L, Ros-Bernal F, Yuste JE, Ortiz-Cullera V, Martin E, et al. The radial arm maze (RAM) for the evaluation of working and reference memory deficits in the diurnal rodent octodon degus. *Proc Measuring Behav* 2012;98-100.
24. Tarbali S, Khezri S, Heidari R. Effect of vitamin D3 on improvement of learning and spatial memory following demyelination induction in hippocampal CA1 area of rat. *Physiol Pharmacol* 2014;17(4):449-60.
25. Pistorio AL, Hendry SH, Wang X. A modified technique for high-resolution staining of myelin. *J Neurosci Methods* 2006;153(1):135-46.
26. Hammond J, Le Q, Goodyer C, Gelfand M, Trifiro M, LeBlanc A. Testosterone-mediated neuroprotection through the androgen receptor in human primary neurons. *J Neurochem* 2001;77(5):1319-26.
27. Ahlbom E, Prins GS, Ceccatelli S. Testosterone protects cerebellar granule cells from oxidative stress-induced cell death through a receptor mediated mechanism. *Brain Res* 2001;892(2):255-62.
28. Ramsden M, Shin TM, Pike CJ. Androgens modulate neuronal vulnerability to kainate lesion. *Neuroscience* 2003;122(3):573-8.
29. Norata GD, Tibolla G, Seccomandi PM, Poletti A, Catapano AL. Dihydrotestosterone decreases tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human endothelial cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(2):546-54.
30. Hussain R, Ghoumari AM, Bielecki B, Steibel J, Boehm N, Liere P, et al. The neural androgen receptor: a therapeutic target for myelin repair in chronic demyelination. *Brain* 2013;136(Pt 1):132-46.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-16]

TUMJ Tehran University Medical Journal, November 2015; Vol. 73, No. 8: 561-568 Original Article

Protective effect of testosterone on cognitive deficits induced by ethidium bromide in experimental model of multiple sclerosis

Sallahadin Feizollah M.Sc.
Shiva Khezri Ph.D.*

Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran.

Abstract

Received: 08 Apr. 2015 Accepted: 24 Aug. 2015 Available online: 08 Oct. 2015

***Background*:** Multiple Sclerosis (MS) is a neurodegenerative disease of the central nervous system (CNS). The hippocampus is a vital center for learning and memory; it is extremely vulnerable to neurodegenerative diseases. The male hormones could be neuroprotective for the CNS. The current study is an attempt to investigate the effect of testosterone on learning and spatial memory following the demyelination of CA1 area by the injection of ethidium bromide in the rats' hippocampus.

***Methods*:** This experimental study has been conducted on healthy rats in the faculty of science of the Urmia University from September 2013 to February 2015. For demyelination in all previously gonadectomized healthy rats, 3µl ethidium bromide was injected into the CA1 area of rats by stereotaxic surgery. In addition, the treatment groups received 1µl testosterone (6µg/µl) during a 20-day timeframe on a daily basis after demyelination by the ethidium bromide. The control groups had no drug injection. The process of the learning and spatial memory of the rats were closely monitored by the radial Maze. The demyelination and remyelination in the hippocampus were checked by the myelin-specific coloring (Luxol fast blue and Cresyl violet).

***Results*:** The histological results suggest that the testosterone is capable of minimizing the destructive impacts of ethidium bromide in the treatment group as well as enhancing the remyelination process. In the group treated by testosterone, the percentage of the pyknotic cells 20 days after demyelination induction, represented a significant reduction compared to that of ethidium bromide group (P=0.008). The behavioral studies analyses show that the amount of the food finding time in those groups received ethidium bromide was significantly longer than those of the control groups (P=0.001). Furthermore, the application of the testosterone in the treatment groups reduced the extent of demyelination while the memory impairment induced by the ethidium bromide was significantly improved (P=0.001).

Conclusion: Testosterone can act as a neuroprotective factor that reduces the extent of demyelination and the number of pyknotic cells. It also may improve the learning and memory impairment induced by ethidium bromide.

Keywords: ethidium bromide, multiple sclerosis, rat, remyelination, spatial learning, testosterone.

* Corresponding author: Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Sero Road, Urmia, Iran.
Tel: +98- 44-32752741
E-mail: sh.khezri@urmia.ac.ir

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-16]