

Comparative Study of Simultaneously and Interval Injection Estradiol and Tamoxifen on Estrogen Receptor α Expression in the CA1 Region of Hippocampal Pyramidal Neurons in Ovariectomized Rat

Eftekharzadeh M., M.Sc., Mohammadzadeh F., M.Sc., Rastegar T., M.Sc., Nobakht M., Ph.D*

** P.O.Box:14496-14525, Cellular and Molecular Research Center, Medical Faculty, Tehran University, Tehran, Iran*

Received: May 2011 Accepted: Jul 2011

Abstract

Purpose: The aim of our study is the assessment of estrogen receptor α expression in pyramidal neurons in rat CA1 hippocampus that has been ovariectomized. By using the estrogen antagonist, Tamoxifen level of expression of estrogen receptor α in these cells.

Materials and Methods: To study the effect of 17 - β estradiol and tamoxifen on estrogen receptors α , expression in hippocampus rats of Wistar female rats weighting approximately 180-220 g, were ovariectomized. The rats after receiving Tamoxifen, and 17 - β - estradiol simultaneously or with 12 delay hours, or receiving Tamoxifen and estradiol solvents, or solvent received Tamoxifen and estradiol, and eventually receiving two solvents, two or 24 hours after the last ip injection, were studied. Using western blotting techniques and protein expression of estrogen receptor α , the response rate of ER α activity immunoreactivity in different groups were evaluated.

Results: Results from the present survey studies shows that research conducted with Western blot analysis by antibodies ER- α , the presence of estrogen receptor α 55 KDa proteins were shown only in the area CA1 pyramidal cell cytoplasm. The results also express that estrogen receptor α expression in groups under the effect of tamoxifen, if simultaneously received Tamoxifen and estradiol, have been shown to have decreased. Expression of estrogen receptor α in estrogen antagonist affected groups, with 12 hours delay, increase the show. Considering the half-life of Tamoxifen, Estrogen and Tamoxifen interaction, different responses towards a study group in 16 rats were verified.

Conclusion: The presence of 17 - β - estradiol in the cytosol of cells through ER α receptor is expressed in our findings. In the group that 17 - β - estradiol along with Tamoxifen, were injected solvents were estrogen receptor protein expression in most reactions within the cell represents. Minimum response groups were injected solvent. Also during the 12-hour infusion interval, Tamoxifen, due to half life according to the arrival of TAM as an estrogen antagonist, remained unaffected by injection of 17 - β - estradiol, remains strong.

Key words: Hippocampus, 17 - β - estradiol, Estrogen receptor α , Tamoxifen Immunohistochemistry

مطالعه مقایسه‌ای تزریق همزمان و با فاصله استرادیول و تاموکسیفن بر بیان رسپتور استروژن α در نوروئ‌های هرمی ناحیه CA1 هیپوکامپ موش صحرایی اورکتومی شده

مینا افتخارزاده M.Sc.*، فرزانه محمدزاده کارزگاه M.Sc.*، طیه رستگار M.Sc.*، ملیحه نوبخت Ph.D.**

* گروه آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

** مرکز تحقیقات مقاومت‌های میکروبی دانشگاه علوم پزشکی تهران و

مرکز تحقیقات سلولی ملکولی دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

تاریخ دریافت: اردیبهشت ماه ۹۰، تاریخ پذیرش: مرداد ماه ۹۰

چکیده

هدف: بررسی بیان رسپتور استروژن α در نوروئ‌های هرمی ناحیه CA1 هیپوکامپ در موش صحرایی اورکتومی شده
مواد و روش‌ها: ابتدا موش‌های صحرایی ماده اورکتومی شدند. با دریافت تاموکسیفن و β -۱۷-استرادیول به‌طور همزمان یا با تأخیر ۱۲ ساعت بعد، بررسی انجام شد. سپس بیان پروتئین رسپتور استروژن α ، با میزان واکنش‌های حاصل از فعالیت‌های ایمونوراکتیویتی رسپتور استروژن در گروه‌های مختلف، ارزیابی شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان می‌دهد که پروتئین 55 KDa رسپتور استروژن α تنها در سیتوپلاسم سلول‌های هرمی ناحیه CA1 بیان می‌شود. هم‌چنین بیان رسپتور استروژن α در گروه‌های تحت تأثیر تاموکسیفن، با همزمانی دریافت تاموکسیفن و استرادیول و بیان رسپتور استروژن α در گروه‌های تحت تأثیر آنتاگونیست استروژن، با تأخیر زمانی ۱۲ ساعت بعد، افزایش را نشان می‌دهد. در گروه‌هایی که تزریق β -۱۷-استرادیول را به همراه حلال تاموکسیفن داشتند بیان پروتئین رسپتور استروژن، بیشترین واکنش را در داخل سلول نشان داد. کمترین واکنش در گروه‌های تزریق حلال‌ها بود. هم‌چنین در زمان تزریق با فاصله زمانی ۱۲ ساعته، به دلیل طول عمر تاموکسیفن، با توجه به ورود تاموکسیفن به عنوان آنتاگونیست استروژن، تأثیرپذیری تزریق β -۱۷-استرادیول به قوت خود باقی می‌ماند.

نتیجه‌گیری: پروتئین رسپتور استروژن α تنها در سیتوپلاسم سلول‌های هرمی ناحیه CA1 یافت می‌شود. هم‌چنین بیان رسپتور استروژن α در گروه‌های تحت تأثیر آنتاگونیست استروژن کاهش نشان می‌دهد که با دریافت تاموکسیفن و به فاصله ۱۲ ساعت بعد، استرادیول، سبب این کاهش می‌باشد که ناشی از اهمیت نیمه عمر تاموکسیفن است.

کلیدواژه‌ها: هیپوکامپ، β -۱۷-استرادیول، رسپتورهای استروژنی α ، تاموکسیفن، ایمونوهیستوشیمی

مقدمه

سیستم عصبی دخالت دارد. استروژن نقش‌های مهمی در

هورمون‌های مختلفی در تنظیم تمایز، رشد و تکامل

آدرس مکاتبه: تهران، انورب همت دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، مرکز

تحقیقات سلولی و مولکولی، صندوق پستی ۱۴۴۹۶-۱۴۵۲۵

Email: m-nobakht@sina.tums.ac.ir

فعالیت در هیپوکامپ موش صحرایی مطالعه شده است. این موضوع در شرایط فقدان استروژن کاربرد دارد که در اثر کمبود یا فقدان این هورمون مثلاً در شرایط اورکتومی، اختلالات ناشی از آن منجر به بیان نشدن رسپتورهای استروژن شده و استفاده از تاموکسیفن به عنوان بلوک کننده رسپتور استروژن، را مطرح می سازد [۱۰-۱۱].

مواد و روش‌ها

این مطالعه به صورت تجربی (experimental) انجام شد. حیوانات در حیوانخانه دانشگاه علوم پزشکی ایران نگهداری شدند و از شرایط یکسانی از نظر روشنایی و تاریکی برخوردار بودند. کار با حیوانات بر اساس روش مصوب کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه انجام شد. در این مطالعه تعداد ۸۰ سر موش صحرایی ماده بالغ نژاد *awistar* با وزن تقریبی ۱۸۰-۲۲۰ گرم در ۱۶ گروه ۵ تایی استفاده شدند. حیوانات بعد از بیهوشی توسط کانامین و گزیلازین، اورکتومی شدند. سه روز بعد از اورکتومی تزریق در هر گروه (۱۰ سر موش) طبق برنامه زیر انجام شد: گروه اول؛ میزان ۲ میلی گرم بر کیلوگرم تاموکسیفن دریافت نمودند و سپس ۱۲ ساعت بعد میزان ۱۰ میکروگرم در ۱۰۰ میکرولیتر ۱۷ بتا - استرادیول بنزوات دریافت کردند. گروه دوم؛ مانند گروه اول با این تفاوت که ۱۲ ساعت بعد، روغن کنجد دریافت نمودند. گروه سوم؛ ابتدا حلال تاموکسیفن یعنی پروپیلن گلیکول را دریافت نمود و بعد از ۱۲ ساعت استرادیول دریافت کردند. گروه چهارم؛ مانند گروه سوم اما بعد از ۱۲ ساعت روغن کنجد دریافت کردند. گروه پنجم؛ تاموکسیفن و استرادیول را همزمان دریافت کردند. گروه ششم؛ تاموکسیفن و روغن کنجد را همزمان دریافت کردند. گروه هفتم؛ پروپیلن گلیکول و استرادیول را دریافت نمودند و گروه هشتم؛ پروپیلن گلیکول و روغن کنجد را دریافت کردند (جدول ۱). نیمی از افراد هر گروه ۲ ساعت بعد از آخرین تزریق و نیمی دیگر ۲۴ ساعت بعد از تزریق ارزیابی شدند. در زمان بررسی، پس از پرفیوژن با محلول ۴ درصد پارافرمالدید در محلول ۰/۱ مولار فسفات بافر، بافت مغز خارج شد.

تکامل دستگاه عصبی شامل رشد سلول‌های عصبی و غیر عصبی، تمایز نورونی، حیات و مرگ سلول‌های نورونی بر عهده دارد [۱-۴]. آنتاگونیست رسپتورهای استروژنی باعث کاهش نورونزنی شده و تأثیر مهمی بر پارامترهای مورفومتریک اعمال می نماید. تاموکسیفن دارای هر دو اثر آگونیستی و آنتاگونیستی است که بستگی به گونه، بافت و نوع سلول دارد [۵]. در دستگاه عصبی مرکزی، تاموکسیفن به عنوان آنتاگونیست رسپتور استروژن عمل کرده و مرگ سلولی را در گروه متفاوت سلولی القا می نماید [۶]. هورمون‌های استرویدی گونادال در رشد و تکامل ساختمان‌های مختلف بدن، به ویژه دستگاه عصبی از ویژگی‌های خاصی برخوردار است. یکی از مهم‌ترین آثار بیولوژیکی شناخته شده استروژن، اتصال این هورمون به رسپتور استروژن α و β است [۷]. استروژن ممکن است از دو مسیر ژنومیک و غیرژنومیک عمل نماید. از دیدگاه کلاسیک ساده، استروژن باید به رسپتور استروژن α و β باند شود و تشکیل دimer را بدهد. دایمر تشکیل شده قادر است در تنظیم نسخه برداری ژن‌های هدف شرکت نماید که دارای سکانس‌های عنصر پاسخ استروژن در ناحیه پرموتور خود است. به عبارت دیگر استروژن قادر است که بعضی از آثار آن را، در دوره کوتاه از زمان که نمی تواند در سنتز پروتئین جدید دخالت داشته باشد، القاء نماید [۸-۹]. این عمل سریع استروژن به اعمال غیرژنومیک آن بر می گردد که ممکن است ناشی از فعالیت سلول‌های ناحیه هیپوکامپ باشد. با توجه به اهمیت وجود استروژن در سلول‌های نورونی، در مطالعه حاضر بیان رسپتورهای استروژنی α در نورون‌های هرمی ناحیه CA1 هیپوکامپ در موش صحرایی اورکتومی شده، بررسی می شود. در این راستا این سؤال مطرح است که آثار مستقیم استرادیول روی سلول‌های نورونی چیست؟ و چگونه این آثار در نورون‌های هیپوکامپ تنظیم می شود؟ وجود استروژن و آنتاگونیست آن یعنی تاموکسیفن در نورون‌های هیپوکامپ چه نقشی دارد؟ آیا رسپتورهای استروژنی α در نورون‌های هیپوکامپ بیان می شود؟ در تحقیق حاضر با اهمیت استروژن از طریق رسپتورهای استروژن بر فعالیت نورون‌های هیپوکامپ بررسی شده و نقش تداخلی تاموکسیفن به عنوان آنتاگونیست استروژن در روند این

در بررسی نمونه‌ها، تعدادی از نمونه‌ها برای Western blot در نظر گرفته شد و میزان بیان پروتئین رسپتورهای استروژنی α ارزیابی شد.

به‌منظور انجام روش ایمونوهیستوشیمی، از برش‌های انجمادی استفاده شده است که میزان واکنش رسپتورهای استروژن را در سلول‌های هرمی ناحیه هیپوکامپ نشان می‌دهد. در این روش دانسیته سلول‌هایی که پاسخ ایمونوراکتیو مثبت به رسپتورهای استروژنی α در زمان ۲ و ۲۴ ساعت بعد از آخرین تزریق نشان دادند، بررسی شد.

روش وسترن بلات

ناحیه مورد نظر در هیپوکامپ توسط بافر لایزیز حاوی مهارکننده‌های پروتئینی مخلوط و یک دست شد. بافر لایزیز حاوی Tris HCl PH=8.0، ۵۰ میلی مولار و کلورور سدیم ۱۵۰ میلی مولار، ۱% Nonident P-40، Cocktail، ۳ میلی مولار، PMSF ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر بود. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ گذاشته شد و به فاصله ۱۰ دقیقه ورتکس شد. سپس در ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. بعد از جدا کردن سوپر ناتانت، پلیت‌ها جمع‌آوری شد و سوپرناتانت در لوله دیگری جمع‌آوری شد. پروتئین‌های مورد نظر به همراه پروتئین راهنمای β اکتین، به مقدار ۸۰-۹۰ میکروگرم روی ژل ۱۰% SDS-Polyacrylamide الکتروفورز شد. پروتئین‌های جدا شده به غشای نیترو سلولز به مدت یک ساعت در دمای اتاق با ولتاژ ۵۰ ولت و جریان ۷۰۰ میلی آمپرانتقال داده شد. سپس با TBS (Tris-buffered saline) حاوی شیر خشک بدون چربی ۵ درصد به مدت دو ساعت بلوک شد. غشای نیتروسلولز بعد از شستشو با بافر تریس حاوی توپین ۲۰ یک درصد برای برداشتن آنتی‌بادی‌های باند نشده، با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال α ER (1:5,000 Sigma, St. Louis, MO, USA) مجاور شد. پس از شستشو با بافر، با آنتی‌بادی ثانویه کنژوگه با HRP (horseradish peroxidase)، به مدت ۴۵ دقیقه تا یک ساعت در

جدول ۱. گروه‌های مورد مطالعه؛ T: تاموکسیفن، E: استرادیول، 0: روغن کنجد، T: پروپیلن گلیکول

مشخصات	ردیف
موش صحرایی اورکتومی شده با تزریق همزمان استرادیول و تاموکسیفن، نمونه‌برداری ۲ ساعت بعد از آخرین تزریق (TE-s-2)	۱
موش صحرایی اورکتومی شده با تزریق همزمان حلال استرادیول و تاموکسیفن، نمونه‌برداری ۲ ساعت بعد از آخرین تزریق (TO-s-2)	۲
موش صحرایی اورکتومی شده با تزریق همزمان استرادیول و حلال تاموکسیفن، نمونه‌برداری ۲ ساعت بعد از آخرین تزریق (PE-s-2)	۳
موش صحرایی اورکتومی شده با تزریق همزمان حلال استرادیول و حلال تاموکسیفن، نمونه‌برداری ۲ ساعت بعد از آخرین تزریق (OP-s-2)	۴
موش صحرایی اورکتومی شده با فاصله زمانی ۱۲ ساعته تزریق استرادیول و تاموکسیفن، نمونه‌برداری ۲ ساعت بعد از آخرین تزریق (TE-12-2)	۵
موش صحرایی اورکتومی شده با فاصله زمانی ۱۲ ساعته تزریق حلال استرادیول و تاموکسیفن، نمونه‌برداری ۲ ساعت بعد از آخرین تزریق (TO-12-2)	۶
موش صحرایی اورکتومی شده با فاصله زمانی ۱۲ ساعته تزریق حلال استرادیول و حلال تاموکسیفن، نمونه‌برداری ۲ ساعت بعد از آخرین تزریق (PE-12-2)	۷
موش صحرایی اورکتومی شده با فاصله زمانی ۱۲ ساعته تزریق حلال استرادیول و حلال تاموکسیفن، نمونه‌برداری ۲ ساعت بعد از آخرین تزریق (OP-12-2)	۸
موش صحرایی اورکتومی شده با تزریق همزمان استرادیول و تاموکسیفن، نمونه‌برداری ۲۴ ساعت بعد از آخرین تزریق (TE-s-24)	۹
موش صحرایی اورکتومی شده با تزریق همزمان حلال استرادیول و تاموکسیفن، نمونه‌برداری ۲۴ ساعت بعد از آخرین تزریق (TO-s-24)	۱۰
موش صحرایی اورکتومی شده با تزریق همزمان حلال استرادیول و حلال تاموکسیفن، نمونه‌برداری ۲۴ ساعت بعد از آخرین تزریق (PE-s-24)	۱۱
موش صحرایی اورکتومی شده با تزریق همزمان حلال استرادیول و حلال تاموکسیفن، نمونه‌برداری ۲۴ ساعت بعد از آخرین تزریق (OP-s-24)	۱۲
موش صحرایی اورکتومی شده با فاصله زمانی ۱۲ ساعته تزریق استرادیول و تاموکسیفن، نمونه‌برداری ۲۴ ساعت بعد از آخرین تزریق (TE-12-24)	۱۳
موش صحرایی اورکتومی شده با فاصله زمانی ۱۲ ساعته تزریق حلال استرادیول و تاموکسیفن - نمونه برداری ۲۴ ساعت بعد از آخرین تزریق (TO-12-24)	۱۴
موش صحرایی اورکتومی شده با فاصله زمانی ۱۲ ساعته تزریق همزمان استرادیول و حلال تاموکسیفن - نمونه‌برداری ۲۴ ساعت بعد از آخرین تزریق (PE-12-24)	۱۵
موش صحرایی اورکتومی شده با فاصله زمانی ۱۲ ساعته تزریق حلال استرادیول و تاموکسیفن - نمونه‌برداری ۲۴ ساعت بعد از آخرین تزریق (OP-12-24)	۱۶

semiquantitatively به شرح زیر درجه بندی شد: بدون واکنش (-)، بسیار بسیار کم ($\pm$)، بسیار کم (+)، کم (++)، متوسط (+++)، زیاد (++++)، و بسیار زیاد (+++++) و چون متغیر کیفی بوده و مقایسه در چند گروه مورد نظر بود از روش غیرپارامتری کروسکال والیس استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج براساس مطالعه بافت‌ها در ۱۶ گروه طبق جدول شماره ۱ به دست آمده است. نمونه‌های اورکتومی شده با ۱۷ بتا استرادیول و آنتاگونیست آن‌ها، تاموکسیفن یا حلال‌های آن‌ها بررسی شد. از ۱۶ گروه مورد بررسی که تعداد هر گروه ۵ حیوان بود، حداقل دو برش از هر بلوک بافتی پارافینی بررسی میکروسکوپی شد.

آنالیز وسترن بلات

با انجام روش وسترن بلات و آنالیز آن، مقدار رسپتور استروژن α در سلول‌های هرمی ناحیه CA1 هیپوکامپ موش صحرایی تعیین شد. در گروه‌های مختلف که با تزریق همزمان یا ۱۲ ساعت تأخیر استرادیول و تاموکسیفن یا حلال‌های آن صورت گرفت، نمونه‌گیری ۲ ساعت و ۲۴ ساعت بعد از آخرین تزریق انجام شد. نتایج حاصل در نمونه‌گیری ۲ ساعت بعد از آخرین تزریق، نشان می‌دهد که بیشترین میزان پروتئین رسپتور استروژن α در گروه PE-12-2 بوده است (شکل ۱) که در مقایسه با گروه نمونه‌گیری بعد از ۲۴ ساعت، واکنش بسیار کمتری مشاهده شد (شکل ۲).



شکل ۱. آنالیز وسترن بلات مقدار رسپتور استروژن α در لایه سلول‌های هرمی ناحیه CA1 هیپوکامپ موش صحرایی با تزریق همزمان یا ۱۲ ساعت تأخیر استرادیول و تاموکسیفن یا حلال‌های آن و نمونه‌گیری ۲ ساعت بعد از تزریق

دمای اتاق قرار گرفت. سیگنال‌ها با استفاده از کیت آشکار کننده ECL Advace (Amersham) تعیین و سپس غشاهای نیتروسلولز در معرض فیلم کوداک Biomax MR قرار گرفته و باندهای آشکار شده بررسی شد.

روش ایمونو هیستوشیمی

برای انجام روش ایمونو هیستوشیمی برش‌های پارافینی تهیه شد. هیپوکامپ‌ها طبق روند معمول، آبیگری و در پارافین قالب‌گیری شد. برش‌های پارافینی با دستگاه Semi-Ultramicrotome (Lieca 3000) به ضخامت ۳ میکرون روی اسلایدهای با پوشش سیلان (Sigma) تهیه و برای مطالعات ایمونو هیستوشیمی آماده شد.

برای آشکارسازی رسپتورهای استروژنی α روی ساختار سلولی، از کیت EnVision استفاده شد که نمونه بعد از رنگ‌آمیزی افتراقی با همتوکسیلین و چسباندن با انتالن با میکروسکوپ نوری Olympus (PROVIS AX70, Japan) مجهز به دوربین دیجیتالی سونی (DP11, Japan) مطالعه شد.

آنالیز آماری

برای وسترن بلات، هر باند با میزان واکنش β -Actin همان بلات، استانداردسازی شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از Student t - test و آنالیز واریانس (ANOVA) صورت گرفت.

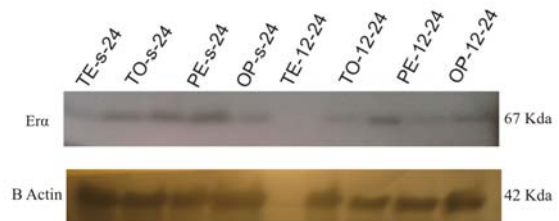
از برش‌های پارافینی، به منظور بررسی وجود رسپتورهای استروژن α از روش ایمونو هیستوشیمی استفاده گردید و توسط فتومیکروسکوپ المپیوس (PROVIS AX70, Japan) مجهز به دوربین دیجیتال (DP11, Japan) بررسی و با بزرگنمایی $\times 40$ عکس برداری انجام شد. برای بررسی میزان واکنش هیستوشیمیایی و ایمونو هیستوشیمیایی، حداقل ۵ ناحیه در هر لام انتخاب و مورد ارزیابی قرار گرفت. لکالیزاسیون و توزیع میزان واکنش‌ها در نوروهای هیپوکامپ در فعالیت‌های هیستوشیمی و ایمونو هیستوشیمی بر اساس دانسیته رنگ‌ها در مشاهدات موردی، به‌طور

مشاهده نشد. در گروه ۹ ($\alpha 9$) که تزریق همزمان E و T انجام شد (TE-12-2) با جلوگیری از بلوکه کردن، افزایش کمتری در بیان ER- α دیده شد. در گروه ۱۰ ($\alpha 10$) که تزریق همزمان O و T انجام شد (TO-12-2) بیان ER- α کاهش بیشتری یافت. در گروه ۱۱ ($\alpha 11$) که تزریق همزمان E و O انجام شد (PE-12-2) بیان ER- α در مقایسه با گروه ۹ کاهش نشان داد اما واکنش بیشتری نسبت به گروه ۱۰ دیده شد. در گروه ۱۲ ($\alpha 12$) که تزریق همزمان P و T انجام شد (OP-12-2) بیان ER- α مشاهده نشد. در گروه ۱۳ ($\alpha 13$) که تزریق همزمان E و T انجام شد (TE-12-24) با جلوگیری از بلوکه کردن، افزایش بسیار کمتری در بیان ER- α مشاهده شد. در گروه ۱۴ ($\alpha 14$) که تزریق همزمان O و T انجام شد (TO-12-24) بیان ER- α کاهش بیشتری یافت. در گروه ۱۵ ($\alpha 15$) که تزریق همزمان E و O انجام شد (PE-12-24) بیان ER- α در مقایسه با گروه ۱۳ کاهش نشان داد اما واکنش بیشتری نسبت به گروه ۱۴ مشاهده شد. در گروه ۱۶ ($\alpha 16$) که تزریق همزمان P و T انجام شد (OP-12-24) بیان ER- α مشاهده نشد (شکل ۳).

جدول ۲. توزیع و تراکم نسبی واکنش رسپتور استروژن α در سیتوپلاسم نورون‌های هرمی ناحیه CA1 هیپوکامپ

گروه ها	زمان نمونه برداری	
	بعد از ۲ ساعت	بعد از ۲۴ ساعت
TE-s	+++	+++
TO-s	±	±
PE-s	+	±
OP-s	-	-
TE-12	+++++	+++++
TO-12	+	±
PE-12	+++	++
OP-12	-	-

ارزیابی نیمه کمی تراکم رسپتورهای استروژنی α با درجه‌بندی - یافت نمی‌شود، ± خیلی کم، + تعداد خیلی کم، ++ تعداد کم، +++ تعداد متوسط، ++++ تعداد زیاد، +++++ تعداد بسیار زیاد



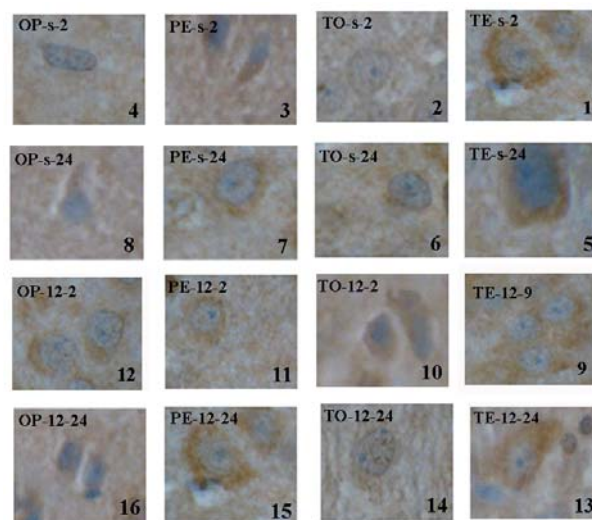
شکل ۲. آنالیز وسترن بلات مقدار رسپتور استروژن α در لایه سلول‌های هرمی ناحیه CA1 هیپوکامپ موش صحرایی با تزریق همزمان یا ۱۲ ساعت تأخیر استرادیول و تاموکسیفن یا حلال‌های آن و نمونه‌گیری ۲۴ ساعت بعد از تزریق

بیان ایمونوراکتیویته ER- α در نورون‌های

هرمی ناحیه CA1 هیپوکامپ

نتایج حاصل از بررسی واکنش‌های ایمونوهیستوشیمیایی استروژن رسپتور α در جدول ۲ نشان داده شده است که بیانگر توزیع و دانسیته نسبی میزان ER- α در نورون‌های هرمی ناحیه CA1 ناحیه هیپوکامپ موش صحرایی است. در گروه ۱ ($\alpha 1$) که تزریق همزمان E و T انجام شد (TE-s-2) با جلوگیری از بلوکه کردن، افزایش بیان ER- α مشاهده شد. در گروه ۲ ($\alpha 2$) که تزریق همزمان O و T انجام شد (TO-s-2) بیان ER- α کاهش یافت. در گروه ۳ ($\alpha 3$) که تزریق همزمان E و O انجام شد (PE-s-2) بیان ER- α در مقایسه با گروه ۱ کاهش نشان داد اما واکنش بیشتری نسبت به گروه ۲ مشاهده شد. در گروه ۴ ($\alpha 4$) که تزریق همزمان P و T انجام شد (OP-s-2) بیان ER- α مشاهده نشد. در گروه ۵ ($\alpha 5$) که تزریق همزمان E و T انجام شد (TE-s-24) با جلوگیری از بلوکه کردن، افزایش کمی در بیان ER- α مشاهده شد. در گروه ۶ ($\alpha 6$) که تزریق همزمان O و T انجام شد (TO-s-24) بیان ER- α کاهش بیشتری نشان داد. در گروه ۷ ($\alpha 7$) که تزریق همزمان E و O انجام شد (PE-s-24) بیان ER- α در مقایسه با گروه ۵ کاهش نشان داد اما واکنش بیشتری نسبت به گروه ۶ مشاهده شد. در گروه ۸ ($\alpha 8$) که تزریق همزمان P و O انجام شد (OP-s-24) بیان ER- α

هیپوتالاموس بلکه در ساختمان‌هایی چون هیپوکامپ که تحت تاثیر تمایزات جنسی است نیز صادق است [۱۳، ۱۰ و ۱۴]. هورمون‌های استرویدی گونادال نقش مهمی در رشد و تکامل ساختمان‌های مختلف بدن به ویژه دستگاه عصبی بر عهده دارد. وجود این هورمون‌ها در نواحی مختلف مغز مثل هیپوتالاموس، هیپوکامپ، مغز پیشین، پوتامن و هسته کودایت، باعث ایجاد اختلاف و تنوع اثر این هورمون در دستگاه عصبی می‌شود. آثار هورمون‌های استرویدی گونادال بر فعالیت‌های طبیعی و غیرطبیعی حرکات بدن در ارتباط با ساختمان‌هایی مثل پوتامن و کودیت است [۱۵] آثار هورمونی آن روی حافظه هیپوکامپ را درگیر می‌کند [۱۶]. وجود رسپتورهای استروژنی در نواحی مختلف مغز، نشان از اثر هورمون‌ها در مغز است. یافته‌های بالینی و تجربی نشان می‌دهد که استروژن‌ها، فاکتورهای محافظ برای مغز پستانداران بوده و به‌عنوان ابزار دارویی نیرومند جهت جلوگیری از اختلالات گوناگون عصبی محسوب می‌شوند [۱۷]. مطالعات قبلی نشان می‌دهد که استروژن به‌عنوان عامل محافظت‌کننده در مقابل انواع مرگ سلولی عمل می‌نماید [۲۵]. تحقیقات بالینی درمان جایگزین استروژن را در درمان آلزایمر [۱۸] و کاهش میزان تشکیل پروتئین بتا آمیلوید [۱۹] را مؤثر می‌داند. برای تمایز این استروئیدها از سایر ارگان‌های کلاسیک استروئیدوزنیک مانند گونادها، نورودرنال و جفت، آن‌ها را نورواستروئید می‌نامند. ستر استروئیدها به‌وسیله مغز توسط بانلین (Banlien) و همکارانش در سال ۱۹۹۴ مطرح شد و نشان داد که آنزیم‌های مداخله‌گر در فرایند استروئیدوزنریز در بافت عصبی یافت می‌شود. استروژن‌ها و تنظیم‌کننده‌های انتخابی رسپتور استروژن، قادر است با آنتاگونیست خود در سیستم عصبی مانند تاموکسیفن باند شود تا با تشکیل کمپلکس، مولکولی ایجاد نماید که آثار اختصاصی یافته‌های حاصل را با استفاده از تنظیم بیان ژن هدف، اعمال نماید [۱۹]. تاموکسیفن متعلق به گروهی از ترکیبات متنوع ساختمانی به نام تنظیم‌کننده‌های انتخابی



شکل ۳. فتومیکروگراف واکنش‌های ایمونوهیستوشیمیایی رسپتور استروژن α در سلول‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ در موش صحرایی اورکتومی‌شده. گروه‌های ($\alpha 1$ - $\alpha 4$) که تزریق همزمان استرادیول و تاموکسیفن یا حلال‌های آن‌ها را داشتند و ۲ ساعت بعد از آخرین تزریق نمونه‌برداری شدند. گروه‌های ($\alpha 5$ - $\alpha 8$) که تزریق همزمان استرادیول و تاموکسیفن یا حلال‌های آن‌ها را داشتند و ۲۴ ساعت بعد از آخرین تزریق نمونه‌برداری شدند. گروه‌هایی که تزریق دوم استرادیول و تاموکسیفن یا حلال‌های آن‌ها با فاصله زمانی ۱۲ ساعت داشتند و ۲ ساعت بعد از آخرین تزریق نمونه‌برداری شدند. گروه‌های ($\alpha 13$ - $\alpha 16$) که تزریق دوم استرادیول و تاموکسیفن یا حلال‌های آن‌ها با فاصله زمانی ۱۲ ساعت داشتند و ۲۴ ساعت بعد از آخرین تزریق نمونه‌برداری شدند (بار: ۲۰ میکرومتر)

بحث

هدف مطالعه حاضر مقایسه بیان رسپتورهای استروژنی α در نورون‌های هرمی ناحیه CA1 هیپوکامپ در موش صحرایی اورکتومی‌شده بود. در این مطالعه نشان داده شد که استروژن رسپتور α تنها در سیتوپلاسم سلول‌های نورون هرمی ناحیه CA1 هیپوکامپ موش صحرایی بیان می‌شود. تاموکسیفن به‌عنوان آنتاگونیست استروژن در سیستم عصبی موجب مهار این بیان می‌شود. مطالعات کمی حضور رسپتورهای استروژنی α را در ناحیه CA1 هیپوکامپ نشان می‌دهد [۱۲]. این مطالعات و تحقیقات نشان داده است که مغز واکنش‌های بسیار گسترده‌تری نسبت به آنچه قبلاً تصور می‌شد در ارتباط با هورمون‌های گونادی دارد [۱۰] و این واقعیت نه تنها در

رستپور استروژن (SERMs) محسوب می‌شود که قادرست با رستپور استروژن واکنش کند و بر حسب بافت هدف ممکن است به‌عنوان آگونیست یا آنتاگونیست عمل نماید. تاموکسیفن به عنوان اولین تنظیم کننده در بافت عصبی به نام آنتاگونیست استروژن عمل می‌نماید [۲۱]. رستپورهای استروژن ممکن است به دو صورت ژنومیک (هسته‌ای) و غیرژنومیک (غشایی) عمل نماید که رستپورهای هسته‌ای برای نسخه‌برداری نیاز به زمان دارد. اما رستپورهای استروژن غشایی به‌طور سریع عمل نموده و نیاز به نسخه‌برداری ندارد [۲۲-۲۳] و چون فعال عمل می‌کند تنوع وسیعی از مسیرهای سیگنال داخل سلولی مانند افزایش کلسیم داخل سلولی و فعال نمودن پروتئین کیناز غیرفعال را ایجاد می‌نماید. لازم به ذکر است که در نوروهای هیپوکامپ پروتئین‌های اکسید نیتریک سینتاز اندوتلیالی و نورونی یافت می‌شود [۲۴] که تولید نوع اندوتلیالی آن در زمان یائسگی پس از تزریق E2 در موش اورکتومی شده افزایش می‌یابد [۲۵] که همراه با افزایش فعالیت کانال‌های کلسیم (بیان غیرژنومیک) است. براساس یافته‌های مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که استروژن چندین اثر مهم بر هیپوکامپ دارد؛ در موش‌های اورکتومی شده ماده درمان با استروژن سطح پروتئین nNOS در سلول‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ افزایش می‌دهد که این افزایش به‌وسیله آنتاگونیست رستپورهای استروژنی مهار می‌شود که نشان می‌دهد این عمل استروژن با واسطه رستپور انجام می‌شود. تحقیقات پلی‌گرنو و همکارانش این نتایج را تأیید می‌نمایند [۲۶ و ۲۷]. تحقیقات متعدد در زمینه اثر استروژن و تاموکسیفن بر ساختار بافت عصبی انجام شده ولی مکانیسم عمل هنوز مورد بحث و بررسی است [۲۸ و ۲۹].

نقش حیاتی استروژن در روند رشد، تکامل و موارد آسیب شناختی درباره استخوان، پستان و رحم به‌طور قابل توجهی بررسی شده است. مطالعات اولیه سرطان پستان با تاموکسیفن در بیماران با سرطان پیشرفته در سال ۱۹۶۹ شروع شد. مکانیزم عمل تاموکسیفن با جلوگیری از اتصال استروژن

به ER و بلوک ناحیه AF2، عدم فعالیت Coactivator II و در نهایت عدم نسخه‌برداری به‌عنوان اثر آنتی تومور در پستان بررسی شده است [۳۰ و ۳۱]. مطالعات گروهی از محققین بر تعیین حجم هیپوکامپ با مداخله استروژن و تاموکسیفن نشان داده است که افزایش استروژن موجب افزایش حجم هیپوکامپ و افزایش تاموکسیفن موجب کاهش حجم آن می‌شود [۳۱]. در سال ۱۹۶۰ رستپور استروژنی به‌عنوان جایگاه باندهای استروژنی، ابتدا در هیپوتالاموس و غده هیپوفیز و به‌تدریج در نواحی مغز مثل هیپوکامپ بررسی شد [۳۲]. مکانیزم اثر استروژن در سیستم عصبی به دو صورت ژنومیک و غیرژنومیک مطرح می‌شود [۷]. در مطالعه‌ای که روی سلول‌های گرانولوزای جوجه انجام شده است اثر استروئید بر کلسیم داخل سلولی تحت عنوان اثر غیرژنومیک استروژن بررسی شده است [۳۳]. نتایج حاصل از این مطالعه نقش مؤثر رستپورهای استروژنی را در محافظت با واسطه استرادیول در مقابل صدمات مغزی را نشان می‌دهد. بررسی حاضر نشان داد که رستپورهای استروژنی α فقط در سیتوپلاسم نوروهای هیپوکامپ یافت می‌شود. تزریق ۱۷ بتا استرادیول به‌طور همزمان یا با تأخیر ۱۲ ساعت بعد و برداشت بافت به مدت ۲ یا ۲۴ ساعت در بیان میزان ER- α اثر به سزایی دارد زیرا تزریق همزمان و برداشت ۲ ساعت بعد افزایش بیان را نشان می‌دهد که این افزایش در گروه دوم که با تأخیر ۱۲ ساعته تزریق و برداشت همان ۲ ساعت بوده است، بیشتر است که به دلیل بلوکه شدن استروژن توسط تاموکسیفن است که در این ارتباط زمان نیمه عمر تاموکسیفن نقش اساسی را بر عهده دارد [۳۴]. در صورت تزریق تاموکسیفن به تنهایی، واکنش کمتر از تزریق استرادیول به تنهایی است و استفاده از حلال‌ها، هیچ تاثیری در ایجاد واکنش نشان نمی‌دهد. این نتایج، با انجام آنالیز وسترن بلات در شکل ۱، یعنی ۲ ساعت بعد از آخرین تزریق و در شکل ۲، یعنی ۲۴ ساعت بعد از آخرین تزریق تأیید می‌گردد.

نتایج حاصل از یافته‌های بررسی حاضر نشان می‌دهد که

که از دیدگاه‌های مختلف بتوان اثر استروژن را در نورون‌های هیپوکامپ بررسی نمود و اهمیت ویژه استروژن را در درمان بیماری‌های نورودژنراتیو مطرح نمود.

این تحقیق با توجه به حذف هورمون استروژن، استفاده از آنتاگونیست‌ها، استفاده از استرادیول، استفاده از حلال استروژن و استفاده از حلال آنتاگونیست این امکان را فراهم آورده است

References

1. **Yararbas G, Pogun S.** Tamoxifen and mifepriston modulate nicotine induced conditioned place preference in female rats. *Brain Res Bull* 2011; 84:425-9.
2. **Younes M, Honma N.** Estrogen receptor β . *Arch Pathol Lab Med* 2011; 135: 63-6.
3. **Moreira PI, Custódio JB, Nunes E, Oliveira PJ, Moreno A, Seica R, Oliveira CR, Santos MS.** Mitochondria from distinct tissues are differently affected by 17 β -estradiol and tamoxifen. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011;123: 8-16.
4. **Lee ES, Yin Z, Milatovic D, Jiang H, Aschner M.** Estrogen and tamoxifen protect against Mn-induced toxicity in rat cortical primary cultures of neurons and astrocytes. *Toxicol Sci* 2009;110: 156-67.
5. **Veenman CL, Lehmann J, Stöhr T, Totterdell S, Yee B, Mura A, et al.** Comparisons of the densities of NADPHd reactive and nNOS immunopositive neurons in the hippocampus of three age groups of young nonhandled and handled rats. *Brain Res Dev Brain Res* 1999; 114: 229-43.
6. **Couldwell WT, Hinton DR, He S, Chen TC, Sebat I, Weiss MH, Law RE.** Protein kinase C inhibitors induce apoptosis in human malignant glioma cell lines, *FEBS Lett* 1994; 345 :43-6.
7. **McEwen BS, Alves SE.** Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev* 1999;20: 279-307.
8. **Ganz PA, Castellon SA, Silverman DH.** Estrogen, tamoxifen, and the brain. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94:547-9.
9. **Lei DL, Long JM, Hengemihle J, O'Neill J, Manaye KF, Ingram DK, et al.** Effects of estrogen and raloxifene on neuroglia number and morphology in The hippocampus of aged female mice. *Neuroscience* 2003;121 :659 -66.
10. **Eberling JL, Wu C, Tong-Turnbeaugh R, Jagust WJ.** Estrogen- and tamoxifen- associated effects on brain structure and function. *Neuroimage* 2004; 21:364 -371.
11. **Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW.** Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest* 1999;103: 401 -6.
12. **Morley P, Whitfield JF, Vanderhyden BC, Tsang BK, Schwartz JL.** A new, nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium. *Endocrinology* 1992;131: 1305-12
13. **Shiau AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA, et al.** The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 1998; 95: 927-37.
14. **Clemons M, Danson S, Howell A.** Tamoxifen (Nolvadex): a review. *Cancer Treat Rev* 2002; 28: 165 -80.
15. **Carrer HF, Cambiasso MJ.** Sexual differentiation of the brain: genes, estrogen , and neurotrophic factors. *Cell Mol Neurobiol* 2002; 22:479-500.
16. **Shughrue PJ, Scrimo PJ, Merchenthaler I.** Estrogen binding and estrogen receptor characterization (ER α and ER β) in the cholinergic neurons of the rat basal forebrain. *Neuroscience* 2000; 96: 41-9.
17. **Vegeto E, Belcredito S, Etteri S, Ghisletti S, Brusadelli A, Meda C, et al.** Estrogen receptor-

- alpha mediates the brain antiinflammatory activity of estradiol. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100: 9614-9.
18. **Rudick CN, Woolley CS.** Estrogen regulates functional inhibition of hippocampal CA1 pyramidal cells in adult female rat. *J Neuroscience* 2001; 21: 6532-43.
 19. **Pinzone JJ, Stevenson H, Strobl JS, Berg PE.** Molecular and cellular determinants of estrogen receptor α expression. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 4605-12.
 20. **Alves SE, Lopez V, McEwen BS, Weiland NG.** Differential colocalization of estrogen receptor β (ER β) with oxytocin and vasopressin in the paraventricular and supraoptic nuclei of the female rat brain: An immunocytochemical study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 3281-6.
 21. **Li C, Brake WG, Romeo RD, Dunlop JC, Gordon M, Buzescu R, et al.** Estrogen alters hippocampal dendritic spine shape and enhances synaptic protein immunoreactivity and spatial memory in female mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(7): 2185-90.
 22. **Goodsell D.S.** The molecular perspective: tamoxifen and the estrogen receptor. *Oncologist* 2002;7:163-4.
 23. **McEwen BS.** The molecular and neuroanatomical basis for estrogen effects in the central nervous system clinical. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1790-7.
 24. **MacGregor JI, Jordan VC, Robert H.** Basic guide to the mechanism of antiestrogen action. *Pharmacol Rev* 1998;50(2):151-96.
 25. **McEwen BS.** Invited review: Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. *J Appl Physiol* 2001; 91(6): 2785-801.
 26. **Mitchner NA, Garlick C, Steinmetz RW, Ben-Jonathan N.** Differential regulation and action of estrogen receptors α and β in GH3 cells. *Endocrinology* 1999; 140(6): 2651-8.
 27. **Simoncini T, Genazzani AR, Liao JK.** Nongenomic mechanisms of endothelial nitric oxide synthase by the selective estrogen receptor modulator raloxifene. *Circulation* 2002; 105: 68-73.
 28. **Dubal DB, Zhu H, Yu J, Rau SW, Shughrue PJ, Merchenthaler I, et al.** Estrogen receptor α , not β is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 1952-7.
 29. **McNeill AM, Zhang C, Stanczyk FZ, Duckles SP, Krause DN.** Estrogen increases endothelial nitric oxide synthase via estrogen receptors in rat cerebral blood vessels: effect preserved after concurrent treatment with medroxyprogesterone acetate or progesterone. *Stroke* 2002; 33:1685-91.
 30. **Pelligrino DA, Ye S, Tan F, Santizo RA, Feinstein DL, Wang Q.** Nitric-oxide-dependent pial arteriolar dilation in the female rat: effects of chronic estrogen depletion and repletion. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 269:165-71.
 31. **Patrone C, Andersson S, Korhonen L, Lindholm D.** Estrogen receptor-dependent regulation of sensory neuron survival in developing dorsal root ganglion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96:10905-10.
 32. **Figtree GA, Webb CM, Collins P.** Tamoxifen acutely relaxes coronary arteries by an endothelium-, nitric oxide-, and estrogen receptor-dependent mechanism. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 295:519-23.
 33. **Scott PA, Tremblay A, Brochu M, St-Louis J.** Vasorelaxant action of 17- estradiol in rat uterine arteries: role of nitric oxide synthases and estrogen receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293: H3713-9.
 34. **Nobakht M, Najafzadeh N, Kordestani Shargh BE.** Effects of tamoxifen on morphological and ultrastructural aspects of developing hippocampus of rat. *Iran Biomed J* 2009; 13: 171-7.