



## بررسی اثر تزریق استروژن به قشر مخچه موش صحرایی بر رفتارهای شبه اضطراب و پارامترهای سیستم آنتی اکسیدانی به دنبال تزریق اتیدیوم بروماید

فراانک نجاتی<sup>۱</sup>، شیوا خضری<sup>۱</sup>، حمیرا حاتمی<sup>۲</sup>، علیرضا علی همتی<sup>۳</sup>

۱- گروه علوم زیستی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۲- گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۳- گروه تشریح و بافت شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۰۳/۱۲

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۱۰/۲۵

### چکیده

**زمینه و هدف:** دمیلیناسیون توسط اتیدیوم بروماید (EB) یکی از روش‌هایی است که به طور معمول برای القای مدل‌های تجربی MS استفاده می‌شود. تیمار با استروژن، الیگوندروسیت‌ها را از مسمومیت سلولی محافظت کرده و پراکسیداسیون لیپید را مهار می‌کند. هدف از این پروژه بررسی تاثیر استروژن بر رفتارهای شبه اضطراب و پارامترهای استرس اکسیداتیو پس از القای دمیلیناسیون در قشر مخچه موش صحرایی توسط اتیدیوم بروماید است.

**مواد و روش‌ها:** القای MS با تزریق مستقیم اتیدیوم بروماید (۰/۰۱٪) به قشر مخچه انجام گرفت. گروه‌های تیمار یک هفته پس از القای MS، استروژن را به صورت ریزتزریق و به مدت ۳ روز و با دو دوز ۲ μg و ۴ μg دریافت نمودند. پس از اتمام دوره تیمار، از حیوانات تمامی گروه‌ها آزمون ماز مرتفع بعلاوه شکل به عمل آمد و پارامترهای استرس اکسیداتیو پس از پایان دوره آزمایشات سنجیده شد. داده‌های آماری با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه مقایسه شدند.

**نتایج:** نتایج این بررسی نشان داد که درصد ورود به بازوی باز و مدت زمان سپری شده در بازوی باز (شاخص‌های اضطراب) در گروهی که استروژن دریافت کرده بودند نسبت به گروه اتیدیوم بروماید افزایش معنی دار یافت ( $P < 0/01$ ). همچنین میزان فعالیت گلوکوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز در گروه تحت درمان با استروژن نسبت به گروه اتیدیوم بروماید افزایش معنی داری را نشان داد.

**نتیجه‌گیری:** ریزتزریق استروژن می‌تواند میزان اضطراب را کاهش داده و اثر آنتی اکسیدانی اعمال کند.

**کلمات کلیدی:** اتیدیوم بروماید، استروژن، مخچه، اضطراب، استرس اکسیداتیو، موش صحرایی

### مقدمه

مولتیپل اسکلروزیس (MS) یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مزمن سیستم عصبی مرکزی است که با دمیلینه شدن نورون‌های عصبی همراه است و قطعات متعدد دمیلینه شده حاصل از بیماری، سرتاسر ماده سفید را فرا می‌گیرد و عملکرد حسی و حرکتی را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۱، ۲). نقایص شناختی به طور معمول به عنوان یکی از عوارض بالینی ناتوان کننده‌ی بیماری MS شناسایی شده است. شایع‌ترین نقایص شناختی در میان بیماران مبتلا به MS شامل کاهش سرعت پردازش اطلاعات، کاهش حافظه و اضطراب می‌باشند. استرس مزمن، با تغییر نوروترانسمیترها و ساختارهای نورونی در راه‌های عصبی، سبب بوجود آمدن بیماری‌ها و اختلالات بسیاری می‌شود. از آنجایی که مخچه مسؤول هماهنگی حرکات بوده و درگیر در عملکردهای شناختی می‌باشد، اختلال در تشکیل نورون‌ها و ساختارهای نورونی آن، سبب ایجاد اختلالات بسیاری در عملکرد طبیعی فرد می‌شود (۲، ۳).

مولتیپل اسکلروزیس (MS) یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مزمن سیستم عصبی مرکزی است که با دمیلینه شدن نورون‌های عصبی همراه است و قطعات متعدد دمیلینه شده حاصل از بیماری، سرتاسر ماده سفید را فرا می‌گیرد و عملکرد حسی و حرکتی را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۱، ۲).

نقایص شناختی به طور معمول به عنوان یکی از عوارض بالینی ناتوان کننده‌ی بیماری MS شناسایی شده است. شایع‌ترین

\*نویسنده مسئول: شیوا خضری، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. تلفن: ۰۴۴۳۲۷۵۲۷۴۱  
Email: sh.khezri@urmia.ac.ir

استرس اکسیداتیو (گلوکوتیون پر اکسیداز - کاتالاز) بعد از القای دمیلیناسیون در قشر مخچه توسط اتیدیوم بروماید است.

### مواد و روش‌ها

استروژن مورد استفاده در این مطالعه (استرادیول بنزوات) از شرکت Merck آلمان و روغن کنجد از شرکت باریج اسانس تهیه گردید. در مطالعه‌ی حاضر تعداد ۴۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با محدوده وزنی ( $20 \pm 210$ ) گرم، از حیوان خانه دانشگاه آزاد تبریز خریداری شد و به آزمایشگاه انتقال یافت. حیوانات تحت شرایط استاندارد آزمایشگاهی در دمای ۲۰ تا ۲۲ درجه سانتیگراد و با دسترسی آزاد به آب و غذای کافی در شرایط مراقبتی یکسان با سیکل ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی مورد مطالعه قرار گرفتند. قبل از شروع آزمایش حیوانات به مدت ۲ هفته برای رفع حالت اضطراب در محیط آزمایشگاه نگهداری شدند. کلیه آزمایش‌ها روی حیوانات با رعایت اصول اخلاقی و ثبت شده بین المللی کار با حیوانات آزمایشگاهی و مطابق با راهنمای انستیتوی ملی سلامت انجام شد.

موش‌ها به طور تصادفی به شش گروه هفت تایی ذیل تقسیم شدند: I- گروه کنترل سالم، II- گروه شاهد (سالین)، III- گروه اتیدیوم بروماید (۰/۰۱٪)، IV- گروه روغن کنجد (حلال استروژن)، V- گروه اتیدیوم بروماید (۰/۰۱٪) + استروژن با دوز  $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ، VI- گروه اتیدیوم بروماید (۰/۰۱٪) + استروژن با دوز  $4 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ .

موش‌ها به صورت داخل صفاقی با کتامین ( $100 \text{ mg/kg}$ ) و زایلازین ( $5 \text{ mg/kg}$ ) بیهوش شده و در دستگاه استریوتاکس (Stoelting, USA) در موقعیت جمجمه مسطح مستقر شدند. پوست ناحیه سر به حداقل میزان، برش داده شد. پس از کنار زدن بافت‌های پوششی اطراف، نواحی برگما و لامبدا شناسایی شده و بر اساس مختصات ذکر شده در اطلس پاکسینوس ناحیه مربوط به قشر مخچه ( $AP = -9/9$ ،  $ML = \pm 0/4$  و  $DV = 2/5$ ) (۱۳) در سطح جمجمه به صورت دوطرفه مشخص گردیده و کانول گذاری انجام شد.

موش‌های صحرایی در گروه‌های II، III، IV، V و VI تحت جراحی قرار گرفتند و به مدت ۷-۵ روز دوره بهبودی را طی

رادیكالهای آزاد تولید شده به دنبال استرس، با آسیب به فسفولیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک، باعث اختلال عصبی و ضایعه سلولی می‌شوند. استرس حاد، با افزایش هیستامین مغز به ویژه در دیانسفال، می‌تواند با آسیب شناسی اضطراب ارتباط داشته باشد. اضطراب، به عنوان آشفتگی روحی یا عاطفی تعریف می‌شود که در پاسخ به اثرات عوامل زیان آور خارجی و همچنین محرک یا موقعیت ایجادکننده آن رخ می‌دهد. یکی از ویژگی‌های بیماری MS التهاب سیستم اعصاب مرکزی می‌باشد که آن نیز به نوبه‌ی خود تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را تسهیل می‌کند. مطالعات مختلف بیان می‌کنند که تولید ROS با اختلال در قشر مخچه در بیماران MS و مدل‌های تجربی MS در ارتباط می‌باشد (۴).

استرس اکسیداتیو سبب القای آسیب اکسیداتیو در سلول‌های مغزی، قشر مخچه و سلول‌های پورکنژ می‌گردد، از آنجایی که سلول‌های مغزی مصرف اکسیژن بالایی دارند و غشاهای نورونی سیستم اعصاب مرکزی غنی از پلیمرهای اسید چرب غیراشباع می‌باشند، هدف بالقوه برای پروکسیداسیون لیپیدی می‌باشند. تجمع محصولات نهایی پروکسیداسیون لیپیدی نیز می‌تواند در نقایص شناختی دخیل باشد (۵).

اتیدیوم بروماید (EB) به منظور القای دمیلیناسیون سمی در جوندگان مورد استفاده قرار می‌گیرد. تزریق موضعی EB به سیستم اعصاب مرکزی (CNS)، اولیگودندروسیت‌ها و آستروسیت‌ها را به طور انتخابی از بین می‌برد و دمیلیناسیون کانونی در CNS را القا می‌کند. همچنین مطالعات مختلفی بیان می‌کنند که تزریق مستقیم EB به مغز حیوانات آزمایشگاهی منجر به افزایش بار اکسیداتیو می‌باشد (۶).

شواهد پژوهشی نشان می‌دهند که استروژن در مغز در شرایط طبیعی ساخته و رها می‌شود. استروژن ساخته شده در مغز ممکن است در حفظ تون اتونومیک مغزی نقش بارزی ایفا کند. استروژن در سیستم اعصاب مرکزی نقش‌های چندگانه‌ای دارد. مشاهده شده زانی که در مراحل پیشرفته بیماری MS قرار دارند، هنگامی که میزان استروژن بالایی دریافت می‌کنند، پیشرفت بیماری سیر نزولی می‌یابد، در واقع استروژن اثر حفاظت عصبی دارد (۷، ۱۲). بنابراین با توجه به اثرات حفاظتی استروژن هدف از این پروژه بررسی تاثیر استروژن بر رفتارهای شبه اضطراب و پارامترهای



(Open Arm Entries: OAE) به عنوان عوامل استاندارد سنجش اضطراب به شکل زیر محاسبه شد:

$$\text{در صد زمان سپری شده در بازوی باز} = 100 \times \frac{\text{زمان ماندن در بازوی باز}}{\text{زمان ماندن در بازوی باز و بسته}}$$

$$\text{در صد ورود به بازوی باز} = 100 \times \frac{\text{تعداد ورود به بازوی باز}}{\text{تعداد ورود به باز و بسته}} \quad (15)$$

(سنجش ماز مرتفع بعلاوه شکل همیشه در فاصله قبل از ظهر انجام می‌گرفت). به دلیل این که تفاوت معنی داری در درصد زمان سپری شده در بازوی باز و درصد ورود به بازوی باز بین گروه‌های کنترل سالم، شاهد (سالین) و روغن کنجد (حلال استروژن) مشاهده نشد، میانگین داده‌های آن‌ها به عنوان گروه کنترل در نتایج وارد شد.

جهت اندازه‌گیری پارامترهای استرس اکسیداتیو آنزیم‌های گلوکوتاتیون پراکسیداز (GPx) و کاتالاز مورد ارزیابی قرار گرفتند. فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز (GPx) توسط کیت Ransel اندازه‌گیری شد. گلوکوتاتیون پراکسیداز، اکسیداسیون گلوکوتاتیون توسط کومن هیدروپروکسید را کاتالیز می‌کند. فعالیت GPx در سوپرناتانت در طول موج ۳۴۰ نانومتر و در ۳۷ °C توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شده و با استفاده از واحد (GPx U/L of Sample) تعیین گردید. مقادیر GPx بر حسب U/mg پروتئین بیان شده است (۱۶).

فعالیت کاتالاز بر اساس توانایی آن در تجزیه‌ی H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> تعیین گردید. تجزیه‌ی H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> با کاهش جذب در طیف جذبی ۲۴۰ نانومتر قابل بررسی است. محلول سنجش محتوی ۳ میلی‌لیتر بافر سیترات-فسفات-بورات (مولار ۰/۱، pH= ۷)، ۲۶ میکرولیتر هیدروژن پراکسید (۱۱/۸ mM) و ۵۰ میکرولیتر از عصاره (محلول هموژنات مخچه) بود. هر واحد از فعالیت کاتالاز نشان-دهنده‌ی یک میکرومول از هیدروژن پراکسید تجزیه شده در هر دقیقه می‌باشد. فعالیت آنزیم کاتالاز بر حسب μmol/mg protein/min بیان شده است (۱۶).

داده‌های مربوط به درصد ورود به بازوی باز، زمان سپری شده در بازوی باز و پارامترهای استرس اکسیداتیو به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین (Mean ± S.E.M) ارائه گردید و برای مقایسه‌ی داده‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA)،

نمودند. ریزتزریق داروها با استفاده از سرنگ همیلتون ۱۰ μl انجام گرفت. برای القای مدل تجربی MS، سم اتیدیوم بروماید به صورت تک دوز (محلول ۰/۰۱٪ اتیدیوم بروماید در سالین ۰/۰۹٪ استریل) و در حجم ۳ میکرولیتر و با سرعت ۱ میکرولیتر در دقیقه به صورت دو طرفه به قشر مخچه تزریق شد. موش‌های صحرایی گروه‌های تیمار با استروژن، یک هفته بعد از القای مدل تجربی MS، استروژن را در دو دوز ۲ μg/1μl و ۴ μg/1μl به مدت ۳ روز و به صورت ریزتزریق از طریق قشر مخچه دریافت نمودند. (تمامی تزریق‌ها در فاصله قبل از ظهر انجام گرفت). جهت ارزیابی اثر دمیلیناسیون القاء شده توسط اتیدیوم بروماید و نیز اثرات حفاظتی استروژن بر اضطراب، روش ماز مرتفع بعلاوه شکل مورد استفاده قرار گرفت. (تست اضطراب یک روز پس از اتمام تزریق‌ها سنجش شد). این ارزیابی براساس مدلی که توسط Pellow و همکاران برای اولین بار ارائه شد، صورت گرفت (۱۴). این مدل آزمون اضطراب با توجه به غیرشرطی بودن نیازی به آموزش و یادگیری حیوان ندارد.

ماز مرتفع بعلاوه شکل از جنس چوب و دارای چهار بازو به شکل علامت به علاوه (+) است. ابعاد بازو بسته ۴۰×۷ است که در دو طرف و انتهای بازوی بسته دیوارهایی به بلندی ۱۰ سانتی متر قرار دارد. برای جلوگیری از سقوط موش‌های صحرایی، در دو طرف و انتهای بازوی باز لبه‌هایی به ارتفاع یک سانتی متر از جنس شیشه تعبیه شده است. ماز به وسیله‌ی پایه‌هایی در ارتفاع ۴۰ سانتی متر از سطح زمین قرار می‌گیرد. موش‌ها درون محدوده‌ی مرکزی و رو به یک بازوی باز قرار می‌گیرند. نور مناسب به وسیله‌ی یک لامپ ۱۰۰ واتی که در ارتفاع ۱۲۰ سانتی متری از مرکز ماز قرار دارد، تامین می‌شود.

در مدت پنج دقیقه‌ای که حیوان آزادانه در قسمت‌های مختلف ماز حرکت می‌کند، چهار پارامتر به روش مشاهده اندازه‌گیری می‌شود: تعداد دفعاتی که حیوان وارد بازوی باز می‌شود، تعداد دفعاتی که حیوان وارد بازوی بسته می‌شود، مدت زمانی که حیوان در بازوی باز می‌ماند و مدت زمانی که حیوان در بازوی بسته می‌ماند. مدت زمان ماندن در هر بازو نیز بر همین اساس محاسبه می‌شود. برای هر حیوان درصد زمان سپری شده در بازوی باز (% Open Arm Time: OAT)، درصد ورود به بازوی باز:

بروماید افزایش معنی داری در زمان سپری شدن در بازوی باز داشتند ( $P < 0.01$ ) که نشان دهنده کاهش اضطراب در گروه دریافت کننده استروژن می باشد (نمودار ۱).

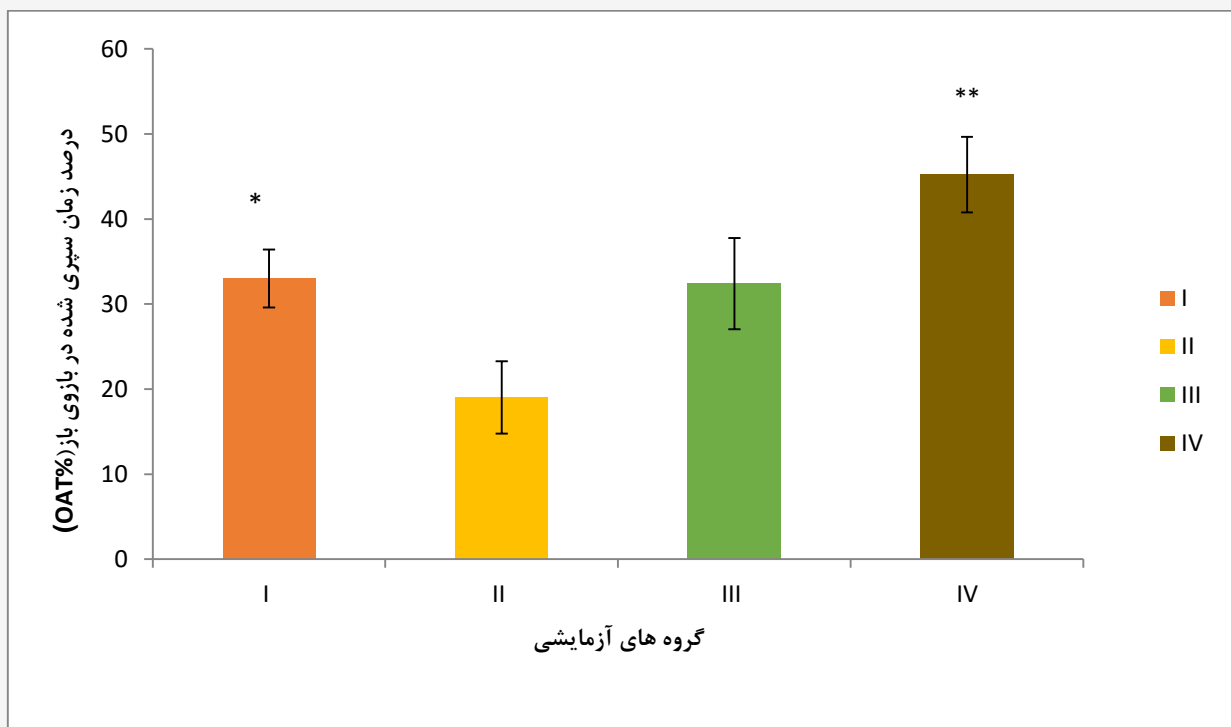
درصد ورود به بازوی باز در نمودار ۲ نمایش داده شده است. تجزیه و تحلیل آماری نشان داد درصد ورود به بازوی باز در گروه کنترل و استروژن دوز  $4\mu\text{g}/1\mu\text{l}$  و ۲ نسبت به گروه اتیدیوم بروماید معنی دار بود ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). افزایش ورود به بازوی باز و مدت زمان سپری شده در آن،

و سپس آزمون تعقیبی (Tukey) Post\_hoc استفاده شد و ( $0.05$ )  $P <$  معنی دار در نظر گرفته شد.

## نتایج

### ۱- نتایج اضطراب

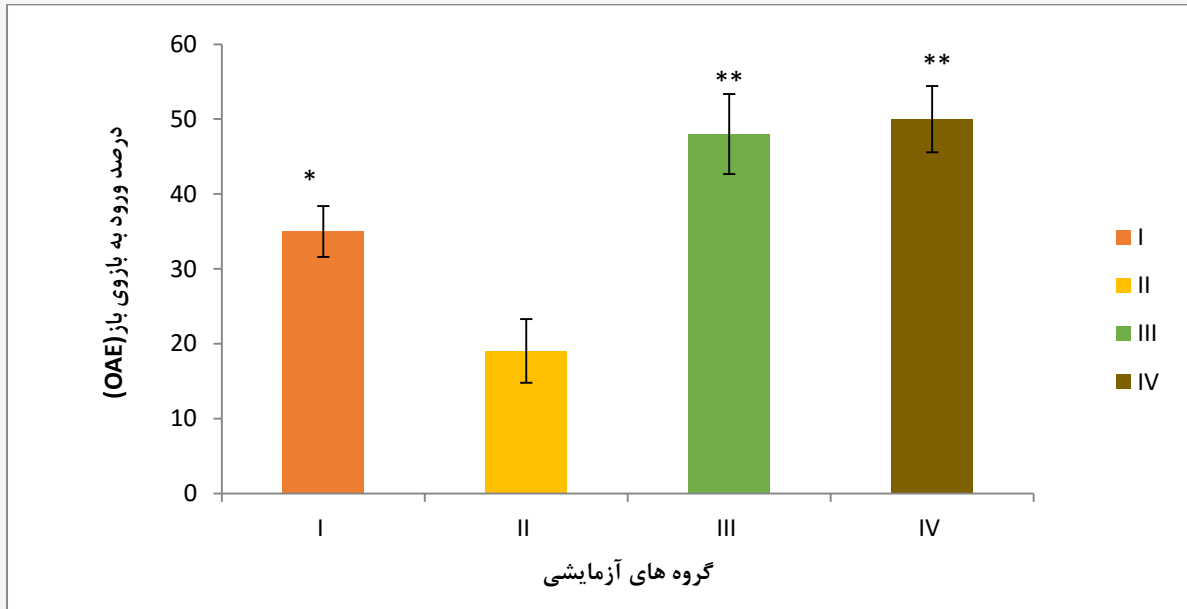
برای بررسی فرآیند اضطراب در طی روزهای آزمایش، درصد زمان سپری شده در بازوی باز و درصد ورود به بازوی باز، پس از پایان دوره آزمایشها انجام گرفت. تجزیه و تحلیل آماری نشان



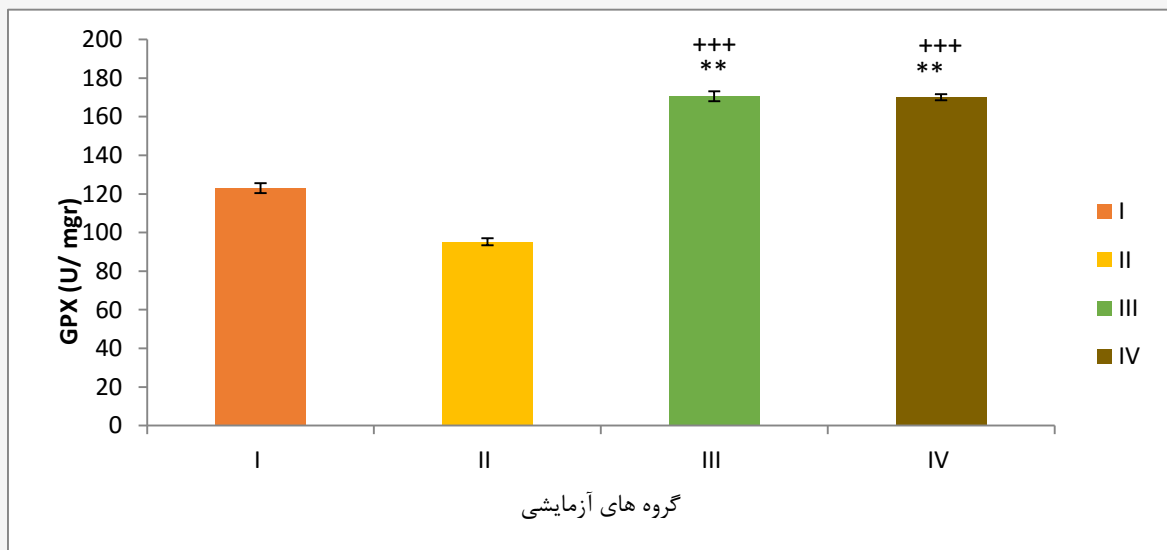
**نمودار ۱-** مقایسه‌ی درصد زمان سپری شده در بازوی باز بین موش‌های صحرایی دمیلینه شده با اتیدیوم بروماید و موش‌های دمیلینه شده‌ای که تحت تیمار با استروژن قرار گرفته‌اند. گروه‌ها: I (کنترل)، II (اتیدیوم بروماید + سالین)، III (گروه اتیدیوم بروماید + استروژن با دوز  $2\mu\text{g}/1\mu\text{l}$ ، IV (گروه اتیدیوم بروماید + استروژن با دوز  $4\mu\text{g}/1\mu\text{l}$ ). نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین بیان شده است (در هر گروه،  $n=7$ ). \* و \*\* اختلاف معنی دار نسبت به گروه دریافت کننده اتیدیوم بروماید).

شاخص کاهش اضطراب در موش تلقی می‌شود. این یافته‌ها نشان می‌دهند که اختلالاتی که با ریز تزریق سم اتیدیوم بروماید ایجاد شده است، توسط تیمار با استروژن و به صورت وابسته به دوز بهبود یافته است.

داد که مدت زمان سپری شده در بازوی باز توسط گروهی که اتیدیوم دریافت کرده بودند نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ( $P < 0.05$ ). همچنین نتایج ما نشان داد رت‌هایی که  $4\mu\text{g}/1\mu\text{l}$  استروژن دریافت کرده بودند، نسبت به رت‌های گروه اتیدیوم



**نمودار ۲-** مقایسه‌ی درصد ورود به بازوی باز بین موش‌های صحرائی دمیلینه شده با اتیدیوم بروماید و موش‌های دمیلینه شده‌ای که تحت تیمار با استروژن قرار گرفته‌اند. گروه‌ها: I (کنترل)، II (اتیدیوم بروماید + سالین)، III (گروه اتیدیوم بروماید + استروژن با دوز ۱μg/2)، IV (گروه اتیدیوم بروماید + استروژن با دوز ۱μg/۴). نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین بیان شده است (\* و \*\* اختلاف معنی دار نسبت به گروه اتیدیوم بروماید) (در هر گروه، n=۷).



**نمودار ۳:** مقایسه‌ی نتایج سنجش فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز، موش‌های صحرائی دمیلینه شده با اتیدیوم بروماید و موش‌های دمیلینه شده‌ای که تحت تیمار با استروژن قرار گرفته‌اند. گروه‌ها: I (کنترل)، II (اتیدیوم بروماید + سالین)، III (گروه اتیدیوم بروماید + استروژن با دوز ۱μg/2)، IV (گروه اتیدیوم بروماید + استروژن با دوز ۱μg/۴). نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین بیان شده است (در هر گروه، n=۷). (\*\*): اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل و (+++): اختلاف معنی دار نسبت به گروه اتیدیوم بروماید).

## ۲- نتایج سنجش پارامترهای استرس اکسیداتیو گلووتاتیون پر اکسیداز (GPX):

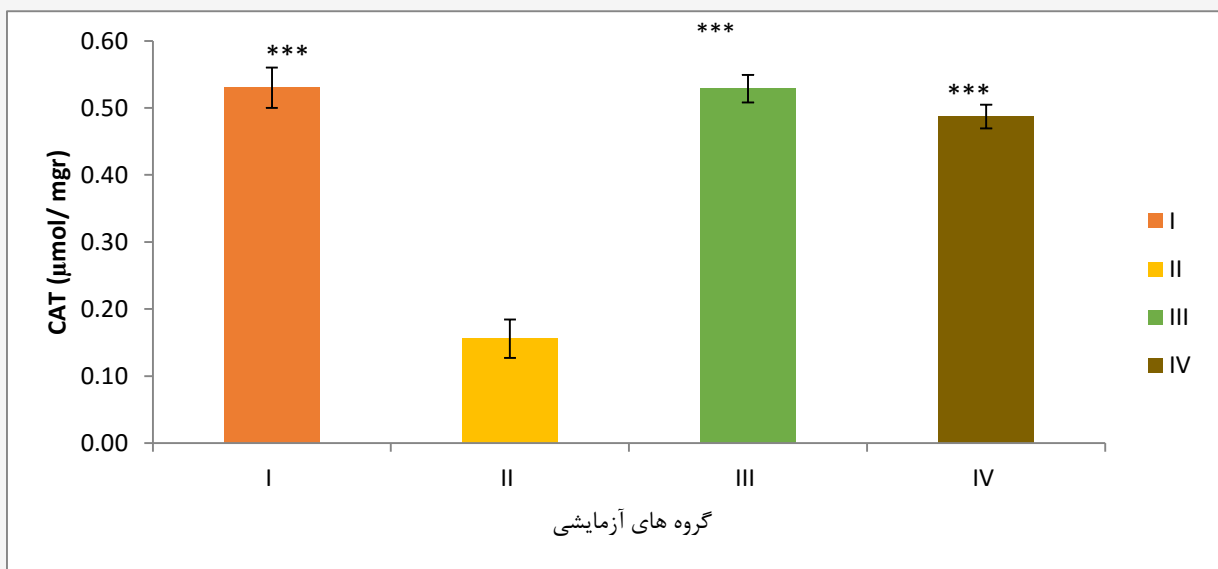
با توجه به آنالیز داده‌های فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی (نمودار ۳)، مقادیر آنزیم گلووتاتیون پر اکسیداز بین گروه کنترل و استروژن دوز  $2 \mu\text{g}/1 \mu\text{l}$  و  $4 \mu\text{g}/1 \mu\text{l}$  معنی دار بود ( $P < 0.01$ )، همچنین اختلاف معنی داری بین گروه اتیدیوم بروماید و گروه دریافت کننده استروژن مشاهده شد ( $P < 0.001$ ).

## کاتالاز (CAT)

با توجه به آنالیز داده‌های فعالیت آنزیم کاتالاز، مقادیر CAT گروه کنترل و استروژن دوز  $2 \mu\text{g}/1 \mu\text{l}$  و  $4 \mu\text{g}/1 \mu\text{l}$  نسبت به گروه اتیدیوم بروماید معنی دار بود ( $P < 0.001$ ) (نمودار ۴).

با استفاده از این مدل، تحقیق حاضر نشان داد که تزریق تک دوز محلول  $0.1/0.1\%$  اتیدیوم بروماید به صورت مستقیم به قشر مخچه باعث پدیدار شدن اختلالات حرکتی می‌شود. اتیدیوم بروماید ترکیبی است که به عنوان یک ماده‌ی دمیلینه کننده برای شبیه سازی فرایند پاتوفیزیولوژیک بیماری‌های دمیلینه کننده نظیر MS کاربرد دارد. به نظر می‌رسد اثرات منفی ریزتزریق اتیدیوم بروماید بر اضطراب از طریق افزایش بار اکسیداتیو واسطه-گری می‌شود، که صدمات جبران‌ناپذیری را به مغز و سلول‌های عصبی وارد می‌کند.

نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از پیش تیمار استروژن با دوز  $4 \mu\text{g}/1 \mu\text{l}$  و  $2 \mu\text{g}/1 \mu\text{l}$  اثر ضد اضطرابی اعمال می‌کند، پیشنهاد شده است که اثر استروژن بر روی اضطراب، به دلیل فعالیت آنتی



نمودار ۴: مقایسه‌ی نتایج سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز موش‌های صحرایی دمیلینه شده با اتیدیوم بروماید و موش‌های دمیلینه شده‌ای که تحت تیمار با استروژن قرار گرفته‌اند. گروه‌ها: I (کنترل)، II (اتیدیوم بروماید + سالین)، III (گروه اتیدیوم بروماید + استروژن با دوز  $2 \mu\text{g}/1 \mu\text{l}$ )، IV (گروه اتیدیوم بروماید + استروژن با دوز  $4 \mu\text{g}/1 \mu\text{l}$ ). نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین بیان شده است (در هر گروه،  $n=7$ ). (\*\*\*) اختلاف معنی دار نسبت به گروه اتیدیوم بروماید).

## بحث و نتیجه‌گیری

در بررسی حاضر تأثیر تزریق گلیوتوکسین اتیدیوم بروماید به قشر مخچه و نیز تأثیر ریزتزریق کوتاه مدت استروژن به قشر مخچه با دو دوز متفاوت، بر روی اضطراب و استرس اکسیداتیو نمونه‌های تجربی MS مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت.

اکسیدانی ترکیبات فعال آن می‌باشد. در تحقیقات نشان داده شده است که استرس بی حرکتی حاد، سبب ایجاد تغییرات تخریبی فراساختاری در سلول‌های قشری کریمینه مخچه موش‌های صحرایی شده و در نتیجه سبب کاهش در اندازه سلول‌ها در کورتکس کریمینه مخچه می‌شود، همچنین



تنظیم کننده عوامل نورو پروتکتیو است. در زنان سطح بالای دوز پلاسمایی استروژن میزان اضطراب را کاهش می‌دهد (۲۱) که با نتایج بررسی حاضر همسو می‌باشد.

سیستم سروتونرژیک نقش بسیار مهمی در اختلال‌های عصبی، اضطراب و افسردگی بازی می‌نماید. اخیراً دریافته‌اند که کاهش سطح گیرنده‌های HT1A-5 باعث افزایش اضطراب می‌گردد. در میان تمام گیرنده‌های سروتونین HT1A-5، نقش مهمی را در ایجاد اضطراب دارند و این حقیقت که برخی آگونیست‌های گیرنده دارای خاصیت ضد اضطرابی هستند، از این موضوع حمایت می‌کند (۲۱). استروژن آگونیست سروتونین می‌باشد که بر روی عملکرد استروژنی در هسته رافه میانی و تنظیم فعالیت نورون‌های سروتونرژیک مؤثر است و بر روی اضطراب با تغییر در عملکرد HT1A-5 اثر می‌گذارد و آگونیست گیرنده می‌تواند اثرات اضطرابی و یا ضداضطرابی داشته باشد (۲۲).

در بخش دیگری از مطالعه‌ی حاضر به بررسی اثر تزریق داخل قشر مخچه‌ای اتیدیوم بروماید و استروژن بر روی پارامترهای استرس اکسیداتیو پرداخته شد. عوامل اصلی اکسیداسیون، رادیکال‌های آزاد هستند. این مولکول‌های فعال قادر به واکنش سریع با بیومولکول‌ها بوده در نتیجه موادی تولید می‌گردد که نه تنها کارکرد اولیه خود را از دست می‌دهند بلکه باعث بروز اختلالاتی در سیستم بیولوژیکی بدن می‌شوند. در بررسی حاضر نیز به نظر می‌رسد تزریق مستقیم سم اتیدیوم بروماید به مخچه، با القای استرس اکسیداتیو منجر به کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز در نتیجه کاهش فعالیت کل آنتی اکسیدانی می‌شود. از طرفی تحقیق بیان کننده‌ی افزایش فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز در گروه‌های استروژن با دوزهای متفاوت می‌باشد. در واقع می‌توان چنین بیان نمود که اختلاف معنی داری بین فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز بین گروه‌های دریافت کننده استروژن و اتیدیوم بروماید وجود دارد. اثر آنتی اکسیدانی استروژن ممکن است به علت دادن اتم هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و غیر فعال کردن آن‌ها باشد. مکانیسم احتمالی دیگر که در مدل آزمایشگاهی موش‌های مبتلا به ایسکمی مشاهده شد، ممکن است به افزایش سطح آنزیم‌های آنتی اکسیدان مربوط شود (۸).

این مطالعه نشان داد که استرس بی حرکتی مزمن، سبب کاهش معنی دار در اندازه سلول‌های قشری کرمینه مخچه می‌شود و کاهش اندازه سلول‌ها، می‌تواند ناشی از کاهش فعالیت‌های متابولیکی سلول به دنبال استرس باشد (۱۸).

در مطالعه‌ی حاضر درصد زمان سپری شده در بازوی باز و ورود به بازوی باز که به عنوان شاخص اضطراب تلقی می‌شود در گروه بیمار که مخچه آن‌ها با اتیدیوم بروماید دمیلینه شده و گروه تحت درمان با استروژن، بررسی شدند. نتایج تحقیق نشان داد که در شاخص‌های ذکر شده اختلاف معنی داری بین گروه‌های آزمایشی استروژن و گروه اتیدیوم بروماید مشاهده می‌شود و نشان دهنده‌ی کاهش اضطراب در گروه‌های تحت درمان با استروژن است (نمودار ۱ و ۲). از طرفی در نتایج تحقیق صوفی آبادی و همکاران نشان داده شد که تجویز حاد استرادیول موجب کاهش ورود حیوانات به بازوی باز و مدت سپری در آن می‌شود که بیان‌گر افزایش اضطراب می‌باشد و بر عکس نتایج حاصل از تحقیقات ما می‌باشد. تفاوت در جنس و گونه حیوانات مورد بررسی، حجم و دوز ماده‌ی سمی تزریقی و مدت زمان آزمایش از جمله علل احتمالی تناقض موجود بین نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعات فوق الذکر می‌باشد (۱۹).

از آنجایی که بیماران مبتلا به MS در معرض اضطراب بیشتری نسبت به افراد سالم هستند و همان طور که ذکر شد، اضطراب باعث آسیب به سلول‌های مخچه‌ای می‌شود، در نتیجه‌ی آتروفی مخچه و از دست دادن سلول‌های پورکنژ و در نتیجه عدم تعادل در این بیماران مشهود است. از طرفی در مطالعه‌ی دیگر بیان شده در موش‌هایی که در معرض تیمار با استروژن قرار گرفتند به علت اثرات نروپروتکتیو هر دو گیرنده استروژن، سلول‌های پورکنژ مورد حفاظت عصبی قرار گرفته و این امر باعث ممانعت از آتروفی مخچه می‌شود که موافق با یافته‌های ماست (۲۰).

نقش هورمون‌های استروئیدی به ویژه استروژن بر اضطراب نشان می‌دهد که تغییرات سطح هورمون‌های تخمدانی در طول سیکل ماهیانه، تاثیر معنی داری بر سطح اضطراب می‌گذارد. فعالیت ژنومی استروژن به وسیله‌ی دو گیرنده درون سلولی به نام ER $\alpha$  و ER $\beta$  انجام می‌شود. فعالیت گیرنده  $\beta$  باعث کاهش اضطراب در گونه‌های مختلف می‌شود. در واقع گیرنده ER $\beta$



اختلالات رفتاری به طور مستقیم با میزان ROS در مغز مدل‌های تجربی MS در ارتباط می‌باشد (۲۴).

نتایج تحقیقات نشان می‌دهند که استرس اکسیداتیو نقش مهمی در پیشبرد مدل‌های تجربی MS ایفا می‌کند و ثابت شده است که درمان با استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها روش درمانی مؤثری در مدل‌های تجربی MS می‌باشد (۲۵).

به طور خلاصه می‌توان عنوان کرد که ریزتزریق کوتاه مدت استروژن می‌تواند، اختلالات القاء شده توسط سم اتیدیوم بروماید در مخچه‌ی مدل‌های تجربی MS را بهبود بخشد. همچنین یافته‌های مطالعه‌ی حاضر پیشنهاد می‌کنند که استروژن به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی می‌تواند استرس اکسیداتیو در نورون‌ها را مهار کند و در درمان اختلالات تحلیل‌برنده‌ی مغزی نظیر MS مفید باشد. تعیین مکانیسم‌های دقیقی که اثرات فوق را به وجود می‌آورد نیازمند بررسی‌های تکمیلی است.

### تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی را اعلام نکرده‌اند.

بر اساس نتایج عبدالسلام و همکاران در سال ۲۰۱۱، تزریق موضعی اتیدیوم بروماید با دوز ۱٪ و حجم ۱۰۰µl به داخل مخزن پل مغزی با کاهش معنی‌دار ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی و افزایش معنی‌دار محصولات پروکسیداسیون لیپیدی، MDA، همراه می‌شود که نشان دهنده‌ی افزایش استرس اکسیداتیو در بافت مغزی، توسط این سم می‌باشد، که همسو با نتایج این تحقیق می‌باشد به طوری که تزریق اتیدیوم بروماید باعث کاهش سطح آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز شد (۲۳).

مطالعات اخیر پیشنهاد می‌کنند که استرس اکسیداتیو نقش مهمی در اتیولوژی MS ایفا کرده و به طور مستقیم در آسیب CNS دخالت دارد. رادیکال‌های آزاد به طور انبوه توسط ماکروفاژها و میکروگلیاهای فعال شده در MS تولید می‌شوند، که به نظر می‌رسد از جمله عوامل مهم دخیل در آسیب بافتی در این بیماری باشند. یافته‌های مطالعات قبلی به روشنی نشان می‌دهند که التهاب سیستم اعصاب مرکزی نقش مهمی را در ایجاد اضطراب در مدل‌های تجربی MS ایفا می‌کند اختلال پیشرونده در

### References

1. McQualter JL, Bernard CC. Multiple sclerosis: a battle between destruction and repair. *J Neurochem.* 2007; 100(2):295-306.
2. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol.* 2005; 23: 683-747.
3. Gilmore CP, Donaldson I, Bo L, Owens T, Lowe J, Evangelou N. Regional variations in the extent and pattern of grey matter demyelination in multiple sclerosis: a comparison between the cerebral cortex, cerebellar cortex, deep grey matter nuclei and the spinal cord. *J NeurolNeurosurg Psychiatry.* 2009; 80(2): 182-187.
4. Covarrubias L, Hernández-García D, Schnabel D, Salas-Vidal E, Castro-Obregón, S. Function of reactive oxygen species during animal development: passive or active? *Develop Biol.* 2008; 320(1): 1-11.
5. Brown R, Tennant C, Dunn S, Pollard J. A review of stress-relapse interactions in multiple sclerosis: important features and stress-mediating and -moderating variables. *MultScler.* 2005; 11: 477-484.
6. Bondan E, Lallo M, Sinhorini I, Pereira L, Graça D. The effect of cyclophosphamide on brainstem remyelination following local ethidium bromide injection in Wistar rats. *J SubmicroscCytolPathol.* 2000; 32(4): 603-612.
7. Kii N, Adachi N, Liuk, Arai T. Acute effects of 17 beta-estradiol on oxidative stress in ischemic rat striatum. *J NeurosurgAnesthesiol.* 2005; 17(1): 27-32.
8. Ozacmak VH, Sayan H. The effects of 17-β estradiol, 17-α estradiol and progesterone on oxidative Stress biomarkers in ovariectomized female rat brain subjected to global cerebral ischemia. *Physiol Res.* 2009; 58: 909-912.
9. Kim S, Liva SM, Dalal MA, Verity MA, Voskuhl RR. Estriol ameliorates autoimmune demyelinating disease: implications for multiple sclerosis. *Neurol.* 1999; 52(6):1230-1238.
10. Zhao L, Wu TW, Brinton RD. Estrogen receptor subtypes alpha and beta contribute to neuroprotection and increased Bcl-2 expression in primary hippocampal neurons. *Brain Res.* 2004; 1010(1-2): 22-34.
11. Sierra A, Azcoitia I, Garcia-Segura L. Endogenous estrogen formation is neuroprotective in model of cerebellar ataxia. *Endocrine.* 2003; 21(1); 43-51.





12. Hoffman GE, Merchenthaler I, Zup SL. Neuroprotection by ovarian hormones in animal models of neurological disease. *Endocrine*. 2006; 29(2): 217–31.
13. Paxinos G, Watson C. 1986. The rat brain in stereotaxic coordinates, 2nd ed. Academic Press, Sydney, Australia.
14. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. 1985;14(3):149-67.
15. Silveira MC, Sandner G, Graeff FG. Induction of Fosimmunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. *Behav Brain Res*. 1993;56(1):115–118.
16. Takeuchi T, Nakamura S, Kayasuga A, Isa S, Sato K. Multiple elements for negative regulation of the rat catalase gene expression in dedifferentiated hepatoma cells. *J Biochem*. 2000;128(6):1025–1031.
17. Kutzelnigg A, Faber-Rod JC, Bauer J, Lucchinetti CF, Sorensen PS, Laursen H, et al. Widespread demyelination in the cerebellar cortex in multiple sclerosis. *Brain Pathol*. 2007; 17(1): 38–44.
18. Hutchison JB, Steimer T. Androgen Increases Formation of Behaviorally Effective Estrogen in Dove Brain. *Endocrinol*. 1986;118(6): 2180-7.
19. Sophiabadi M, Sadeghipour HR, Shabanzadeh AR, Zarindast MR, Dehpour AR. Possible involvement of nitric oxide (NO) in anxiety-like behavior induced by female steroid hormones. *J Sem uni med sci*. 2001; 2 (3,4): 177-183.
20. Liu HB, Loo KK, Palaszynski K, Ashouri J, Lubahn DB, Voskuhl RR. Estrogen receptor alpha mediates estrogen's immune protection in autoimmune disease. *J Immunol*. 2003; 171(12): 6936-6940.
21. Jakab RL, Wong JK, Belcher SM. Estrogen receptor beta immunoreactivity in differentiating cells of the developing rat cerebellum. *J Comp Neurol*. 2001;430(3):396–409.
22. Harada K, Aota M, Inoue T, Matsuda R, Mihara T, Yamaji T, et al. Anxiolytic activity of a novel potent serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor antagonist FR260010: a comparison with diazepam and buspirone. *Eur J Pharmacol*. 2006; 553(1-3):171–184.
23. Abdel-Salam OME, Khadrawy YA, Mohammed NA, Youness E, Agarwal A, Saleh R, et al. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *FertilSteril*. 2003; 79(4): 829-843.
24. Nguyen C, Bérezné A, Baubet T, Mestre-Stanislas C, Rannou F, Papelard A, et al. Association of gender with clinical expression, quality of life, disability, and depression and anxiety in patients with systemic sclerosis. *PLoS One*. 2011;6(3): 1-7.
25. Mirshafiey A, Mohsenzadegan M. Antioxidant therapy in multiple sclerosis. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2009; 31(1):13-29.



Original Article

## The Effects of Intracerebellum Injection of Estrogen on Anxiety-like Behavior and Parameters of Antioxidant System following Ethidium Bromide Injection in Rat

Nejati F<sup>1</sup>, Khezri SH<sup>1\*</sup>, Hatami H<sup>2</sup>, Ali Hemmati AR<sup>3</sup>

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

2- Department of Animal Biology, Faculty of Natural Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

3- Department of Anatomy and Histology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Science, Tabriz, Iran.

Received: 16 Nov 2014

Accepted: 03 Mar 2015

### Abstract

**Background & Objectives:** Demyelination by Ethidium bromide is one of the ways that is usually used for preparing experimental models of MS. Treatment with estrogen protects oligodendrocytes from cell poisoning and stops lipidic peroxidation. The aim of this study is the evaluation of the effects of estrogen on anxiety like behavior and stress oxidative parameters after inducing demyelination by ethidium bromide to the cortex of cerebellum in rats.

**Materials & Methods:** Induction of demyelination was carried out in cerebellum cortex by direct injection of Ethidium Bromide (EB) (0.01%). One week after injection of EB, animals were treated with two doses of estrogen (2µg/µl and 4µg/µl) for 3 days. After the treatment stage, characteristics of anxiety were assessed by using Elevated plus Maze; moreover, the parameters of stress oxidative were evaluated. One-way Analysis of Variance (ANOVA) was performed.

**Results:** The results of this study showed that Open Arm Entry percentage and open arm time (anxiety index) in rats with estrogen treatment was significant relative to Ethidium Bromide group ( $p < 0.01$ ); in addition, activity value of glutathione peroxidase and catalase showed significant increase compared to Ethidium Bromide group.

**Conclusion:** Microinjection of estrogen can decrease anxiety as well as oxidative stress.

**Keywords:** Ethidium Bromide, Estrogen, Anxiety, Cerebellum, Oxidative stress, Rat

\*Corresponding author: Shiva Khezri, Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran.

Tel: +98 4432752741

Email: sh.khezri@urmia.ac.ir