

## تعدیل استرس اکسیداتیو هیپوکامپ ناشی از ۱۷-بتا استرادیول در مدل مالتیپل اسکلروزیس القا شده با اتیدیوم بروماید در موش صحرایی نر بالغ

علیرضا علی همتی<sup>۱</sup>، حمیرا حاتمی<sup>۲\*</sup>، نازلی خواجه نصیری<sup>۳</sup>

(۱) گروه تشریح و بافت شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

(۲) گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

(۳) گروه علوم جانوری، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱/۱۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۹/۱۳

### چکیده

**مقدمه:** بیماری مالتیپل اسکلروزیس (MS) نوعی بیماری سیستم عصبی مرکزی است که در آن میلین رشته های عصبی تخریب می شوند. استرس اکسیداتیو به عنوان یکی از عوامل دخیل در پاتوژنز بیماری MS شناخته شده است، خاصیت آنتی اکسیدانی ۱۷-بتا استرادیول نیز کاملاً مشخص است. از این رو در این پژوهش اثر ۱۷-بتا استرادیول بر پارامترهای استرس اکسیداتیو در مدل تجربی MS مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش ها:** چهل و نه سر موش صحرایی نر نژاد ویستار پس از کنول گذاری در ناحیه CA1 هیپوکامپ به طور تصادفی به هفت گروه هفت تایی تقسیم شدند: گروه کنترل، گروه شاهد، گروه MS، گروه های دریافت کننده استرادیول، گروه های MS+استرادیول. MS با تزریق داخل هیپوکامپی اتیدیوم بروماید القاء می شود و استرادیول بنزوات به صورت پیش تیمار و به مدت ۵ روز تزریق گردید. بیست و چهار ساعت پس از اتمام دوره آزمایش، میزان پارامترهای استرس اکسیداتیو در این ناحیه با سنجش MDA، محتوای گلوتاتیون و آنزیم های آنتی اکسیدانی (گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتازو کاتالاز) مشخص شد.

**یافته های پژوهش:** ریز تزریق سم اتیدیوم بروماید موجب افزایش معنی دار ظرفیت اکسیدانی و کاهش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی شد ( $P < 0.05$ ). پیش تیمار ۱۷-بتا استرادیول از افزایش ظرفیت اکسیدانی و کاهش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی نشأت گرفته از اتیدیوم بروماید به طور معنی دار ممانعت کرد ( $P < 0.05$ ).

**بحث و نتیجه گیری:** ۱۷-بتا استرادیول به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی احتمالاً از طریق حذف گونه های فعال اکسیژن و پاکسازی بافت از رادیکال های آزاد، از افزایش شاخص های استرس اکسیداتیو در مدل تجربی MS جلوگیری می کند.

**واژه های کلیدی:** مالتیپل اسکلروزیس، اتیدیوم بروماید، ریز تزریق، استرس اکسیداتیو، ۱۷-بتا استرادیول، هیپوکامپ، موش صحرایی

\* نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

Email: Homeirahatami@yahoo.com

Copyright © 2018 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

## مقدمه

بیماری مالتیپل اسکلروزیس (MS) از شایع ترین بیماری های نورولوژیک در انسان است، به طوری که از این بیماری به عنوان شایع ترین عامل ناتوانی در جوانان نام برده می شود (۱). مکانیسم های دخیل در پاتوژنز این بیماری به طور کامل شناخته نشده است، اما التهاب، میلین زدایی، استرس اکسیداتیو و آسیب های اکسونی از جمله عوامل شناخته شده در پاتوفیزیولوژی بیماری MS می باشند (۲). به طوری که افزایش سطوح محصولات ثانویه استرس اکسیداتیو یا کاهش سطوح آنزیم های آنتی اکسیدانی و آنتی اکسیدان های مولکولی کوچک در خون و مایع مغزی-نخاعی در حین فازهای فعال MS دیده شده است (۴). از آن جایی که سیستم اعصاب مرکزی دارای مصرف زیاد اکسیژن، غلظت نسبتاً پایین آنتی اکسیدان های کلاسیک و آنزیم های مربوطه و محتوای بالای لیپیدهای غیراشباع (مولکول های زیستی که بیشتر از همه مستعد اکسیداسیون هستند) می باشد، نسبت به حملات اکسیداتیو بسیار آسیب پذیر می باشد (۳). به عبارت دیگر این عدم تعادل مکانیسم دفاعی آنتی اکسیدانی که به وسیله تولید بیش از اندازه رادیکال های آزاد یا ورود آن ها از محیط به سیستم زنده ایجاد می گردد، منجر به آسیب و متعاقباً تحلیل عصبی می گردند (۴). شایان ذکر است اتیدیوم بروماید به عنوان یک ماده دمیلینه کننده برای شبیه سازی پروسه پاتوفیزیولوژیک بیماری های دمیلینه کننده نظیر MS کاربرد دارد. در واقع، دمیلیناسیون سمی توسط اتیدیوم بروماید که به طور معمول برای بررسی ظرفیت ترمیمی سیستم اعصاب مرکزی کاربرد دارد (۵).

مطالعات متعددی اثرات حفاظت عصبی ۱۷-بتا استرادیول را هم در شرایط *in vitro* و هم شرایط *in vivo* نشان دادند. از این رو ۱۷-بتا استرادیول به عنوان یک در مان مناسب در بیمارهای خودایمنی در نظر گرفته می شود (۶)، علت این امر از بهبود شرایط بالینی بیماران مزبور در دوره بارداری نشأت می گیرد، چرا که بررسی ها نشان دادند که در افراد مبتلا به آرتریت روماتوئید (نوعی بیماری خود ایمن) بهبود علائم بالینی در دوره بارداری مشاهده می شود (۵). هم چنین

نتایج بررسی دیگر که بر روی ۲۵۴ زن باردار مبتلا به بیماری MS صورت گرفته بود، نشان داد که میزان عود بیماری در سه ماهه سوم بارداری ۸۰ درصد کاهش می یابد، به طوری که این میزان کاهش نسبت به درمان بیماران با ایتترفرون بتا بسیار موثرتر می باشد (۷).

با وجود مشخص شدن نقش ۱۷-بتا استرادیول در تقلیل اثرات بیماری MS اما تا کنون مکانیسم مشخصی برای نحوه اعمال اثرات ۱۷-بتا استرادیول به اثبات نرسیده است. ۱۷-بتا استرادیول به علت ساختار فنولی یک آنتی اکسیدان قوی است (۸) به طوری که در دوران یائسگی استرس اکسیداتیو در زنان به شدت افزایش می یابد (۹-۱۱) در ضمن سطح ۱۷-بتا استرادیول در طی چرخه قاعدگی با ظرفیت آنتی اکسیدانی پلازما و بیان آنزیم های آنتی اکسیدانی رابطه مستقیم و با پراکسیداسیون لیپیدی رابطه عکس دارد چرا که درمان جایگزینی ۱۷-بتا استرادیول ظرفیت آنتی اکسیدانی کل پلازما را افزایش و پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش می دهد (۱۲).

با در نظر داشتن این امر که استرس اکسیداتیو یکی از علل اصلی بروز بیماری MS می باشد و در ضمن با عنایت به این مسئله که ۱۷-بتا استرادیول دارای خاصیت آنتی اکسیدانی است، در این بررسی برآنیم تا با مطالعه تاثیرات ریزترزیق ۱۷-بتا استرادیول بر سطوح بافتی آنزیم های آنتی اکسیدانی و نیز پراکسیداسیون لیپیدی در مدل تجربی MS مشخص نماییم که آیا پیش تیمار ۱۷-بتا استرادیول می تواند به عنوان روشی نو در جلوگیری از بروز بیماری MS در نظر گرفته شود یا نه؟

## مواد و روش ها

در این بررسی تجربی، چهل و نه سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با محدوده وزنی (۲۵۰±۵۰) گرم، از حیوان خانه دانشکده دام پزشکی دانشگاه تبریز خریداری شد و به آزمایشگاه فیزیولوژی دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز انتقال یافت. موش ها به مدت دو هفته برای رسیدن به حالت پایه و رفع استرس در شرایط آزمایشگاه نگهداری شدند. محل نگهداری

۷. گروه MS با پیش تیمار استرادیول بنزوات ( $4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ): این گروه پس از انجام جراحی بر روی آن ها و تعبیه کانول در ناحیه CA1 هیپوکامپ به میزان  $4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  استرادیول بنزوات به مدت ۵ روز دریافت کردند و نیم ساعت پس از آخرین تزریق استرادیول، اتیدیوم بروماید برای القاء MS تزریق گردید.

برای انجام عمل جراحی و کانول گذاری حیوانات به وسیله تزریق داخل صفاقی کتامین ( $100 \text{ mg/kg}$ ) و زایلازین ( $5 \text{ mg/kg}$ ) بیهوش شده (۱۳) و سپس سر در موقعیت مجامه صاف تثبیت شد. در ادامه بر اساس مختصات اطلس واتسون و پاکسینوس  $AP = -3/8 \text{ mm}$  از برگما،  $ML = \pm 2/2 \text{ mm}$  از خط وسط و  $DV = -2/7 \text{ mm}$  از سطح مجامه کانول گذاری دو طرفه در ناحیه CA1 صورت پذیرفت. برای القاء مدل تجربی مالتیپل اسکروزیس ۵ الی ۷ روز پس از جراحی اتیدیوم بروماید به صورت محلول ۰/۰۱ درصد، در حجم ۳ میکرولیتر و با سرعت ۱ میکرولیتر در دقیقه به صورت دو طرفه به تشکیلات هیپوکامپ (ناحیه CA1) تزریق شد. موش های صحرایی گروه های پیش تیمار نیز استرادیول به مدت ۵ روز در دو دوز  $4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  و  $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  را به فرم ریز تزریق دریافت نمودند و نیم ساعت پس از آخرین تزریق استرادیول، اتیدیوم بروماید برای القاء MS تزریق گردید.

بیست و چهار ساعت پس از اتمام دوره آزمایش، حیوانات به وسیله تزریق داخل صفاقی کتامین ( $100 \text{ mg/kg}$ ) و زایلازین ( $5 \text{ mg/kg}$ ) بی هوش شده سر توسط گیوتین جدا، بلافاصله مغز و هیپوکامپ خارج گردیده و توسط سالین استریل سرد شست و شو داده شد. هیپوکامپ جدا شده بلافاصله در نیتروژن مایع فریزر گردید. تمامی نمونه ها تا زمان تهیه هموژن در فریزر  $-80^\circ\text{C}$  درجه سانتی گراد نگهداری شدند (۱۵).

بافت های هیپوکامپ از فریزر  $-80^\circ\text{C}$  درجه سانتی گراد خارج شد و به منظور تهیه هموژن روی هر یک از آن ها محلول سرد  $1/15 \text{ KCL}$  درصد با نسبت ( $1:10 \text{ w/v}$ ) اضافه گردید. سپس با استفاده از هموژنایزر مکانیکی هموژن بافت های هیپوکامپ تهیه

حیوانات دارای دوره روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعته و دمای  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  درجه سانتی گراد بود. آب و غذا به اندازه کافی در اختیار آن ها قرار داشت. آزمایشات با تاییدیه کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و با توجه به راهنمای استفاده و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی منتشر شده توسط انستیتوی ملی سلامت ایالات متحده آمریکا (No. 23-80 Publications NIH. 1996 revised) انجام پذیرفت.

موش ها به طور تصادفی به هفت گروه هفت تایی تقسیم شدند:

۱. گروه کنترل: که بر روی این گروه هیچ گونه پیش تیماری اعمال نگردید.

۲. گروه شاهد: این گروه پس از انجام جراحی بر روی آن ها و تعبیه کانول در ناحیه CA1 هیپوکامپ روغن کنجد به عنوان حلال استرادیول بنزوات (سیگما-انگلیس) را به مدت ۵ روز دریافت کردند.

۳. گروه MS: این گروه پس از انجام جراحی بر روی آن ها و تعبیه کانول در ناحیه CA1 هیپوکامپ تک دوز اتیدیوم بروماید (سیگما-انگلیس) به میزان  $3 \mu\text{l}$  (از محلول اتیدیوم بروماید ۰/۰۱ درصد) دریافت کردند (۱۳).

۴. گروه دریافت کننده استرادیول بنزوات ( $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ): این گروه پس از انجام جراحی بر روی آن ها و تعبیه کانول در ناحیه CA1 هیپوکامپ به میزان  $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  استرادیول بنزوات به مدت ۵ روز دریافت کردند (۱۴).

۵. گروه دریافت کننده استرادیول بنزوات ( $4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ): این گروه پس از انجام جراحی بر روی آن ها و تعبیه کانول در ناحیه CA1 هیپوکامپ به میزان  $4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  استرادیول بنزوات به مدت ۵ روز دریافت کردند (۱۴).

۶. گروه MS با پیش تیمار استرادیول بنزوات ( $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ): این گروه پس از انجام جراحی بر روی آن ها و تعبیه کانول در ناحیه CA1 هیپوکامپ به میزان  $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  استرادیول بنزوات به مدت ۵ روز دریافت کردند و نیم ساعت پس از آخرین تزریق استرادیول، اتیدیوم بروماید برای القاء MS تزریق گردید.

گردید و بعد از سانتریفوژ کردن در دور  $g$  ۱۴۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد محلول رویی استخراج شد تا برای آنالیزهای بیوشیمیایی مورد استفاده قرار بگیرد. میزان پروتئین توتال در محلول رویی توسط روش برادفورد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد اندازه گیری شد (۱۵).

پس از تهیه هموژن، برای سنجش پراکسیداسیون لیپیدی از ترکیبی به نام مالون دی آلدئید (MDA) حاصل که به عنوان بیومارکری برای سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی است، استفاده شد. میزان مالون دی آلدئید به کمک روش اسپکتروفتومتری که بر اساس واکنش با تیوباربتوریک اسید است، اندازه گیری گردید (۱۵).

برای تعیین محتوای گلوتاتیون تام، میزان مساوی از نمونه ها به نسبت ۱ به ۵۰ رقیق شده و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول فوق به مخلوط تهیه شده از ۰/۲۱ میلی مول NADPH، ۰/۶ میلی مول DNTP (دی نیترو بنزوئیک اسید)، ۵ میلی مول EDTA (اتیلن دی آمین تترا استیک اسید)، ۰/۵ واحد گلوتاتیون ردوکتاز در ۱۰۰ میلی مول بافر فسفات پتاسیم (PH 7.5) در حجم نهایی ۱ میلی لیتر اضافه گردید. میزان جذب نور در طول موج ۴۱۲ نانومتر اندازه گیری و محتوای گلوتاتیون به وسیله مقایسه با منحنی استاندارد به دست آمده از مقادیر معلوم گلوتاتیون محاسبه شد. مقادیر گلوتاتیون بر حسب  $nmol/mg$  پروتئین بیان گردید (۱۵).

فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (GPx) با استفاده از کیت (RANSOD (Randox labs. Crumlin UK) اندازه گیری شد. گلوتاتیون پراکسیداز اکسیداسیون گلوتاتیون توسط کومن هیدروپروکسید را کاتالیز می کند. فعالیت GPx در محلول رویی در طول موج ۳۴۰ نانومتر و در ۳۷ درجه سانتی گراد توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه گیری شد و با استفاده از واحد (U/L of Sample) تعیین گردید. مقادیر GPx بر حسب U/mg پروتئین بیان شد (۱۵).

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) توسط کیت (RANSOD (Randox labs. Crumlin UK) بر روی محلول رویی تهیه شده از هموژن بافته

هیپوکامپ اندازه گیری شد. در این روش از گزانتین و گزانتین اکسیداز (XOD) برای تولید رادیکال های سوپراکسید استفاده می شود که با ۲-۴-ایدوفیل-۳-۴-نیتروفنل-۵-فنیل تترازولیوم کلرید (I.N.T) واکنش داده و رنگ قرمز فورمازن را تولید می کند. فعالیت سوپراکسید دیسموتاز از روی شدت و درجه مهار این واکنش سنجیده می شود. میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز بر حسب U/mg پروتئین بافتی ثبت شد (۱۶). فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) بر اساس میزان تجزیه  $H_2O_2$  در طول موج ۲۴۰ نانومتر و در ۲۰ درجه سانتی گراد اندازه گیری شد. هموژن اولیه تهیه شده از بافت در دور  $g$  ۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد و مقادیر مساوی از محلول رویی به مخلوط حاوی ۰/۰۰۲ درصد تریتون ۱۰۰-X، ۰/۱ میلی مول EDTA، بافر فسفات ۰/۵ میلی مولر (PH 7.0) و  $H_2O_2$  ۱۵ میلی مولر در حجم نهایی ۱ میلی لیتر اضافه گردید. فعالیت آنزیم از طریق محاسبه میزان جذب نوری در طول موج ۲۴۰ نانومتر و در فاصله زمانی ۰ و ۱۵ ثانیه محاسبه گردید. میزان فعالیت کاتالاز بر حسب U/mg پروتئین بیان شد (۱۵).

داده های پراکسیداسیون لیپیدی (MDA)، محتوای گلوتاتیون و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی گلوتاتیون پراکسیداز (GPx)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین (Mean  $\pm$  SEM) ارائه شد.

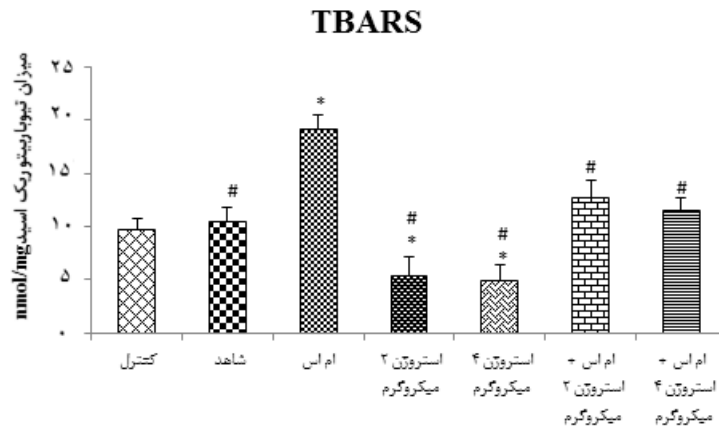
تجزیه و تحلیل آماری داده ها با روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی Tukey و به وسیله نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ صورت گرفت و نمودارهای مربوطه از طریق نرم افزار Excel نسخه ۲۰۱۰ رسم گردید.  $P < 0.05$  به عنوان معیار معنی دار بودن اختلاف در نظر گرفته شد.

### یافته های پژوهش

نتایج سنجش تیوباربتوریک اسید (TBARS): آنالیز داده های پراکسیداسیون لیپیدی نشان داد که مقادیر TBARS در گروه MS به طور معنی داری بیش از گروه کنترل و در گروه های دریافت کننده استرادیول  $4 \mu g/\mu l$  و  $2 \mu g/\mu l$  به طور معنی داری کمتر از گروه کنترل می باشد ( $P < 0.05$ ) (جدول شماره ۱). در

در ضمن ما بین گروه MS و گروه شاهد نیز تفاوت معنی داری در مقادیر TBARS مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ) (نمودار شماره ۱).

مقادیر TBARS بین گروه MS و گروه های پیش تیمار استرادیول (MS+استرادیول) با دوزهای  $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  و  $4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  تفاوت معنی داری وجود دارد ( $P < 0.05$ ).



نمودار شماره ۱. نتایج سنجش میزان TBARS برای ارزیابی میزان پراکسیداسیون لیپیدی در هیپوکامپ تمام گروه های مورد مطالعه. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد بیان شده و  $P < 0.05$  به عنوان معیار معنی دار بودن اختلاف در نظر گرفته شده است. \* نشان دهنده اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل و # نشان دهنده اختلاف معنی دار نسبت به گروه MS می باشد ( $P < 0.05$ ).

آنتی اکسیدانی GPx، مقادیر GPx بین گروه MS و گروه های پیش تیمار استرادیول (MS+استرادیول) با دوزهای  $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  و  $4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  تفاوت معنی داری وجود دارد ( $P < 0.05$ ). هم چنین ما بین گروه MS و گروه شاهد تفاوت معنی داری در مقادیر GPx مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ) (جدول شماره ۱).

نتایج سنجش سوپراکسید دیسموتاز (SOD): آنالیز داده های حاصل از سنجش فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانی SOD، نشان داد که مقادیر SOD در گروه MS به طور معنی داری کمتر از گروه کنترل و در گروه های دریافت کننده استرادیول ( $4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  و  $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) به طور معنی داری بیشتر از گروه کنترل می باشد ( $P < 0.05$ ) (جدول شماره ۱). در ضمن فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانی SOD، مقادیر SOD بین گروه MS و گروه های پیش تیمار استرادیول (MS+استرادیول) با دوزهای  $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  و  $4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  نیز تفاوت معنی داری وجود دارد ( $P < 0.05$ ). علاوه بر این ما بین گروه MS و گروه شاهد تفاوت معنی داری در مقادیر SOD مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ) (جدول شماره ۱).

نتایج سنجش محتوای گلوتاتیون (GSH): با توجه به آنالیز داده های حاصل از سنجش گلوتاتیون، مقادیر گلوتاتیون بین گروه کنترل و گروه MS و هم چنین بین گروه کنترل و گروه های دریافت کننده استرادیول ( $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  و  $4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) تفاوت معنی داری را نشان داد ( $P < 0.05$ ) (جدول شماره ۱). در ضمن در مقادیر گلوتاتیون بین گروه MS و گروه های پیش تیمار استرادیول (MS+استرادیول) با دوزهای  $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  و  $4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  نیز تفاوت معنی داری مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ). تفاوت معنی داری ما بین گروه MS و گروه شاهد در میزان گلوتاتیون نیز مشاهده شد ( $P < 0.05$ ) (جدول شماره ۱).

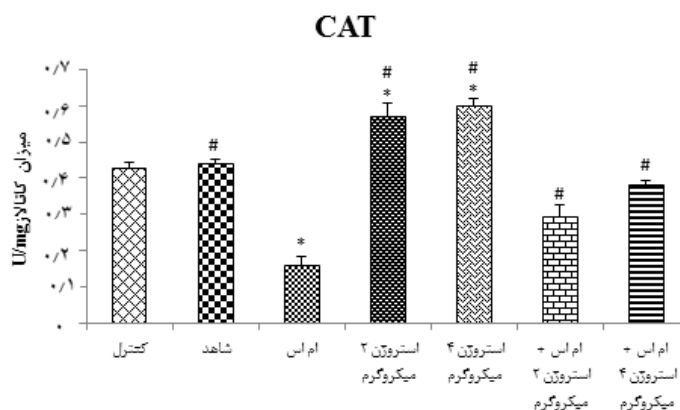
نتایج سنجش گلوتاتیون پروکسیداز (GPx): آنالیز داده های حاصل از سنجش فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانی (GPx)، نشان داد که مقادیر GPx در گروه MS به طور معنی داری کمتر از گروه کنترل و در گروه های دریافت کننده استرادیول ( $4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  و  $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) به طور معنی داری بیشتر از گروه کنترل می باشد ( $P < 0.05$ ) (جدول شماره ۱). فعالیت آنزیم

جدول شماره ۱. نتایج سنجش میزان محتوای گلوتاتیون (GSH)، گلوتاتیون پروکسیداز (GPx) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) مورد مطالعه در این بررسی در تمام گروه ها. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد بیان شده و  $P < 0.05$  به عنوان معیار معنی دار بودن اختلاف در نظر گرفته شده است. \* نشان دهنده اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل و # نشان دهنده اختلاف معنی دار نسبت به گروه MS می باشد. تعداد نمونه ها در هر گروه هفت عدد می باشد.

گروه های آزمایشی	کنترل	شاهد	ام اس	۱۷-بتا استرادیول ۲ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	۱۷-بتا استرادیول ۴ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	ام اس + ۱۷-بتا استرادیول ۲ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	ام اس + ۱۷-بتا استرادیول ۴ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
محتوای گلوتاتیون بر حسب nmol/mg protein	۰/۳۴ $\pm$ ۰/۰۱	۰/۳۱ $\pm$ ۰/۰۲#	۰/۱۳ $\pm$ ۰/۰۱*	۰/۴۹ $\pm$ ۰/۰۳#	۰/۵۱ $\pm$ ۰/۰۲#	۰/۲۵ $\pm$ ۰/۰۲#	۰/۳۰ $\pm$ ۰/۰۲#
مقادیر GPx بر حسب nmol/mg protein	۱۶/۸۷ $\pm$ ۲/۷	۱۶/۳۲ $\pm$ ۲/۶۳#	۱۱/۱۴ $\pm$ ۱/۵۱*	۲۱/۱۳ $\pm$ ۲/۱۱#	۲۳/۷۸ $\pm$ ۱/۳۱#	۱۵/۸۹ $\pm$ ۱/۴۷#	۱۶/۷۵ $\pm$ ۲/۰۶#
مقادیر SOD بر حسب nmol/mg protein	۵/۳۳ $\pm$ ۰/۱۱	۵/۲۴ $\pm$ ۰/۱۱#	۲/۴۰ $\pm$ ۰/۱۲*	۷/۳۵ $\pm$ ۲/۱۱#	۸/۱۲ $\pm$ ۰/۱۲#	۴/۳۵ $\pm$ ۰/۳۸#	۵/۵۴ $\pm$ ۰/۱۷#

نتایج سنجش کاتالاز (CAT): با توجه به آنالیز داده های حاصل از سنجش فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانی CAT، مقادیر CAT بین گروه کنترل و گروه MS و هم چنین بین گروه کنترل و گروه های دریافت کننده استرادیول (۲  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  و ۴  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) تفاوت معنی داری را نشان داد ( $P < 0.05$ ) (جدول شماره ۱). بر اساس نتایج حاصل از آنالیز داده های سنجش

فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانی CAT، در مقادیر CAT بین گروه MS و گروه های پیش تیمار استرادیول با دوزهای ۲  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  و ۴  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  تفاوت معنی داری مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ). هم چنین تفاوت معنی داری در مقادیر CAT ما بین گروه MS و گروه شاهد نیز وجود دارد ( $P < 0.05$ ) (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۲. نتایج سنجش میزان CAT برای ارزیابی میزان فعالیت آنتی اکسیدانی این آنزیم در هیپوکامپ تمام گروه های مورد مطالعه. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد بیان شده و  $P < 0.05$  به عنوان معیار معنی دار بودن اختلاف در نظر گرفته شده است. \* نشان دهنده اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل و # نشان دهنده اختلاف معنی دار نسبت به گروه MS می باشد ( $P < 0.05$ ).

### بحث و نتیجه گیری

بر اساس نتایج حاضر، تزریق اتیدیوم بروماید پارامترهای استرس اکسیداتیو را افزایش و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی را کاهش می دهد، اما

ریز تزریق ۱۷-بتا استرادیول به علت خاصیت آنتی اکسیدانی قوی، افزایش میزان پارامترهای استرس اکسیداتیو و کاهش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی ناشی از تزریق اتیدیوم بروماید را تعدیل نمود.

ریز تزریق آتیدیوم بروماید کاهش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی GPx، SOD و CAT را در پی داشت. بنا بر این شاید بتوان این گونه عنوان نمود که آتیدیوم بروماید منجر به افزایش بار اکسیداتیو و کاهش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی در هیپوکامپ موش های صحرایی نر بالغ می شود. یافته های این بررسی با مطالعه عبدالسلام و همکاران (۲۰۱۲) که نشان داده اند تزریق موضعی آتیدیوم بروماید (۱۰ μl از آتیدیوم بروماید ۰/۱ درصد) در مغز موش صحرایی بالغ منجر به افزایش MDA (که یک شاخص پراکسیداسیون لیپیدی است) و نیتریک اکسید می گردد و این امر نیز افزایش تولید رادیکال های آزاد در قشر مغز و هم چنین کاهش معنی داری را در سطح گلوکوتایون در پی دارد، هم راستا می باشد (۱۷).

از نتایج دیگر این مطالعه می توان به کاهش مقادیر MDA و افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی GPx، SOD و CAT در نتیجه پیش تیمار با استرادیول بنزوات با دوزهای ۲ و ۴ μg/μl در بافت هیپوکامپ اشاره نمود. پیش تیمار استرادیول (استرادیول بنزوات+آتیدیوم بروماید) با هر دو دوز تغییرات نشات گرفته از ریز تزریق آتیدیوم بروماید را بهبود می بخشد که این یافته نشانگر اثرات آنتی اکسیدانی ۱۷-بتا استرادیول در مدل تجربی بیماری MS می باشد. در تأیید این نتایج می توان به یافته های بررسی کی و همکاران اشاره نمود، آنان نشان دادند که ۱۷-بتا-استرادیول پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از پپتید β آمیلوئید و فرسوس سولفات القاء شده را مهار کرده و مرگ سلولی ایجاد شده با استرس اکسیداتیو در ردیف سلولی هیپوکامپ را نیز کاهش می دهد (۱۸). علاوه بر این، نتایج مطالعه دیگر نیز حاکی از وجود رابطه خطی بین سطح ۱۷-بتا استرادیول در گردش و وضعیت آنتی اکسیدانی می باشد به طوری که برداشتن دو طرفه تخمدان، بیان mRNA آنزیم های آنتی اکسیدانی SOD و GPx را کاهش داده که این اثر، با جایگزینی ۱۷-بتا استرادیول بهبود می یابد که این نتایج نیز در راستای نتایج مطالعه حاضر می باشد (۱۹).

در پژوهش دیگر نیز اثر استروئیدهای گنادی بر پراکسیداسیون لیپیدی و هموستاز گلوکوتایون (GSH) در مغز موش صحرایی بالغ مورد بررسی قرار گرفته بود. آن محققین نشان دادند که سطوح مالون دی آلدئید هیپوکامپ و استریاتوم به طور معنی داری در گروه پیش تیمار شده با ۱۷-بتا استرادیول کاهش می یابد، که نتایج مزبور با یافته های مطالعه حاضر همسو می باشد، اما این پژوهشگران اذعان نمودند که پیش تیمار ۱۷-آلفا استرادیول (ایزومر غیر ۱۷-بتا استرادیولی ۱۷-بتا استرادیول) مانند ۱۷-بتا استرادیول در کاهش پراکسیداسیون لیپیدی در این مناطق موثر واقع نشده است. در ضمن ۱۷-بتا استرادیول از کاهش گلوکوتایون در هیپوکامپ نیز محافظت نمود و محتوای گلوکوتایون را به طور معنی داری در هیپوکامپ موش های پیش تیمار شده با ۱۷-آلفا استرادیول و ۱۷-بتا استرادیول افزایش داد و این پیشنهاد کننده وجود یک مکانیسم غیر رسپتوری است. از آن جایی که در قشر مغز درمان با ۱۷-بتا استرادیول و در استریاتوم درمان با ۱۷-آلفا استرادیول در حفاظت از سطوح گلوکوتایون موثر است، به نظر می رسد که استروئیدهای گنادی اثر منطقه ای بر پراکسیداسیون لیپیدی و هموستاز گلوکوتایون (GSH) در مغز موش صحرایی بالغ دارند (۲۰).

ریز تزریق ۱۷-بتا استرادیول احتمالاً به دلیل داشتن خاصیت آنتی اکسیدانی موجب کاهش میزان پارامترهای استرس اکسیداتیو و افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی در مدل تجربی MS شد، بنا بر این شاید بتوان عنوان نمود که پیش تیمار ۱۷-بتا استرادیول احتمالاً از طریق تعدیل استرس اکسیداتیو احتمال بروز بیماری MS را کاهش می دهد.

### سپاسگزاری

بدین وسیله از پرسنل محترم آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز تقدیر و تشکر می گردد. لازم به ذکر است که هیچ گونه تعارض در منافع در بین نویسندگان وجود ندارد.





## References

1. Adiele RC, Adiele CA. Metabolic defects in multiple sclerosis. *Mitochondrion* 2019; 44:7-14. doi: 10.1016/j.mito.2017.12.005f.
2. Gilgunsherki Y, Melamed E, Offen D. The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis the need for effective antioxidant therapy. *J Neurol* 2004;251:261-8. doi:10.1007/s00415-004-0348-9
3. Carlson NG, Rose JW. Antioxidants in multiple sclerosis. *CNS Drug* 2006;20:433-41. doi:10.1080/08923970802331943
4. Koch MW, Ramsaransing GS, Arutjunyan AV, Stepanov M, Teelken A, Heersema DJ, et al. Oxidative stress in serum and peripheral blood leukocytes in patients with different disease courses of multiple sclerosis. *J Neurol* 2006;253:483-87. doi: 10.1007/s00415-005-0037-3
5. 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 Submicroscop Cytolo Pathol* 2000;32:603-12.
6. Williams WV. Hormonal contraception and the development of autoimmunity: A review of the literature. *Lin Quarter* 2017;84:275-95.
7. Gold SM, Voskuhl RR. Estrogen treatment in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2009;286:99-103. doi: 10.1016/j.jns.2009.05.028
8. Garciasigura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL. Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol* 2001; 63:29-60.
9. Santosignorelli S, Neri S, Sciacchitano S, Di Pino L, Costa MP, Marchese G, et al. Behaviour of some indicators of oxidative stress in postmenopausal and fertile women. *Maturities* 2006 ;53:77-82. doi:10.1016/j.maturitas.2005.03.001
10. Sanchezrodriguez MA, Zacariasflores M, Arronterosales A, Correamunoz E, MendozaOnunez VM. Menopause as risk factor for oxidative stress. *Menopause* 2012; 19:361-7. doi:10.1097/gme.0b013e318229977d
11. Voskuhl R, Momtazee C. Pregnancy: effect on multiple sclerosis, treatment considerations, and breastfeeding. *Neurotherapeutics* 2017; 1-11. doi: 10.1007/s13311-017-0562-7
12. Franklin RJM, Sim FJ, Hinks GL. The reexpression of the homeodomain transcription factor Gtx during remyelination of experimentally induced demyelinating lesions in young and old Rat brain. *Neuroscience* 2000;100: 131-9
13. Ordikhani M, Babri Sh, Gholamipour H. Effects of intrahippocampal injection of 17- $\beta$ estradiol on memory consolidation in the female ovariectomized Rats. *Pharmaceut Sci* 2007; 1: 35-42.
14. Bednarek G, Tupikowski K, Bidzinska B, Bohdanowicz A, Antonowicz J, Kosowska B, et al. Serum lipid peroxides and total antioxidant status in postmenopausal women on hormone replacement therapy. *Gynecol Endocrinol* 2004 1; 19:57-63.
15. Ghadrdoost B, Vafaei AA, Rashidypour A, Hajisoltani R, Bandegi AR, Motamedi F, et al. Protective effects of saffron extract and its active constituent crocin against oxidative stress and spatial learning and memory deficits induced by chronic stress in rats. *European J Pharmacol* 2011; 667:222-9. doi:10.1016/j.ejphar.2011.05.012
16. Gao R, Yuan Z, Zhao Z, Gao X. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. *Bioelectrochem Bioenerge* 1998; 45:41-5. doi.org/10.1016/S0302-4598(98)00072-5
17. Abdelsalam OM, Khadrawy YA, Mohammed NA. Neuroprotective effect of nitric oxide donor isosorbide dinitrate against oxidative stress induced by ethidium bromide in Rat brain. *EXCLI* 2012;3: 125-41.
18. Kii N, Adachi N, Liu K, Arai T. Acute effects of 17 $\beta$ -estradiol on oxidative stress in ischemic rat striatum. *J Neurosurg Anesthesiol* 2005; 17:27-32.
19. Bellanti F, Matteo M, Rollo T, De Rosario F, Greco P, Vendemiale G,

Serviddio G. Sex hormones modulate circulating antioxidant enzymes: impact of estrogen therapy. *Red Biol* 2013; 1:340-6. doi:10.1016/j.redox.2013.05.003

20.Ozacmak VH, Sayan B. The effects of 17 beta estradiol 17 alpha estradiol and

progesterone on oxidative stress biomarkers in ovariectomized female Rat brain subjected to global cerebral ischemia. *Physiolo Res*2009;58:909. doi:10.1016/j.redox.2013.05.003

## 17- $\beta$ estradiol Attenuated Hippocampus Oxidative Stress in an Ethidium Bromide-Induced Multiple Sclerosis Model among Adult Male Rats

Hemmati A<sup>1</sup>, Hatami H<sup>2\*</sup>, Khajehnasiri N<sup>3</sup>

(Received: December 4, 2017

Accepted: April 4, 2018)

### Abstract

**Introduction:** Multiple sclerosis (MS) is a disease of the central nervous system in which myelin is destroyed. Oxidative stress and subsequent apoptosis are recognized as factors involved in the pathogenesis of MS. On the other hand, 17- $\beta$ -estradiol is well known for its anti-oxidant properties. Therefore, this study aimed to investigate the effect of 17-beta-estradiol on oxidative stress parameters in the experimental model of MS.

**Materials & Methods:** This study was conducted on 49 Wistar male rats cannulating into the CA1 area of hippocampus. The rats were randomly divided into following groups (n=7): control group, sham group, MS group, estradiol groups, MS+estradiol groups. MS model was induced by intrahippocampal injection of ethidium bromide and estradiol was injected as a pretreatment for 5 days. At the end of experiments, the levels of oxidative stress parameters, such as MDA, Glutathione, and antioxidant enzymes

(Glutathione peroxidase, Superoxide dismutase and Catalase) were measured in this study.

**Findings:** The microinjection of ethidium bromide increased the oxidative capacity and reduced the antioxidant enzyme (SOD GPx and CAT) activity (P<0.05). The pre-treatment of 17-beta-estradiol prevented an increase in oxidative capacity and decreased the activity of antioxidant enzymes in the experimental groups (P<0.05).

**Discussion & Conclusions:** The 17-beta-estradiol, as a potent antioxidant, is likely to prevent the increase of oxidative stress indices in the experimental model of MS by removing reactive oxygen species and clearing the tissues from free radicals.

**Keywords:** Multiple sclerosis, Ethidium bromide, Microinjection, Oxidative stress, 17-beta-estradiol, Hippocampus, Rat

1. Dept of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

2. Dept of Animal sciences, Faculty of biological sciences, Tabriz University, Tabriz, Iran

3. Dept of Animal sciences, Biological Sciences and Technology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

\* Corresponding author Email: Homeirahatami@yahoo.com