

تأثیر جنیستین بر حافظه فضایی موش‌های صحرایی پارکینسونی اواریکتومی شده

الهه اربابی (MSc)^۱، سید علیرضا طلایی (PhD)^۱، غلامعلی حمیدی (PhD)^۱، ابوالفضل اعظمی (PhD)^۲، نسترن افسرده (MSc)^۱، محمود سلامی (PhD)^{*۱}

۱- مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

۲- مرکز تحقیقات علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

دریافت: ۹۴/۷/۱۱، اصلاح: ۹۴/۱۰/۱۶، پذیرش: ۹۴/۱۲/۱۲

خلاصه

سابقه و هدف: اختلال در حافظه و یادگیری از عوارض بیماری پارکینسون می‌باشد. همچنین کاهش هورمون استروژن در دوران یائسگی باعث بروز اختلال در حافظه می‌گردد. با توجه به اینکه جنیستین دارای اثرات استروژنی و محافظت نوروئی می‌باشد. بنابراین این مطالعه جهت بررسی اثر جنیستین بر یادگیری و حافظه در موش‌های صحرایی پارکینسونی اواریکتومی شده انجام گردید.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی بر روی ۴۸ سر از موش‌های صحرایی ماده نژاد ویستار که به شش گروه ۸ تایی تقسیم شدند، انجام گردید که گروه‌ها شامل گروه کنترل و پارکینسونی دریافت کننده حلال دی متیل سولفوکساید و چهار گروه پارکینسونی-اواریکتومی شده دریافت کننده حلال دی متیل سولفوکساید، جنیستین (۱۰ mg/kg)، تاموکسیفن (۲۰ mg/kg) و مخلوط جنیستین (۱۰ mg/kg) و تاموکسیفن (۲۰ mg/kg) به صورت پیش درمان به مدت یک هفته بودند. مسیر نیگرواستریاتال توسط ۸ میکروگرم ۶-هیدروکسی دوپامین تخریب شد. یادگیری و حافظه فضایی با آزمون ماز آبی موریس مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در هر دو مرحله یادگیری و بازخوانی اختلاف معنی‌داری بین گروه کنترل با گروه‌های پارکینسونی و پارکینسونی-اواریکتومی ($P < 0.0001$) وجود دارد. همچنین گروه‌های پارکینسونی-اواریکتومی $4/21 \pm 0/26$ ثانیه و پارکینسونی $5/94 \pm 0/61$ ثانیه در ربع هدف مانده‌اند که در مقایسه با گروه کنترل کمتر ($12/15 \pm 0/33$ ثانیه) بوده است. بعلاوه اواریکتومی باعث افزایش مدت زمان یادگیری ($P = 0.002$) و کاهش مدت زمان بازخوانی ($P = 0.034$) در موش‌های پارکینسونی شد. جنیستین ($11/85 \pm 0/46$ ثانیه) در مقایسه با دریافت کننده جنیستین و تاموکسیفن ($6/37 \pm 0/86$ ثانیه) مدت زمان بیشتری را در ربع هدف طی کرده است ($P = 0.0001$).

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه نشان داد که جنیستین یادگیری و حافظه فضایی در موش‌های صحرایی پارکینسونی اواریکتومی شده را بهبود می‌بخشد.

واژه‌های کلیدی: جنیستین، یادگیری، حافظه، اواریکتومی، پارکینسون.

مقدمه

بیماری پارکینسون یک بیماری آسیب عصبی پیشرونده است که به‌عنوان دومین بیماری شایع نورودژنراتیو بعد از آلزایمر در جهان شناخته شده است. مشخصه نوروپاتولوژی این بیماری تخریب نورون‌های دوپامینرژیک موجود در بخش متراکم جسم سیاه مغز میانی (SNc) و در نتیجه کاهش دوپامین اجسام مخطط است (۱). یکی از علائم غیر حرکتی که در مراحل پیشرفته این بیماری دیده می‌شود، کاهش عملکردهای شناختی است (۲ و ۳). التهاب، آپوپتوز، اختلال عملکرد میتوکندری و استرس اکسیداتیو از فاکتورهای کلیدی مرتبط در مرگ نورونی مسیر نیگرواستریاتال هستند (۴). اواریکتومی رایجترین مدل تجربی حیوانی برای بررسی تأثیر کاهش تولید استروژن می‌باشد (۵). سویا منبع بزرگی از فیتواستروژنها است (۶). فیتواستروژن‌ها از نظر ساختاری و عملکردی مشابه استروژن درون‌زاد عمل می‌کنند اما بدون عوارض جانبی هستند، همچنین دارای اثرات محافظت کننده عصبی می‌باشند (۷). جنیستین یکی از ترکیبات عمده

سویا، ایزوفلاوونوئیدی است که دارای اثرات استروژنی، ضد التهابی، محافظت نوروئی و خاصیت میتوژنی می‌باشد (۸ و ۹) و منجر به کاهش آزادسازی دوپامین اجسام مخطط می‌شود (۱۰ و ۱۱). جنیستین می‌تواند از سدخونی مغزی عبور کرده (۱۰) و با گیرنده‌های استروژنی α و β باند شود؛ هرچند تمایل بیشتری برای اتصال به گیرنده‌های β نشان می‌دهد (۱۱ و ۱۲). اثرات استروژنی جنیستین به صورت ژنومیک (۱۳) و یا غیرژنومیک (۱۴) از طریق گیرنده‌های استروژنی اعمال می‌شود (۱۵). از طرف دیگر جنیستین دارای ویژگی آزادکنندگی نیتریک‌اکساید می‌باشد (۱۶). جنیستین ممکن است بر گیرنده‌های استروژنی اثر آگونیستی یا آنتاگونیستی داشته باشد (۱۷ و ۱۸). تأثیر مثبت ترکیبات فلاوونوئیدی از جمله جنیستین بر بیماری پارکینسون به اثبات رسیده است و از آنجاکه یکی از مکانیسم‌های افزایش آسیب‌های وارد شده به جسم سیاه مغز، افزایش استرس اکسیداتیو می‌باشد، ممکن است اثر حفاظتی جنیستین در برابر این بیماری بدلیل

این مقاله حاصل پایان نامه الهه اربابی دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی و طرح تحقیقاتی به شماره ۹۳۰۲ دانشگاه علوم پزشکی کاشان می‌باشد.

* مسئول مقاله: دکتر محمود سلامی

E-mail: Salami-m@kaums.ac.ir .com

آدرس: کاشان، بلوار قطب راوندی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات فیزیولوژی. تلفن: ۰۳۱-۵۵۶۲۱۱۵۷

ارزیابی حافظه و یادگیری: در این مطالعه به منظور بررسی فرآیند یادگیری و تثبیت حافظه فضایی حیوانات همه گروه‌ها از ماز آبی موریس (۲۳) دوهفته بعد از تزریق OHDA-۶ استفاده شد. این ماز متشکل از یک تانک ساخته شده از فلز، به قطر ۱۵۰ و عمق ۷۰ سانتی‌متر است که تا ارتفاع ۵۰ سانتی‌متری آن از آب پر می‌شود. ماز بطور فرضی به چهار ربع مساوی شمالی، جنوبی، شرقی و غربی تقسیم شده است و یک سکوی نجات به قطر ۱۰ سانتی‌متر در وسط یکی از ربع‌های فرضی قرار می‌گیرد. در بالای ماز یک دوربین دیجیتال نصب شده و کلیه رفتارهای حیوان پس از فیلمبرداری در حافظه کامپیوتر ذخیره می‌شود تا برای انجام آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گیرد. در پایان، فیلم‌های ذخیره‌شده توسط نرم‌افزار اختصاصی (Radiab, Ver. 2.1, Iran) آنالیز شده و مدت زمان سپری‌شده در ماز توسط حیوان و سرعت حرکت حیوان در ماز به‌منظور یافتن سکوی نجات در اختیار محقق قرار می‌گیرد. باتوجه به اینکه فاکتور سرعت حرکت حیوانات در ماز به‌عنوان یک عامل مداخله‌کننده در نظر گرفته می‌شود پس از محاسبه سرعت این عامل به‌عنوان فاکتور مخدوش‌کننده وارد آزمون آنالیز COANOVA شد تا اثر آن حذف گردد.

مراحل انجام آزمایش

مرحله یادگیری یا آموزش: طی این مرحله، حیوان از یکی از سمت‌های چهارگانه ماز در آب رها شد. حداکثر زمان آزمایش در هر مرحله ۶۰ ثانیه در نظر گرفته شد. در صورتی که حیوان به‌طور اتفاقی سکوی نجات مخفی در زیر آب را پیدا می‌کرد، به حیوان اجازه داده می‌شد تا به مدت ۱۵ ثانیه روی سکو بماند و در صورتی که در مدت تعیین شده موش نمی‌توانست سکو را پیدا کند، توسط آزمایش‌کننده به آرامی به‌سوی سکو هدایت می‌شد تا سکو را بیابد. سپس، حیوان از سکو برداشته شده و پس از ۱۰ دقیقه آزمایش مجدداً تکرار گردید، با این تفاوت که محل رها شدن موش در ماز نسبت به مرحله قبل متفاوت بود. هر موش روزانه ۴ جلسه آموزش با فاصله ۱۰ دقیقه‌ای راتجربه کرد. در مجموع این مرحله از آموزش به مدت ۴ روز طول کشید (۲۴).

مرحله بازخوانی (پروپ): در روز پنجم مرحله بازخوانی انجام گرفت؛ بدین صورت که سکو از ماز برداشته شده و آزمایش انجام شد. این نکته مورد توجه قرار گرفت که موش در حین آزمایش بیشترین وقت خود را در کدامیک از قسمت‌های چهارگانه ماز گذراند. در این مرحله از آزمایش هر جلسه ۳۰ ثانیه طول کشید. این مرحله از آزمایش برای هر موش یکبار انجام گرفت و مدت زمان ماندن در ربع صحیح ماز (که در مرحله قبل واجد سکو بود) معیار میزان یادآوری قرار گرفت (۲۵).

مطالعات بافتی: پس از انجام تست‌های رفتاری و در پایان کار، پرفیوژن با ۵۰۰ میلی‌لیتر محلول ثبوت (Neutral-buffered Formalin) NBF10% به مدت ۲ ساعت انجام شد (۲۶). بلافاصله پس از اتمام پرفیوژن با دقت مغز را از داخل جمجمه خارج نموده و در محلول ثبوت به مدت ۲۴ ساعت دردمای اتاق قرار دادیم تا ثبوت بافت مغز کامل شود. پس از گذشت ۲۴ ساعت نمونه‌های بافتی را در دستگاه tissue processor قرار دادیم. در نهایت بافت‌ها قالبگیری شدند و با استفاده از دستگاه میکروتوم برش‌هایی در ابعاد ۵ میکروتوم از آن‌ها تهیه شد. سپس برای ارزیابی آسیب بافتی در بخش متراکم جسم سیاه، روش رنگ‌آمیزی نیسل به‌کار گرفته شد (۲۷).

خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن باشد (۱۹). مطالعات نشان داده است که تجویز دوز بالای جنیستین به کاهش اختلالات رفتاری و ساختاری در موش‌های مدل پارکینسون منجر می‌شود (۲۰). Sarkaki و همکاران نیز نشان دادند که مصرف سویا می‌تواند در بهبود عملکرد شناختی موش‌های اواریکتومی مدل پارکینسون در ماز آبی موریس تاثیر مثبتی داشته باشد که علت آن می‌تواند افزایش تراکم نورونی توسط این ترکیب فلاوونوئیدی باشد (۲۱). با توجه به عوارض جانبی داروهای رایج برای درمان پارکینسون از جمله لودوپا، به نظر می‌رسد سویا می‌تواند دارای اثرات استروژنی مفید بدون عوارض جانبی استروژن بوده و منجر به کاهش شدت علائم پارکینسون در زنان یائسه گردد. لذا با توجه به تاثیر مثبت ترکیبات ایزوفلاوونوئیدی از جمله سویا بر حافظه بخصوص در مدل‌های حیوانی پارکینسون هدف از این مطالعه بررسی اثر تجویز جنیستین بر یادگیری و حافظه موش‌های مدل پارکینسونی-اواریکتومی شده می‌باشد.

مواد و روش‌ها

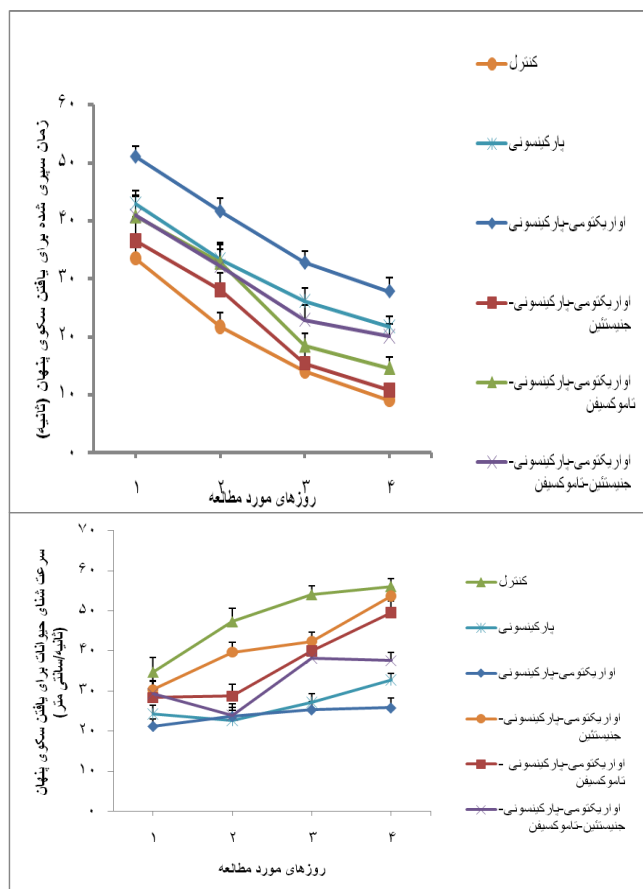
حیوانات: در این مطالعه تجربی ۴۸ موش صحرایی ماده نژاد ویستار در محدوده وزنی (۲۰۰-۱۷۰) به‌طور تصادفی به گروه‌های هشت‌تایی کنترل دریافت‌کننده حلال دی‌متیل سولفو کساید (C)، پارکینسونی دریافت‌کننده حلال دی‌متیل سولفو کساید (P) و چهارگروه پارکینسونی-اواریکتومی شده دریافت‌کننده حلال دی‌متیل سولفو کساید (O.P)، جنیستین (۲۷mg) جنیستین در ۱cc DMSO حل گردید (Laboratories LC, USA) (O.P.G) ۱۰ (mg/kg)، تاموکسیفن (۵۶mg) تاموکسیفن در ۱cc DMSO حل گردید (Company Iran Hormone) (O.P.T) ۲۰ (mg/kg) و مخلوط جنیستین ۱۰ (mg/kg) و تاموکسیفن (۲۰ (mg/kg) (O.P.GT) تقسیم شدند. حیوانات اواریکتومی شده داروها را یک هفته پس از اواریکتومی به مدت هفت روز دریافت کردند. همه گروه‌ها داروها و حلال را بصورت پیش‌درمان و تزریق داخل صفاقی دریافت کردند. سپس در روز هفتم مسیر نیگرواستریاتال حیوانات همه گروه‌ها به غیر از گروه کنترل، توسط تزریق ۶- هیدروکسی دوپامین هیدروکلراید (6-OHDA) تخریب شد.

تزریق ۶- هیدروکسی دوپامین هیدروکلراید: برای آسیب مسیر نیگرواستریاتال از ۶- هیدروکسی دوپامین هیدروکلراید (6-OHDA) (Sigma-Aldrich, USA) استفاده شد. بعد از بیهوش کردن حیوانات و ثابت شدن آنها در دستگاه استریوتاگس (Stoelting, USA)، بخش متراکم جسم سیاه با مختصات $AP=5/3$, $ML=1/6$, $DV=8$ (۲۲) روی سطح جمجمه علامتگذاری شد و به کمک دریل دندانپزشکی سوراخ گردید. سپس ۸ میکروگرم 6-OHDA در ۴ میکرولیتر محلول نمکی ۰/۹ درصد که حاوی اسیدآسکوربیک ۰/۱ درصد بود بصورت دوطرفه درون SNC تزریق شد. برای تأیید محل تزریق ابتدا در یک گروه ۱۰ تایی از حیوانات بصورت پایلوت رنگ متیلن بلو تزریق شد (شکل ۱) و سپس مغزها پرفیوژن شده و پس از برش‌گیری با استفاده از اطلس، زیر میکروسکوپ محل‌های تزریق بررسی شدند. در پایان آزمایشات نیز مغز همه حیوانات مورد مطالعه توسط رنگ‌آمیزی نیسل، جهت نشان دادن تراکم نورون‌ها بخش متراکم جسم سیاه بررسی شدند.

مطالعات بافت‌شناسی: نتایج بافت‌شناسی نشان داد که تعداد نورونهای موجود در بخش متراکم جسم سیاه گروه‌های پارکینسونی-اواریکتومی ($23/74 \pm 295/86$) و پارکینسونی ($45/12 \pm 449/68$) در مقایسه با کنترل ($54 \pm 20/14$) کاهش یافته است ($p=0/001$) برای هر دو مقایسه، نمودار ۳ و شکل ۲). همچنین اواریکتومی تعداد نورون‌ها در گروه پارکینسونی را کاهش داده است ($p=0/004$). جنیستین در ممانعت از کاهش تعداد نورون‌ها در بخش متراکم جسم سیاه نسبت به مخلوط جنیستین و تاموکسیفن ($p=0/010$) دارای اثر بیشتری بوده است به گونه‌ای که اختلاف معنی‌داری بین گروه کنترل با گروه دریافت‌کننده جنیستین وجود ندارد ($p=0/081$) و جنیستین از کاهش تعداد نورون‌ها در بخش متراکم جسم سیاه جلوگیری کرده است.



شکل ۱. تصویر بافت‌شناسی از مقطع کروئال SNc مبنی بر تایید صحت جایگاه تزریق



نمودار ۱. زمان سپری شده (الف) و سرعت شنای (ب) حیوانات جهت یافتن سکوی پنهان در آزمون ماز آبی موریس

ارزیابی کمی: برای شمارش نورون‌های بخش متراکم جسم سیاه از دوربین میکروسکوپ مدل Nikon Eclipse Ti-SR با بزرگنمایی $\times 200$ استفاده شد و نورون‌های ناحیه هدف مورد شمارش قرار گرفت.

آنالیز آماری: داده‌ها بصورت میانگین $\pm$ انحراف میانگین استاندارد بیان شده‌اند. نتایج حاصل از آزمون ماز آبی موریس با آزمون Repeated measures COANOVA مقایسه شدند. نتایج حاصل از شمارش نورونی با آزمون ANOVA سه طرفه و در صورت وجود اختلاف معنی‌دار با پس آزمون LSD مقایسه شدند و $p < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

آزمون ماز آبی موریس

مرحله یادگیری: الف) مدت زمان سپری شده به منظور یافتن سکوی پنهان: داده‌های حاصل از مجموع چهار روز آموزش حیوانات در ماز آبی موریس نشان داد که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری در روزهای مختلف بین همه گروه‌ها وجود دارد ($F_{5,186} = 16/854, p < 0/001$) اختلاف معنی‌داری بین گروه کنترل با گروه‌های پارکینسونی ($p = 0/001$) و پارکینسونی-اواریکتومی ($p = 0/001$) وجود دارد، بدین صورت که مدت زمان سپری شده برای یافتن سکوی پنهان در این دو گروه نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است. همچنین اواریکتومی مدت زمان یادگیری در موش‌های گروه پارکینسونی را افزایش داد ($p = 0/002$). نتایج نشان می‌دهد که جنیستین در مقایسه با مخلوط جنیستین و تاموکسیفن ($p = 0/008$) یادگیری در ماز را بهبود بخشیده به گونه‌ای که اختلاف معنی‌داری بین گروه کنترل با گروه دریافت‌کننده جنیستین مشاهده نمی‌شود (نمودار ۱-الف).

ب) سرعت شنای حیوانات در ماز به منظور یافتن سکوی پنهان: اختلاف بین گروه‌های آزمایش از نظر سرعت حیوانات در ماز از نظر آماری معنی‌دار است ($F_{5,182} = 16/459, p < 0/001$) بین گروه کنترل با گروه‌های پارکینسونی و پارکینسونی-اواریکتومی ($p = 0/001$) اختلاف وجود دارد؛ بدین صورت که سرعت سپری شده برای یافتن سکوی پنهان در این دو گروه نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. همچنین اواریکتومی سرعت حیوانات برای یافتن سکوی هدف در موش‌های گروه پارکینسونی را کاهش داد ($p = 0/001$). جنیستین در مقایسه با مخلوط جنیستین و تاموکسیفن ($p = 0/001$) سرعت شنا را افزایش داده است. اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های کنترل و دریافت‌کننده جنیستین مشاهده نشد (نمودار ۱-ب).

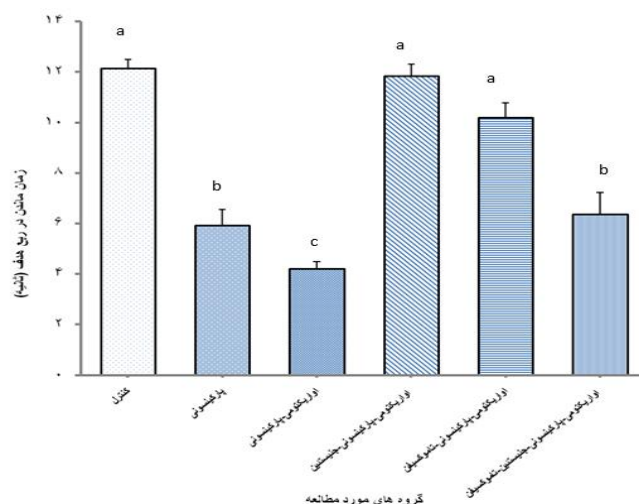
مرحله بازخوانی (پروپ)

زمان ماندن در ربع هدف: نتایج نشان داد که حیوانات گروه‌های پارکینسونی-اواریکتومی $4/21 \pm 0/26$ ثانیه و پارکینسونی $5/94 \pm 0/61$ ثانیه در ربع هدف مانده‌اند که در مقایسه با گروه کنترل کمتر ($12/15 \pm 0/33$ ثانیه) بوده است ($p = 0/001$) برای هر دو مقایسه، نمودار ۲). همچنین حیوانات گروه پارکینسونی-اواریکتومی مدت زمان کمتری را نسبت به گروه پارکینسونی در ربع هدف سپری کرده‌اند. به علاوه، گروه دریافت‌کننده جنیستین ($11/85 \pm 0/46$ ثانیه) در مقایسه با دریافت‌کننده جنیستین و تاموکسیفن ($6/37 \pm 0/86$ ثانیه) مدت زمان بیشتری را در ربع هدف طی کرده است ($p = 0/001$). اختلاف معنی‌دار بین گروه کنترل با گروه دریافت‌کننده جنیستین مشاهده نشد.

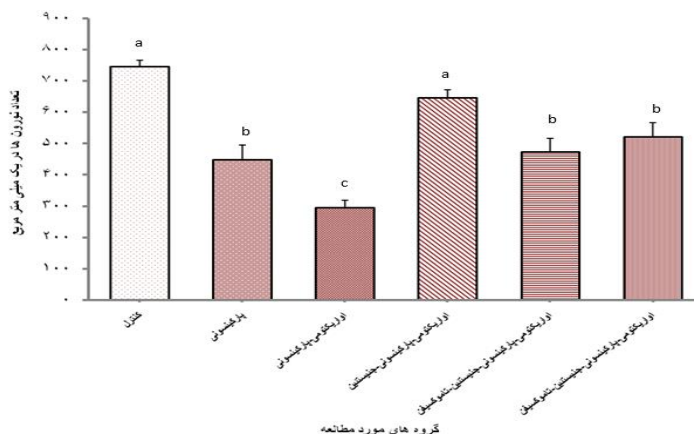
بحث و نتیجه گیری

یافته‌های این مطالعه بیانگر آن است که القا پارکینسون به‌صورت دوطرفه منجر به ایجاد اختلال در حافظه شده و اواریکتومی می‌تواند اختلال در حافظه را تشدید کند. به‌علاوه تجویز جنیستین یادگیری و حافظه درموش‌های صحرایی پارکینسونی اواریکتومی شده را بهبود بخشید. 6-OHD برای ایجاد مدل مشابه پارکینسون در جوندگان بکار می‌رود. این نوروتوکسین وارد پایانه‌های دوپامینرژیک اجسام مخطط می‌شود و با تولید هیدروکسیل باعث فراگامتانسیون DNA و در نتیجه مرگ سلولی می‌گردد (۲۸).

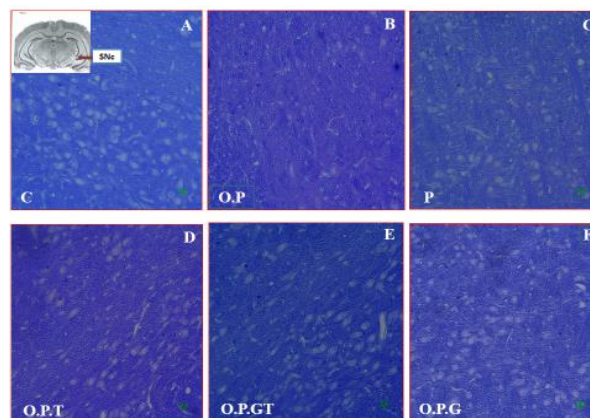
یافته‌های ما نشان داد که القا مدل پارکینسون منجر به اختلال در روند یادگیری فضایی و تثبیت حافظه در حیوانات مورد مطالعه می‌شود که با نتایج برخی از مطالعات قبلی که حاکی از ایجاد نقص شناختی بدنال تزریق 6-OHDA است مطابقت دارد (۲۹). نتایج نشان می‌دهد که اواریکتومی اختلال حافظه ناشی از پارکینسون را تشدید می‌کند. Azizi و همکاران نشان دادند که کاهش سطح استروژن در دوران یائسگی منجر به تضعیف شناخت می‌شود و اواریکتومی باعث اختلال در روند یادگیری فضایی می‌گردد (۳۰). نشان داده شده است که اواریکتومی از طریق افزایش استرس اکسیداتیو نقش مهمی در تخریب حافظه ایفا می‌کند (۳۱-۳۳). در این مطالعه پیش‌درمان با جنیستین اختلالات حافظه را بهبود می‌بخشد و این نتایج که نشان‌دهنده ارتباط بین فیتواستروژن‌ها با حافظه است، در مطالعات متعددی بررسی شده است (۳۷ و ۳۶ و ۲۱ و ۱۰). فیتواستروژن‌ها به‌عنوان آگونیست‌های استروژن (۳۴)، در کاهش آسیب عصبی از طریق مقابله با استرس اکسیداتیو نقش مهمی ایفا می‌کنند (۳۵). فیتواستروژن‌ها روی آسیب شناختی ناشی از نقص کولینرژیک در بیماری پارکینسون موثر بوده و در نتیجه از دست‌رفتن نورون‌ها و تضعیف شناخت در موش‌ها را کاهش می‌دهند (۳۶). درمان با فیتواستروژن در موش‌های اواریکتومی شده منجر به بهبود حافظه فضایی دیداری می‌گردد که این بهبود در توانایی شناخت ممکن است به‌علت افزایش حضور mRNA استیل کولین ترانسفراز در قشر فرونتال مغز باشد (۳۷). ایزوفلاوونوئیدهای سویا یک عملکرد محافظت عصبی در مقابل بیماری‌های مربوط به کمبود استروژن بعد از یائسگی (۳۸) نشان می‌دهند. Quercetin ترکیبی فلاوونوئیدی است، آسیب شناختی ناشی از تزریق 6-OHDA را بهبود می‌بخشد (۳۹). Hosseini و همکاران نیز نشان دادند مصرف عصاره برگ زیتون که ترکیبی از فلاوونوئیدها می‌باشد، در درازمدت سبب محافظت نورونی و کاهش اختلال حافظه در برابر آسیب ناشی از 6-OHDA می‌گردد (۴۰). نقش محافظت‌کننده عصبی جنیستین به‌عنوان یک ترکیب با فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۴۱) بر روی سلول‌های عصبی مغز بیماران پارکینسونی گزارش شده است (۴۲). مطالعه حاضر نشان می‌دهد که تاموکسیفن باعث کاهش زمان و افزایش سرعت شناخت برای یافتن سکوی پنهان می‌شود؛ به‌علاوه زمان طی‌شده در ربع هدف را افزایش می‌دهد. تاموکسیفن به‌عنوان تنظیم‌کننده انتخابی گیرنده استروژن، دارای اثرات شبه آگونیست - آنتاگونیست روی گیرنده‌های استروژن در نواحی مختلف مغز می‌باشد (۴۳). تاموکسیفن مانند استروژن منجر به افزایش بیان mRNA استیل کولین ترانسفراز در مغز جلوبی می‌شود (۴۴) و دارای اثرات محافظت عصبی روی نورون‌های دوپامینرژیک نیگرواستریاتال است (۴۵، ۴۶) و همچنین دارای فعالیت آگونیستی استروژن بر روی گیرنده‌های NMDA و AMPA مغز می‌باشد (۴۷). در نتیجه ممکن است تاموکسیفن با اثرات آگونیستی - آنتاگونیستی مشابه با



نمودار ۲. مدت زمانی که موش‌های گروه‌های آزمایش در مرحله بازخوانی اطلاعات آموخته شده در ربع هدف سپری کردند. حروف مشابه: عدم اختلاف معنی دار، حروف نامشابه: اختلاف معنی دار



نمودار ۳. تعداد نورون‌ها در یک میلی متر مربع از ناحیه بخش متراکم جسم سیاه گروه‌های مورد مطالعه. حروف مشابه: عدم اختلاف معنی دار، حروف نامشابه: اختلاف معنی دار



شکل ۲. اسکن فوتومیکروگراف (بزرگنمایی ۲۰۰×) مقطع کروئال (۵ میکرومتر) بخش متراکم جسم سیاه که نشان‌دهنده نورون‌های رنگ‌آمیزی شده به روش نیسل می‌باشد.

جنیستین عمل کند؛ بدین صورت که در غیاب جنیستین به عنوان آگونیست گیرنده های استروژن باشد (۴۳) و در محافظت از سلول های عصبی و افزایش یادگیری و تثبیت حافظه نقش مهمی را ایفا نماید (۴۶). همچنین نتایج نشان می دهد که مخلوط جنیستین و تاموکسیفن نیز موجب کاهش زمان و افزایش سرعت برای یافتن سکوی هدف می شود ولی در مقایسه با گروه جنیستین اثر ضعیفتری داشته و دارای اختلاف معنی دار با این گروه است. داروهای تنظیم کننده گیرنده های انتخابی استروژن از قبیل تاموکسین و رالوکسیفن بسته به ویژگی های شیمیایی خود در بافت هدف دارای هردو اثر آگونیستی و آنتاگونیستی برای استروژن هستند (۴۳، ۴۸). برخی از گزارشات نشان داده اند که تاموکسیفن عملکرد جنیستین را بلاک می کند (۱۷). در نتیجه احتمالاً به دلیل اینکه تاموکسیفن آگونیست نسبی گیرنده های استروژن است با جنیستین رقابت کرده و مانع از باندشدن جنیستین روی گیرنده های استروژنی می شود و بدین صورت تا حدودی اثرات جنیستین را مسدود می کند ولی به طور کامل مانع از بروز اثر جنیستین در اتصال با گیرنده نمی شود. احتمال دیگر این است که جنیستین از مسیری غیر از گیرنده های استروژنی اثرات خود را اعمال کرده است. نتایج بافت شناسی نشان می دهد که تعداد نورون های بخش متراکم جسم سیاه در گروه های پارکینسونی و پارکینسونی-اواریکتومی کاهش یافته است و جنیستین اثر محافظت عصبی بر

روی نورون های بخش متراکم جسم سیاه داشته است. این نتایج با یافته های مطالعات Bagheri و همکارانش که حاکی از کاهش در تعداد نورون های بخش متراکم جسم سیاه در موش های پارکینسونی و عدم این کاهش در موش های دریافت کننده جنیستین می باشد، مطابقت دارد (۴۹). نتایج برخی دیگر از تحقیقات حاکی از عدم تغییر در تعداد نورون های بخش متراکم جسم سیاه در موش های پارکینسونی درمان شده با عصاره Silymarin بدست آمده از گیاه خار مریم است (۵۰). پیش درمان با جنیستین به میزان ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن موجب بهبود فرآیند یادگیری و تثبیت حافظه فضایی در موش های مدل پارکینسونی-اواریکتومی می شود و همچنین از کاهش و آسیب نورون های دوپامینرژیک بخش متراکم جسم سیاه جلوگیری می کند.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کاشان جهت حمایت از این تحقیق و آقایان دکتر اژدر حیدری بخاطر کمک در طراحی پروژه، مهدی تخت فیروزه بخاطر کمک در انجام برخی آزمایشات و نیز مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه، تقدیر و تشکر می گردد.

The Effect of Genistein on Spatial Memory in Ovariectomized Rat Model of Parkinson's Disease

E. Arbabi (MSc)¹, S.A.R. Talaei (PhD)¹, G.A. Hamidi (PhD)¹, A. Azami (PhD)², N. Afsordeh (MSc)¹,
M. Salami (PhD)^{*1}

1. Physiology Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I.R.Iran

2. Anatomical Sciences Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 18(5); May 2016; PP: 44-52

Received: Oct 3th 2015, Revised: Jan 6th 2016, Accepted: Mar 2th 2016.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Impaired learning and memory are the complications of Parkinson's disease. Moreover, estrogen reduction during menopause may impair memory. Given that genistein has neuroprotective and estrogen effects, this study aimed to investigate the effect of genistein on learning and memory of ovariectomized rat model of Parkinson's disease.

METHODS: In this experimental study, 48 female Wistar rats were divided into six groups of eight, including a Parkinsonism group receiving dimethyl sulfoxide solvent, four ovariectomized groups of rats with Parkinson's disease receiving dimethyl sulfoxide solvent, genistein (10 mg/kg), tamoxifen (20 mg/kg), and a mixture of genistein (10 mg/kg) and tamoxifen (20 mg/kg) as pre-treatment for a week, as well as a control group. Nigrostriatal pathway was destroyed by 8 µg of 6-hydroxy-dopamine. Learning and spatial memory were evaluated by Morris water maze test.

FINDINGS: In training and assessment stages, there was a significant difference between the control group and the Parkinsonism and ovariectomized-Parkinsonism groups ($p < 0.0001$). The mean times the ovariectomized-Parkinsonism and Parkinsonism groups remained in the target quadrant were 4.21 ± 0.26 s and 5.94 ± 0.61 s, respectively, which was less compared to the control group (12.15 ± 0.33). In addition, ovariectomy prolonged acquisition ($p = 0.002$) and reduced probe testing time ($p = 0.034$) in the rats with Parkinson's disease. The genistein group spent more time in the target quadrant compared to the group receiving genistein and tamoxifen (11.85 ± 0.46 s vs. 6.37 ± 0.86 s, respectively; $p = 0.0001$).

CONCLUSION: The results showed that genistein improves spatial learning and memory in the ovariectomized rat model of Parkinson's disease.

KEY WORDS: Genistein, Learning, Memory, Ovariectomy, Parkinson.

Please cite this article as follows:

Arbabi E, Talaei SAR, Hamidi GA, Azami A, Afsordeh N, Salami M. The Effect of Genistein on Spatial Memory in Ovariectomized Rat Model of Parkinson's Disease. J Babol Univ Med Sci. 2015;18(5):44-52.

***Corresponding author: M. Salami (PhD)**

Address: Physiology Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Boulevard Ghotb Ravandi, Kashan, I.R.Iran

Tel: +98 31 55621157

Email: Salami-m@kaums.ac.ir

References

- Galvan A, Wichmann T. Pathophysiology of parkinsonism. NIH Public Access.2008; 119(7): 1459-74.
- Aarsland D, Bronnick K, Fladby T. Mild cognitive impairment in Parkinson's disease. Curr Neurol Neuros Rep.2011; 11(4): 371-8.
- Lau YS, Patki G, Das-Panja K, Le WD, Ahmad SO. Neuroprotective effects and mechanisms of exercise in a chronic mouse model of Parkinson's disease with moderate neurodegeneration. Eur j neuros.2011;33(7): 1264-74.
- Hu LF, Lu M, Tiong CX, Gavin S, Dawe, Gang HuJin-Song Bian Neuroprotective effects of hydrogen sulfide on Parkinson's disease rat models. Aging Cell.2010; 9(2): 135-46.
- Gale SK, Sclafani A. Comparison of ovarian and hypothalamic obesity syndromes in the female rat: effects of diet palatability on food intake and body weight. J comp physiol psychol.1977; 91(2): 381-92.
- Brzezinski A, Debi A. Phytoestrogens: the "natural" selective estrogen receptor modulators?. Eur J obstet gynecol reproduct biol.1999;85(1): 47-51.
- Huang YH, Zhang QH. Genistein reduced the neural apoptosis in the brain of ovariectomised rats by modulating mitochondrial oxidative stress. British J nutrit.2010; 104(9): 1297-303.
- Ogawara H, Akiyama T, Watanabe S, Ito N, Kobori M, Seoda Y. Inhibition of tyrosine protein kinase activity by synthetic isoflavones and flavones. J Antibiot.1989; 42(2): 340-3.
- Setchell KD, Zimmer-Nechemias L, Cai J, Heubi JE. Exposure of infants to phyto-oestrogens from soy-based infant formula. Lancet.1997; 350(9070): 23-7.
- 12.An J, Tzagarakis-Foster C, Scharschmidt TC, Lomri N,Leitman DC. Estrogen receptor beta-selective transcriptional activity and recruitment of coregulators by phytoestrogens. J biol chem.2001;276(21): 17808-14.
- Adlercreutz H. Phytoestrogens. State of the art. Environm toxicol pharmacol.1999; 7(3): 201-7.
- Arjmandi BH. The role of phytoestrogens in the prevention and treatment of osteoporosis in ovarian hormone deficiency. J Ame Coll Nut.2001;20(5): 398-402.
- Sannti R, Mäkelä S, Strauss L, Kostian ML. Phytoestrogens: potential endocrine disruptors in males. Toxicol indust health.1998;14(1-2): 223-37.
- Wiener C, Fauci A, Braunwald E. Harrisons principles of internal medicine self-assessment and board review. 18th ed. McGraw Hill Professional; 2012.
- Hawkins MB, Thornton JW, Crews D,James K,Skipper, Dotte A, Thomas P. Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. Proc Nati Acad Sci U S A. 2000; 97(20): 10751-6.
- Wimalawansa SJ. Nitroglycerin therapy is as efficacious as standard estrogen replacement therapy (Premarin) in prevention of oophorectomy-induced bone loss: a human pilot clinical study. J bone miner res.2000; 15(11): 2240-4.
- Wang TT, Sathyamoorthy N, Phang JM. Molecular effects of genistein on estrogen receptor mediated pathways. Carcinogenesis.1996; 17(2): 271-5.
- Shen ZL, Dodge MR, Kahn H, Ballarini R,Eppell SJ. Stress-strain experiments on individual collagen fibrils. Biophys J.2008; 95(8): 3956-63.
- Liu LX, Chen WF, Xie JX, Wong MS. Neuroprotective effects of genistein on dopaminergic neurons in the mice model of Parkinson's disease. Neurosc res.2008; 60(2): 156-61.
- Baluchnejadmojarad T, Roghani M, Nadoushan MR, Bagheri M. Neuroprotective effect of genistein in 6-hydroxydopamine hemi-parkinsonian rat model. Phytothe res.2009; 23(1): 132-5.
- Sarkaki A, Badavi M, Aligholi H,Zand Moghaddam A. Preventive effects of soy meal (+/- isoflavone) on spatial cognitive deficiency and body weight in an ovariectomized animal model of Parkinson's disease. Pakistan J Biol Sci.2009; 12(20): 1338-45.
- Paxinos GaCW, 5th ed. The rat brain in stereotaxic coordinates. Elsevier: Academic press; 2004.

- 23.Kinney JW, Starosta G, Crawley JN. Central galanin administration blocks consolidation of spatial learning. *Neurobiol learn mem.*2003; 80(1): 42-54.
- 24.Tamtaji O, Taghizadeh M, Takhtfiroozeh S,Talaei S. The Effect of *Elaeagnus Angustifolia* Water Extract on Scopolamine-Induced Memory Impairment in Rats. *Univ Med Sci Zanjan.* 2014; 22(95): 101-11.[In Persian].
- 25.Morris RG. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn motivat.*1981; 12(2): 239-60.
- 26.Suemoto T, Okamura N, Shiomitsu T,Suzuki M,Akatsu H,Yamamoto T,et al. In vivo labeling of amyloid with BF-108. *Neurosci Res.*2004; 48(1): 65-74.
- 27.Williams A, Gill S, Varma T,Jenkinson C,Quinn N, Mitchell R, et al. Deep brain stimulation plus best medical therapy versus best medical therapy alone for advanced Parkinson's disease (PD SURG trial): a randomised, open-label trial. *Lancet Neurol.*2010; 9(6): 581-91.
- 28.Soto-Otero R, Méndez-Álvarez E, Hermida-Ameljeiras Á, María Muñoz-Patiño A ,Labandeira-Garcia J. Autoxidation and Neurotoxicity of 6-Hydroxydopamine in the Presence of Some Antioxidants. *J neurochem.*2000; 74(4): 1605-12.
- 29.De Leonibus E, Pascucci T, Lopez S, Oliverio A, Amalric M, Mele A. Spatial deficits in a mouse model of Parkinson disease. *Psychopharmacology.* 2007; 194(4): 517-25.
- 30.Azizi-Malekabadi H, Hosseini M, Saffarzadeh F, Karami R,Khodabandehloo F. Chronic treatment with the nitric oxide synthase inhibitor, L-NAME, attenuates estradiol-mediated improvement of learning and memory in ovariectomized rats. *Clinics.*2011; 66(4): 673-9.
- 31.Fukui K, OMOI NO, Hayasaka T, S Suzuki, Kouichi BE, Urano SH .Cognitive impairment of rats caused by oxidative stress and aging, and its prevention by vitamin E. *Ann New York Acad Sci.*2002; 959(1): 275-84.
- 32.Pourganji M, Hosseini M, Soukhtanloo M, Zabihi H, Al-reza Hadjzadeh M. Protective Role of Endogenous Ovarian Hormones Against Learning and Memory Impairments and Brain Tissues Oxidative Damage Induced by Lipopolysaccharide. *Iran Red Crescent Med J.*2014; 16(3):13954.
- 33.Elsabagh S, Hartley DE, File SE. Cognitive function in late versus early postmenopausal stage. *Maturitas.*2007; 56(1): 84-93.
- 34.Bagheri M, Joghataei MT, Mohseni S,Roghani M.Genistein ameliorates learning and memory deficits in amyloid beta(1-40) rat model of Alzheimer's disease. *Neurobiol learn mem.*2011; 95(3): 270-6.
- 35.Bhutada P, Mundhada Y, Bansod K,Tawari S,Mundhada D,Dixit P, et al. Ameliorative effect of quercetin on memory dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurobiol learn mem.*2010; 94(3): 293-302.
- 36.Tee MK, Rogatsky I, Tzagarakis-Foster C, Cvorov A,Jinping An, Christy RJ, et al. Estradiol and selective estrogen receptor modulators differentially regulate target genes with estrogen receptors α and β . *Molecul biol cell.*2004; 15(3): 1262-72.
- 37.Blum-Degen D, Haas M, Pohli S,Harth R,Römer W,Riederer P, et al. Scavestrogens protect IMR 32 cells from oxidative stress-induced cell death. *Toxicol appl pharmacol.*1998; 152(1): 49-55.
- 38.Lee Y-B, Lee HJ, Won MH, , Hwang IK, Kang TCh,Lee JY,et al. Soy isoflavones improve spatial delayed matching-to-place performance and reduce cholinergic neuron loss in elderly male rats. *J nutri.*2004; 134(7): 1827-31.
- 39.Pan Y, Anthony M, Clarkson TB. Effect of estradiol and soy phytoestrogens on choline acetyltransferase and nerve growth factor mRNAs in the frontal cortex and hippocampus of female rats. *Experim Biol Med.*1999; 221(2): 118-25.
- 40.Jayagopal V, Albertazzi P, Kilpatrick ES, Elaine M, Warth H, Paul E, et al. Beneficial effects of soy phytoestrogen intake in postmenopausal women with type 2 diabetes. *Diabetes Care.*2002; 25(10): 1709-14.
- 41.Liang HW, Qiu SF, Shen J, Li-Na Sun, Jing-Ye Wang, Iain C, et al. Genistein attenuates oxidative stress and neuronal damage following transient global cerebral ischemia in rat hippocampus. *Neurosci lett.*2008; 438(1): 116-20.

- 42.Kish SJ, Morito C, Hornykiewicz O. Glutathione peroxidase activity in Parkinson's disease brain. *Neurosc lett*.1985; 58(3): 343-6.
- 43.Zheng H, Kangas L, Härkönen PL. Comparative study of the short-term effects of a novel selective estrogen receptor modulator, ospemifene, and raloxifene and tamoxifen on rat uterus. *J stero biochemi molecuol biol*.2004; 88(2): 143-56.
- 44.McMillan PJ, LeMaster AM, Dorsa DM. Tamoxifen enhances choline acetyltransferase mRNA expression in rat basal forebrain cholinergic neurons. *Molecul bra res*.2002; 103(1): 140-5.
- 45.Dluzen DE. Neuroprotective effects of estrogen upon the nigrostriatal dopaminergic system. *J neurocytol*.2000; 29(5-6): 387-99.
- 46.Dluzen DE, Mcdermott JL. Estrogen, Anti-Estrogen, and Gender. *Ann New York Acad Sci*.2002; 965(1): 136-56.
- 47.Cyr M, Ghribi O, Thibault C, Morissette M, Landry M, Di Paolo T. Ovarian steroids and selective estrogen receptor modulators activity on rat brain NMDA and AMPA receptors. *Brain Res Rev*.2001; 37(1): 153-61.
- 48.O'Neill K, Chen S, Diaz Brinton R. Impact of the selective estrogen receptor modulator, tamoxifen, on neuronal outgrowth and survival following toxic insults associated with aging and Alzheimer's disease. *Experiment neurol*. 2004; 188(2): 268-78.
- 49.Bagheri M. Neuroprotective Effect of Genistein: Studies in Rat Models of Parkinson's and Alzheimer's Disease. *Linköping Univ Med Dissert*. 2012;1288: 1-72.
- 50.Baluchnejadmojarad T, Roghani M, Mafakheri M. Neuroprotective effect of silymarin in 6-hydroxydopamine hemi-parkinsonian rat: involvement of estrogen receptors and oxidative stress. *Neurosci Lett*. 2010; 480(3): 206-10.