

اثر گنادوتروپین کوریونی انسانی و ویتامین E بر تراکم سلولی ناحیه CA1 هیپوکامپ

و توانایی یادگیری و حافظه به دنبال ایسکمی - ریپرفیوژن در موش سوری

اسرین باباجحیان^۱، دکترهما رسولی^۲، دکترمجید کانی^۳، آرش سروآزاد^۴، دکتر منصوره سلیمانی^{۵*}، دکتر ملیحه نوبخت^۶

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم تشریحی، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران. ۲- استادیار گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران. ۳- استادیار گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران. ۴- دانشجوی دکتری علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران. ۵- استادیار، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران. ۶- استادیار گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران.

چکیده

زمینه و هدف: ایسکمی مغزی و کاهش جریان خون مغزی باعث تولید رادیکال‌های سوپرا اکسید در بافت مغز و در نتیجه تخریب آن می‌شود. سلول‌های پیرامیدال ناحیه CA1 هیپوکامپ به شدت نسبت به کاهش اکسیژن حساسند. این مطالعه به منظور تعیین اثر گنادوتروپین کوریونی انسانی (HCG) و ویتامین E بر تراکم سلولی ناحیه CA1 هیپوکامپ و توانایی یادگیری و حافظه به دنبال ایسکمی - ریپرفیوژن در موش سوری انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی ۴۰ سر موش سوری نر در گروه‌های شام، ایسکمی، HCG، ویتامین E و HCG+ویتامین E قرار گرفتند. ایسکمی با بستن شریان کاروتید مشترک در دو طرف به مدت ۱۵ دقیقه القاء گردید. ویتامین E هنگام برقراری ریپرفیوژن به صورت تک دوز داخل صفاقی و HCG ۴۸ ساعت پس از ایسکمی به صورت داخل عضلانی به مدت ۵ روز تجویز شد. بعد از تکمیل دوره درمان توانایی یادگیری موش‌ها در شاتل باکس مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی بافت شناسی مغز حیوانات به روش رنگ‌آمیزی نیسل برای شمارش سلول‌های سالم در ناحیه هیپوکامپ انجام شد.

یافته‌ها: تجویز توأم HCG و ویتامین E به دنبال ایسکمی - ریپرفیوژن موجب افزایش تراکم سلول‌های سالم شد و اختلاف معنی‌داری در تعداد نورون‌های پیرامیدال CA1 هیپوکامپ موش‌ها در گروه درمان نسبت به گروه ایسکمی مشاهده گردید ($P < 0.001$). معیار حافظه حیوانات در گروه درمان توأم با HCG و ویتامین E افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه ایسکمی داشت ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: استفاده توأم HCG و ویتامین E اثر بیشتری بر بهبود عملکرد حافظه و یادگیری و بازسازی تراکم سلولی ناحیه CA1 هیپوکامپ دارد.

کلید واژه‌ها: ایسکمی ریپرفیوژن، هیپوکامپ، ناحیه CA1، گنادوتروپین کوریونی انسانی، ویتامین E

* نویسنده مسؤول: دکتر منصوره سلیمانی، پست الکترونیکی mansourehsoleimani@gmail.com

نشانی: تهران، بزرگراه همت، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی، تلفن ۰۲۱-۸۲۹۴۴۵۶۹، نمابر ۸۸۶۲۲۸۹

وصول مقاله: ۹۱/۵/۴، اصلاح نهایی: ۹۱/۹/۷، پذیرش مقاله: ۹۱/۱۰/۱۰

مقدمه

شخصی خود نیز نیستند (۱). سکنه هر سنی را درگیر می‌کند؛ اما شیوع آن در سنین بالای ۴۵ سال دو برابر شده و در سنین بالای ۷۵ سال، ۱-۲ درصد به شیوع آن اضافه می‌شود (۲). علل متعددی برای بروز سکنه مغزی وجود دارند؛ ولی به‌طور کلی می‌توان این علل را به دو گروه ایسکمیک و هموراژیک تقسیم‌بندی نمود (۳و۱). ایسکمی در پی انسداد عروق مغز ایجاد می‌شود و این انسداد می‌تواند در هر کدام از عروق مغزی رخ دهد. برای بررسی اثرات ایسکمی از مدل‌های مختلفی مانند بستن شریان‌های کاروتید مشترک یا انسداد شریان مغزی میانی استفاده می‌شود (۴-۶). اثر این

آسیب مغزی به دلیل سکنه به عنوان یک معطل بزرگ عمومی در سطح دنیا مطرح است. سکنه مغزی می‌تواند به عنوان یک نقص نورولوژیک موضعی ناگهانی غیر تشنجی تعریف شود. این عارضه شایع‌ترین بیماری نورولوژیک تهدیدکننده حیات و سومین علت مرگ بعد از بیماری‌های قلبی و سرطان در آمریکا است (۱). در ایالات متحده آمریکا دو میلیون نفر که از سکنه مغزی جان سالم به‌در برده‌اند، زندگی می‌کنند. اکثر آنها از ناتوانی‌های حرکتی و اختلالات دیگر رنج می‌برند. به طوری که حتی قادر به انجام اعمال

انسدادها بر روی نقاط مختلف مغز از جمله کورتکس (V)، هیپوتالاموس (A)، هیپوکامپ (۹) و تالاموس (۱۰) مورد مطالعه قرار گرفته است. با توجه به این که ناحیه هیپوکامپ منطقه‌ای کلیدی در فرآیند یادگیری و حافظه است؛ مطالعه این ناحیه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. ناحیه هیپوکامپ دارای نواحی CA1، CA2، CA3، هیپوکامپ و هیپوسانتوس است. ناحیه CA1 حساس‌ترین ناحیه هیپوکامپ به ایسکمی است (۹). متعاقب ایسکمی مواد نوروپروتکتیو مختلفی از جمله آنتی‌اکسیدان‌ها، آلبومین، منیزیم سولفات و اریتروپویتین برای کاهش صدمات مغزی ناشی از آن استفاده می‌شود (۱۱). گنادوتروپین کوریونی انسانی (HCG) و ویتامین E (به عنوان یک آنتی‌اکسیدان) از جمله این مواد نوروپروتکتیو هستند (۱۱). HCG هورمونی است که از جفت طی حاملگی ترشح می‌شود. این هورمون و عامل رشد عصبی (NGF) به یک خانواده از عوامل رشد (cysteine-knot growth factor) تعلق دارند (۱۲). HCG از سد خونی - مغزی عبور می‌کند و گیرنده‌های آن توسط نورون‌های مغزی بیان می‌شود (۱۳ و ۱۴). ویتامین E به علت توانایی در مقابله با ROS (Reactive Oxygen Species) که طی ایسکمی آزاد می‌شود؛ به عنوان یک عامل نوروپروتکتیو موثر مدنظر است (۱۵). با توجه به این که تاکنون مطالعه‌ای در رابطه با مصرف همزمان این دو عامل کارآمد نوروپروتکتیو انجام نشده است؛ این مطالعه به منظور تعیین اثر گنادوتروپین کوریونی انسانی (HCG) و ویتامین E بر تراکم سلولی ناحیه CA1 هیپوکامپ و توانایی یادگیری و حافظه به دنبال ایسکمی - ریپرفیوژن در موش سوری انجام شد.

روش بررسی حیوانات

این مطالعه روی ۴۰ سر موش سوری نر با وزن ۳۰-۴۰ گرم که به روش تصادفی از حیوانخانه انتخاب شده بودند؛ در دانشکده پزشکی (پردیس همت) دانشگاه علوم پزشکی تهران طی تابستان ۱۳۹۰ انجام شد.

تمام حیوانات در شرایط استاندارد حیوانخانه (۱۲ ساعت روشنایی - تاریکی، دمای 24 ± 1 درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند و در تمام طول دوره آزمایش، آب و غذای کافی قبل و بعد از ایسکمی در اختیار داشتند.

این مطالعه با تصویب کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران و طبق پروتکل اصول کار با حیوانات انجام شد.

گروه‌های آزمایش

موش‌ها به صورت تصادفی در پنج گروه هشت تایی به شرح زیر قرار داده شدند:

الف) گروه شم که مورد جراحی قرار گرفتند؛ ولی ایسکمی به آنها القا نشد. همچنین نرمال سالین به شکل داخل صفاقی و عضلانی

به آنها تزریق شد.

ب) گروه ایسکمی که مورد جراحی قرار گرفتند و القاء ایسکمی انجام شد. همچنین نرمال سالین به شکل داخل صفاقی و عضلانی به آنها تزریق شد.

ج) گروه HCG که ۴۸ ساعت پس از ایسکمی به مدت ۵ روز HCG را به میزان 5 USP/30g (۱۶) به صورت تزریق عضلانی (هر روز یک دوز) دریافت کردند.

د) گروه ویتامین E که به هنگام ریپرفیوژن ویتامین E را به صورت تک دوز ۵۰ mg/kg (۱۷) به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. از شکل محلول در آب ویتامین E با نام تجاری Trolox استفاده شد.

ه) گروه HCG توأم با ویتامین E که HCG را ۴۸ ساعت پس از القای ایسکمی در ۵ روز به میزان 5 USP/30g (هر روز یک دوز) به صورت تزریق عضلانی و ویتامین E را به صورت تک دوز ۵۰ mg/kg به هنگام ریپرفیوژن به صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

القاء ایسکمی

موش‌های سوری با استفاده کتتامین ۶۰ mg/kg (σ) و گزیلازین ۱۰ mg/kg (σ)، عمیقاً بی‌هوش شدند و در تمام مدت جراحی بدن حیوان گرم نگه داشته شد. ایسکمی با بستن شریان‌های کاروتید مشترک القاء شد. بدین صورت که سر حیوان بر روی تخته جراحی ثابت شد. سپس برش عمودی در خط وسط و قدام گردن توسط قیچی ایجاد و پس از کنار زدن غده تیروئید، عضله اوموئیوئید (عضلات قدامی تحتانی گردن) و غلاف کاروتید در طرفین نای در معرض دید قرار گرفت. پس از باز کردن غلاف کاروتید شریان کاروتید مشترک به دقت از عصب واگ و ورید ژوگولار داخلی جدا و با استفاده از کلمپ‌های مخصوص (میکروبولداگ) شریان‌های دو طرف به مدت ۱۵ دقیقه مسدود شد. پس از این مدت (۱۵ دقیقه) کلمپ‌ها به منظور برقراری مجدد جریان خون (ریپرفیوژن) باز شدند. به محض باز کردن کلمپ و برقراری جریان خون ویتامین E با دوز ذکر شده در گروه‌های دریافت کننده ویتامین E به صورت داخل صفاقی تزریق شد. در نهایت پس از برگرداندن عضلات و غده تیروئید به محل خود، پوست محل ضایعه با نخ ۴ صفر بخیه زده شد (۶). بعد از به‌هوش آمدن موش‌ها به حیوانخانه منتقل شدند. ۴۸ ساعت پس از ایسکمی به مدت ۵ روز HCG به میزان 5 USP/30g (هر روز یک دوز) به صورت تزریق عضلانی به حیوانات گروه‌های مربوطه تجویز شد.

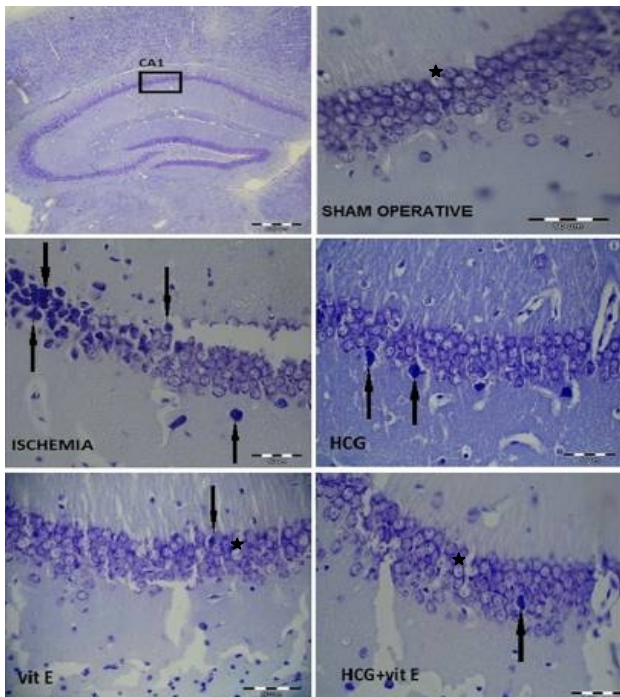
آزمون حافظه

روش اندازه‌گیری توانایی یادگیری و عملکرد حافظه، یادگیری احترازی غیرفعال (passive avoidance learning) و دستگاه مورد استفاده شاتل باکس بود. این دستگاه از دو اتاقک مجزا با

داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS-16 و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند و در موارد معنی دار بودن اختلاف، آزمون Tukey استفاده گردید. مقادیر کمتر از ۰/۰۵ به عنوان معنی دار بودن اختلاف از نظر آماری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میانگین و انحراف معیار میزان حافظه و یادگیری در گروه‌های ایسکمیک، دریافت کننده HCG و دریافت کننده ویتامین E به ترتیب $101/28 \pm 137/83$ ، $104/91 \pm 223/14$ و $254 \pm 112/67$ تعیین شد. میزان حافظه در گروه درمانی HCG توأم با ویتامین E ($296/43 \pm 9/44$) تعیین شد که در مقایسه با گروه ایسکمیک کاهش آماری معنی داری نشان داد ($P < 0/05$) (نمودار یک). نتایج آزمون واریانس یک طرفه نشان داد که تفاوتی در STL بین گروه‌های مختلف وجود ندارد.



شکل ۱: سلول‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ در برش کرونال در سطح ۲/۷ نسبت به برگما و با رنگ آمیزی کرزیل ویوله در گروه‌های مورد مطالعه. علامت ستاره نورون‌های سالم دارای هسته سالم و یوکروماتین و نوک پیکان سلول پیکنوزه با هسته هتروکروماتین را نشان می‌دهند. رنگ آمیزی نیسل (بزرگ نمایی $\times 400$)

میانگین تعداد سلول‌های یوکروماتین در ناحیه CA1 هیپوکامپ در گروه ایسکمیک کاهش معنی داری نسبت به گروه شم داشت. در گروه‌های درمانی مرگ سلولی نورون‌های پیرامیدال ناحیه CA1 به طور چشمگیری کمتر و تعداد سلول‌های یوکروماتین به طور معنی داری بیشتر از گروه ایسکمیک بود (شکل یک و نمودار ۲).

میانگین تعداد سلول‌های یوکروماتین در ناحیه CA1 هیپوکامپ گروه‌های HCG، ویتامین E، HCG توأم با ویتامین E، شم و ایسکمیک به ترتیب $47/62 \pm 12/63$ ، $47/62 \pm 12/63$ ، $46/25 \pm 20/76$ ،

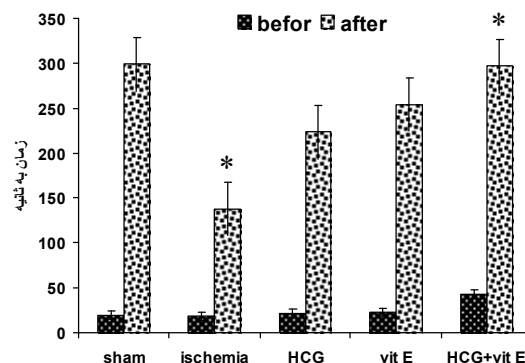
ابعاد 20×30 سانتی متر و ارتفاع ۲۰ سانتی متر تشکیل شده است که به وسیله یک دریچه گیوتینی به هم مرتبطند. یکی از اتاقک‌ها به وسیله لامپ ۴۰ وات که روی سقف آن قرار دارد؛ روشن (اتاقک روشن) و دیگری تاریک (اتاقک تاریک) است. در کف هر دو بخش میله‌های فلزی که به قطر یک میلی‌متر و به فاصله یک سانتی متر از هم، قرار گرفته‌اند؛ وجود دارد و می‌توان با استفاده از استیمولیتور متصل به همین میله‌ها شوک الکتریکی با ولتاژ و مدت زمان دلخواه در بخش تاریک به پای حیوان وارد نمود. در ابتدا برای آشنایی حیوان با دستگاه، هر حیوان در قسمت روشن قرار گرفت و پس از پنج ثانیه که درب بین دو قسمت باز شد؛ طبق تمایل طبیعی به محیط تاریک، به قسمت تاریک رفت. پس از بسته شدن درب و گذشت ۳۰ ثانیه از حضور در قسمت تاریک، حیوان خارج گردید. برای انجام آزمون یادگیری ۳۰ دقیقه بعد، موش در محفظه روشن قرار گرفت و پس از ۳۰ ثانیه خوگیری موش به محفظه درب بین دو اتاقک باز شد و به موش اجازه داده شد تا وارد اتاقک تاریک شود و هنگامی که پاهای عقبی موش وارد اتاق تاریک شد؛ درب بین دو قسمت بسته شد و یک شوک الکتریکی با شدت ۰/۲۵ میلی آمپر تا ۲۰ ولت به مدت دو ثانیه از طریق میله‌های کف محفظه تاریک به پای حیوان وارد شد. زمان سیری شده قبل از ورود با اتاقک تاریک ثبت شد. حیوان چند ثانیه بعد از قسمت تاریک خارج می‌شد.

برای انجام آزمون حافظه (Retention) ۲۴ ساعت پس از آزمون یادگیری، موش در قسمت روشن قرار گرفت و ۳۰ ثانیه بعد درب بین دو قسمت باز شد. سپس تأخیر در ورود به قسمت تاریکی گردید. هنگامی که تا ۳۰۰ ثانیه موش از ورود به قسمت تاریک اجتناب نمود؛ آزمون خاتمه یافت (۱۸).

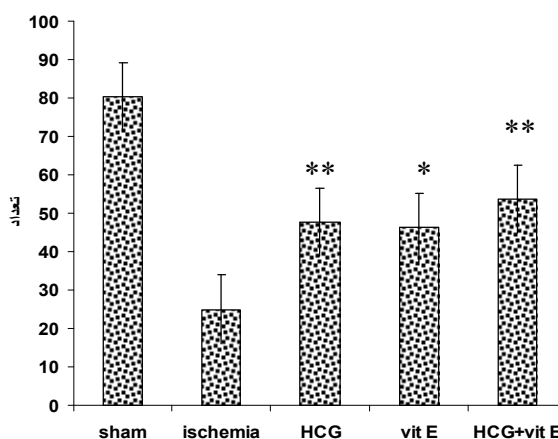
شمارش سلولی

برای بررسی کاهش تعداد سلول به دنبال ایسکمیک در ناحیه CA1 هیپوکامپ، از رنگ آمیزی کرزیل ویوله استات ۰/۱ درصد استفاده شد. در این رنگ آمیزی سلول‌های سالم به صورت سلول‌های یوکروماتین گرد دیده می‌شوند. از هر گروه ۴ سر موش و از هر موش تعداد ۵ برش برای رنگ آمیزی نیسل انتخاب شد. بعد از تهیه عکس، شمارش سلولی در سطح 53500 میکرومتر مربع و در مقاطع با فاصله ۲/۷ میلی‌متر نسبت به برگما در ناحیه CA1 با بزرگ‌نمایی (400x) توسط نرم‌افزار OLYSIA BioReport انجام شد. برای این منظور ۱۰ روز بعد از القاء ایسکمیک (پس از کامل شدن دوره تجویز و انجام تست شاتل باکس و جمع‌آوری اطلاعات) مغز حیوانات پس از انجام پرفیوژن داخل قلبی با پارافرمالید ۴ درصد از حفره جمجمه خارج و پس از آماده‌سازی بافتی با پارافین قالب‌گیری شد. سپس برش‌های کرونال به ضخامت ۵ میکرون تهیه و بر روی لام‌های سیلانه منتقل و با رنگ کرزیل ویوله رنگ آمیزی شد.

در گروه‌های درمانی مرگ سلولی نورون‌های پیرامیدال ناحیه CA1 به طور چشمگیری کمتر و تعداد سلول‌های یوکروماتین به طور معنی‌داری بیشتر از گروه ایسکمی بود ($P < 0/01$) (شکل یک و نمودار ۲).



نمودار ۱: زمان تاخیر در ورود به محفظه تاریک قبل و بعد از دریافت شوک در گروه‌های تحت بررسی ($P < 0/05$ *)



نمودار ۲: تعداد سلول‌های یوکروماتین ناحیه CA1 هیپوکامپ در گروه‌های تحت بررسی ($P < 0/01$ **, $P < 0/01$ *)

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که درمان ترکیبی HCG و ویتامین E توانست موجب کاهش مرگ سلول‌های پیرامیدال ناحیه CA1 هیپوکامپ و بهبود عملکرد حافظه و یادگیری حیوانات به دنبال ایسکمی گردد.

در مطالعه Schmidt و Reymann مدل ایسکمی گلوبال مغزی موجب نورودژنراسیون وسیع در ناحیه CA1 هیپوکامپ، استریاتوم و نئوکورتکس گردید (۱۹) که موافق با مطالعه حاضر است. به طوری که بستن هردو کاروتید مشترک به مدت ۱۵ دقیقه موجب مرگ سلولی گسترده در ناحیه CA1 هیپوکامپ شد. به نحوی که کاهش معنی‌داری در میانگین تعداد سلول‌های ناحیه CA1 گروه ایسکمی نسبت به سایر گروه‌ها و نیز تغییرات معنی‌داری در آزمایشات

رفتاری حیوانات مشاهده شد.

در مطالعه Tagami و همکاران ویتامین E آپوپتوز نورون‌های ناشی از ایسکمی و برقراری مجدد جریان خون مغزی را کاهش داد و نتیجه گیری شد که ویتامین E یک عامل مهم در کاهش آسیب رادیکال‌های آزاد به نورون‌های ناحیه هیپوکامپ است (۲۰). در مطالعه حاضر نیز در گروه درمانی دریافت کننده ویتامین E افزایش معنی‌داری در میانگین تعداد سلول‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ نسبت به گروه ایسکمی مشاهده شد و در تست حافظه زمان تاخیر در ورود به محفظه تاریک در این گروه افزایش یافت؛ ولی تفاوت نسبت به گروه ایسکمی معنی‌دار نبود.

هورمون HCG در خانواده عوامل رشد به عنوان عامل رشد عصبی شناخته شده است (۲۱). از سد خونی - مغزی عبور می‌کند و وارد مایع مغزی نخاعی می‌شود (۲۲) و گیرنده آن به طور معمول در مغز موش صحرائی بالغ وجود دارد (۲۳). در مطالعات اخیر وجود گیرنده‌های هورمون جسم زرد (LH) و گنادوتروپین جفتی انسان (HCG) در مغز موش با بالاترین تراکم در داخل هیپوکامپ و شکنج دندانه‌دار نشان داده شده است (۱۳).

Finklestein و همکاران بیان نمودند که مکانسیم احتمالی اثر HCG به نقش آن به عنوان یک عامل رشد مربوط است. سطح عوامل رشد به صورت خودبه‌خود در بسیاری از مناطق مغز پس از سکته مغزی افزایش می‌یابد و یک عامل مهم در روند ترمیم و بهبود خودبه‌خودی به‌شمار می‌روند (۲۴). عوامل رشد موجب القاء نوروزن و انژیوزن می‌شوند و آسیب‌های ناشی از ایسکمی مغزی از طریق اثر آنتی آپوپتوتیک و ضدالتهابی آنها کاهش می‌یابد (۲۵). افزایش سطوح عوامل رشد با تجویز آگوزون آن در طی ۱-۷ روز پس از سکته مغزی، سبب بهبود بیشتری در نتایج طولانی مدت در آزمایشات بالینی می‌شود (۲۶). شروع درمان ۲۴ ساعت پس از مدل حیوانی سکته مغزی در موش صحرائی منجر به بهبود نتایج رفتاری در طولانی مدت می‌شود (۲۷).

در گروه درمان با HCG نیز افزایش تراکم سلولی نسبت به گروه ایسکمی معنی‌دار و STL (به عنوان معیار حافظه) افزایش یافت؛ ولی تفاوت نسبت به گروه ایسکمی معنی‌دار نبود.

با توجه به نتایج بالا انتظار کاهش قابل توجهی در ضایعات ایسکمی را در گروه درمان ترکیبی با HCG و ویتامین E داشتیم که با نتایج حاصل از این تست‌ها همخوانی داشت. به نحوی که استفاده همزمان از این دو ماده موجب افزایش در میانگین تعداد سلول‌های یوکروماتین ناحیه CA1 هیپوکامپ در مقایسه با دو گروه درمانی دیگر شد و همچنین افزایش STL در تست حافظه نسبت به گروه ایسکمی معنی‌دار گردید.

با توجه به مطالعات انجام گرفته در مورد مکانسیم‌های این مواد با توجه به یافته‌های این مطالعه به نظر می‌رسد که تجمیع خواص

توأم ویتامین E و هورمون گنادوتروپین کوریونی انسانی (HCG) اثر بیشتری بر بهبود عملکرد حافظه و یادگیری و بازسازی تراکم سلولی در ناحیه CA1 هیپوکامپ به دنبال ایسکمی مغزی دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه اسرین باباجیان برای اخذ کارشناسی ارشد در رشته علوم تشریحی از دانشگاه علوم پزشکی تهران بود. بدین وسیله از کارکنان مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران سپاسگزاری می‌گردد.

References

- Haaga Yohn R, Lanzieri Charles F. Computed tomography and magnetic resonance imaging of the whole body. 3rd. Philadelphia: Mosby. 1997; pp:453,502.
- Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*. 2008 Sep; 55(3):310-8.
- Cummins RO. Textbook of advanced cardiac life support. 1st. Philadelphia: Harley and Belus. 1995; pp:123-35.
- Ohyama H, Hosomi N, Takahashi T, Mizushige K, Kohno M. Thrombin inhibition attenuates neurodegeneration and cerebral edema formation following transient forebrain ischemia. *Brain Res*. 2001 Jun;902(2):264-71.
- Wang RY, Yang YR, Yu SM. Protective effects of treadmill training on infarction in rats. *Brain Res*. 2001 Dec;922(1):140-3.
- Yanamoto H, Nagata I, Niitsu Y, Xue JH, Zhang Z, Kikuchi H. Evaluation of MCAO stroke models in normotensive rats: standardized neocortical infarction by the 3VO technique. *Exp Neurol*. 2003 Aug;182(2):261-74.
- Liu Y, Belayev L, Zhao W, Busto R, Belayev A, Ginsberg MD. Neuroprotective effect of treatment with human albumin in permanent focal cerebral ischemia: histopathology and cortical perfusion studies. *Eur J Pharmacol*. 2001 Oct;428(2):193-201.
- Legos JJ, Mangoni AA, Read SJ, Campbell CA, Irving EA, Roberts J, et al. Programmable microchip monitoring of post-stroke pyrexia: effects of aspirin and paracetamol on temperature and infarct size in the rat. *J Neurosci Methods*. 2002 Jan; 113(2):159-66.
- Butler TL, Kassed CA, Sanberg PR, Willing AE, Pennypacker KR. Neurodegeneration in the rat hippocampus and striatum after middle cerebral artery occlusion. *Brain Res*. 2002 Mar; 929(2):252-60.
- Belayev L, Busto R, Zhao W, Fernandez G, Ginsberg MD. Middle cerebral artery occlusion in the mouse by intraluminal suture coated with poly-L-lysine: neurological and histological validation. *Brain Res*. 1999 Jul;833(2):181-90.
- Sutherland BA, Minnerup J, Balami JS, Arba F, Buchan AM, Kleinschnitz C. Neuroprotection for ischaemic stroke: translation from the bench to the bedside. *Int J Stroke*. 2012 Jul;7(5):407-18.
- Lapthorn AJ, Harris DC, Littlejohn A, Lustbader JW, Canfield RE, Machin KJ, et al. Crystal structure of human chorionic gonadotropin. *Nature*. 1994 Jun; 369(6480):455-61.
- Lukacs H, Hiatt ES, Lei ZM, Rao CV. Peripheral and intracerebroventricular administration of human chorionic gonadotropin alters several hippocampus-associated behaviors in cycling female rats. *Horm Behav*. 1995 Mar;29(1):42-58.
- Lei ZM, Rao CV, Kornyei JL, Licht P, Hiatt ES. Novel expression of human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone

آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌آپوپتوتیکی در هنگام بروز ایسکمی می‌تواند از آسیب‌دیدگی نورون‌های زیادی جلوگیری کرده؛ همچنین مانع از مرگ تعداد زیادی از نورون‌های آسیب‌دیده شود. هر دو این مکانیسم‌ها باعث حفظ نورون‌های زیادی از مرگ می‌شود که در نهایت باعث حفظ عملکرد هیپوکامپ در رابطه با توانایی یادگیری و حافظه می‌شوند.

نتیجه‌گیری

نتایج رفتاری و هیستولوژیک این مطالعه نشان داد که استفاده

receptor gene in brain. *Endocrinology*. 1993 May;132(5):2262-70.

- Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS, Said TM. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod Biomed Online*. 2004 Jun;8(6):616-27.
- Weiss S, Enwere E, Andersen L, Gregg Ch. Pheromones and the luteinizing hormone for inducing proliferation of neural stem cells and neurogenesis. US Patent 0178009. 21 Jul 2011.
- Wang HK, Park UJ, Kim SY, Lee JH, Kim SU, Gwag BJ, et al. Free radical production in CA1 neurons induces MIP-1alpha expression, microglia recruitment, and delayed neuronal death after transient forebrain ischemia. *J Neurosci*. 2008 Feb;28(7):1721-7.
- Sato T, Tanaka Ki, Ohnishi Y, Teramoto T, Irifune M, Nishikawa T. Effects of steroid hormones on (Na⁺, K⁺)-ATPase activity inhibition-induced amnesia on the step-through passive avoidance task in gonadectomized mice. *Pharmacol Res*. 2004 Feb; 49(2):151-9.
- Schmidt W, Reymann KG. Proliferating cells differentiate into neurons in the hippocampal CA1 region of gerbils after global cerebral ischemia. *Neurosci Lett*. 2002 Dec;334(3):153-6.
- Tagami M, Ikeda K, Yamagata K, Nara Y, Fujino H, Kubota A, et al. Vitamin E prevents apoptosis in hippocampal neurons caused by cerebral ischemia and reperfusion in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Lab Invest*. 1999 May;79(5):609-15.
- Lei ZM, Rao CV. Neural actions of luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin. *Semin Reprod Med*. 2001; 19(1):103-9.
- Davidoff AW, Hill MD, Cramer SC, Yang Y, Moore A. Open labeled, uncontrolled pharmacokinetic study of a single intramuscular hCG dose in healthy male volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2009 Aug;47(8):516-24.
- al-Hader AA, Tao YX, Lei ZM, Rao CV. Fetal rat brains contain luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptors. *Early Pregnancy*. 1997 Dec;3(4):323-9.
- Finklestein SP, Caday CG, Kano M, Berlove DJ, Hsu CY, Moskowitz M, Klagsbrun M. Growth factor expression after stroke. *Stroke*. 1990 Nov;21(11 Suppl):III122-4.
- Lanfranco S, Locatelli F, Corti S, Candelise L, Comi GP, Baron PL, et al. Growth factors in ischemic stroke. *J Cell Mol Med*. 2011 Aug;15(8):1645-87.
- Kawamata T, Ren J, Chan TC, Charette M, Finklestein SP. Intracisternal osteogenic protein-1 enhances functional recovery following focal stroke. *Neuroreport*. 1998 May;9(7):1441-5.
- Belayev L, Khoutorova L, Zhao KL, Davidoff AW, Moore AF, Cramer SC. A novel neurotrophic therapeutic strategy for experimental stroke. *Brain Res*. 2009 Jul;1280:117-23.

Original Paper

Effect of human chorionic gonadotropin and vitamine E on cellular density of CA1 hippocampal area, learning ability and memory, following ischemia - reperfusion injury in mice

Babahajian A (BSc)¹, Rasouli H (PhD)², Katebi M (PhD)³
Sarveazad A (MSc)⁴, Soleimani M (PhD)*⁵, Nobakht M (PhD)⁶

¹MSc Student of Anatomy, Cellular and Molecular Research Center, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ²Assistant Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ³Assistant Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar-Abbas, Iran. ⁴PhD Candidate in Anatomy, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ⁵Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center, Department of Anatomy, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ⁶Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract

Background and Objective: Reduction in cerebral blood flow following cereblal ischemia cause the production of oxygen free radicals and finally leads to brain tissue destruction. Pyramidal cells of the CA1 region of hippocampus are highly sensitive to hypoxic condition. This study was done to determine the effect of human chorionic gonadotropin (hCG) and vitamine E on cellular density of CA1 hippocampal area, learning ability and memory, following ischemia - reperfusion injury in mice.

Materials and Methods: This experimental study was done on 40 male mice in 5 groups as follow: sham control, ischemia, hCG treated, vitamine E treated and hCG + vitamine E treated groups. Single dose of vitamin E was injected intraperitoneally during the establishment of reperfusion and hCG was injected from 48h after ischemia for 5 days. Folowing the treatment period, mice brains were fixated by transcardial perfusion and stained by nissle method. The shuttle box was used to evaluate the learning memory.

Results: Co-administartion of vitamine E and hCG, significantly increased the cell numbers in hippocampus compared to the ischemic group ($P < 0.001$). Also learning and memory improved in treatment group in comparison with ischemia group ($P < 0.05$).

Conclusion: Co-administration of vitamin E and hCG improved ischemia-induced neurodegeneration and memory impairment.

Keywords: Ischemia, Reperfusion, Hippocampus, CA1 area, Human chorionic gonadotropin, Vitamine E

* **Corresponding Author:** Soleimani M (PhD), E-mail: m-soleimani@sina.tums.ac.ir

Received 25 July 2012 Revised 27 November 2012 Accepted 30 December 2012