

تحقیقی

اثر ۳ و ۴ متیلن دی اکسی مت آمفتامین

بر نوروتهای ناحیه CA1 هیپوکامپ موش صحرایی نر بالغ

دکتر سارا سلیمانی اصل^۱، نیما شکرریز^۲، نیما مولوی^۲، ارغوان بصیرت^۲، پیمان فلاحتی^۲

فرزانه اسماعیلی^۲، زهرا عظیمی^۲، فریدون سجادی^۲، دکتر مهدی مهدیزاده^{۳*}

۱- استادیار گروه علوم تشریحی و مرکز تحقیقات اختلالات رفتاری و سوء مصرف مواد، دانشگاه علوم پزشکی همدان. ۲- دانشجوی رشته پزشکی، کمیته پژوهشی - دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران. ۳- استاد مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، گروه علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی تهران.

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به نقش هیپوکامپ در حافظه و یادگیری، این مطالعه به منظور تعیین اثر ۳ و ۴ متیلن دی اکسی مت آمفتامین (MDMA) بر نوروتهای ناحیه CA1 هیپوکامپ موش صحرایی نر بالغ انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه تجربی روی ۱۸ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد *Sprague dawely* با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم انجام شد. موشها به طور تصادفی به سه گروه ۶ تایی کنترل سالم، کنترل شام و تجربی تقسیم شدند. گروه کنترل شام، نرمال سالین را با دوز ۱ cc/kg و گروه تجربی MDMA را با دوز ۱۰ mg/kg، دوبار در روز به صورت داخل صفاقی، به مدت هفت روز دریافت کردند. در روز هشتم با روش پرفیوژن داخل قلبی و با استفاده از پارافرمالدئید ۴ درصد موشها فیکس شدند و بافت مغز خارج گردید. ناحیه هیپوکامپ راست از نظر تعداد سلول سالم به وسیله میکروسکوپ نوری (رنگ آمیزی کرزیل ویوله) و شاخصهای مرگ سلولی به وسیله میکروسکوپ الکترونی بررسی شدند. دادهها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS-16 و آزمونهای آنالیز واریانس و توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافتهها: میانگین و انحراف استاندارد تعداد سلولهای سالم در ناحیه CA1 هیپوکامپ در گروه کنترل شام (۱۹۹±۳۸/۷) و کنترل (۲۱۰±۴۰/۳۸) تفاوت آماری معنی داری نسبت به هم نداشتند؛ اما این میزان در گروه تجربی (۹۸±۲۵/۱) کاهش آماری معنی داری نسبت به دو گروه کنترل و شام نشان داد (P<۰/۰۰۱). در بررسی با میکروسکوپ الکترونی گروههای شام و کنترل دارای الکترون دانسیته هسته و سیتوپلاسم نرمال، تراکم کروماتین و میتوکندری طبیعی بودند و واکوئلیزاسیون سیتوپلاسمی و ادم غشائی دیده نشد؛ اما در گروه تجربی تغییرات فراساختاری با مشخصات آپوپتوز شامل کاهش کریستهای میتوکندری، پراکندگی کروماتین هسته و کاهش ارگانل های سیتوپلاسمی مشاهده گردید.

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد مصرف ۳ و ۴ متیلن دی اکسی مت آمفتامین منجر به کاهش تعداد سلولهای سالم و مرگ سلولی با مشخصات آپوپتوز در ناحیه CA1 هیپوکامپ می گردد.

کلید واژهها: ۳ و ۴ متیلن دی اکسی مت آمفتامین، نوروتهای مرگ سلولی، هیپوکامپ، موش صحرایی

* نویسنده مسؤل: دکتر مهدی مهدیزاده، پست الکترونیکی mehdizadehm@tums.ac.ir

نشانی: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی، تلفن ۰۲۱-۸۶۷۰۳۲۰۲-۰۲۱، نمابر ۸۸۶۲۲۶۸۹

وصول مقاله: ۹۰/۱۱/۸، اصلاح نهایی: ۹۰/۱۲/۱۷، پذیرش مقاله: ۹۰/۱۲/۲۰

مقدمه

تبدیل به یک داروی تفریحی گردید (۱). MDMA ابتدا باعث بالا رفتن خلق، تهاجم و عصبانیت شده و بعد از چندین روز مصرف کنندگان آن دچار افسردگی می گردند. MDMA روی نوروتهای حامل های مونسوآمینی سروتونریک (5-HT)، دوپامینریک و نوراپی نفریک اثر گذاشته و بیشترین تمایل را به نوروتهای سروتونریک و حامل (SERT) 5-HT دارد (۲). تجویز MDMA سبب افزایش حاد و سریع در میزان سروتونین خارج سلولی، بلوک SERT، مهار جذب مجدد سروتونین در

اکستازی نام عامیانه ای است که توسط مصرف کنندگان آن به ۳ و ۴ متیلن دی اکسی مت آمفتامین (MDMA) (3,4-methylenedioxyamphetamine) اطلاق می شود. این دارو در سال ۱۹۱۴ به وسیله شرکت مرک ثبت شد ولی به خاطر این که اثرات سوء آن توسط ارتش آمریکا امتحان شده بود؛ هرگز به فروش نرفت و در اواسط ۱۹۸۰ به دلیل ایجاد خوش خلقی و احساس نزدیکی با دیگران در مهمانی های رقص شبانه استفاده و

انتهای پیش‌سیناپسی و مهار مونوآمین‌اکسیدازها می‌شود (۳). تحریک رسپتور 5-HTA2 به وسیله MDMA می‌تواند باعث افزایش تحریک نورونی با افزایش حساسیت به رسپتورهای AMPA گلوتامرژیک و افزایش میزان یون کلسیم گردد (۴). اثرات طولانی مدت این دارو روی یادگیری و حافظه است (۵). یادگیری و حافظه از جمله مکانیسم‌هایی محیطی هستند که رفتار انسان را تغییر می‌دهند و مواد توکسیک مختلفی از جمله MDMA باعث اختلال در حافظه فضایی و یادگیری می‌شوند (۶). MDMA مهارت‌های تصمیم‌گیری و اجرایی را مختل می‌کند و امتناع از مصرف آن این اثرات را بهبود نمی‌دهد (۷). تجویز این دارو باعث طولانی شدن زمان رسیدن به سکو و افزایش خطا در اختلال حافظه فضایی (Cincinnati Water Maze) در ماز آبی موریس گردید (۸و۹). MDMA میزان گلوتامینون داخل سلولی را کاهش داده و باعث افزایش پروتئین‌های متصل به کوئینون، القاء استرس اکسیداتیو و مرگ سلولی می‌گردد (۱۰).

ساختارهایی که در ایجاد حافظه فضایی نقش دارند شامل استریاتوم، نئوکورتکس و به خصوص هیپوکامپ است (۱۱). هیپوکامپ ساختاری ضروری در شکل‌گیری حافظه فضایی است و نقشه شناختی از محیطی که حیوان در آن حرکت می‌کند را دارد (۱۲). جسم هیپوکامپ از نظر بافت‌شناسی به سه ناحیه CA (Corn ammonias) تقسیم می‌شود. ناحیه CA1 مجاور سویکولوم و ناحیه CA3 در نزدیکی شکنج دندانه‌ای قرار دارد (۱۳). این مطالعه به منظور تعیین اثر ۳و۴متیلن‌دی‌اکسی‌متامفتمین بر نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ موش صحرایی نر بالغ انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۱۸ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد Sprague dawely با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم خریداری شده از انستیتو رازی ایران در گروه علوم تشریحی دانشگاه علوم پزشکی تهران طی بهمن ۱۳۸۹ تا شهریور ۱۳۹۰ انجام شد.

تمام مراقبت‌های حیوانی و روش‌های آزمایشگاهی مطابق با کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تهران رعایت گردید.

گروه‌بندی حیوانات و تجویز ۳و۴متیلن‌دی‌اکسی‌متامفتمین

موش‌ها تحت شرایط استاندارد با دوره روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته و دمای 21 ± 3 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. حیوانات به آب آشامیدنی و غذای کافی دسترسی داشتند و برای سازگاری با محیط حداقل ۱۰ روز قبل از شروع مطالعه به حیوانخانه منتقل شدند. با توجه به افزایش درجه حرارت بدن پس از مصرف MDMA؛ حیوانات قبل از قرار گرفتن در گروه‌ها از نظر درجه حرارت بدن کنترل و موش‌هایی با درجه حرارت طبیعی ۳۶-۳۷ درجه سانتی‌گراد انتخاب شدند. سپس موش‌ها به‌طور تصادفی در سه گروه

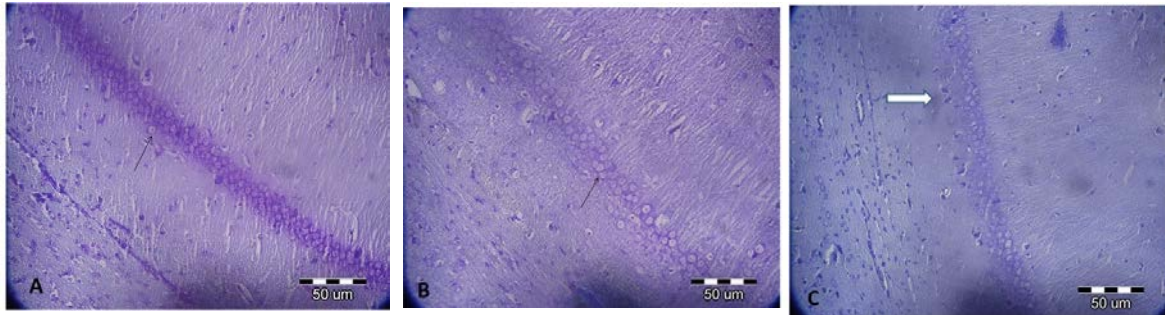
۶ تایی کنترل سالم، کنترل شم و تجربی قرار داده شدند. گروه کنترل شم، نرمال سالین را با دوز ۱cc/kg و گروه تجربی MDMA را با دوز ۱۰ mg/kg دوبار در روز به صورت داخل صفاقی، به مدت هفت روز دریافت کردند.

تثبیت و آماده‌سازی ناحیه هیپوکامپ

حیوانات در روز هشتم با استفاده از تزریق داخل صفاقی کتامین (۱۵۰ mg/kg) و گزیزیلزین (۱۵ mg/kg) بیهوش شدند. سپس با برشی خط وسط قفسه سینه باز و قلب از پریکاردا جدا گردید. از راس قلب ۰/۱cc هپارین و ۰/۱cc نیترات سدیم یک درصد به درون بطن چپ تزریق گردید. هپارین باعث جلوگیری از لخته شدن خون و نیترات سدیم باعث گشادتر شدن عروق گردید. با کنارزدن ریه چپ، شریان آئورت نزولی را یافته و آن را مسدود کردیم و کانونل مربوط به سیستم پرفیوژن را از رأس قلب وارد بطن چپ نموده و همزمان با برقرار کردن جریان نرمال سالین به بطن چپ، دهلیز راست برای خروج خون شکاف داده شد. در این زمان حدود ۱۵۰cc-۱۰۰cc نرمال سالین در عروق به گردش در آمد. پس از خروج کامل خون از بدن حیوان (سفیدشدن کامل دست‌ها و انگشتان) جریان نرمال سالین قطع و جریان فیکساتیو برقرار شد. محلول فیکساتیو کارنوفسکی (پارافرمالدهید ۴ درصد با گلو تارالدئید ۲/۲۵ درصد در بافر فسفات ۰/۱ مولار pH=۷/۲) به حجم ۲۰۰cc و به مدت ۴۰-۳۵ دقیقه در عروق به گردش در آمد. بعد از اتمام پرفیوژن، سر حیوانات جدا شد و مغز با دقت خارج گردید. ۵ سر موش صحرایی از هر گروه برای بررسی ساختاری و یک سر دیگر برای بررسی فراساختاری در محلول تثبیت کننده فوق برای انجام ثبوت ثانویه منتقل گردید.

رنگ‌آمیزی نیسل و مطالعه ساختاری

برای رنگ‌آمیزی نیسل از پروتکل مطالعه قبلی استفاده شد (۱۴). بعد از انجام پرفیوژن از نمونه‌های فیکس شده قالب پارافینه تهیه شد و پس از قالب‌گیری با پارافین، با استفاده از دستگاه میکروتوم روتاتوری مقاطع کرونال با ضخامت ۷ میکرون تهیه و سپس برش‌ها بر روی لام‌های آلبومینه قرار داده شدند. بعد از شفاف‌سازی و آبدهی، لام‌ها با استفاده از کریزل و یوله یک درصد رنگ شدند و در نهایت مقاطع به‌وسیله چسب انتلان و لامل پوشانده شدند. لام‌های رنگ شده به روش نیسل توسط میکروسکوپ OLYMPUS, AX70 با بزرگنمایی ۴۰X بررسی و بعد از تهیه عکس توسط نرم‌افزار Olysia bio report شمارش سلولی انجام شد. برای شمارش سلولی، ناحیه CA1 هیپوکامپ نیمکره راست در برش‌های کرونال انتخاب شد و تعداد نورون‌ها در این منطقه مشخص شده؛ شمارش گردید. دو مقطع ۳/۸ و ۵/۸ نسبت به برگما با توجه به اطلس Paxinos و Watson (۱۵) انتخاب و شمارش برای



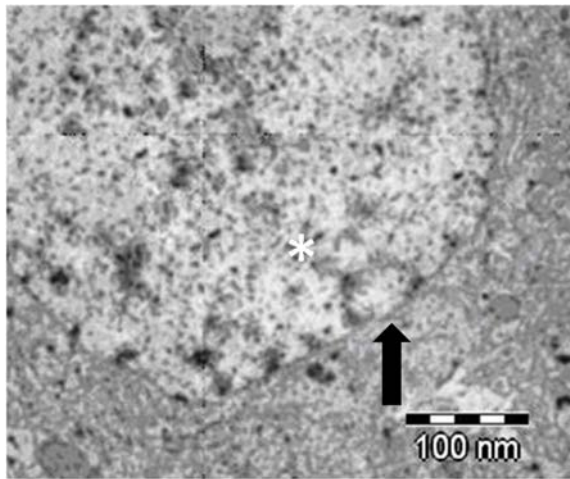
شکل ۱: سلول‌ها ناحیه CA1 هیپوکامپ
گروه‌های کنترل (A)، شام (B) و تجربی (C) (10 mg/kg MDMA)
نوکل پیکان سیاه: نورون‌های سالم با هسته سالم و یوکروماتین، نوکل پیکان سفید: ساول پیکنوزه با هسته هتروکروماتین
رنگ‌آمیزی نیسل بزرگ‌نمایی ۴۰×

کمتراز ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج بافتی حاصل از رنگ‌آمیزی نیسل

شکل یک نمایانگر سلول‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ در برش کرونال در سطح ۳/۸ نسبت به برگما در گروه‌های مختلف است. میانگین و انحراف استاندارد تعداد سلول‌های سالم در ناحیه CA1 هیپوکامپ در گروه کنترل شام (۱۹۹±۳۸/۷) و کنترل (۲۱۰±۴۰/۳۸) تفاوت آماری معنی‌داری نسبت به هم نداشتند؛ اما این میزان در گروه تجربی (۹۸±۲۵/۱) کاهش آماری معنی‌داری نسبت به دو گروه کنترل و شام نشان داد ($P < 0.001$).



شکل ۲: هسته و سیتوپلاسم سلول‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ با استفاده از میکروسکوپ الکترونی؛ گروه کنترل با هسته یوکروماتین (*، غشاء هسته سالم (پیکان سیاه) و ارگانل‌های سیتوپلاسمی سالم (magnification x 5000))

نتایج فراساختاری با استفاده از میکروسکوپ الکترونی

نتایج بررسی ناحیه CA1 هیپوکامپ با میکروسکوپ الکترونی در شکل‌های ۲ الی ۴ قابل مشاهده است.

گروه‌های شام و کنترل دارای الکترون دانسیته هسته و سیتوپلاسم نرمال، تراکم کروماتین و میتوکنندری طبیعی بودند و واکونولیزاسیون

هر مقطع در ۵ برش با حداقل فاصله ۴۰ میکرون انجام شد.

برای شمارش نورون‌ها در هر گروه سطحی برابر با ۱۲۵۰ میکرومتر مربع در نظر گرفته شد.

چروکیدگی سلول، از دست رفتن یکنواختی اجسام نیسل، تراکم سیتوپلاسم و هسته و پیکنوزه شدن هسته توسط میکروسکوپ نوری بررسی گردید (۱۶).

مطالعه فراساختاری

پس از پرفیوژن، نیمکره‌های مغزی برای مطالعات فراساختاری به محلول کارنوفسکی منتقل و به مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از تهیه بلوک، با استفاده از دستگاه اولترا میکروتوم (Leica Ultracut) برش‌های ۵۰۰ نانومتری از بلوک‌ها تهیه گردید و توسط رنگ تولوئیدین بلو یک درصد به مدت ۵ دقیقه رنگ شدند. بعد از شستشوی لام با آب مقطر و خشک شدن آن بر روی لام، لامل چسبانده شد و با میکروسکوپ نوری مطالعه گردید تا محل مناسب برای برش‌های فوق‌نازک مشخص گردد.

تهیه برش‌های فوق‌نازک (Ultrathin)

بعد از تعیین محل مناسب برش‌ها در زیر میکروسکوپ نوری، برش‌های ۷۰-۵۰ نانومتری توسط اولترا میکروتوم تهیه گردید. در ادامه برش‌ها به گریدهای ۲۰۰ مش منتقل و پس از خشک شدن، با اورانیل استات اشباع شده و سیترات سرب رنگ‌آمیزی شدند.

مطالعه با میکروسکوپ الکترونی انتقالی (TEM)

گریدهای تهیه شده توسط میکروسکوپ الکترونی انتقالی (Ziess, EM 900) از نظر الکترون دانسیته هسته و سیتوپلاسم، تراکم کروماتین، مورفولوژی غشاء هسته، میتوکنندری و شبکه اندوپلاسمی، و واکونولیزاسیون سیتوپلاسم و شکل کریستال‌های میتوکنندری در دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی مطالعه گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

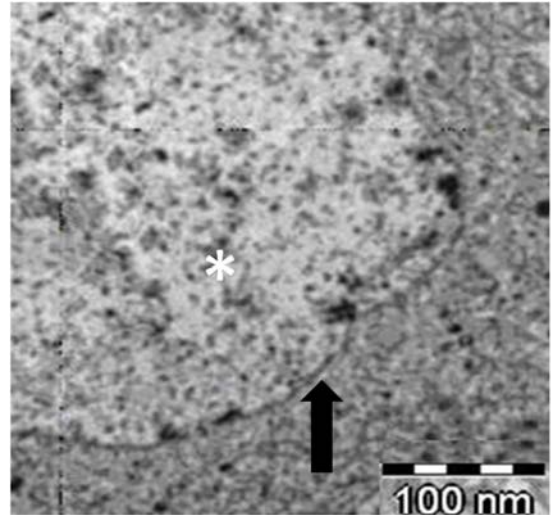
داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-16 و آزمون‌های آنالیز واریانس و توکی تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری

بحث

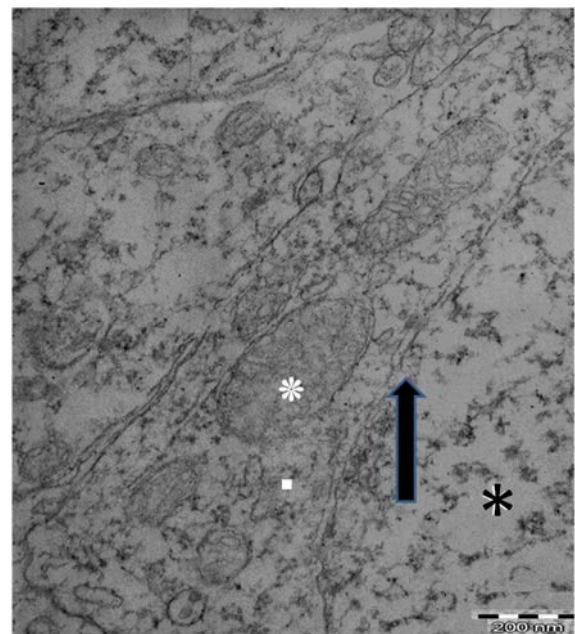
نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تجویز MDMA منجر به مرگ سلولی با مشخصات آپوپتوز در ناحیه CA1 هیپوکامپ می‌گردد. مغز به دلیل ترکیب لیپیدی غشاء سلولی و سطح پایین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی، ارگانی حساس نسبت به مواد توکسیک از جمله MDMA است (۱۷). مطالعه دیگر ما (۹) نشان داد که تجویز MDMA در موش‌های صحرایی بالغ سبب اختلال حافظه فضایی در ماز آبی موریس شامل افزایش زمان و مسافت طی شده برای رسیدن به سکو و کاهش درصد زمان طی شده در ربع دایره هدف گردید. آفتامین‌های حلقوی دیگر مثل فن‌فلورامین نیز باعث اختلال عملکرد در ماز آبی موریس شدند (۱۸). نواحی از مغز شامل استریاتوم، کورتکس فرونتال و به‌ویژه هیپوکامپ برای هدایت در ماز آبی موریس نیاز هستند (۱۱). این نواحی مستعد نورو توكسیسیتی بعد از تجویز MDMA در موش صحرایی می‌باشند (۱۹). در مطالعه حاضر در گروه تحت درمان با MDMA تعداد سلول‌های پیکنوزه افزایش و سلول‌های سالم کاهش یافت. موافق با مطالعه حاضر در مطالعه Riezzo و همکاران تجویز تک دوز MDMA باعث تغییرات مورفولوژیک همراه با افزایش رادیکال‌های آزاد و کاهش گلوتاتیون در نواحی مختلف مغزی گردید (۲۰). همچنین تجویز متامفتامین منجر به افزایش مرگ سلولی در کورتکس پیرفورمیس، استریاتوم و هیپوکامپ (۲۱) و آسیب به اجسام سلولی گشته است (۲۲). به نظر می‌رسد که آزاد شدن عوامل آپپتوتیک به داخل سیتوپلاسم به دنبال مصرف مواد توکسیک باعث به‌هم‌ریختن ثبات سیتواسکلتون و در نهایت مرگ سلولی می‌شود (۲۳).

نتایج مطالعه فراساختاری حاضر با میکروسکوپ الکترونی نشانگر مرگ سلولی با ویژگی‌های آپوپتوز بعد از تجویز MDMA است. در مقایسه با گروه شم و کنترل که حاوی هسته یوکروماتین و ارگانل‌های داخل سلولی سالم، بدون ادم سیتوپلاسمی و یکنواختی غشاء بودند؛ در گروه‌های دریافت کننده MDMA واکوتلیزاسیون سیتوپلاسمی، پراکنندگی کروماتین هسته و به‌هم‌ریختن ساختار میتوکندری دیده شد که موافق با مطالعه Bai و همکاران (۲۴) است. مکانیسمی تخریبی MDMA هنوز به خوبی شناخته نشده است؛ ولی به نظر می‌رسد که متابولیت‌های MDMA مثل N-متیل - آلفا - متیل دوپامین (MeDA)، ارتو کوئینون‌ها و کوئینون تیوترها در تولید این اثرات نقش مهمی داشته باشند. MDMA از طریق واکنش متیلاسیون به وسیله ایزوانزیم سیتوکروم P-450 کاتالیزه و به MeDA تبدیل می‌شود و خود عنصری ناپایدار بوده و در حضور NADPH به کوئینون متابولیزه و با گلوتاتیون واکنش می‌دهد (۲۴). این واکنش منجر به تولید رادیکال‌های آزاد می‌گردد (۲۵). افزایش اکسیداتیو استرس‌ها به دنبال مصرف MDMA همراه با کاهش

سیتوپلاسمی و ادم غشائی دیده نشد (شکل‌های ۲ و ۳). در گروه تجربی (MDMA با دوز ۱۰ mg/kg) واکوتلیزاسیون سیتوپلاسمی، کاهش ارگانل‌های سیتوپلاسمی، پراکنندگی کروماتین هسته، کاهش کریستاهای میتوکندری و ادم در غشاء هسته مشاهده گردید (شکل ۴).



شکل ۳: هسته و سیتوپلاسم سلول‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ با استفاده از میکروسکوپ الکترونی؛ گروه کنترل شم با هسته یوکروماتین (x)، غشاء هسته سالم (پیکان سیاه) و ارگانل‌های سیتوپلاسمی سالم (magnification x 5000)



شکل ۴: هسته و سیتوپلاسم سلول‌های ناحیه CA1 هیپوکامپ با استفاده از میکروسکوپ الکترونی؛ گروه تجربی با کاهش در کریستاهای میتوکندری (* سفید)، واکوتلیزاسیون سیتوپلاسم (■)، پراکنندگی کروماتین هسته (*) و ادم غشاء هسته (پیکان سیاه) (magnification x 7000)

سیستم آنتی‌اکسیدانتی سلول‌های عصبی و آنزیم‌های کبیدی و در نهایت مرگ سلولی می‌شود (۲۸ و ۲۹).

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مصرف ۴ و ۳ میلی‌دی‌اکسی مت‌آمفتامین منجر به مرگ سلولی با مشخصات آپوپتوز در ناحیه CA1 هیپوکامپ گردید که نیاز به بررسی بیشتر از نظر بیان پروتئین‌های آپپتوتیک و آنتی‌آپپتوتیک دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب (شماره ک/۱۲۱) کمیته دانشجویی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران بود و با حمایت مالی آن واحد انجام شد. از کارکنان محترم آزمایشگاه بافت‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی تهران تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

- Farré M, de la Torre R, Mathúna BO, Roset PN, Peiró AM, Torrens M, et al. Repeated doses administration of MDMA in humans: pharmacological effects and pharmacokinetics. *Harmacology (Berl)*. 2004 May;173(3-4):364-75.
- Bowyer JF, Young JF, Slikker W, Itzak Y, Mayorga AJ, Newport GD, et al. Plasma levels of parent compound and metabolites after doses of either d-fenfluramine or d-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) that produce long-term serotonergic alterations. *Neurotoxicology*. 2003 Jun;24(3):379-90.
- Verrico CD, Miller GM, Madras BK. MDMA (Ecstasy) and human dopamine, norepinephrine, and serotonin transporters: implications for MDMA-induced neurotoxicity and treatment. *Psychopharmacology (Berl)*. 2007 Jan;189(4):489-503.
- Kita T, Wagner GC, Nakashima T. Current research on methamphetamine-induced neurotoxicity: animal models of monoamine disruption. *J Pharmacol Sci*. 2003 Jul;92(3):178-95.
- Simantov R, Tauber M. The abused drug MDMA (Ecstasy) induces programmed death of human serotonergic cells. *FASEB J*. 1997 Feb;11(2):141-6.
- Zakzanis KK, Campbell Z. Memory impairment in now abstinent MDMA users and continued users: a longitudinal follow-up. *Neurology*. 2006 Mar;66(5):740-1.
- Able JA, Gudelsky GA, Vorhees CV, Williams MT. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine in adult rats produces deficits in path integration and spatial reference memory. *Biol Psychiatry*. 2006 Jun;59(12):1219-26.
- Skelton MR, Able JA, Grace CE, Herring NR, Schaefer TL, Gudelsky GA, et al. (+/-)-3,4-Methylenedioxymethamphetamine treatment in adult rats impairs path integration learning: a comparison of single vs once per week treatment for 5 weeks. *Neuropharmacology*. 2008 Dec;55(7):1121-30.
- Soleimani Asl S, Naghdi N, Choopani S, Farhadi MH, Samzadeh-Kermani A, Mehdizadeh M. Non-acute effects of different doses of 3-4, methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on spatial memory in the Morris water maze in Sprague Dawley male rats. *Neural Regen Res*. 2011; 6(22):1715-19.
- Puerta E, Hervias I, Goñi-Allo B, Zhang SF, Jordán J, Starkov AA, et al. Methylenedioxymethamphetamine inhibits mitochondrial complex I activity in mice: a possible mechanism underlying neurotoxicity. *Br J Pharmacol*. 2010 May;160(2):233-

فعالیت آنتی‌اکسیدانت‌های اندوژن مثل گلو‌تاتیون و کاتالاز می‌گردد و کاهش این آنتی‌اکسیدانت‌ها باعث افزایش رادیکال‌های آزاد می‌گردد (۲۶). MDMA باعث افزایش پروتئین‌های متصل به کوئینون و در نهایت القای استرس اکسیداتیو، به هم خوردن سیستم آنتی‌اکسیدانتی سلول‌های عصبی و مرگ سلولی می‌گردد (۲۷ و ۲۸). به نظر می‌رسد که نه تنها تولید ROS بلکه خارج شدن گلو‌تاتیون از سلول نیز در توکسیسیته ایجاد شده توسط MDMA نقش دارد. کاهش میزان گلو‌تاتیون داخل سلولی به دنبال تجویز MDMA باعث افزایش تولید TNF- α می‌گردد که منجر به آپوپتوز می‌گردد (۲۸). با توجه به مطالعات اخیر احتمال دارد که در مطالعه حاضر نیز استفاده از MDMA سبب به هم ریختن سیستم آنتی‌اکسیدانتی سلول‌های عصبی و در نهایت القای استرس اکسیداتیو، به هم خوردن

- 45.
- Lynch MA. Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev*. 2004 Jan;84(1):87-136.
- Fellgiebel A, Yakushev I. Diffusion tensor imaging of the hippocampus in MCI and early Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2011;26 Suppl 3:257-62.
- Szilágyi T, Orbán-Kis K, Horváth E, Metz J, Pap Z, Pávai Z. Morphological identification of neuron types in the rat hippocampus. *Rom J Morphol Embryol*. 2011;52(1):15-20.
- Alipanahzade H, Soleimani M, Soleimani Asl S, Mehdizadeh M, Katebi M. [Effect of transforming growth factor alpha of dentyte jyrus neurons and pyramidal cells of CA1 subfield of hippocampus following ischemia-reperfusion in Rats]. *J Gorgan Uni Med Sci*. 2012; 14(3): 26-32. [Article in Persian]
- Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain Stereotaxic Coordinates*. 2nd. San Diego: Academic Press. 1986:353-68.
- Azad N, Rasoolijazi H, Joghataei MH, Soleimani S. Neuroprotective effects of carnolic acid in an experimental model of Alzheimer's Disease in rats. *Cell Journal*. 2011;13(1):39-44.
- Marttila RJ, Röyttä M, Lorentz H, Rinne UK. Oxygen toxicity protecting enzymes in the human brain. *J Neural Transm*. 1988;74(2):87-95.
- Vorhees CV, He E, Skelton MR, Graham DL, Schaefer TL, Grace CE, et al. Comparison of (+)-methamphetamine, \pm -methylenedioxymethamphetamine, (+)-amphetamine and \pm -fenfluramine in rats on egocentric learning in the Cincinnati water maze. *Synapse*. 2011 May;65(5):368-78.
- Simić I, Malicević Z. [The acute effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on oxidative stress in rat brain]. *Med Pregl*. 2008 May-Jun;61(5-6):222-5. [Article in Serbian]
- Riezzo I, Cerretani D, Fiore C, Bello S, Centini F, D'Errico S, et al. Enzymatic-nonenzymatic cellular antioxidant defense systems response and immunohistochemical detection of MDMA, VMAT2, HSP70, and apoptosis as biomarkers for MDMA (Ecstasy) neurotoxicity. *J Neurosci Res*. 2010 Mar;88(4):905-16.
- Schmued LC, Bowyer JF. Methamphetamine exposure can produce neuronal degeneration in mouse hippocampal remnants. *Brain Res*. 1997 Jun;759(1):135-40.
- Eisch AJ, Marshall JF. Methamphetamine neurotoxicity:

dissociation of striatal dopamine terminal damage from parietal cortical cell body injury. *Synapse*. 1998 Dec;30(4):433-45.

23. Nutt LK, Pataer A, Pahler J, Fang B, Roth J, McConkey DJ, et al. Bax and Bak promote apoptosis by modulating endoplasmic reticular and mitochondrial Ca²⁺ stores. *J Biol Chem*. 2002 Mar;277(11):9219-25.

24. Bai F, Lau SS, Monks TJ. Glutathione and N-acetylcysteine conjugates of alpha-methyl dopamine produce serotonergic neurotoxicity: possible role in methylenedioxyamphetamine-mediated neurotoxicity. *Chem Res Toxicol*. 1999 Dec;12(12):1150-7.

25. Thiriet N, Ladenheim B, McCoy MT, Cadet JL. Analysis of ecstasy (MDMA)-induced transcriptional responses in the rat cortex. *FASEB J*. 2002 Dec;16(14):1887-94.

26. Capela JP, Fernandes E, Remião F, Bastos ML, Meisel A, Carvalho F. Ecstasy induces apoptosis via 5-HT(2A)-receptor stimulation in cortical neurons. *Neurotoxicology*. 2007 Jul;

28(4):868-75.

27. Wasik AM, Gandy MN, McIlldowie M, Holder MJ, Chamba A, Challa A, et al. Enhancing the anti-lymphoma potential of 3,4-methylenedioxyamphetamine ('ecstasy') through iterative chemical redesign: mechanisms and pathways to cell death. *Invest New Drugs*. 2012 Aug;30(4):1471-83.

28. Cerretani D, Bello S, Cantatore S, Fiaschi AI, Montefrancesco G, Neri M, et al. Acute administration of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) induces oxidative stress, lipoperoxidation and TNF α -mediated apoptosis in rat liver. *Pharmacol Res*. 2011 Nov;64(5):517-27.

29. Fattahi E, Forozaifar M, Bagheri Haghighi A. [Effect of 3,4 Methylenedioxy Meth Amphetamine on hepatocyte and liver enzymes Wistar Rats]. *J Gorgan Uni Med Sci*. 2013; 14(4):24-30. [Article in Persian]

Original Paper

Effect of 3-4,methylenedioxyamphetamine in CA1 hippocampal neurons in male Rats

Soleimani Asl S (PhD)¹, Shekarriz N², Molavi N², Basirat A², Falahati P²
Esmaeili F², Azimi Z², Sajadi F², Mehdizadeh M (PhD)*³

¹Assistant Professor, Department of Anatomy, Research Center for Behavioral Disorders and Substance Abuse, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran. ²Medicine Student, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ³Professore, Cellular and Molecular Research Center, Department of Anatomy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract

Background and Objective: Considering the role of the hippocampus in memory, this study was done to evaluate the effect of 3-4,methylenedioxyamphetamine on CA1 hippocampal neurons in male rats.

Materials and Methods: In this experimental study 18 sprague dawley male rats (200-250g) were randomly allocated into three groups as follow: control (intact), control sham and experimental groups. Sham and experimental groups were received normal saline (1 cc) and MDMA10mg/kg IP for 7 days, respectively. Following transcardial perfusion by paraformaldehyd 4%, structure and ultrastructure of right CA1 hippocampus were assessed by crysel violet staining and electronic microscope. Data were analyzed using SPSS-16, ANOVA and Tukey tests.

Results: There was no significant difference between control (mean=210±40.38) and sham groups (mean=199±38.7) in neuron density. Neuron number decreased significantly in experimental group (mean=98±25.4) in compare to control and sham groups (P<0.001). There was no ultrastructural abnormality in control and sham groups. Finally, ultrastructural changes with apoptosis characterized by mitochondrial cristae reduction, distribution of nuclear chromatin and loss of cytoplasmic organelles in MDMA groups.

Conclusion: This study shows that MDMA administration can stimulate the cell death with apoptotic pattern in hippocampus.

Keywords: 3,4-methylenedioxyamphetamine, Neuron, Cell Death, Hippocampus, Rat

* **Corresponding Author:** Mehdizadeh M (PhD), E-mail: mehdizadehm@tums.ac.ir

Received 28 January 2012

Revised 7 March 2012

Accepted 10 March 2012