

## **Morphological changes of the hippocampal astrocytes at different phases of the estrous cycle in female mice**

**Ghorbanian MT<sup>\*</sup>, Ghorbanian M, Sadrollahi M**

Department of Cellular and Molecular Biology, School of Biology and Institute of Biological Sciences,  
Damghan University, I. R. Iran.

Received November 8, 2014; Accepted March 11, 2015

### **Abstract:**

**Background:** Usual fluctuations of sex hormones during the estrous cycle in female mice affect the hippocampal neurogenesis. The hippocampus also comprises many steroid receptors suggesting the modulatory effects of gonadal hormones on the hippocampal plasticity. Sex differences at the level of structure and function of the hippocampus are mostly due to the fluctuations of steroid hormones during the estrous cycle. The purpose of this study was to investigate the morphological changes in hippocampal astrocytes and also the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) at different phases of the estrous cycle.

**Materials and Methods:** In this study, different stages of the estrous cycle were determined in 6-8 week NMRI female mice by methylene blue-stained vaginal smears. The morphological changes of astrocytes in the hippocampus were investigated using GFAP immunohistochemistry. In addition to the morphological study, the expression of astrocytic marker was quantitatively evaluated.

**Results:** GFAP immunostaining showed the changes in the morphology of astrocytes and also in the serum level of estrogen during the estrous cycle. The highest concentrations of estrogen and GFAP reactivity were observed in the proestrus stage.

**Conclusion:** Different stages of the estrous cycle in female mice were associated with morphological changes of hippocampal astrocytes and the alternation in the serum level of estrogen.

**Keywords:** Astrocytes, Hippocampus, Estrous cycle, Neurogenesis

**\* Corresponding Author.**

**Email:** ghorbanian@du.ac.ir

**Tel:** 0098 912 5318 732

**Fax:** 0098 233 530 112

**Conflict of Interests: No**

*Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, June, 2015; Vol. 19, No 2, Pages 118-126*

**Please cite this article as:** Ghorbanian MT, Ghorbanian M, Sadrollahi M. Morphological changes of the hippocampal astrocytes at different phases of the estrous cycle in female mice. *Feyz* 2015; 19(2): 118-26.

# بررسی تغییرات مورفولوژیکی آستروسیت‌های هیپوکامپ در مراحل مختلف چرخه استروس موش ماده

\*<sup>۱</sup> محمد تقی قربانیان ، محمد قربانیان ، مجید صدرالهی

## خلاصه:

سابقه و هدف: نوسانات طبیعی هormون‌های جنسی در طی چرخه استروس (فحلی) بر نورون‌زایی در ناحیه هیپوکامپ اثر دارد. هیپوکامپ دارای گیرنده‌های استروئیدی است که نشان از اثر تنظیمی هormون‌های گنادی بر شکل پذیری هیپوکامپ دارد. اغلب تفاوت‌های جنسی مشاهده شده در سطح ساختمان و عملکرد هیپوکامپ به دلیل نوسانات هormون‌های استروئیدی در طول مراحل چرخه استروس می‌باشد. هدف از این مطالعه، بررسی تغییرات مورفولوژی آستروسیت‌های هیپوکامپ و نیز بیان نشان‌گر GFAP در مراحل مختلف چرخه استروس می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مراحل مختلف چرخه استروس موش ماده نژاد NMRI ۸-۶ هفت‌های با تهیه اسمر و ازن و با رنگ‌آمیزی توسط متیلن بلو تعیین گردید. به منظور بررسی مورفولوژی آستروسیت‌های هیپوکامپ از روش اینتوشیمی برای نشان‌گر GFAP استفاده شد. علاوه بر بررسی مورفولوژی از نظر کمی نیز بیان نشان‌گر آستروسیتی ارزیابی گردید.

نتایج: تفاوت در مورفولوژی آستروسیت‌ها و باسخ به نشان‌گر GFAP در مراحل مختلف استروس مشاهده گردید. بالاترین غلظت استروئن و بیشترین رنگ‌پذیری به GFAP در مرحله پرواستروس دیده شد.

نتیجه‌گیری: مراحل مختلف چرخه استروس با تغییر هormون استروئن و مورفولوژی آستروسیت‌های هیپوکامپ موش ماده همراه است. واژگان کلیدی: آستروسیت، هیپوکامپ، چرخه استروس، نورون‌زایی

دو ماهنامه علمی-پژوهشی فیض، دوره نوزدهم، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۳۹۴، صفحات ۱۱۸-۱۲۶

برای اولین بار در سال ۱۹۶۹ توسط Lawrence GFAP

سازی، توصیف و نام‌گذاری شد [۸]. پروتئین اسیدی رشته‌ای گلیال پروتئینی است که در انسان با ژن GFAP کد می‌شود [۹]. فرض بر این است که GFAP به حفظ نیروی مکانیکی آستروسیت و همچنین شکل سلول کمک می‌نماید [۱۰] و در فرآیندهای مهم CNS شامل ارتباطات سلولی و عملکرد سد خونی مغزی دخیل می‌باشد [۱۱]. از طریق تعدیل شبکه فیلامان حاضر در سلول در تقسیم میتوز نقش داشته [۱۲] و در ایجاد ارتباط بین آستروسیت‌ها و نورون‌ها نیز نقش ایفاء می‌کند [۱۳]. تعامل آستروسیت‌ها با سلول بنیادی عصبی برای نورون‌زایی بسیار مهم محسوب می‌شود [۱۵، ۱۴]. آستروسیت‌های هیپوکامپ پیام‌هایی را که سبب تکثیر و تعیین سرنوشت عصبی سلول بنیادی عصبی می‌شود، تولید می‌کنند. علاوه بر این، فاکتورهای مشتق از آستروسیت ممکن است باعث تحریک سیناپتوژن نورون‌های تازه تولید شود [۱۶، ۱۴]. آستروسیت‌های هیپوکامپ تخصصی هستند و مجموعه‌ای بی‌نظیر از پیام‌هایی را که برای حفظ نورون‌زایی در طول دوران بلوغ بسیار مهم است، تولید می‌کنند [۱۴]. نشان داده شده است که نوسانات رخ داده در هormون‌های گنادی، به طور طبیعی در سراسر چرخه استروس، نورون‌زایی هیپوکامپ موش ماده باکره بزرگسال را تحت تاثیر قرار می‌دهد [۱]. به دنبال تغییر مرحله دی‌استروس و پرواستروس چرخه فحلی موش صحرایی تفاوت جنسی در بیان

## مقدمه

نوسانات طبیعی هormون‌های جنسی در طی چرخه استروس بر نورون‌زایی در ناحیه هیپوکامپ اثر دارد [۱]. هormون‌های گنادی از طریق تاثیر بر نورون‌ها و سلول‌های گلیالی به خصوص آستروسیت‌ها در تنظیم مورفولوژی و فعالیت هیپوکامپ دخالت می‌نمایند [۲]. سه نشان‌گر اصلی آستروسیت‌ها در سیستم عصبی مرکزی شامل (Glial Fibrillary Acidic Protein) GFAP، گلوتامین سنتاز و S۱۰۰ بنا است [۳-۵]. پروتئین اسیدی رشته‌ای گلیال (GFAP) یک پروتئین فیلامان حد老子 است که توسط تعداد زیادی از انواع سلول‌های دستگاه عصبی مرکزی از جمله آستروسیت‌ها [۶] و سلول‌های اپاندیم [۷] بیان می‌شود.

۱ استادیار، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه دامغان

۲ دانشجوی کارشناسی، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه دامغان

۳ کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه دامغان

## \* نشان‌گر نویسنده مسئول:

دامغان، دانشگاه دامغان، دانشکده زیست‌شناسی و پژوهشکده علوم زیستی  
تلفن: ۰۳۳۳۵۳۰۱۱۲، دهنویس: ۹۱۲ ۵۳۱۸۷۳۳

پست الکترونیک: ghorbanian@du.ac.ir

تاریخ پذیرش نهایی: ۹۳/۱۲/۲۰، تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۱۷

و پردازش بافتی، بافت‌ها با پارافین مذاب ۶۰ درجه سانتی‌گراد قالب‌گیری شدند. سپس، با استفاده از میکروتوم روتاری برش‌های ۵ میکرومتری کرونال با توجه به اطلس پاکسینوس در محدوده مناطق DG, CA3, CA1, TEHIE شد. ۵ تا ۷ برش میکروسکوپی کرونال به ضخامت ۵ میکرومتر برای ۵ حیوان در هر گروه با عدسی ۴۰X ارزیابی شدند.

#### اندازه‌گیری میزان استروژن

برای سنجش استروژن، از قلب موش‌ها در مراحل مختلف چرخه استروس خون‌گیری انجام شد و سرم خون با سانتریفوژ جدا گردید. پیش از سنجش، نمونه‌های سرم در شرایط دمایی ۷۰-۷۰ نگه داری گردید. میزان استروژن سرم‌های جمع‌آوری شده با استفاده از کیت سنجش  $17\beta$  Estradiol (Italy-Diametra-35375) و بر اساس دستورالعمل کیت با دستگاه میکروپلیت اسپکتروفوتوسنتر (BioTec-Power Wave XS) اندازه‌گیری شد.

#### مطالعه ایمنوہیستوشیمی

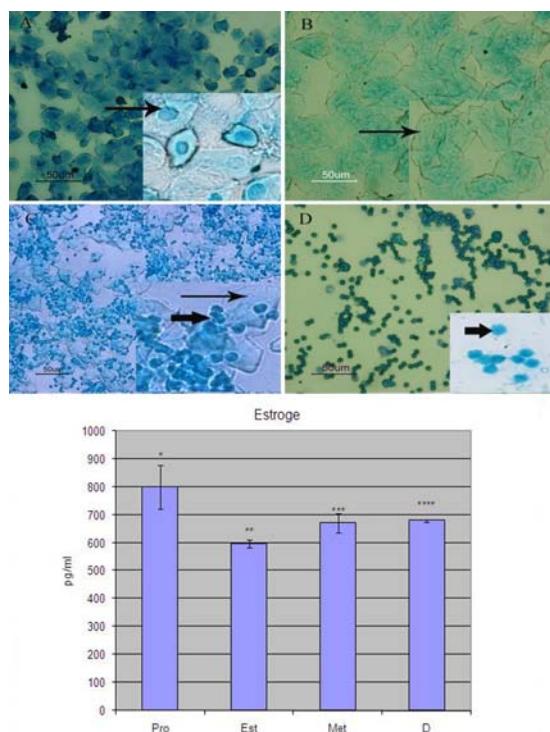
در تحقیق حاضر به‌منظور بررسی مورفولوژی آسترودیت‌های هیپوکامپ از روش ایمنوہیستوشیمی برای نشان‌گر GFAP استفاده شد. مراحل انجام کار شامل پارافین‌زدایی و آب‌دهی در الكل‌های صعودی و شستشوی نمونه‌ها با آب بود. سپس، برای بازیابی آنتی‌ژن، مقاطع بافتی در بافر سیترات سدیم قرار داده شده و نمونه‌ها در مایکروفر باشدت ۱۸۰، ۳۶۰ و ۷۲۰ وات هر کدام به مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند. انکوباسیون نمونه‌های با محلول بلاک کننده سرم بزر ۱۰ درصد و تریتون  $0/۳$  درصد به مدت یک ساعت انجام گردید. انکوباسیون با آنتی‌بادی اولیه GFAP (Monoclonal Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein) (RQIC شده ۱: ۲۰۰) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و سپس شستشو با محلول PBS و انکوباسیون با آنتی-بادی ثانویه کونژوگه با روdamine (Goat Anti Mouse Rhodamine conjugate) (RQIC شده ۱: ۲۰۰) به مدت دو ساعت، در دمای ۳۷ درجه انجام شد. در پایان، شستشو با PBS و چسباندن با چسب گلیسرول فسفات و مشاهده با میکروسکوپ DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) برای رنگ‌آمیزی هسته استفاده شده است. تصاویر میکروسکوپی با میکروسکوپ فلورسنت (Nikon Eclipse, E 600, Japan) و به کمک سیستم تصویر برداری دوربین دیجیتال (Nikon, Japan) DXM 120, USA) انجام شد. شدت و میزان بیان GFAP هیپوکامپ با نرم‌افزار Image J بررسی شد.

GFAP، تعداد و مورفولوژی آسترودیت‌های هیپوکامپ مشاهده می‌شود [۲]. آسترودیت‌ها در تمايز و تکوین عصبی، تنظیم هدایت آکسونی و شکل‌گیری سیناپس‌ها نقش دارند. آسترودیت‌ها چندین BDNF (Brain derived neurotrophic factor) GDNF (Glial derived neurotrophic factor) CNTF (Ciliary neurotrophic factor) factor را بیان می‌کنند [۲۳-۲۴]. هیپوکامپ یکی از نواحی مغزی است که عملکرد آن با شناخت، حافظه و یادگیری مربوط است و هدف مشترک چندین بیماری مربوط به آسیب مغزی و مرتبط با سن نظری افسردگی، آزمایم و پارکینسون می‌باشد [۲]. با توجه به اثر هورمون‌های جنسی بر ساختار و عملکرد هیپوکامپ [۲۴] و ظایف متعدد آسترودیت‌ها در دستگاه عصبی مرکزی و نیز دخالت این سلول‌ها در نورون‌زایی، مطالعه حاضر به‌منظور بررسی واپسگی اثر تغییر هورمون استروژن در چرخه استروس بر مورفولوژی آسترودیت‌های و میزان بیان GFAP در هیپوکامپ موش کوچک آزمایشگاهی انجام شده است.

#### مواد و روش‌ها

در این تحقیق از ۳۵ سر موش سوری ماده نژاد NMRI در این تحقیق از ۴ هفته (موش‌های نابالغ) و ۶ تا ۸ هفته (موش‌های بالغ) استفاده شد. این موش‌ها از مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی حصارک کرج خریداری شد و به محل نگهداری حیوانات آزمایشگاهی در دانشگاه دامغان منتقل گردید. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت روشتابی و ۱۲ ساعت تاریکی، دما و رطوبت کنترل شده نگهداری شدند. غذا و آب به اندازه کافی در اختیار آن‌ها قرار داده شد. اصول اخلاقی کار بر روی حیوانات بر اساس دستور کار کمیته اخلاقی دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه دامغان رعایت گردید. موش‌ها به صورت روزانه به‌روش تهیه اسپیر و اژن تعیین مرحله شدند و در پنج گروه ( $n=5-7$ ) پرواستروس، استروس، متاستروس، دیاستروس و موش نابالغ قرار گرفتند. برای تهیه اسپیر و اژن، پس از انتقال ترشحات و اژن بر روی لام، نمونه‌ها در دمای اتاق خشک شده، با متابولو فیکس گردیده و با رنگ متیلن بلو ۲ درصد رنگ شدند [۲۵]. حیوانات توسط تزریق داخل صفاقی مخلوط ۱۰۰ میلی‌گرم کتامین و ۱۰ میلی‌گرم زایلازین به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت عمیق بیهوش شدند. پس از تعیین مرحله چرخه استروس، با تزریق داخل قلبی محلول فسفات بافر (Phosphate buffered saline- PBS) به‌دبیل آن محلول پارافرمالدئید ۴ درصد سرد پریوژن صورت گرفت و مغزها از جمجمه خارج شدند. پس از انجام مراحل ثبوت

آستروسیت‌ها کوچک ستاره‌ای دارای زوائد متعدد با طول کم دیده می‌شود. در SGZ حضور آستروسیت‌های با زوائد کم در بین سلول‌های گرانولی قابل مشاهده است. مورفولوژی آستروسیت‌ها لایه مولکولی با سایر مراحل متفاوت است. آستروسیت‌های دور عروقی در این لایه دیده می‌شوند (تصاویر شماره ۲ و ۳).



تصویر شماره ۱ - تصویر میکروسکوپی مراحل مختلف چرخه استروس به روش رنگ آمیزی اسمیر واژن. A: همان‌گونه که در تصویر دیده شود، سلول‌های غالب در مرحله پرواستروس، سلول‌های پوششی هسته‌دار (پیکان) هستند. B: سلول‌های شاخی (پیکان) بیشترین سلول‌های موجود در مرحله استروس هستند. C: سلول‌های موجود در مرحله متاستروس ترکیبی از لوکوسیت (پیکان کوتاه) و سلول‌های شاخی و پوششی است (پیکان) و D: لوکوسیت‌ها (پیکان کوتاه)، بیشترین تعداد سلول‌های مرحله دی استروس را تشکیل می‌دهند. تصاویر داخل مربع‌ها برای مشاهده دقیق‌تر سلول‌ها بزرگ‌تر شده است. نمودار مربوط به ارزیابی میزان استروژن موجود در گردش خون مراحل مختلف چرخه استروس (مرحله پرواستروس Pro، استروس Est، استروس Met و دی استروس D) می‌باشد. اختلاف معنی‌دار با ستاره بر روی ستون‌ها نشان داده شده و اختلاف همه گروه‌ها با یکدیگر معنی‌دار است ( $P \leq 0.05$ ).

## آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۶ و بررسی اختلاف بین گروه‌ها با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه (One Way ANOVA) و به دنبال آن آزمون تکمیلی Tukey انجام شد و نمودارها با نرم افزار Excel ترسیم گردید.

## نتایج

تعیین مراحل چرخه استروس و مقایسه میزان استروژن در مراحل مختلف چرخه

تعیین مراحل مختلف چرخه استروس با رنگ‌آمیزی اسمیر ترشحات واژن و بر اساس نوع و نسبت سلول‌های مشاهده شده در اسمیر واژنی انجام شد. در مرحله پرواستروس، سلول‌های پوششی هسته‌دار و در استروس، سلول‌های شاخی شده غالب بودند. در مرحله متاستروس، حضور یکسان از لوکوسیت‌ها و سلول‌های شاخی شده و اپیتلیالی مشاهده می‌شود. در مرحله دی استروس، برتری لوکوسیت‌ها مشخص بود (تصویر شماره ۱). همان‌گونه که در نمودار شماره ۱ مشاهده می‌گردد، بیشترین میزان استروژن در مرحله پرواستروس چرخه فحلی وجود دارد. این میزان استروژن خون موش‌های مرحله پرواستروس نسبت به سایر مراحل به صورت معنی‌داری بیشتر بود ( $P \leq 0.05$ ).

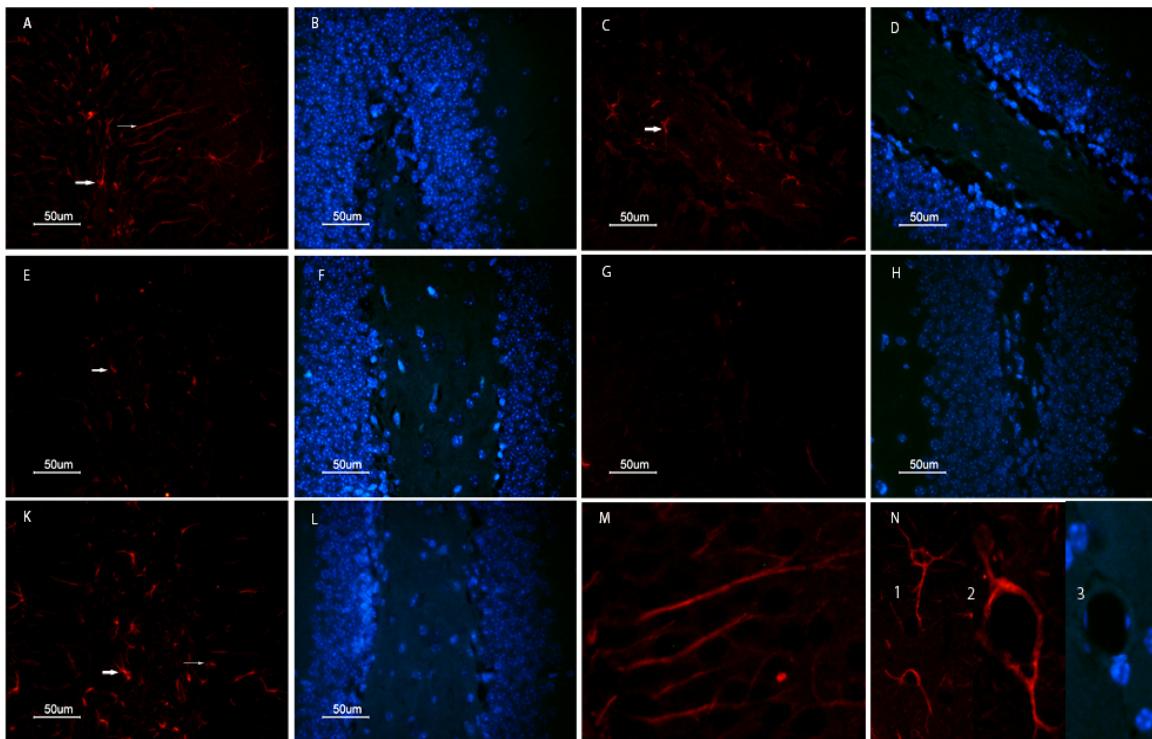
ویژگی مورفولوژیکی آستروسیت‌ها در مرحله پرواستروس چرخه فحلی

سلول‌های GFAP مثبت در (SGZ; subgranular zone شکنیج دندانه‌ای هیپوکامپ با رنگ‌پذیری زیاد، دارای زوائد بلند و شعاعی در بین سلول‌های گرانولی امتداد یافته و پس از طی نمودن این لایه در ناحیه مولکولی شاخه شاخه می‌شوند. سلول‌های آستروسیتی دور عروق فراوان ناحیه مولکولی و SGZ به‌وضوح دیده می‌شوند. در لایه مولکولی آستروسیت‌های دور عروقی به صورت یک حلقه کامل عروق را فرا گرفته و از طریق یک زانه بلند با آستروسیت‌های پیرامون مربوط هستند (تصاویر شماره ۲ و ۳).

ویژگی مورفولوژیکی آستروسیت‌های هیپوکامپ در مراحل مختلف چرخه فحلی

## مرحله پرواستروس

علاوه بر تغییر مورفولوژیکی سلول‌ها از میزان رنگ‌پذیری به نشان‌گر GFAP کاسته می‌شود. در ناحیه ناف یا هایلوس



تصویر شماره ۲- مشاهده مقاطع رنگ آمیزی شده مراحل مختلف چرخه استتروس در منطقه شکیج دندانه‌ای هیپوکامپ به روش ایمنوستیشیمی برای نشان‌گر GFAP (قرمز) با میکروسکوپ فلورسانس. A و B: مرحله پرواستتروس، C و D: مرحله استتروس، E و F: مرحله متاستتروس، G و H: مرحله اپیاستتروس، K و L: موش نابالغ، M: تصویر بزرگ مرحله پرواستتروس (A)، آستروسیت‌های شعاعی SGZ که زوائد بلند آن‌ها طول لایه دی استتروس، N: تصویر بزرگ شده آستروسیت‌های دور عروقی ناحیه مولکولی پرواستتروس دیده می‌شود. هسته سلول‌ها با DAPI (آبی) رنگ شده است.

مشاهده است. آستروسیت‌های دور عروقی کمتر دیده می‌شوند و از نظر آرایش سلولی و چیدمان سلولی با مراحل قبلی متفاوت هستند (تصاویر شماره ۲ و ۳).

#### پیش از بلوغ

در منطقه هایلوس و SGZ واکنش به نشان‌گر GFAP کمتر دیده می‌شود و سلول‌ها مورفولوژی و زوائد مشخصی را نشان نمی‌دهند. در بین سلول‌های گرانولی زوائد سلول‌های آستروسیتی وجود دارد. در لایه مولکولی آستروسیت‌ها دور عروقی و آستروسیت‌های با زوائد دو شاخه‌ای دیده می‌شود، ولی اندازه زوائد طویل نیست (تصاویر شماره ۲ و ۳).

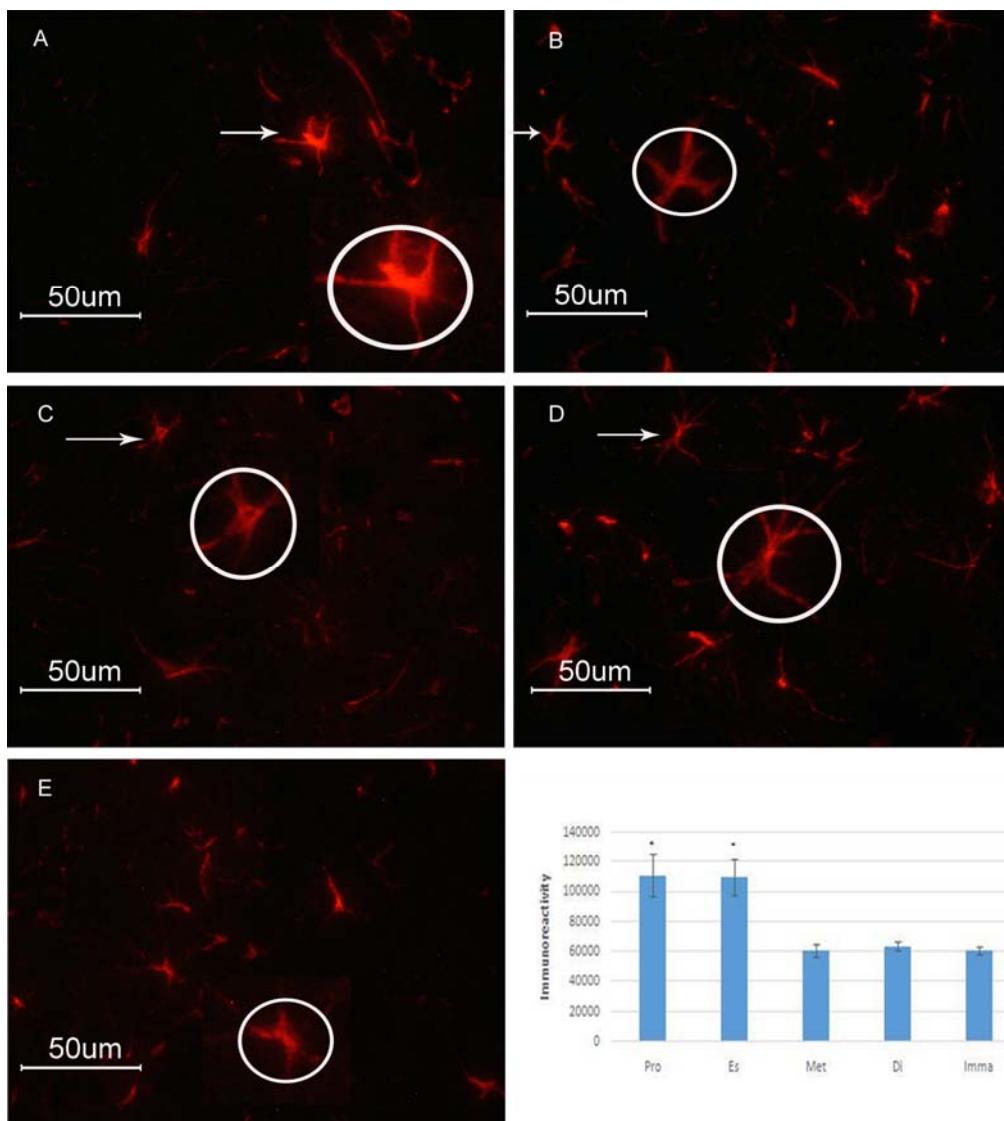
مقایسه شدت واکنش به نشان‌گر GFAP در هیپوکامپ پاسخ به نشان‌گر GFAP هیپوکامپ در مرحله پرواستتروس و استتروس نسبت به سایر مراحل بیشتر بوده و از نظر آماری معنی دار است (نمودار تصویر ۳).

#### مرحله مت استتروس

آستروسیت‌های SGZ کوچک بوده و مورفولوژی چندان مشخصی ندارند، ولی زوائد آن‌ها در بین سلول‌های گرانولی دیده می‌شود. در لایه مولکولی آستروسیت‌ها دارای مورفولوژی با زوائد دو شاخه‌ای است که از دو طرف سلول امتداد یافته و منشعب می‌گردد. آستروسیت‌های دور عروقی کاملاً عروق را احاطه کرده‌اند. هم‌چنین، آستروسیت‌های ناحیه هایلوس کوچک‌تر بوده و داری انشعابات متعدد و کوتاه می‌باشند (تصاویر شماره ۲ و ۳).

#### مرحله دی استتروس

آستروسیت‌ها SGZ مانند مرحله پرواستتروس با مورفو-لوزی مشخص با زوائد بلند شعاعی نظیر آنچه که در مرحله پرواستتروس وجود داشتند، دیده نمی‌شود. آستروسیت‌های ناحیه هایلوس با مورفولوژی ستاره‌ای مشخص شده و دارای زوائد متعدد و منشعب هستند. تعداد این زوائد منشعب شده از جسم سلولی به ۶ عدد می‌رسد. در لایه مولکولی، آستروسیت‌های با زوائد بلند و منشعب هستند که انشعابات ثانویه آن‌ها نیز قابل



تصویر شماره ۳- مقاطع رنگ‌آمیزی شده مراحل مختلف چرخه استروس در منطقه مولکولی هیپوکامپ به روش ایمنوستیشیمی برای نشان‌گر GFAP با میکروسکوپ فلورسانس. A: مرحله پرواستروس، B: مرحله استروس، C: مرحله متاستروس، D: مرحله نابالغ مشاهده می‌شود. سلول‌های آستروسیتی GFAP مثبت به شکل ستاره‌ای با زوائد متعدد دیده می‌شود. برای مشاهده مورفولوژی دقیق‌تر سلول‌ها و گستردگی انشعابات آستروسیت‌ها یکی از سلول‌ها بزرگ‌تر شده (پیکان) و در داخل دایره دیده می‌شود. اندازه دایره وسعت محیطی که سلول اشغال می‌کند را نشان می‌دهد. نمودار: مقایسه بین و رنگ‌پذیری به GFAP در هیپوکامپ و پاسخ به این نشان‌گر (Immunoreactivity) در گروه‌های مختلف (مرحله‌ی پرواستروس Pro، استروس Est، متاستروس Met و دیاستروس Di) را نشان می‌دهد. گروه‌های پرواستروس و استروس (ستاره‌دار) با گروه‌های بدون ستاره اختلاف معنی‌دار دارند ( $P \leq 0.05$ ).

استروس و غلظت استروژن تغییر می‌کند. علاوه بر نقش حمایت متابولیکی و ساختمانی سلول‌های گلیال در ارتباطات نورونی، آستروسیت‌ها در پاسخ به استروئیدهای جنسی چهار تغییرات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی می‌شوند. این تغییرات مورفولوژیکی در عملکرد نورونی از طریق تنظیم ارتباطات سیناپسی نشان داده می‌شود. استرادیول مسیرهایی که منجر به تغییر در ترجمه‌ی پروتئین‌های سیناپسی، شکل‌گیری مجدد اکتین، شکل‌گیری سیناپس و خار دندانی می‌شود را فعال می‌کند [۲۶]. تغییر در مورفولوژی

## بحث

مطالعه حاضر نشان داد که علاوه بر مورفولوژی متفاوت آستروسیت‌ها در نواحی شکنج دندانه‌ای و مولکولار هیپوکامپ، ساختمان این سلول‌ها با تغییر مراحل چرخه استروس و نوسان هورمون‌های جنسی به خصوص استروژن دگرگون می‌گردد. رابطه بین مورفولوژی آستروسیت‌ها با تغییر مراحل چرخه استروس و تغییر میزان استروژن پلاسمای خون در این پژوهش به خوبی نشان داده شده است. شدت بیان GFAP هیپوکامپ با تغییر چرخه

سلول بنیادی عصبی محسوب می‌شود، شبیه باشد. آستروسیت‌های SGZ سایر مراحل از نوع افقی است و مورفولوژی متفاوتی دارد. این مرحله بالاترین میزان رنگ‌پذیری به GFAP را نشان می‌دهد. ناحیه‌ی مولکولار مرحله‌ی استروس دارای سلول‌های آستروسیتی با جسم سلولی مشخص و زوائد منشعب فراوان می‌باشد. در مرحله‌ی متاستروس آستروسیت‌های SGZ کوچک بوده و مورفولوژی چندان مشخصی ندارند، ولی زوائد آنها در بین سلول‌های گرانولی دیده می‌شود. در لایه مولکولی، آستروسیت‌ها دارای مورفولوژی با زوائد دو شاخه‌ای است که از دو طرف سلول امتداد یافته و منشعب می‌گردد. هم‌چنین، آستروسیت‌های ناحیه هایلوس کوچک بوده و داری انشعابات متعدد و کوتاه می‌باشند. این مرحله کمترین میزان رنگ‌پذیری به GFAP را نشان می‌دهد. تصاویر شماره ۲ و ۳. در مرحله‌ی دی‌استروس آستروسیت‌ها SGZ مانند مرحله پرواستروس که دارای مورفولوژی مشخص با زوائد بلند شعاعی بودند، دیده نمی‌شود. آستروسیت‌های ناحیه هایلوس با مورفولوژی ستاره‌ای مشخص و دارای زوائد متعدد و منشعب هستند (تصاویر شماره ۲ و ۳). در فاز پرواستروس که میزان هورمون‌های جنسی افزایش می‌باید [۲]. موش‌های صحرایی دارای چرخه استروس ۴–۵ روزه بوده و در این مدت میزان نوسان چشم‌گیر در میزان استروژن و پروژسترون دارند. در شکنج دندانه‌ای جوندگان بزرگ‌سال، استرادیول هم بر تکثیر و هم بر بقاء سلولی تاثیر می‌گذارد. در هیپوکامپ، افزایش تکثیر سلولی ناشی از استرادیول تا حدودی مربوط به اثرات آن بر گیرنده‌ی استروژن می‌باشد [۲۴]. در طول چرخه استروس ۴ تا ۶ روزه جوندگان، در مرحله‌ی پرو-استروس، استرادیول در گردش افزایش یافته و سپس کاهش پیدا می‌کند. در روز بعد در مرحله‌ی استروس، استرادیول در گردش پایین رفت و در مرحله‌ی دی‌استروس اندکی بالا می‌رود؛ فقط در بازگشت به پرواستروس به سرعت افزایش می‌باید [۳۰]. مطالعه‌ی حاضر نیز نشان داد علاوه بر تفاوت در مورفولوژی آستروسیت‌های هیپوکامپ، میزان رنگ‌پذیری به GFAP نیز با تغییر هورمون استروژن دگرگون می‌شود. آستروسیت‌های شعاعی که به صورت طبیعی در بخش داخلی لایه سلولی گرانولی قرار دارند با نورون-زاویی مرتبط هستند [۳۱]. در پاسخ به آسیب، زوائد سلولی آستروسیت‌ها تحریک شده، هیپرتروفی پیدا کرده و زوائد آن ضخیم‌تر و بلندتر می‌گردد [۳۲]. استرادیول پلاستیسیته سیناپسی را تنظیم کرده و رشد زوائد آستروسیت‌ها را تسهیل می‌کند [۳۳]. سلول‌های بنیادی عصبی، نشان‌گر آستروسیت‌های نابالغ و گلیال-های شعاعی نظری GFAP، ویمتین و Brain lipid (BLBP)

آستروسیت‌ها به واسطه‌ی استروئیدهای جنسی با ارزیابی بیان GFAP که یکی از مهمترین پروتئین‌های ساختاری آستروسیت‌ها است، انجام می‌گردد [۲۷]. علاوه بر نورون‌ها، سلول‌های گلیال نیز هدف هورمون‌های جنسی مانند، استروژن و تستوسترون هستند. در CA1 مosh صحرایی ماده آستروسیت‌های GFAP مثبت منطقه CA3 مosh‌های نر دارای بیشتر از نرها بوده و برعکس ناحیه CA3 مosh‌های نر دارای آستروسیت‌های بیشتر از ماده‌ها است [۲۸]. در چرخه استروس جوندگان ماده میزان ۱۷-بتا استرادیول در مرحله‌ی دی‌استروس به آرامی افزایش می‌باید تا این‌که در پرواستروس به بالاترین حد رسیده و سریع افت می‌کند. پایین‌ترین میزان ۱۷-بتا استرادیول در مرحله‌ی استروس است [۲۹]. نتایج سنجش هورمونی این مطالعه نیز بیشترین میزان استروژن را در پرواستروس نشان می‌دهد. تفاوت‌های جنسی در مورفولوژی و عملکرد هیپوکامپ گزارش شده است. در مرحله‌ی پرواستروس مosh صحرایی، رنگ‌پذیری به GFAP در مناطق CA1، CA3 و DG یا شکنج دندانه‌ای هیپوکامپ نسبت به مرحله‌ی دی‌استروس ماده و Mosh نر بالاتر است. جالب این‌که مورفولوژی آستروسیت‌ها نیز با یکدیگر تفاوت داشت. تفاوت در رنگ‌پذیری GFAP، تعداد و مورفولوژی آستروسیت‌ها در طی سیکل استروس نشان دهنده‌ی دخالت هورمون‌های استروئیدی جنسی در عملکرد متفاوت جنسی هیپوکامپ در طول چرخه استروس است. هم‌چنین، این مطالعه نشان داد که تفاوت مشخص در بیان GFAP، تعداد و مورفولوژی آستروسیت‌های هیپوکامپ Mosh صحرایی بالغ و هم‌چنین در طول مراحل پرواستروس و دی‌استروس وجود دارد [۲]. در مطالعه حاضر نشان‌گر GFAP برای نشان دادن آستروسیت‌ها به کار رفته است. پس از اینتوهیستوشیمی مشخص گردید که این نشان‌گر در مراحل مختلف چرخه استروس و هم‌چنین نواحی مختلف هیپوکامپ (شکنج دندانه‌ای و منطقه مولکولار) پاسخ‌های متفاوت نشان داده است. در مجموع، مرحله‌ی پرواستروس واکنش یا پاسخ قوی‌تری به نشان‌گر GFAP نسبت به سایر مراحل نشان داده است (تصاویر شماره ۲ و ۳). شکل و مورفولوژی آستروسیت‌ها در ناحیه‌ی DG نسبت به نواحی هایلوس و مولکولی متفاوت است. آستروسیت‌های مرحله‌ی پرواستروس در ناحیه‌ی DG دارای زوائد بلند و باریک بوده ولی در نواحی هایلوس و مولکولی بیشتر به شکل ستاره‌ای دارای زوائد متعدد و منشعب هستند. زوائد بلند و کشیده آستروسیت‌ها در تصویر مشخص است. زوائد آستروسیت‌های SGZ به سمت ناحیه‌ی گرانولی کشیده شده و تا لایه مولکولار پیش می‌رود. ممکن است آستروسیت‌های SGZ مرحله پرواستروس از نوع شعاعی بوده و به سلول‌های گلیال شعاعی که

کوچک آزمایشگاهی باشد.

### نتیجه‌گیری

در طول چرخه استروس در ناحیه هیپوکامپ معز موش ماده علاوه بر تفاوت مورفولوژی آستروسیت‌ها به صورت وابسته به چرخه استروس و غلظت استروژن، میزان پیان GFAP نیز دچار تغییر می‌شود.

### تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت دانشکده زیست‌شناسی و پژوهشکده علوم زیستی دانشگاه دامغان انجام شده است. در ضمن از آقای ابوطالب کوشان کارشناس آزمایشگاه برای انجام سنجش آنژیمی تشکر می‌گردد.

### References:

- [1] Pawluski JL, Brummelte S, Barha CK, Crozier TM, Galea LA. Effects of steroid hormones on neurogenesis in the hippocampus of the adult female rodent during the estrous cycle, pregnancy, lactation and aging. *Front Neuroendocrinol* 2009; 30(3): 343-57.
- [2] Arias C, Zepeda A, Hernández-Ortega K, Leal-Galicia P, Lojero C, Camacho-Arroyo I. Sex and estrous cycle-dependent differences in glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the adult rat hippocampus. *Horm Behav* 2009; 55(1): 257-63.
- [3] Horner PJ, Palmer TD. New roles for astrocytes: the nightlife of an 'astrocyte'. La vida loca!. *Trends Neurosci* 2003; 26(11): 597-603.
- [4] Wu Y, Zhang AQ, Yew DT. Age related changes of various markers of astrocytes in senescence-accelerated mice hippocampus. *Neurochem Int* 2005; 46(7): 565-74.
- [5] Ogata K, Kosaka T. Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus. *Neurosci* 2002; 113(1): 221-33.
- [6] Jacque CM, Vinner C, Kujas M, Raoul M, Racadot J, Baumann NA. Determination of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in human brain tumors. *J Neurol Sci* 1978; 35(1): 147-55.
- [7] Roessmann U, Velasco ME, Sindely SD, Gambetti P. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) in ependymal cells during development. An immunocytochemical study. *Brain Res* 1980; 200(1): 13-21.
- [8] Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res* 2000; 25(9-10): 1439-51.
- [9] Isaacs A, Baker M, Wavrant-De Vriese F, Hutton M. Determination of the gene structure of human GFAP and absence of coding region mutations associated with frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17. *Genomics* 1998; 51(1): 152-4.
- [10] Cullen DK, Simon CM, LaPlaca MC. Strain rate-dependent induction of reactive astrogliosis and cell death in three-dimensional neuronal-astrocytic co-cultures. *Brain Res* 2007; 1158: 103-15.
- [11] Tardy M, Fages C, Le Prince G, Rolland B, Nunez J. Regulation of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) and of its encoding mRNA in the developing brain and in cultured astrocytes. *Adv Exp Med Biol* 1990; 265: 41-52.
- [12] Liedtke W, Edelmann W, Bieri PL, Chiu FC, Cowan NJ, Kucherlapati R, Raine CS. GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron* 1996; 17: 607-15.
- [13] Weinstein DE, Shelanski ML, Liem RK. Suppression by antisense mRNA demonstrates a requirement for the glial fibrillary acidic protein in the formation of stable astrocytic processes in response to neurons. *J Cell Biol* 1991; 112(6): 1205-13.
- [14] Song H, Stevens CF, Gage FH. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 2002; 417(6884): 39-44.
- [15] Seri B, García-Verdugo JM, Collado-Morente L, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J Comp Neurol* 2004; 478(4): 359-78.
- [16] Song HJ, Stevens CF, Gage FH. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nat Neurosci* 2002; 5(5): 438-45.
- [17] Seth P, Koul N. Astrocyte, the star avatar: redefined. *J Biosci* 2008; 33(3): 405-21.
- [18] Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA. Control of synapse number by glia. *Science* 2001; 291(5504): 657-61.

binding protein بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی و بیان نشانگرهای مولکولی ویژه در SGZ مشخص شده است. نوع I سلول‌های شبکه‌گلیالی (RGLs) Radial Glial Like Cells شاععی سازهایی که دارای زوائد شاععی بوده از کل لایه سلولی گرانولی عبور کرده و در لایه سلولی مولکولی شاخه شاخه می‌شوند. این سلول‌ها Nestin و GFAP را بیان می‌کنند. RGLs دارای ظرفیت خود بازسازی و چند توان می‌باشند و علاوه بر تولید RGLs، نورون‌ها و آستروسیت‌ها را نیز تولید می‌کنند. [۳۶، ۳۵، ۳]. بنابراین، افزایش رنگ‌پذیری هیپوکامپ به GFAP و نیز مورفولوژی آستروسیت‌ها در مرحله پرواستروس می‌تواند نشانه بالا رفتن میزان نورون‌زایی مرتبط با چرخه استروس در موش باشد.

- [19] Powell EM, Geller HM. Dissection of astrocyte-mediated cues in neuronal guidance and process extension. *Glia* 1999; 26(1): 73-83.
- [20] Koehler RC, Roman RJ, Harder DR. Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. *Trends Neurosci* 2009; 32(3): 160-9.
- [21] Fonnum F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem* 1984; 42(1): 1-11.
- [22] Weidenfeller C, Svendsen CN, Shusta EV. Differentiating embryonic neural progenitor cells induce blood-brain barrier properties. *J Neurochem* 2007; 101(2): 555-65.
- [23] Gleichman AJ, Carmichael ST. Astrocytic therapies for neuronal repair in stroke. *Neurosci Lett* 2014; 565C: 47-52.
- [24] Galea LA. Gonadal hormone modulation of neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rodents. *Brain Res Rev* 2008; 57(2): 332-341.
- [25] Goldman JM, Murr AS, Cooper RL. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2007; 80(2): 84-97.
- [26] de Lacalle S. Estrogen effects on neuronal morphology. *Endocrine* 2006; 29(2): 185-90.
- [27] Mong JA, Blutstein T. Estradiol modulation of astrocytic form and function: implications for hormonal control of synaptic communication. *Neuroscience* 2006; 138(3): 967-75.
- [28] Conejo NM, González-Pardo H, Pedraza C, Navarro FF, Vallejo G, Arias JL. Evidence for sexual difference in astrocytes of adult rat hippocampus. *Neurosci Lett* 2003; 339(2): 119-22.
- [29] Barha CK, Galea LA. Influence of different estrogens on neuroplasticity and cognition in the hippocampus. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1800(10): 1056-67.
- [30] Spencer JL, Waters EM, Romeo RD, Wood GE, Milner TA, McEwen BS. Uncovering the mechanisms of estrogen effects on hippocampal function. *Front Neuroendocrinol* 2008; 29(2): 219-37.
- [31] Takahashi T, Amano N, Asamura H, Nomiyama T, Hanihara T, Nakayama J, et al. Correlation between glial fibrillary acidic protein-positive astrocytes and age in the human hippocampus. *Leg Med (Tokyo)* 2006; 8(3): 161-5.
- [32] Pekny M, Wilhelmsson U, Pekna M. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neurosci Lett* 2014; 565C: 30-8.
- [33] Acaz-Fonseca E, Sanchez-Gonzalez R, Azcoitia I, Arevalo MA, Garcia-Segura LM. Role of astrocytes in the neuroprotective actions of 17 $\beta$ -estradiol and selective estrogen receptor modulators. *Mol Cell Endocrinol* 2014; 25; 389(1-2): 48-57.
- [34] Encinas JM, Sierra A, Valcárcel-Martín R, Martín-Suárez S. A developmental perspective on adult hippocampal neurogenesis. *Int J Dev Neurosci* 2013; 31(7): 640-5.
- [35] Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 2008; 132(4): 645-60.
- [36] Faigle R, Song H. Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830(2): 2435-48.