

اثر تزریق سیستمیک dbcAMP بر پاسخ مهاجرتی سلول‌های بنیادی عصبی در مدل EAE بیماری ام اس

شیوا خضری^۱، محمد جوان^۲، حسین بهاروند^۳، سعید سمنانیان^۴

^۱ دانشجوی دکترای فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

^۲ دانشیار گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

^۳ دانشیار گروه سلول‌های بنیادی، پژوهشکده رویان

^۴ استاد گروه سلول‌های بنیادی، پژوهشکده رویان

نشانی نویسنده مسؤول: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه فیزیولوژی، دکتر محمد جوان

E-mail: mjavan@modares.ac.ir

وصول: ۸۹/۱۱/۲۶، اصلاح: ۹۰/۲/۱۱، پذیرش: ۹۰/۴/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: افزایش مشارکت سلول‌های بنیادی عصبی در ترمیم اندوژن آسیب‌های میلینی یکی از مهم‌ترین استراتژی‌ها برای درمان‌های نوین بیماری ام اس است. افزایش cAMP با فعال کردن PKA و همچنین مستقل از آن، ظرفیت ترمیمی مغز را افزایش می‌دهد. در مطالعه حاضر، اثر تزریق داخل صفاقی آنالوگ فعال آن (dbcAMP) بر مهاجرت سلول‌های بنیادی عصبی در مدل EAE بیماری ام اس بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی برای القای EAE، ۳۰۰ μg MOG با CFA (complete Freund's adjuvant) مخلوط و به صورت زیر جلدی به ۳۳ موش تزریق شد. همزمان با تزریق اول و ۴۸ ساعت بعد از آن، سم سیاه سرفه (pertussis toxin: PT) به صورت i.p. تزریق شد. موش‌های گروه کنترل فقط CFA و PT را دریافت کردند. گروهی از موش‌های القا شده dbcAMP را با دوز ۱۰ mg/kg از روز ۹ تا ۱۴ یا ۹ تا ۲۱ به طور داخل صفاقی دریافت کردند. علائم کلینیکی روزانه بررسی شدند. از روش ایمونوهیستوشیمی و شاخص مولکولی نستین برای شناسایی سلول‌های بنیادی عصبی استفاده شد. تعداد سلول‌های Nestin+ در برش‌های ساجیتال نواحی اطراف بطن جانبی (SVZ) و پیاز بویایی (OB) شمارش شد. آنالیز داده‌های آماری با استفاده از GraphPad Prism Version 5 انجام گرفت. برای مقایسه علائم کلینیکی بین گروه‌های EAE و تیمار شده با dbcAMP از آزمون تی غیر زوجی استفاده شد، همچنین برای مقایسه آماری تعداد سلول‌های Nestin+ از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و پس آزمون توکی استفاده شد.

یافته‌ها: القای EAE باعث ایجاد علائم کلینیکی، فلجی دم و پاهای عقب شد. dbcAMP باعث کاهش شدت و علائم EAE شد. بیشترین درجه بیماری در گروهی که پس از القا، dbcAMP دریافت کرده بودند ۰/۶۶±۰/۱۳ و در گروه کنترل ۲/۵±۰/۲ در روز ۲۱ بعد از القا بود (n=6). با القا EAE تعداد سلول‌های nestin+ در ناحیه SVZ تغییر معناداری نکرد اما در پیاز بویایی افزایش یافت. با پیشرفت بیماری در گروه EAE در روز ۲۱ بعد از القا، تعداد این سلول‌ها در بطن جانبی کاهش جزئی یافت (۵/۶۶±۱/۲۰) و افزایشی در تعداد این سلول‌ها در گروه EAE که از روز ۹ تا ۲۱ بعد از القا، dbcAMP دریافت کرده بودند دیده شد (۹±۲/۳). با پیشرفت بیماری در روز ۲۱ بعد از القا، تعداد این سلول‌ها در پیاز بویایی افزایش یافت (۱۹/۵±۲/۰۴) و تفاوت این گروه با گروه کنترل معنادار شد (n=3). وقتی dbcAMP از روز ۹ تا ۲۱ تزریق شد، افزایش بارزی در تعداد سلول‌های Nestin+ مشاهده شد (۴±۲/۷۳) که این تغییر در مقایسه با گروه کنترل و گروه EAE ۲۱ معنادار بود (n=3).

نتیجه‌گیری: dbcAMP با افزایش تعداد سلول‌های بنیادی عصبی و القای مهاجرت بیشتر آن‌ها از SVZ بطن‌های جانبی به پیاز بویایی و نواحی آسیب باعث تسریع فرایند ترمیم میلین شده و علائم بیماری را کاهش می‌دهد. (مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی سبزوار، دوره ۱۸/شماره ۳/صص ۱۸۷-۱۷۹).

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی عصبی؛ EAE، dbcAMP؛ دمیلتانسیون؛ ترمیم میلین؛ موش.

مقدمه

بیماری ام اس (Multiple Sclerosis) بیماری دمی‌لینه‌کننده التهابی مزمن سیستم عصبی مرکزی می‌باشد که با التهاب بافتی و آپوپتوز سلول‌های عصبی همراه است (۱). شیوع این بیماری در زنان ۲ تا ۳ برابر مردان می‌باشد و اغلب در سنین ۲۰ تا ۴۰ سالگی بروز می‌کند (۲). مهم‌ترین علائم این بیماری فلج حرکتی، تخریب حسی به‌ویژه اختلالات بینایی، نقایص شناختی و غیره می‌باشد (۳). شناسایی سلول‌های بنیادی عصبی درون‌زاد در سیستم عصبی مرکزی انسان و جوندگان راهبردهای جدیدی برای ترمیم آسیب‌های مغزی ایجاد کرده است. در طی تکوین، سیستم عصبی از سلول‌های بنیادی عصبی (NSCs: Neural Stem Cells) که پتانسیل خود تجدید شونده (Self-renewing) و تمایز به نورون و انواع سلول‌های گلیال را دارند، پدید می‌آید (۴). نواحی اصلی تمرکز NSCs شامل ناحیه زیر بطنی (SVZ: Subventricular Zone) و منطقه ساب گرانولار هیپوکمپ می‌باشد. این سلول‌ها به‌عنوان پتانسیل فیزیولوژیک مغز در ترمیم سیستم عصبی مرکزی شناخته شده‌اند و پس از آسیب‌های مغزی به محل ضایعه مهاجرت می‌کنند و به اولیگودندروسیت‌ها، نورون‌ها و یا آستروسیت‌ها (بسته به فنوتیپ سلولی خاصی که هر بیماری دیکته می‌کند) متمایز می‌شوند. در این فرایند انواعی از مولکول‌ها و فاکتورهای رشد آزاد شده از نورون‌های آسیب‌دیده، آستروسیت‌ها و سلول‌های ایمنی دخیل هستند. سلول‌های بنیادی SVZ در شرایط معمولی تکثیر و از طریق RMS (Rostral migratory stream) به پیاز بویایی (OB: Olfactory Bulb) مهاجرت می‌کنند و جانشین نورون‌های آن می‌شوند (۴).

انواعی از مدل‌های *in vivo* و *in vitro* جهت مطالعه فرآیندهای التهابی دمی‌لینه‌کننده و نورودژنراتیو بیماری ام اس وجود دارد که شامل مدل EAE (Experimental autoimmune encephalomyelitis)،

دمی‌لیناسیون القا شده توسط عفونت‌های ویروسی مثل ویروس Theiler، دمی‌لیناسیون ناشی از تزریق ترکیبات سمی مانند اتیدیوم بروماید (EB) و لیزولستین و همچنین دمی‌لیناسیون ناشی از پرتو X می‌باشد (۵،۶).

EAE یک مدل حیوانی برای بررسی شاخص‌های التهابی و رفتاری بیماری ام اس است. این مدل به‌وسیله مواجهه مستقیم حیوان با آنتی‌ژن‌ها و یا به‌طور غیرفعال با انتقال سلول‌های T خاص میلینی القا می‌شود. در مدل EAE، سلول‌های T بر علیه آنتی‌ژن‌های میلینی فعال شده و دمی‌لیناسیون را القا می‌کنند (۷،۸،۹).

آسیب آکسونی و از دست دادن آن یکی از پدیده‌هایی است که در بیماری ام اس مزمن و سایر بیماری‌های نورودژنراتیو دیده می‌شود. آکسون‌های آسیب‌دیده در CNS به آسانی ترمیم نمی‌شوند ولی در سیستم اعصاب محیطی (PNS)، آکسون‌های آسیب‌دیده مخروط رشد تشکیل داده و ترمیم می‌شوند. مهم‌ترین تفاوت بین CNS و PNS حضور انواع سلول‌های اختصاصی گلیال از جمله آستروسیت‌ها، الیگودندروسیت‌ها و میکروگلیاها در CNS است که هر کدام اعمال خاص و ضروری را انجام می‌دهند که از آن جمله می‌توان تشکیل اسکار به‌دنبال ضایعه توسط آستروسیت‌ها را نام برد که رشد آکسونی را مهار می‌کند. علاوه بر این، مهارکننده‌های میلینی مثل Myelin MAG (Oligodendrocyte Myelin Associated Glycoprotein) هم جزء عمده‌ترین مهارکننده‌های ترمیم آکسونی می‌باشند (۱۱-۹).

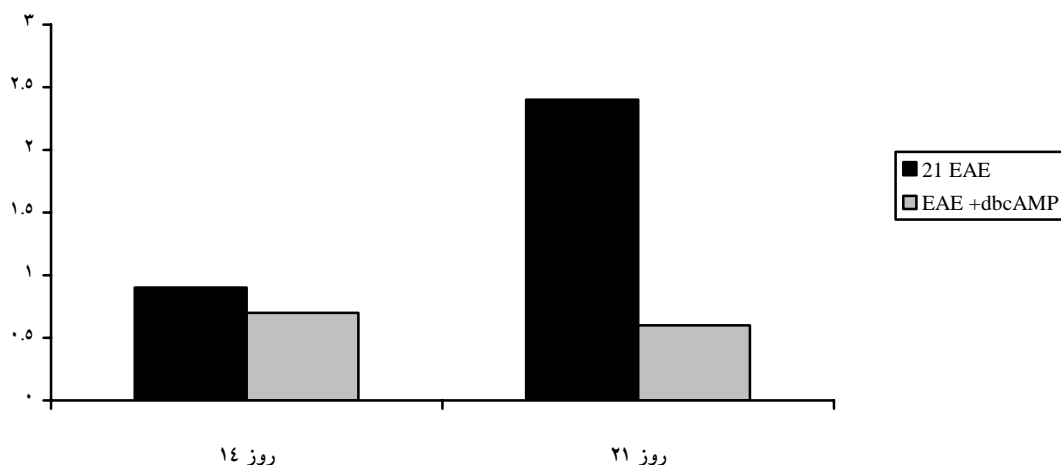
در نورون‌ها، آدنوزین منوفسفات حلقوی (cAMP) در اعمال متعددی همچون رشد جوانه آکسون، تمایز و بقاء عصبی و همچنین در رژنراسیون آکسونی اهمیت دارد (۱۲). مطالعات قبل، نقش مسیر PKAcAMP- در حفاظت عصبی و رژنراسیون را به خوبی مشخص کرده است. یکی از مکانیسم‌های شناخته شده برای cAMP، مهار فعال شدن مسیر Rho به‌وسیله آنتی‌ژن‌های مهار می‌لین همچون Nogo، MAG و... می‌باشد. همچنین cAMP از

دم)، ۱ (فلج شدن دم)، ۲ (اختلال در راه رفتن)، ۳ (فلج اندام‌های عقبی)، ۴ (ضعف اندام‌های جلویی همراه با فلج اندام‌های عقبی)، ۵ (مرگ)، درجه‌بندی شد (۴). موش‌های القا شده از روز ۹ تا ۱۴ یا ۹ تا ۲۱ بعد از القای روزانه 10 mg/kg dbcAMP (Enzo, CN-125, USA) را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. در بررسی علایم بالینی مدل بیماری در هر گروه از ۶ حیوان استفاده شد. مطالعات ایمونوهیستوشیمی: حیوانات گروه‌های آزمایشی مختلف در روزهای ۱۴ و ۲۱ روز بعد از القا با تزریق داخل صفاقی کتامین و زایلوزین به‌طور عمیق بیهوش شدند و عمل پرفیوژن از طریق بطن چپ قلب ابتدا با PBS برای خارج کردن خون درون رگ‌ها و سپس با پارافمالدهید (PFA) ۴ درصد برای تثبیت اولیه بافت مغز انجام شد. پس از نمونه‌برداری برای فیکس شدن بهتر، بافت در PFA ۴ درصد به مدت ۲۴ ساعت در دمای 4°C قرار داده شد. پس از آبگیری با الکل و شفاف‌سازی با زایلول، بلوک پارافینی از بافت مغز تهیه شد و جهت برش‌گیری آماده گردید (۱۵، ۱۶). برش‌های ساجیتال سریال به ضخامت پنج میکرون از مغز کامل و تا حدود ۲ میلیمتر از خط وسط (که شامل SVZ و OB بودند) تهیه شد و بر روی لام‌های از قبل آغشته به چسب پلی لایزین قرار داده شدند. برش‌های مغزی که در بر گیرنده SVZ و OB بودند، برای ایمونوهیستوشیمی انتخاب شدند. پس از شفاف‌سازی و آب‌دهی بافت‌ها با الکل، از HCl ۲ نرمال (۶۰ دقیقه) و بافر بورات (۱۰ دقیقه) استفاده شد. سپس لام‌ها در محلول سیترات بافر ۱۰ میلی مولار (۱۵ دقیقه در دمای 100°C درجه سانتیگراد) اتوکلاو و در $2\times\text{-SSC}$ (sodium standard citrat) (۵ دقیقه) قرار گرفتند. در مرحله بعد، از محلول فرمامید (۶۰ دقیقه در دمای 60°C آون) استفاده شد. بعد از شستشو با $2\times\text{-SSC}$ (۵ دقیقه) و شستشو با PBS (۵ دقیقه)، مقاطع با محلول سرم بز ۱۰ درصد محتوی تریتون ۰/۳ درصد (۶۰ دقیقه) (به‌عنوان محلول بلوک کننده) انکوبه شدند. بافت‌ها در معرض

طریق فعال کردن PKA و متعاقب آن فسفریلاسیون فاکتور نسخه‌برداری CREB موجب بیان ژن‌هایی می‌شوند که با رشد سلول و اکسون مرتبط می‌باشد (۱۳). cAMP با فعال کردن مکانیسم‌های حفاظت عصبی گوناگون، موجب رشد اکسون حتی در حضور پروتئین‌های مهارکننده میلین می‌شود و عمده این اثرات با واسطه فعال شدن پروتئین PKA صورت می‌گیرد (۱). در مطالعه حاضر، از نستین که یک فیلامنت حد واسطه کلاس VI است و در سلول‌های نورواپتیلیالی به میزان بالایی بیان می‌شود، به‌عنوان مارکر شناسایی سلول‌های بنیادی عصبی استفاده شده است (۱۴). با توجه به اثر سیگنالینگ cAMP بر تنظیم سازماندهی و دینامیسی اکتین و ساختار سیتواسکلتون و نقش این اجزاء در مهاجرت سلولی، بر آن شدیم تا اثر dbcAMP بر میزان مهاجرت سلول‌های بنیادی Nestin+ پیرامون بطن‌های جانبی (SVZ) و پیاز بویایی (OB) را بررسی کنیم تا مشخص شود که آیا فعالیت این مسیر سیگنالینگ با اثر بر عواملی چون مهاجرت سلول‌های بنیادی می‌تواند در ترمیم CNS مؤثر باشد.

مواد و روش‌ها

موش‌های ماده نژاد C57BL/6 در محدوده وزنی ۱۹-۲۱ گرم از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. برای القای EAE، $300\ \mu\text{g}$ پپتید MOG 35-55 (GL Biochem, Shanghai) در $100\ \mu\text{l}$ بافر فسفات سالین و $100\ \mu\text{l}$ CFA (complete Freund's adjuvant) (Aldrich) مخلوط و به‌صورت زیر جلدی در ناحیه پشت به هر موش تزریق گردید. همزمان با تزریق اول و ۸ ساعت بعد از آن، $500\ \text{ng}$ سم سیاه‌سرفه PT:pertusis (Aldrich) (toxin) در حجم $200\ \mu\text{l}$ بافر فسفات سالین به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد. به گروه کنترل CFA و PT در مراحل فوق تزریق شد. روند بیماری به‌طور روزانه مورد بررسی قرار گرفت. شدت بیماری به‌صورت صفر (عدم ابتلا به بیماری)، ۰/۵ (اختلال در تون



نمودار ۱. مقایسه میانگین شدت بیماری در روزهای ۱۴ و ۲۱ پس از ایمونیزاسیون با گروهی که از روز ۹ تا ۱۴ و یا ۹ تا ۲۱، dbcAMP دریافت کرده است. تفاوت این گروه‌ها در روز ۲۱ ($P > 0.01/0$) معنادار بود.

روز ۹ بعد از ایمونیزاسیون دیده شد. به تدریج فلجی دم، اختلال در راه رفتن و فلجی اندام‌های عقبی مشاهده شد (نمودار ۱). با گذشت زمان، علائم بیماری بیشتر شدند. بیشترین درجه بیماری ($2/0 \pm 0/2$) در روز ۲۱ بعد از القا دیده شد. موش‌هایی که فقط CFA و PT دریافت کرده بودند، مدل EAE را نشان ندادند.

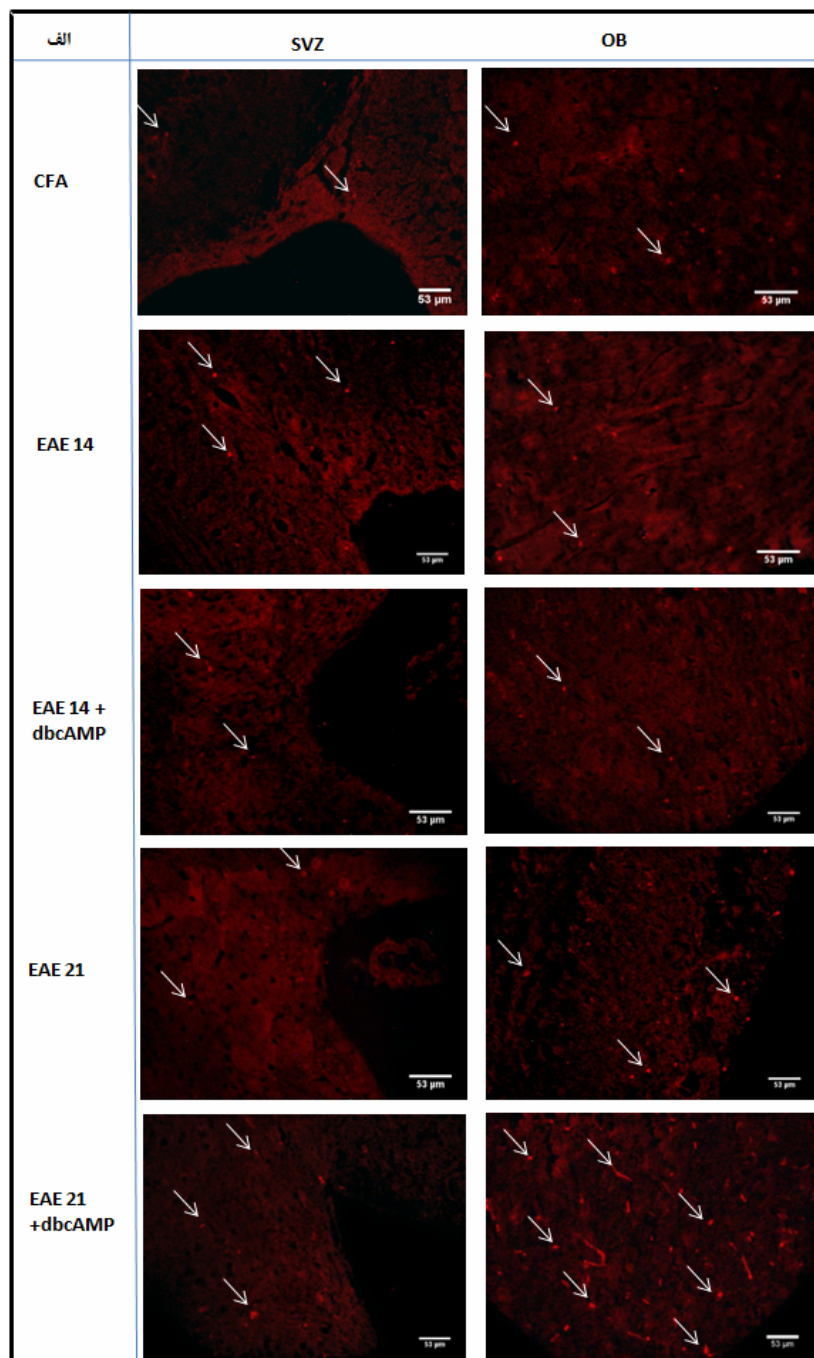
اثر dbcAMP بر شدت علائم القای EAE: موش‌های القا شده با MOG از زمان شروع علائم کلینیکی (روز ۹ بعد از القا) روزانه ۱۰ mg/kg dbcAMP را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند و علائم هر روز بررسی شدند. دو گروه از موش‌های القا شده از روز ۹-۱۴ یا ۹-۲۱، هر روز dbcAMP را دریافت کردند که باعث کاهش شدت و علائم EAE شد. شدت بیماری در روز ۲۱ بعد از القا $0/13 \pm 0/66$ بود و پیشرفت علائم کلینیکی فقط تا مرحله فلجی نسبی دم دیده شد. نمودار ۱ تفاوت گروه‌های EAE و EAE در مان شده با dbcAMP در روزهای ۱۴ و ۲۱ بعد از القا را نشان می‌دهد که تفاوت این دو گروه در روز ۲۱ معنادار بود ($P < 0/001$) (نمودار ۱).

پاسخ سلول‌های بنیادی عصبی به دمی‌لیناسیون و تزریق dbcAMP: برای ردیابی سلول‌های بنیادی عصبی از مارکر نستین استفاده شد و با ایمونوهیستوشیمی تعداد این

آنتی‌بادی اولیه mouse anti-Nestin (۱:۵۰، Chemicon)، overnight در یخچال قرار گرفتند؛ سپس از آنتی‌بادی ثانویه Goat anti-mouse (۱:۷۵، Chemicon) با نشان Rhodamin به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق و محفظه تاریک و مرطوب استفاده شد. در نهایت، لام‌ها با بافر گلیسرول پوشیده شده و بعد از گذاشتن لامل، با میکروسکوپ فلورسنت Nikon E-800 بررسی شد. تعداد سلول‌های Nestin+ در ناحیه SVZ و OB در ۳ موش ($n=3$) و از هر موش در ۳ لام که هر کدام ۳ برش متوالی داشتند، شمارش و میانگین گرفته شد. آنالیز داده‌های آماری با استفاده از GraphPad Prism Version 5 انجام گرفت. آزمون تی غیر زوجی برای مقایسه علائم کلینیکی دو گروه EAE و EAE+dbcAMP و آنالیز واریانس یک طرفه و سپس آزمون توکی برای مقایسه تعداد سلول‌های Nestin+ بین گروه‌ها استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای معیار میانگین ارائه شده و $P < 0/05$ به عنوان حداقل سطح معنادار بودن در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

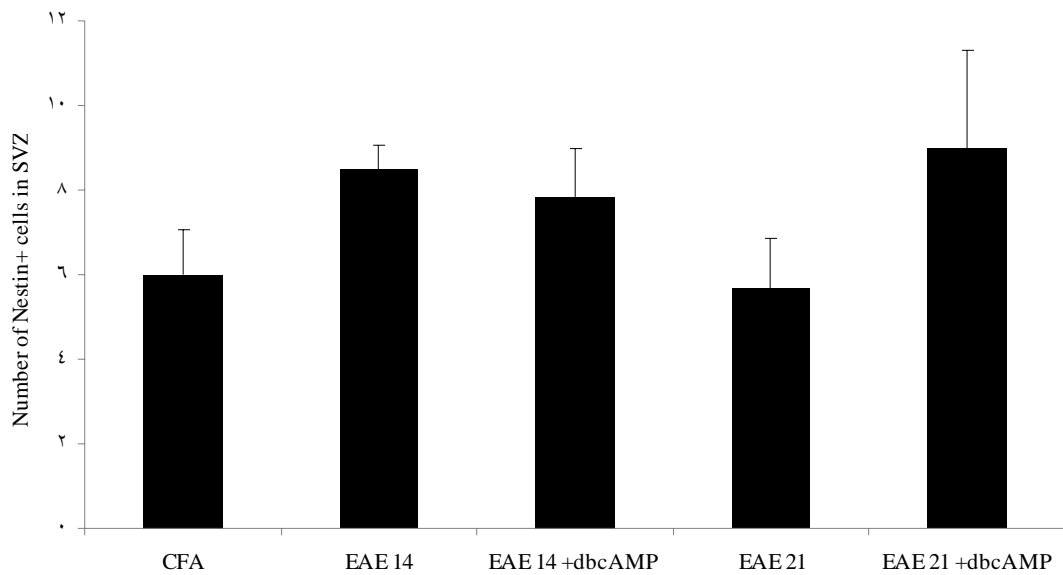
مشخصات مدل EAE: موش‌های ایمونیزه شده با MOG، مدل EAE را نشان دادند و علائم کلینیکی از



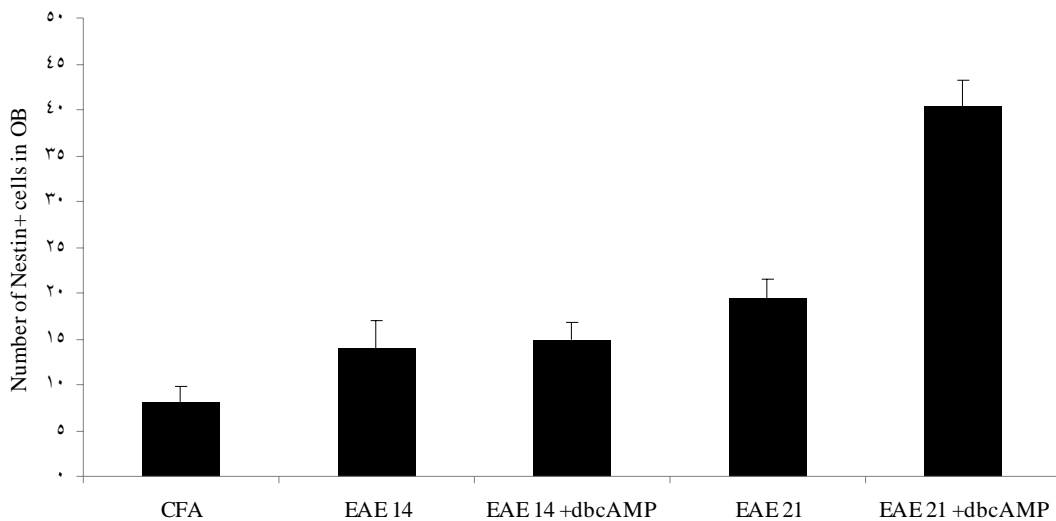
شکل ۱: نمونه ای از تصاویر حاصل از رنگ آمیزی مقاطع بافتی با کمک آنتی بادی اختصاصی علیه Nestin در SVZ و OB گروه‌های مختلف. این تصاویر به‌عنوان نماینده تصاویر حاصل از مطالعات، تغییرات کیفی این مارکر در گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد.

بطن جانبی کاهش جزئی یافت ($5/66 \pm 1/20$). با تزریق داخل صفاقی dbcAMP از روز ۹ تا ۱۴ بعد از القا، تعداد سلول‌های بنیادی عصبی نسبت به گروه کنترل افزایش یافت ($7/85 \pm 1/12$)، همچنین افزایشی در تعداد این سلول‌ها در گروهی که از روز ۹ تا ۲۱ بعد از القا dbcAMP دریافت کرده بودند، نسبت به گروه کنترل و

سلول‌ها در SVZ و OB شمارش شد که شکل ۱ روند تغییرات تعداد سلول‌ها را به‌صورت کیفی نشان می‌دهد. در بطن‌های جانبی گروه EAE ۱۴ روز بعد از القا، افزایشی در تعداد سلول‌های Nestin + ($8/5 \pm 0/56$) نسبت به گروه CFA (کنترل) ($6 \pm 1/08$) مشاهده شد. با پیشرفت بیماری در روز ۲۱ بعد از القا، تعداد سلول‌ها در



نمودار ۲: تغییر تعداد سلول‌های بنیادی عصبی (Nestin+) در دیواره‌های بطن‌های جانبی (SVZ)



نمودار ۲: تغییر تعداد سلول‌های بنیادی عصبی (Nestin+) در پیاز بویایی (OB)

(EAE 21+dbcAMP در مقایسه با گروه کنترل و $p < 0.001$ $+++$ در مقایسه با EAE 21) $p < 0.05$ $***$ $p < 0.001$

گروه EAE دیده شد $(9 \pm 2/30)$ ولی این تفاوت‌ها از نظر آماری معنادار نبود (نمودار ۲). در پیاز بویایی گروه EAE روز ۱۴ بعد از القا، افزایشی در تعداد سلول‌های Nestin+ $(14 \pm 3/05)$ نسبت به گروه CFA (کنترل) $(8/2 \pm 1/56)$ مشاهده شد. با پیشرفت بیماری در روز ۲۱ بعد از القا تعداد این سلول‌ها به صورت معناداری افزایش یافت $(19/5 \pm 2/04)$ $(P < 0/05)$. در موش‌های EAE که از روز ۹ تا ۱۴ را نشان داد $(40 \pm 2/73)$ $(P < 0/001)$ (نمودار ۳).

بحث

در مطالعه حاضر، نتایج ایمونوهیستوشیمی بر علیه

گروه EAE دیده شد $(9 \pm 2/30)$ ولی این تفاوت‌ها از نظر آماری معنادار نبود (نمودار ۲). در پیاز بویایی گروه EAE روز ۱۴ بعد از القا، افزایشی در تعداد سلول‌های Nestin+ $(14 \pm 3/05)$ نسبت به گروه CFA (کنترل) $(8/2 \pm 1/56)$ مشاهده شد. با پیشرفت بیماری در روز ۲۱ بعد از القا تعداد این سلول‌ها به صورت معناداری افزایش یافت $(19/5 \pm 2/04)$ $(P < 0/05)$. در موش‌های EAE که از روز ۹ تا ۱۴

نستین نشان داد که در موش‌های EAE ۱۴ روز بعد از القا، تعداد سلول‌های Nestin⁺ در بطن‌های جانبی در مقایسه با گروه کنترل افزایش می‌یابد. داده‌های مطالعه حاضر با نتایج گروه اسکولدینگ مطابقت دارد که نشان دادند تعداد سلول‌های Nestin⁺ در آسیب‌های حاد ام اس افزایش می‌یابد. همچنین در مدل‌های آزمایشگاهی سخته، تروما و سایر بیماری‌ها نیز افزایش سلول‌های Nestin⁺ در پاسخ به آسیب‌بافتی نشان داده شده است (۱۷). در گروه‌های EAE که از روز ۹ تا ۲۱ dbcAMP دریافت کرده بودند، افزایشی در تعداد سلول‌های Nestin⁺ در SVZ در مقایسه با گروه EAE ۲۱ و CFA کنترل دیده شد. بنابراین، به نظر می‌رسد که dbcAMP تعداد سلول‌های Nestin⁺ را در SVZ افزایش می‌دهد تا پس از مهاجرت به محل آسیب با تمایز به سلول‌های خاصی مثل اولیگودندروسیت‌ها باعث ترمیم پلاک‌های دمیلینه شود.

در ادامه این مطالعه سلول‌های بنیادی عصبی در پیاز بویایی هم بررسی شدند. با القای بیماری، تعداد سلول‌های بنیادی عصبی در پیاز بویایی افزایش یافت، به طوری که در گروه EAE ۱۴ روز بعد از القا تعداد این سلول‌ها بیشتر شده و با پیشرفت بیماری در گروه EAE روز ۲۱ بعد از القا بر تعداد این سلول‌ها افزوده شد، بنابراین می‌توان گفت که EAE و التهاب ایجاد شده باعث افزایش تعداد سلول‌های بنیادی عصبی در پیاز بویایی شده است. به عبارتی EAE القا شده، مهاجرت این سلول‌ها را از بطن‌های جانبی به پیاز بویایی تحریک کرده است.

در مغز سالم، سلول‌های بنیادی عصبی از طریق RMS از SVZ به OB مهاجرت می‌کنند. RMS که از لوله‌های گلیایی تشکیل شده باعث هدایت نوروبلاست‌ها به OB می‌شود و از ورود آن‌ها به بافت‌های مجاور ممانعت می‌کند. ایجاد آسیب یا القای دمیلیناسیون باعث به هم خوردن ساختار این مسیر آستروسیتی شده و سبب خروج سلول‌های اجدادی SVZ از RMS و مهاجرت آن‌ها به ناحیه آسیب می‌شود (۲۰-۱۸). در مطالعه حاضر نیز

التهاب و آسیب ایجاد شده باعث تحریک مهاجرت سلول‌های بنیادی از SVZ بطن‌های جانبی به OB و نواحی آسیب شد. محققین در پژوهشی نشان دادند که تزریق موضعی لیزولستین در کورپوس کالوزوم سبب القای رمیلیناسیون درونزاد با مشارکت سلول‌های ناحیه زیر بطنی در این ناحیه می‌گردد (۲۰). محققین در مطالعات گسترده‌ای پتانسیل پاسخ‌دهی سلول‌های بنیادی عصبی مغز بزرگسالان در نواحی زیر بطنی جانبی و مسیر مهاجرتی قدامی (RMS) و شرکت این سلول‌ها در ترمیم نواحی دمیلینه شده را بررسی نموده و دریافتند که سلول‌های این نواحی قادرند در پاسخ به ایجاد یک ناحیه دمیلینه شده موضعی توسط لیزولستین در کورپوس کالوزوم گسترش یافته و با مهاجرت به این ناحیه بازسازی میلین شرکت کنند (۲۰). در این تحقیق افزایش سلول‌های بنیادی عصبی در پیاز بویایی، نشان‌دهنده شرایط تحریک مهاجرت بوده و بر اساس گزارش‌های قبل (۴)، در این شرایط، مهاجرت به ناحیه آسیب و تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های اجدادی اولیگودندروسیتی و در نهایت به اولیگودندروسیت نیز افزایش می‌یابد تا پلاک‌های دمیلینه در مغز و نخاع را ترمیم کنند.

تزریق dbcAMP از روز ۹ تا ۱۴ در موش‌های القا شده باعث افزایش جزئی تعداد سلول‌ها در پیاز بویایی شد ولی تزریق طولانی مدت آن از روز ۹ تا ۲۱ باعث افزایش معنادار تعداد این سلول‌ها شد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که مهار مسیر Rho A به مدت ۶ روز توسط dbcAMP برای مهاجرت سلول‌ها به OB کافی نیست و با توجه به طولانی بودن روند مهاجرت، این اثر در روز ۲۱ بهتر دیده شده است به طوری که در طولانی مدت (۱۳ روز تزریق) می‌تواند این اثر را داشته و باعث افزایش مهاجرت سلول‌ها به پیاز بویایی و نواحی آسیب شود.

یکی از اثرات dbcAMP می‌تواند القای مکانیزم‌های پیشگیری‌کننده و محافظت‌کننده در مقابل سیر پیشرفت بیماری و ایجاد پلاک‌های دمیلینه باشد. در

دیگری در حمایت از نتایج مطالعه حاضر باشد. به عبارتی، اثر ترمیمی dbcAMP بر روند بیماری در مطالعه حاضر ممکن است علاوه بر تکثیر و مهاجرت بهتر سلول‌های NSCs، با مکانیزم‌های دیگری نیز (مانند کاهش فعالیت سلول‌های T) اثرات خود را اعمال نموده باشد. در عین حال، با توجه به این‌که تفاوتی بین دو گروه حیوان بیمار و بیمار تیمار شده با dbcAMP در روز ۱۴ نبود، به نظر می‌رسد این ماده اثر خاصی بر بروز علائم و ایجاد آسیب نداشته باشد، اما اثر آن در روز ۲۱ بارز بود و احتمالاً نشانه افزایش فرآیندهای ترمیمی باشد.

به‌طور کلی، می‌توان گفت که تعداد سلول‌های بنیادی عصبی که مارکر Nestin را بیان می‌کنند، با القا EAE بطن‌های جانبی و پیاز بویایی افزایش می‌یابد. همچنین مهاجرت این سلول‌ها از بطن‌های جانبی به مسیرهای مهاجرتی (در شرایط بیماری به پارانیشیم مغز) تحریک می‌شود. با مهار مسیر سیگنالینگ RhoA توسط dbcAMP تعداد سلول‌های nestin+ در پیاز بویایی و مهاجرت آن‌ها از بطن‌های جانبی به پیاز بویایی و احتمالاً نواحی آسیب افزایش قابل توجهی می‌یابد.

تقدیر و تشکر

پژوهش حاضر با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس و در قالب رساله دکتری مؤلف اول در دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

مطالعه حاضر در حضور dbcAMP علائم بیماری در روزهای اول مانند گروه‌های کنترل مربوطه بود. به عبارتی، اثر این مواد با تأخیر شروع شد و بروز علائم اولیه تفاوتی با گروه کنترل نداشت اما پیشرفت آن مهار شد که می‌تواند این فرضیه را در ذهن تداعی کند که اثرات مشاهده شده بیشتر نتیجه فعال شدن مکانیزم‌های ترمیمی در مغز و نخاع بوده و مکانیزم‌های محافظتی اثر کمتری داشته باشند. طولانی بودن دوره بروز اثر این ترکیبات نیز، احتمال اثر مثبت آن‌ها را بر روند ترمیم تقویت می‌کند، چون این مکانیزم‌ها بیشتر با واسطه سلول‌های بنیادی، تکثیر، مهاجرت و سپس تمایز درست آنان عمل می‌کنند؛ بنابراین فرایندی زمان بر و طولانی هستند. مطالعات قبلی نشان می‌دهد که cAMP باعث کاهش تکثیر سلول‌های T دارای مارکر CD4 شده و می‌تواند به‌طور بارزی فعالیت آن‌ها را کاهش دهد (۱۳). نتایج مطالعه حاضر نیز مطابق با این گزارشات بود و cAMP باعث کاهش آسیب و دمی‌لیناسیون شده و علائم کلینیکی را کاهش داد. همان‌طور که قبلاً نیز بیان شد، فعال شدن و نفوذ سلول‌های T عامل اصلی ایجاد مدل EAE و MS است و ممکن است cAMP با کاهش فعالیت این سلول‌ها توانسته اثر ترمیمی داشته باشد.

dbcAMP در نورون‌های RGC میزان بیان IL-6 را افزایش می‌یابد. پیشنهاد شده است که IL-6 می‌تواند باعث القای تغییرات مولکولی در نورون‌ها شود که بر مهار ترمیم آکسونی غلبه کنند (۱۲، ۱۳). این گزارش هم می‌تواند دلیل

References

1. Cudrici C, Niculescu T, Niculescu F, Shin ML, Rus H. Oligodendrocyte cell death in pathogenesis of multiple sclerosis: Protection of oligodendrocytes from apoptosis by complement. *J Rehabil Res Dev*. 2006;43(1):123-32.
2. Rolak LA. Multiple sclerosis: it's not the disease you thought it was. *Clin Med Res*. 2003;1(1):57-60.
3. McQualter JL, Bernard CC. Multiple sclerosis: a battle between destruction and repair. *J Neurochem*. 2007;100(2):295-306.
4. Picard-Riera N, Decker L, Delarasse C, Goude K, Nait-Oumesmar B, Liblau R, et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis mobilizes neural progenitors from the subventricular zone to undergo oligodendrogenesis in adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(20):13211-6.
5. Franklin RJ, Zhao C, Fancy SP, Magy L, Urwin JE, Franklin RJ. Why does remyelination fail in multiple

- sclerosis? *Nat Rev Neurosci.* 2002;3(9):705-14.
6. Zhao C, Fancy SP, Magy L, Urwin JE, Franklin RJ. Stem cells, progenitors and myelin repair. *J Anat.* 2005;207(3):251-8.
 7. Hemmer B, Archelos JJ, Hartung HP. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci.* 2002;3(4):291-301.
 8. Ben-Hur T, Einstein O, Bulte JW. Stem cell therapy for myelin diseases. *Curr Drug Targets.* 2005;6(1):3-19.
 9. He Z, Koprivica V. The Nogo signaling pathway for regeneration block. *Annu Rev Neurosci.* 2004;27:341-68.
 10. Brittis PA, Flanagan JG. Nogo domains and a Nogo receptor: implications for axon regeneration. *Neuron.* 2001;30(1):11-4.
 11. Kim W, Snider W. Overcoming Inhibitions. *Science.* 2008; 322(5903): 869-71.
 12. Kao HT, Song HJ, Porton B, Ming GL, Hoh J, Abraham M, et al. A protein kinase A-dependent molecular switch in synapsins regulates neurite outgrowth. *Nat Neurosci.* 2002;5(5):431-7.
 13. Snider WD, Zhou FQ, Zhong J, Markus A. Signaling the pathway to regeneration. *Neuron.* 2002;35(1):13-6.
 14. Ernst C, Christie BR. Nestin-expressing cells and their relationship to mitotically active cells in the subventricular zones of the adult rat. *Eur J Neurosci.* 2005;22(12):3059-66.
 15. Mozafari S, Sherafat MA, Javan M, Mirnajafi-Zadeh J, Tiraihi T. Visual evoked potentials and MBP gene expression imply endogenous myelin repair in adult rat optic nerve and chiasm following local lyssolecithin induced demyelination. *Brain Res.* 2010;1351:50-6
 16. Goudarzvand M, Javan M, Mirnajafi-Zadeh J, Mozafari S, Tiraihi T. Vitamins E and D3 attenuate demyelination and potentiate remyelination processes of hippocampal formation of rats following local injection of ethidium bromide. *Cell Mol Neurobiol.* 2010;30(2):289-99
 17. Snethen H, Love S, Scolding N. Disease-responsive neural precursor cells are present in multiple sclerosis lesions. *Regen Med.* 2008;3(6):835-47.
 18. Nait-Oumesmar B, Picard-Riera N, Kerminon C, Decker L, Seilhean D, Höglinger GU, et al. Activation of the subventricular zone in multiple sclerosis: evidence for early glial progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(11):4694-9.
 19. Calzà L, Giardino L, Pozza M, Bettelli C, Micera A, Aloe L. Proliferation and phenotype regulation in the subventricular zone during experimental allergic encephalomyelitis: in vivo evidence of a role for nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(6):3209-14.
 20. Nait-Oumesmar B, Decker L, Lachapelle F, Avellana-Adalid V, Bachelin C, Van Evercooren AB. Progenitor cells of the adult mouse subventricular zone proliferate, migrate and differentiate into oligodendrocytes after demyelination. *Eur J Neurosci.* 1999;11(12):4357-66.