

بررسی تأثیر کاربرد توأم ویتامین‌های E و D₃ بر روی دمیلیناسیون و رمیلیناسیون هیپوکمپ موش صحرائی

مهدی گودرزوند^۱، محمد جوان^۲، سیدجواد میرنجفی زاده^۳، تقی طریحی^۴

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

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

^۳ استاد فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

^۴ استاد آناتومی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

نشانی نویسنده مسؤل: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، گروه فیزیولوژی، مهدی گودرزوند

E-mail: m118medical@yahoo.com

وصول: ۸۸/۴/۵، اصلاح: ۸۸/۵/۱۹، پذیرش: ۸۸/۶/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: امروزه آنتی اکسیدان‌ها و ویتامین D₃ در بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی مورد استفاده قرار می‌گیرند، هرچند که مکانیسم دقیق عمل آن‌ها به خوبی مشخص نیست. در این مطالعه، اثر تجویز توأم ویتامین‌های E و D₃ بر میزان دمیلیناسیون، مرگ سلولی و بازسازی میلین هیپوکمپ به دنبال تزریق موضعی ایندیوم بروماید (EB) در موش صحرائی، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: این مطالعه به صورت تجربی بر روی ۳۲ سر موش از نژاد اسپراگ انجام شد. حیوانات ویتامین E (۱۰۰ mg/kg) و ویتامین D₃ (۵ μg/kg) را به صورت توأم و داخل صفاقی به مدت ۷ روز پس از القای دمیلیناسیون با EB دریافت نمودند. وسعت و شدت دمیلیناسیون با کمک رنگ آمیزی اختصاصی Luxol fast blue و بیان ژن‌های Caspase-3 فعال و MBP بررسی گردید. برای آنالیز داده‌ها واریانس یک طرفه و پس آزمون توکی تحت نرم افزار SPSS استفاده گردید.

یافته‌ها: این پژوهش نشان داد که تجویز توأم هر دو ویتامین به مدت ۷ روز موجب کاهش معنادار Caspase-3 فعال (۱۰±۰) (p<۰/۰۰۱) و افزایش معنادار بیان MBP (۲۳۶±۳۰) (p<۰/۰۰۱) در مقایسه با گروه ضایعه گردید. تزریق EB به تنهایی در گروه ضایعه به طور معناداری موجب دمیلیناسیون گردید. تجویز توأم این دو ویتامین موجب کاهش معنادار وسعت دمیلیناسیون (۰/۱±۰/۰۳) (p<۰/۰۰۵) و افزایش معنادار شدت رمیلیناسیون (۰/۶±۰/۰۶) (p<۰/۰۰۵) در مقایسه با گروه ضایعه گردید.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان می‌دهد که ویتامین‌های E و D₃ دمیلیناسیون و آپوپتوز ناشی از EB را کاهش داده و بازسازی میلین را افزایش می‌دهند. (مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی سبزوار، دوره ۱۶/شماره ۲/صص ۶۲-۷۱).

واژه‌های کلیدی: رمیلیناسیون؛ دمیلیناسیون؛ اتیدیوم بروماید؛ مرگ سلولی؛ ویتامین E؛ ویتامین D₃؛ هیپوکمپ؛ موش صحرائی.

مقدمه

دمیلیناسیون واقعه پاتولوژیک سیستم عصبی مرکزی (CNS) می‌باشد که می‌تواند با رمیلیناسیون خودبخودی و جایگزینی میلین از دست رفته همراه باشد و به بازگشتن هدایت جهشی و عملکرد نوروک کمک کند (۱). بازسازی CNS به دلایل مختلف همچون اثر مولکول‌های مهاری حاصل از فعالیت میکروگلیاها، با شکست مواجه می‌شود و پتانسیل بازسازی به دلیل آسیب اکثر اکسون‌ها بسیار کم است. مطالعات مختلف نشان می‌دهد که CNS قدرت بازسازی خود را تحت شرایط محیطی مناسب و یا مداخلات مناسب حفظ می‌کند (۲).

هیپوکمپ مرکز اصلی یادگیری و حافظه در CNS می‌باشد. این محل در بیماری‌های نورولوژیک و ایسکمی، بسیار حساس و آسیب‌پذیر بوده (۳) و از صدمات اکسیداتیو به شدت متأثر می‌شود (۴). ژيروس دنداندار (Dentate Gyrus) هیپوکمپ به دلیل داشتن سلول‌های بنیادی عصبی (Neural Stem Cells; NSCs) توانایی تکثیر سلولی و ترمیم را در سرتاسر عمر جوندگان و حتی انسان حفظ می‌کند (۵). بنابراین هیپوکمپ به دلیل آسیب‌پذیری زیاد و همچنین قابلیت بازسازی، ناحیه مناسبی جهت مطالعه مکانیسم‌های دخیل در این فرآیندها می‌باشد. در تعدادی از مطالعات، دمیالیناسیون بافت خاکستری هیپوکمپ در بیماران مبتلا به MS مشخص شده است. همچنین اختلال حافظه در ۲۵ تا ۶۰ درصد این بیماران گزارش شده است (۶،۷).

دمیلیناسیون القاء شده با مواد شیمیایی مدل مناسبی جهت بررسی اثر عوامل مؤثر بر میلیناسیون و دمیالیناسیون است که در بیماری‌های دمیالینه‌کننده مانند MS اتفاق می‌افتد. تزریق مستقیم اتیدیوم، مدل ساده و قابل تکراری است که به دنبال آن فرآیندهای دمیالیناسیون، رمیلیناسیون و ترمیم عصبی را می‌توان بررسی کرد (۸،۹). از طرفی، MBP خانواده‌ای از پروتئین‌هایی با بار مثبت‌اند که در تشکیل و تراکم کردن غلاف میلین نقش

دارند. پروتئین‌های MBP در الیگودندروسیت‌های میلینه-کننده CNS یافت می‌شوند و در هنگام میلیناسیون، پروتئین‌های میلینی به میزان زیادی بیان می‌شوند. از ۴ ایزوفرم اصلی MBP، مقدار ایزوفرم‌های ۲۱/۵ و ۱۷ کیلودالتون در هنگام میلیناسیون افزایش می‌یابد (۱۰-۱۲). آنتی‌اکسیدان آلفا-توکوفرول (ویتامین E) به عنوان جمع‌آوری‌کننده گونه‌های فعال اکسیژن تحت شرایط *in vivo* و *in vitro* عمل می‌کند. فعالیت حفاظتی آلفا-توکوفرول از طریق جلوگیری از آسیب اکسیداتیو بافتی ناشی از رادیکال‌های آزاد است که با شکستن زنجیره رادیکال‌های آزاد صورت می‌گیرد و از این طریق اثر حفاظتی خود را اعمال می‌کند (۱۶-۱۳). بنابراین، موجود را در برابر آپوپتوز و نکروز محافظت می‌کند (۱۷،۱۸).

اثرات و نقش احتمالی ویتامین D₃ نیز در بیماری MS در دهه ۷۰ در مطالعات ژنتیکی و اپیدمیولوژیک مورد توجه قرار گرفته است (۱۹،۲۰). ویتامین D₃ موجب کاهش علائم بیماری در مدل حیوانی بیماری MS به نام Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) می‌شود (۲۱،۲۲)، اگرچه آنتی‌اکسیدان‌ها و ویتامین D₃ در کنترل علائم بیماری MS استفاده می‌شوند، اما مکانیسم عمل دقیق آن‌ها به خوبی مشخص نیست. اثر این ویتامین‌ها می‌تواند وابسته به اثر حفاظتی آن‌ها بوده و یا از طریق مکانیسم‌های دیگری همچون تقویت ظرفیت بازسازی بافت عصبی صورت گیرد. هدف این مطالعه بررسی اثر کاربرد توأم ویتامین‌های E و D₃ بر فرآیند مرگ سلولی و رمیلیناسیون، به دنبال القاء دمیالیناسیون با اتیدیوم بروماید در هیپوکمپ موش صحرایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

روش مطالعه: در این مطالعه تجربی، از ۳۲ سر موش نر از نژاد Sprague-Dawley (خریداری شده از مؤسسه رازی کرج) در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم

کمّی سازی میزان تخریب میلین و بازسازی آن از نرم افزار Image J استفاده شد. شدت رهمیلیناسیون و وسعت دمیلیناسیون با استفاده از نرم افزار فوق مورد ارزیابی قرار گرفت. وسعت دمیلیناسیون نسبت به کل ناحیه هیپوکمپ در هر مقطع بافتی محاسبه گردید. شدت میلیناسیون نیز همواره نسبت به یک ناحیه میلیه سالم در همان مقطع بافتی مورد ارزیابی قرار گرفت. از داده‌های حاصل از مقاطع مختلف مربوط به یک نمونه، میانگین گرفته شد و میانگین گروه‌های مختلف با یکدیگر مقایسه شدند.

تکنیک وسترن بلات: بافت هیپوکمپ راست حیوان که در آن اتیدیوم بروماید (در گروه کنترل سالین) تزریق شده بود، توسط بافر لیز (تریس - 50 mM HCl با 150 mM NaCl، pH=8، Triton 0/1 X-100 درصد، سدیم دی اکسی کولات 0/25 درصد، سدیم دی اکسی سولفات (SDS) 0/1 درصد، 1 mM EDTA، مهارکننده پروتئازها 1 درصد) در شرایط سرما هموزن گردید و سپس سانتریفوژ شد. قسمت فوقانی نمونه جمع‌آوری و غلظت پروتئین با روش برادفورد مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه‌های پروتئینی در ژل پلی‌آکریل آمید - SDS حل و الکتروفورز گردید. سپس بر روی کاغذ PVDF (Amersham Bioscience) ترانسفر شد. بلات (کاغذ) در 2٪ ماده بلاک کننده کیت ECI advanced بلاک شد. سپس بلات‌ها با آنتی‌بادی اولیه منوکلونال خرگوشی علیه Caspase-3 و یا آنتی‌بادی‌های اولیه پلی‌کلونال خرگوشی علیه MBP و Actin در دمای 4 درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از شستشوی کافی، بلات‌ها به مدت 60 دقیقه در دمای اتاق با آنتی‌بادی ثانویه کونجوگه با HRP انکوبه شدند. سپس با استفاده از کیت ECI advanced باندهای فوق آشکار شدند.

آنالیز آماری:

الف) بافت‌شناسی: در مقاطع به دست آمده، وسعت دمیلیناسیون نسبت به کل ناحیه هیپوکمپ در هر مقطع بافتی و شدت میلیناسیون نسبت به یک ناحیه میلیه

استفاده شد. در هر قفس، 4 حیوان تحت شرایط 12 ساعت تاریکی / روشنایی در دمای کنترل شده اتاق (23±2) نگه‌داری شدند که دسترسی کامل به آب و غذا داشتند. پروتکل‌های پژوهش و مراقبت از حیوانات مورد تأیید کمیته اخلاق در کار با حیوانات آزمایشگاهی وابسته به دانشگاه تربیت مدرس قرار گرفت.

جراحی و تزریق گلیوتوکسین: حیوانات با

کلرات هیدرات (80mg/kg) به صورت داخل صفاقی بیهوش و در دستگاه استرئوتاکس قرار داده شدند. مختصات محل تزریق با توجه به اطلس پاکسینوس (AP= -2.8, ML=±1.8, DV=+2.5) تعیین گردید (23). دمیلیناسیون با تزریق مستقیم 3 میکرولیتر اتیدیوم بروماید (0/01 درصد در نرمال سالین 0/9 درصد) (24) در ژيروس دنداندار هیپوکمپ راست موش صحرایی با سرعت نیم تا یک میکرولیتر در دقیقه ایجاد شد.

حیوانات گروه درمان ویتامین E (100 mg/kg) (25,26) و ویتامین D₃ (5 μg/kg) (21) را به مدت 7 روز پس از ضایعه به صورت توأم دریافت نمودند. همچنین از روغن سویا نیز به عنوان حلال ویتامین‌های E و D₃ استفاده گردید (27). سر حیوانات در زمان مناسب تحت بیهوشی با CO₂ جدا شده و مغز حیوان برداشته شد تا در نیتروژن مایع نگه‌داری شود و در زمان مناسب تحت مطالعه بافت‌شناسی و یا ایمونوبلاتینگ قرار گیرد.

بافت‌شناسی: هفت روز پس از ایجاد ضایعه،

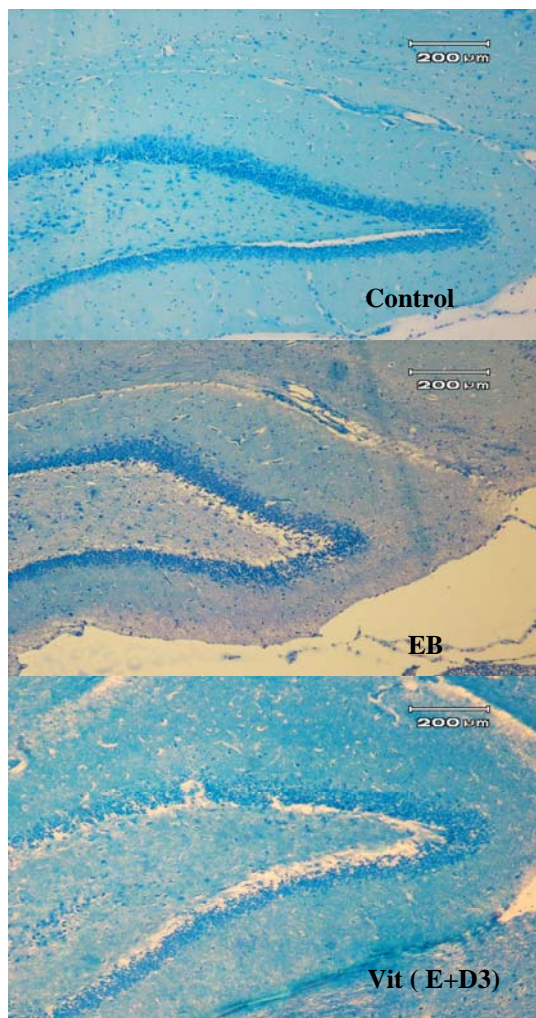
حیوانات بیهوش شده و سپس با بافر سالین فسفات (PBS) 0/1 مولار و پارافرمالدئید (PFA) 4 درصد در PBS 0/1 مولار تازه فیکس شدند. نیمکره راست حیوان جدا و به مدت 24 ساعت در PFA 4 درصد در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

پس از پاساژ نمونه، بلوک پارافینی تهیه و برش‌های سائیتال 5 میکرونی از نمونه‌ها تهیه شد. سپس برش‌ها با رنگ آمیزی اختصاصی میلین Luxol Fast Blue و رنگ آمیزی هسته‌ها با Cryseal Vioet آماده شدند. برای

معنادار ($p < 0/05$) رنگ‌پذیری منطقه آسیب‌دیده هیپوکمپ گردید (تصویر ۱ و نمودار ۲).

اثر تجویز توأم ویتامین‌های E و D₃ بر میزان

Caspase-3: برای بررسی این‌که آیا کاهش میزان آپوپتوز ناشی از تزریق EB در بافت هیپوکمپ نقشی در اثرات محافظتی ویتامین‌های مورد مطالعه دارد، میزان بیان ژن Caspase-3 به‌عنوان شاخصی از آپوپتوز مورد بررسی قرار گرفت. تزریق EB موجب افزایش معنادار Caspase-3 فعال در روز ۷ پس از تزریق (375 ± 19) در مقایسه با گروه کنترل (100 ± 38) شد ($p < 0/001$). کاربرد توأم ویتامین‌های E و D₃ به مدت هفت روز (10 ± 0) باعث



تصویر ۱: وسعت دمی‌لیناسیون و شدت رمیلیناسیون در گروه‌های کنترل، EB و دریافت‌کننده توأم ویتامین
* $P < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل و $P < 0.05$ در مقایسه با گروه EB

سالم در همان مقطع بافتی با استفاده از نرم افزار Image-J محاسبه گردید. سپس میانگین اطلاعات مقاطع مختلف مربوط به هر نمونه محاسبه شد.

ب) وسترن بلات: در بررسی بیان پروتئین‌ها، پس از ظهور فیلم، دانسیته باندها با استفاده از نرم‌افزار Lab Work اندازه‌گیری شد. فیلم‌ها بدین منظور اسکن شده و تصاویر به کامپیوتر منتقل گردید. نسبت دانسیته‌های به‌دست‌آمده برای باندهای Caspase-3 فعال و یا MBP به دانسیته باند اکتین همان نمونه محاسبه شد.

یافته‌ها

یافته‌های این پژوهش اختلاف معناداری را بین گروه‌های سالم (intact) و سالین در وسعت دمی‌لیناسیون، شدت رمیلیناسیون، بیان Caspase-3 فعال و MBP نشان ندادند. از این رو میانگین داده‌های دو گروه محاسبه و به‌عنوان گروه کنترل ارائه شد.

اثر تجویز توأم ویتامین‌های E و D₃ بر میزان

دمیلیناسیون: وسعت دمی‌لیناسیون با استفاده از رنگ‌آمیزی اختصاصی میلین توسط Luxol fast blue بررسی شد. اتیدیوم بروماید (EB) در هفت روز پس از تزریق موضعی موجب دمی‌لیناسیون (14 ± 38) مشخص و وسیعی در هیپوکمپ موش صحرایی شد ($p < 0/05$). تجویز توأم ویتامین‌های E و D₃ ($1 \pm 0/03$) موجب کاهش معنادار ($p < 0/05$) وسعت دمی‌لیناسیون ناشی از تزریق EB شد (تصویر ۱).

اثر تجویز توأم ویتامین‌های E و D₃ بر میزان

رمیلیناسیون: برای مقایسه میزان بازسازی میلین در بافت و یا شدت تخریب آن در نواحی دمی‌لینه، شدت رنگ‌پذیری این نواحی با کمک نرم افزار محاسبه گردید. میزان رنگ‌پذیری مناطق دمی‌لینه در گروه دریافت‌کننده EB ($42 \pm 0/02$) به‌طور معناداری تا حدود ۴۲ درصد رنگ‌پذیری گروه کنترل کاهش یافت. کاربرد توأم ویتامین‌های E و D₃ به مدت هفت روز ($0/6 \pm 0/06$) باعث افزایش

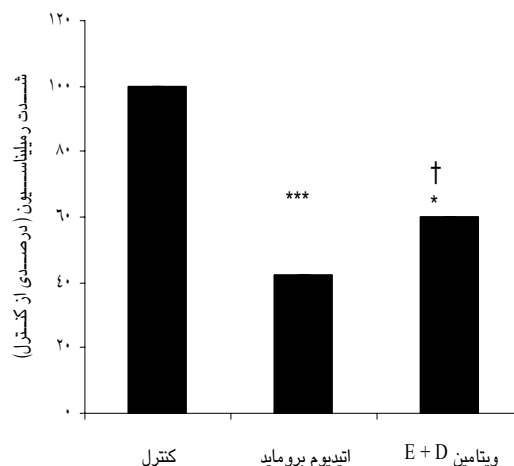
(نمودار ۴).

بحث

تزریق EB به داخل هیپوکمپ موجب دمیلیناسیون موضعی شد. فرآیندهای دمیلیناسیون و رمیلیناسیون ناشی از تزریق EB ابزار مناسبی جهت مطالعه بررسی اثرات داروهای گوناگون بر بیماری‌های دمیلینه کننده مانند ام اس است. تزریق توأم ویتامین E و D₃ به مدت ۷ روز به-طور معناداری موجب کاهش وسعت دمیلیناسیون ناشی از EB در هیپوکمپ گردید. همچنین این ویتامین‌ها رنگ‌پذیری میلین را به عنوان شاخصی از رمیلیناسیون افزایش دادند. شدت رنگ‌پذیری میلین در روز ۷ پس از ضایعه با EB کاهش معناداری را نشان داد. این اثر مثبت ویتامین‌های E و D₃ ممکن است ناشی از اثر محافظتی آن‌ها در مقابل آپوپتوز الیگودندروسیت‌ها و یا اثر تقویت-کننده آن‌ها در فرآیند میلین‌سازی باشد.

در بررسی‌های مولکولی این مطالعه، به دنبال تزریق EB میزان پروتئین آپوپتوتیک Caspase-3 فعال در ۷ روز پس از تزریق افزایش یافت. این یافته مشابه گزارش‌های قبلی در خصوص ایجاد آپوپتوز به دنبال تزریق EB می‌باشد. آپوپتوز ممکن است ناشی از فعال شدن سلول‌های T لنفوسیتی و ماکروفاژها باشد که فعال شدن این سلول‌ها موجب افزایش سیتوکاین‌های التهابی و واسطه‌هایی همچون TNF- α ، IFN- γ ، اکسیژن و نیترژن فعال می‌شود (۲۸، ۲۹).

بعد از تزریق EB به داخل مغز، دژنراسیون الیگودندروسیت‌ها پس از ۷۲ ساعت مشاهده شده است (۳۰، ۳۱). سلول‌های الیگودندروسیتی در مقایسه با سلول‌های آستروسیتی حساسیت بیشتری نسبت به استرس‌های اکسیداتیو و نیتریداتیو دارند (۳۲). EB موجب مرگ سلول‌های الیگودندروسیت از طریق تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود، اما این آسیب عصبی ممکن است به وسیله ظرفیت فیزیولوژیک CNS ترمیم گردد

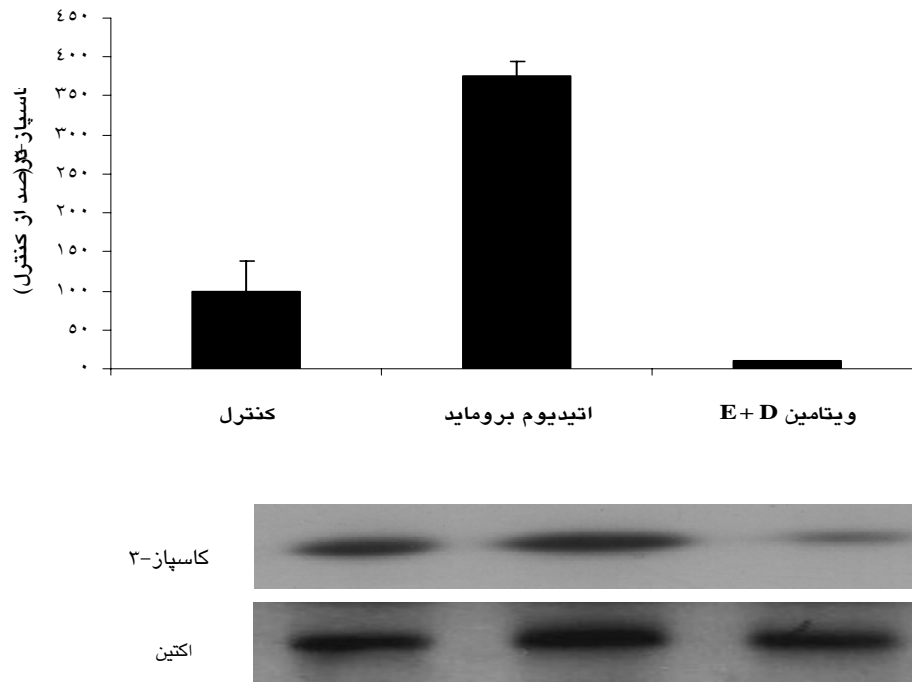


نمودار ۲: مقایسه میانگین شدت رمیلیناسیون در خره‌های کنترل، EB و دریافت کننده توأم ویتامین‌های E+D₃ در مقایسه با گروه کنترل و †: P<0.05* و ***: P<0.001 در مقایسه با گروه کنترل و †: P<0.05 در مقایسه با گروه EB می‌باشد.

کاهش معنادار سطوح Caspase-3 در منطقه آسیب دیده هیپوکمپ گردید (p<0/001) و میزان آن را حتی به مقادیر بسیار پایین‌تر از گروه کنترل رساند (p<0/001). همچنین نمونه‌ای از باندهای مربوط به بیان پروتئین caspase-3 Activated در گروه‌های کنترل، ضایعه و دریافت‌کننده توأم ویتامین‌های E و D با استفاده از تکنیک وسترن بلات، این کاهش را نشان می‌دهد (نمودار ۳).

اثر تجویز توأم ویتامین‌های E و D₃ بر میزان

بیان MBP: میزان بیان MBP به عنوان شاخصی از میزان میلین‌سازی و فعالیت سلول‌های میلین ساز مورد بررسی قرار گرفت. تزریق EB موجب کاهش معنادار بیان MBP در روز ۷ پس از تزریق (۶۰±۸/۴) در مقایسه با گروه کنترل (۱۰۰±۱۲/۲) شد (p<0/05). کاربرد توأم ویتامین‌های E و D₃ در طی این هفت روز باعث افزایش شدید (۲۳۶±۳) و معنادار سطوح MBP در منطقه آسیب‌دیده هیپوکمپ در مقایسه با گروه کنترل (p<0/001) و گروه دریافت‌کننده EB (p<0/001) گردید. همچنین نمونه‌ای از باندهای مربوط به بیان پروتئین MBP در گروه‌های کنترل، ضایعه و دریافت‌کننده توأم ویتامین‌های E و D با استفاده از تکنیک وسترن بلات این افزایش را نشان می‌دهد



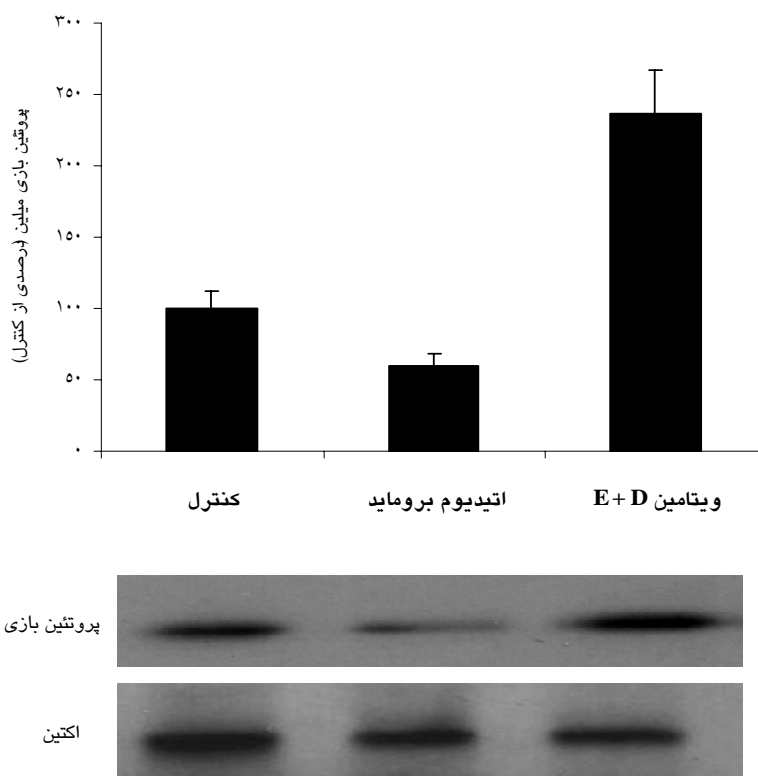
نمودار ۳: مقایسه میانگین Activated Caspase-3 در گروه‌های کنترل، EB و دریافت کننده توأم ویتامین های E+D₃ نمونه ای از باندهای مربوط به بیان پروتئین Activated caspase-3 در گروه های کنترل، ضایعه و دریافت کننده توأم ویتامین های E و D با استفاده از تکنیک وسترن بلات زیر هر گراف آمده است. ***P<0.001: در مقایسه با گروه کنترل و †††P<0.001 در مقایسه با گروه EB.

مطالعات متعددی نقش حفاظت عصبی ویتامین E را در برابر استرس اکسیداتیو در بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی نشان می‌دهد (۳۷-۳۹).

MBP در سلول‌های میلینه‌کننده و همچنین در سلول با سرنوشت مشخص شده الیگودندروسیتی بیان می‌شود. میزان MBP شاخصی از فعالیت سلول‌های الیگودندروسیتی میلین‌کننده می‌باشد. میزان بیان MBP در هیپوکمپ به‌طور معناداری در ۷ روز پس از تزریق EB به‌طور معناداری کاهش یافت. کاهش MBP در روز ۷ پس از تزریق EB ناشی از مرگ الیگودندروسیت‌ها می‌باشد. احتمال دیگری که برای کاهش MBP می‌توان داد، نقش سلول‌های ایمنی فعال می‌باشد. سلول‌های ایمنی فعال میزان بیان MBP را با ترشح سیتوکاین‌ها کاهش می‌دهند (۴۰). ناحیهٔ زیربطنی (SVZ) و هیپوکمپ منابع اصلی سلول‌های بنیادی مغز می‌باشند (۲۲، ۵). سموم گوناگون مانند EB موجب مرگ سلولی سلول‌های بنیادی در محل آسیب می‌شود و ترمیم CNS در محل آسیب عمدتاً از

(۳۳-۳۵).

در این مطالعه، اثرات ویتامین‌های E و D₃ بر فرآیند رمیلیناسیون مشخص گردید. در حالی که سطح بیان Caspase-3 فعال در روز ۷ پس از ضایعه نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری را نشان داد، سطح این پروتئین در حیواناتی که ویتامین‌های E و D₃ را به‌صورت توأم دریافت نمودند نسبت به گروهی که فقط EB دریافت کردند، کاهش یافت. همچنین تغییرات سطح Caspase-3 اثرات آنتی‌اکسیدانی و حفاظتی این ویتامین‌ها را در برابر آپوپتوز همانند مطالعات قبلی گزارش می‌کند (۳۶). این یافته با یافته‌های متعدد محققین دیگر که اثر ضد التهابی و حفاظت عصبی ویتامین‌های E و D را در مدل‌های حیوانی MS و بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی نشان داده‌اند، مطابقت دارد (۳۷). برای مثال، تیمار با ویتامین E در موش‌هایی که ساقه مغز آن‌ها از قبل با EB آسیب‌دیده است، ناحیه دمیله کوچکی را در مقایسه با گروه ضایعه نشان داده است (۳۸). همچنین



نمودار ۴: مقایسه میانگین MBP در گروه‌های کنترل، EB و دریافت کننده توأم ویتامین های E+D₃ نمونه ای از باندهای مربوط به بیان پروتئین MBP در گروه های کنترل، ضایعه و دریافت کننده توأم ویتامین های E و D با استفاده از تکنیک وسترن بلات زیر هر گراف آمده است. ***P<0.001 و *P<0.05 در مقایسه با گروه کنترل و †††P<0.001 در مقایسه با گروه EB.

(۴۳،۴۴). ویتامین D و متابولیت‌های آن در مایع مغزی-نخاعی CNS دیده شده است. همچنین مطالعات *in vivo* حاکی از افزایش سطح فاکتور رشد عصبی (NGF) در مغز موش صحرائی به دنبال استفاده از ویتامین D است (۴۵،۴۶). از طرفی گیرنده ویتامین D در نورون‌ها و سلول‌های گلایال هیپوکمپ شناسایی شده است (۴۷).

مطالعات متعددی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محافظت عصبی ویتامین E را در مقابل بیماری‌های نورودژنراتیو ناشی از استرس اکسیداتیو نشان می‌دهند (۵۰-۴۸) که داده‌های این پژوهش را تأیید می‌کند. همچنین در این مطالعه، اثرات ویتامین‌های E و D₃ بر فرآیند رمیلیناسیون مشخص گردید. در حالی که سطح بیان Caspase-3 فعال در روز ۷ پس از ضایعه نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری را نشان داد، سطح این پروتئین در حیواناتی که ویتامین‌های E و D₃ را به صورت

سلول‌های بنیادی بافت‌های اطراف محل آسیب یا از سلول‌های بنیادی SVZ تأمین می‌شود (۴۱،۴۲). افزایش شدید بیان MBP در روز ۷ پس از تزریق اتیدیوم بروماید در گروه دریافت کننده ویتامین‌های E و D₃ می‌تواند ناشی از کاهش آپوپتوز الیگودندروسیت‌ها و افزایش تولید سلول‌های میلینه‌کننده از سلول‌های بنیادی درونزاد مغز باشد.

مطالعات اپیدمیولوژی، ژنتیک و مدل‌های حیوانی نقش مهم ویتامین D را در MS نشان می‌دهند. اگرچه ویتامین D به صورت مکمل‌های دارویی توصیه شده است، اما در کنترل علائم MS نیز استفاده شده است. اما مکانیسم دقیق اثرات مثبت ویتامین D در بیماری MS به خوبی مشخص نشده است (۱۹-۲۲). مطالعه‌های اتورادیوگرافی و ایمونولوژی حاکی از این است که هیپوکمپ و سلول‌های گلایال هدف ویتامین D می‌باشند

سیستم عصبی و مدل EAE بیماری MS نشان می‌دهد (۲۲-۱۹ و ۵۰-۴۸). نتایج این مطالعه نشان داد که ویتامین‌های E و D₃ به‌صورت توأم توان CNS را در مقابل دمیالیناسیون افزایش داده و موجب حفاظت CNS در مقابل دمیالیناسیون می‌شوند. بنابراین، اثرات این ویتامین‌ها بر فرآیند رمیلیناسیون و افزایش سطح میلیناسیون دیدگاه جدیدی را برای توان درمانی این ویتامین‌ها در عرصه سلامت پدید می‌آورد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با بودجه پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفت که صمیمانه از این دانشگاه تشکر می‌نمایم.

توأم دریافت نمودند، نسبت به گروهی که فقط EB دریافت کردند، کاهش یافت. تغییرات سطح Caspase-3 اثرات آنتی‌اکسیدانی و حفاظتی این ویتامین‌ها را بر آپوپتوز همانند سایر مطالعات قبلی گزارش می‌کند. به عبارت دیگر، حداقل بخشی از اثرات محافظتی ویتامین‌های E و D₃ بر فرآیند دمیالیناسیون و رمیلیناسیون با اثرشان بر آپوپتوز القاء شده از EB، میانجی‌گری می‌شود.

با تزریق توأم ویتامین‌های E و D₃ به‌مدت ۷ روز، افزایش معناداری در میزان MBP اتفاق افتاد. این اثر عمدتاً ناشی از کاهش آپوپتوز در سلول‌های میلین‌کننده می‌باشد. ویتامین‌های E و D₃ ممکن است موجب افزایش فرآیند رمیلیناسیون با واسطه افزایش سلول‌های میلین‌کننده مشتق از سلول‌های بنیادی شوند. مطالعات متعددی اثرات مؤثر ویتامین‌های E و D₃ را در بیماری‌های تحلیل برنده

References

- Smith KJ, Blakemore WF, McDonald WI. Central remyelination restores secure conduction. *Nature*. 1979; 280: 395-6.
- Brecknell JE, Fawcett JW. Axonal regeneration. *Biol Rev*. 1996; 71: 227-55.
- Nakafuku M, Nakatomi H, Kuriu T, Okabe Sh, Yamamoto Sh-I, Hatano O, et al. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell*. 2002; 110: 429-441.
- Cha CI, Shin CM, Chung YH, Kim MJ, Lee EY, Kim E-G. Age-related changes in the distribution of nitrotyrosine. *Brain Res* 2002; 931: 194-9.
- Represa A, Becq H, Jorquera I, Ben-Ari Y, Weiss S. Differential properties of dentate gyrus and CA1 neural precursors. *J Neurobiol* 2005; 62: 243-61.
- Rao SM, Leo GL, Bernardin L, Unverzagt F. Cognitive dysfunction in multiple sclerosis. I. Frequency, patterns, and prediction. *Neurol* 1991; 41: 685-91.
- Sailer M, Fischl B, Salat D, Tempelmann C, Schonfeld MA, Busa E, et al. Focal thinning of the cerebral cortex in multiple sclerosis. *Brain* 2003; 126: 1734-44.
- Blakemore WF. Ethidium bromide induced demyelination in the spinal cord of the cat. *Neuropathol App Neurobiol*. 1982; 8:365-375.
- Levine JM, Reynolds R. Activation and proliferation of endogenous oligodendrocyte precursor cells during ethidium bromide-induced demyelination. *Exp Neurol*. 1999; 160: 333-47.
- Monuki ES, Lemke G. Molecular biology of myelination, in *The Axon*. New York: Oxford University Press; 1995.
- Woodruff RH, Franklin RJ. The expression of myelin basic protein exon 1 and exon 2 containing transcripts during myelination of the neonatal rat spinal cord--an in situ hybridization study. *J Neurocytol* 1998; 27(9): 683-693.

12. Barbarese E, Carson JH, Braun PE. Accumulation of the four myelin basic proteins in mouse brain during development. *J Neurochem* 1978; 31: 779–82.
13. Rose RC, Bode AM. Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate. *FASEB J.* 1993; 7: 1135–42.
14. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002; 82: 47–95.
15. Miyoshi N, Naniwa K, Kumagai T, Uchida K, Osawa T, Nakamura Y. Alpha-tocopherol-mediated caspase-3 up-regulation enhances susceptibility to apoptotic stimuli. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 334(2):466-73.
16. Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med.* 2007; 43: 4-15.
17. Ikeda K, Negishi H, Yamori Y. Antioxidant nutrients and hypoxia/ischemia brain injury in rodents. *Toxicology.* 2003; 189: 55-61.
18. Kang SK, Jeong YW, Park SW, Hossein MS, Kim S, Kim JH, et al. Antiapoptotic and embryotrophic effects of a-tocopherol and L-ascorbic acid on porcine embryos derived from in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Theriogenol.* 2006; 66: 2104-12.
19. Goldberg P. Multiple sclerosis: vitamin D and calcium as environmental determinants of prevalence. 1. Sunlight, dietary factors and epidemiology. *Int J Environ Stud.* 1974; 6:19–27.
20. Goldberg P. Multiple sclerosis: vitamin D and calcium as environmental determinants of prevalence. 2. Biochemical and genetic factors. *Int J Environ Stud.* 1974; 6:121–200.
21. Garcion E, Sindji L, Nataf S, Brachet P, Darcy F, Montero- Menei CN. Treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis in rat by 1,25-dihydroxyvitamin D3 leads to early effects within the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2003; 105: 438–448.
22. Mosayebi G, Ghazavi A, Payani MA. The effect of vitamin D3 on the inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *J Iran Univ Med Sci.* 2006; 13:184-96.
23. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 2nd edition. New York: Academic Press; 1986.
24. Franklin RJM, Sim FJ, Hinks GL. The re-expression of the homeodomain transcription factor Gtx during remyelination of experimentally induced demyelinating lesions in young and old rat brain. *Neurosci.* 2000; 100: 131–9.
25. Martinovits G, Melamed E, Cohen O, Rosenthal J, Uzzan A. Systemic administration of antioxidants does not protect mice against the dopaminergic neurotoxicity of MPTP. *Neurosci let.* 1986; 29:192-7.
26. Offen D, Gilgun-Sherki Y, Melamed E. Oxidative stress induced- neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacol.* 2001; 40: 959-75.
27. Hayes CE, Spach KM, Pedersen LB, Nashold FE, Kayo T, Yandell BS, et al. Gene expression analysis suggests that 1,25-dihydroxyvitamin D3 reverses experimental autoimmune encephalomyelitis by stimulating inflammatory cell apoptosis. *Physiol Genom.* 2004; 18: 141–151.
28. Rus H, Cudrici C, Niculescu T, Niculescu F, Shin ML. Oligodendrocyte cell death in pathogenesis of multiple sclerosis: Protection of oligodendrocytes from apoptosis by complement. *J Rehab Res Dev.* 2006; 43: 123–32.
29. Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis- The Plaque and Its Pathogenesis. *N Engl J Med.* 2006; 354:9.
30. Blakemore WF, Crang AJ, Evans RJ. The effect of chemical injury on oligodendrocytes. In: Mimms CC, Cuzneks MC, Kelly W, editors. *Viruses and demyelinating diseases*. London: Acad Press; 1983.
31. Guazzo EP. A technique for producing demyelination of the rat optic nerves. *J Clin Neurosci.* 2005; 12: 54–58.
32. Smith KJ, Kapoor R, Felts PA. Demyelination: the role of reactive oxygen and nitrogen species. *Brain Pathol.* 1999; 9: 69–92.
33. Franklin RJM, Setzu A, Ffrench-Constant C. CNS axons retain their competence for myelination throughout life. *Glia.* 2004; 45: 307-311.

34. Zhang SC, Ge B, Duncan ID. Adult brain retains the potential to generate oligodendroglial progenitors with extensive myelination capacity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 4089-4094.
35. Levine JM, Reynolds R, Fawcett JW. The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. *Trends in Neurosci*. 2001; 24: 39-47.
36. Cinthia M, Mazzanti CM, Spanevello R, Ahmedb M, Pereira LB, Goncalves JF, et al. Pre-treatment with ebselen and vitamin E modulate acetylcholinesterase activity: interaction with demyelinating agents. *Int J Dev Neurosci*. 2009; 27: 73-80.
37. Reiter E, Jiang Q, Christen S. Anti-inflammatory properties of α - and γ -tocopherol. *Mol Aspect Med*. 2007; 28: 668-91.
38. Jeong YW, Park SW, Hossein MS. Antiapoptotic and embryotrophic effects of α -tocopherol and L-ascorbic acid on porcine embryos derived from in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Theriogenol*. 2006; 66: 2104-12.
39. Grammas P, Hamdheydari L, Benaksas EJ, Mou S, Pye QN, Wechter WJ, et al. Anti-inflammatory effects of tocopherol Metabolites. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 319: 1047-52.
40. Hung CJ, Nazarian R, Lee J, Zhao PM, Espinosa-Jeffery A, De Vellis J. Tumor necrosis factor modulates transcription of myelin basic protein gene through nuclear factor kappa B in a human oligodendrogloma cell line. *Int J Dev Neurosci*. 2002; 20: 289-296.
41. Menn B, Garcia-Verdugo JM, Yaschine C, Gonzalez-Perez O, Rowitch D, Alvarez-Buylla A. Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci*. 2006; 26: 7907.
42. Franklin RJM, Gilson JM, Blakemore WF. Local recruitment of remyelinating cells in the repair of demyelination in the central nervous system. *J Neurosci Res*. 1997; 50: 337-344.
43. Baas D, Pruffer K, Ittel ME, Kuchler-Bopp S, Labourdette G, Sarlieve LL, et al. Rat oligodendrocytes express the vitamin D(3) receptor and respond to 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Glia*. 2000; 31: 59-68.
44. Clemens TL, Garrett KP, Zhou XY, Pike JW, Haussler MR, Dempster DW. Immunocytochemical localization of the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in target cells. *Endocrinol*. 1988; 122: 1224-1230.
45. Saporito MS, Wilcox HM, Harptence KC, Lewis ME, Vaughn JL, Carswell S. Pharmacological induction of nerve growth factor mRNA in adult brain. *Expl Neurol*. 1993; 123: 295-302.
46. Saporito M, Brown E, Hartpence K, Wilcox H, Vaught J, Carswell S. Chronic 1,25-dihydroxyvitamin D3-mediated induction of nerve growth factor mRNA and protein in L929 fibroblasts and in adult rat brain. *Brain Res*. 1994; 633: 189-96.
47. Langub MC, Herman JP, Malluche HH, Koszewski NJ. Evidence of functional vitamin D receptors in rat hippocampus. *Neurosci*. 2001; 104: 49-56.
48. Schewe T. Molecular actions of ebselen—an anti-inflammatory antioxidant. *Gen Pharmacol*. 1995; 26: 1153-69.
49. Imai H, Masayasu H, Dewar D, Graham DI, Macrae IM. Ebselen protects both gray and white matter in a rodent model of focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2001; 32: 2149-2154.
50. Grammas P, Hamdheydari L, Benaksas EJ, Mou S, Pye QN, Wechter WJ, et al. Anti-inflammatory effects of tocopherol. *Metabolites*. 2004; 319: 1047-52.