

مقایسه الکتروفیزیولوژیک و بافت‌شناسی الگوی دمیلیناسیون و رمیلیناسیون کیاسما و عصب بینایی، در موش‌های صحرائی نر گنادکتومی شده، با موش‌های صحرائی ماده

صبح مظفری^۱، محمد امین شرافت^۲، محمد جوان^{۳*}، سید جواد میرنجفی زاده^۴

۱- کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه فیزیولوژی

۲- کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه فیزیولوژی

۳- دانشیار، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه فیزیولوژی

۴- استاد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه فیزیولوژی

*تهران، صندوق پستی ۳۳۱-۱۴۱۱۵

mjavan@modares.ac.ir

(دریافت مقاله: ۸۹/۶/۱، پذیرش مقاله: ۸۹/۸/۲۳)

چکیده - بیماری مولتیپل اسکلروزیس، در زنان سبب بروز اختلالات نورولوژیکی بیش‌تری نسبت به مردان می‌شود. هورمون‌های گنادی، نقش بالقوه‌ای در بلوغ و تمایز سلول‌های عصبی و گلیالی دارند. اثر برخی هورمون‌های گنادی نظیر پروژسترون، بر دمیلیناسیون و رمیلیناسیون به‌خوبی مشخص شده است، نقش آندروژن‌ها نیز در تکوین سیستم عصبی و میلیناسیون گزارش شده است. در مطالعات قبلی، مشاهده کردیم که گنادکتومی حیوانات نر، توان مغز را برای مقاومت در برابر آسیب‌های دمیلینه‌کننده و نیز ترمیم‌های بعدی، می‌کاهد. در این گزارش با القای دمیلیناسیون در دستگاه بینایی، سعی کردیم آثار حذف هورمون‌های گنادی بر الگوی دمیلیناسیون و رمیلیناسیون در موش‌های نر گنادکتومی شده را با موش‌های ماده مقایسه کنیم. تغییرات ایجاد شده در امواج پتانسیل‌های برانگیخته بینایی (VEP) و رنگ‌پذیری میلین، به‌دنبال القای مدل دمیلیناسیون موضعی با لیزولستین، در بین موش‌های نر گنادکتومی شده و موش‌های ماده، در روزهای ۲، ۷، ۱۴ و ۲۸ پس از آسیب، ارزیابی و مشاهده شد. دمیلیناسیون در هر دو گروه، در روز ۲ آغاز شد، در روزهای ۷ و ۱۴ به بالاترین مقدار خود رسید و سرانجام در روز ۲۸، ترمیم نسبی ناکامل معنی‌داری رخ داد. فرایندهای دمیلیناسیون و رمیلیناسیون، به لحاظ زمانی و کیفی، در گروه‌های گنادکتومی شده و ماده، الگوی مشابهی نشان داد. به‌نظر می‌رسد تفاوت‌های اساسی بین دمیلیناسیون و رمیلیناسیون، در موش‌های نر و ماده، عمدتاً به‌دلیل حضور آندروژن‌های گنادی در نرها است. نتایج این پژوهش، می‌تواند در فهم بیشتر نقش هورمون‌های جنسی در بیماری‌های دمیلینه‌کننده، مفید باشد و اطلاعات مهمی برای فراهم کردن درمان‌های ترمیمی ارائه دهد.

کلیدواژگان: دمیلیناسیون، ترمیم میلین، لیزولستین، گنادکتومی، عصب و کیاسمای بینایی، آندروژن‌های گنادی، موش صحرائی نر و ماده

۱- مقدمه

مالتیپل اسکلروزیس^۱ (MS)، یکی از شایع‌ترین و ناتوان‌کننده‌ترین بیماری‌های عصبی در انسان است که با فراوانی قابل توجهی در اوایل بزرگسالی بروز می‌کند (زنان دو تا سه برابر مردان). مهم‌ترین علائم این بیماری عبارتند از: فلج، فقدان حس، خستگی، نقایص شناختی و اختلالات بینایی. در واقع MS یک بیماری با سبب‌شناسی^۲ ناشناخته است که عمدتاً با مرحله فروکشی موقت و عود یا یک مرحله پیشرفته مزمن، مشخص می‌شود. این بیماری دمیلینه‌کننده و التهابی مزمن، در اثر فعالیت سیستم ایمنی، باعث التهاب بافتی و مرگ سلول‌های عصبی می‌شود [۱-۸]. یکی از عوارض بیماری MS، دمیلیناسیون است که پس از آن، مقداری رمیلیناسیون خودبه‌خودی نیز دیده می‌شود [۹-۱۲]. میزان این رمیلیناسیون در جنس نر بیش‌تر از ماده است [۱۳-۱۵]. پلاک‌ها در نتیجه دمیلینه شدن اعصاب، درون ماده سفید ایجاد می‌شود که با رنگ‌آمیزی اختصاصی، از بین رفتن میلین را می‌توان دید. به‌دنبال دمیلیناسیون در دستگاه عصبی مرکزی دو نتیجه حاصل می‌شود؛ یا اکسون به‌صورت دمیلینه باقی مانده و مستعد آتروفی می‌شود که سهم به‌سزایی در ایجاد فاز پیشرونده MS دارد؛ یا این‌که در طی یک فرایند ترمیمی که رمیلیناسیون نامیده می‌شود، صفحات جدید میلین می‌تواند دور اکسون دمیلینه تشکیل شود و قابلیت هدایت پتانسیل عمل و اعمال از دست رفته نورون را به آن بازگرداند [۳، ۷]. تا به‌حال تدابیری که جلوی دمیلیناسیون را می‌گرفتند، به‌عنوان عمده‌ترین راه درمان MS مورد توجه بودند [۱۲]. این در حالی است که روش‌هایی که رمیلینه شدن را پیش می‌برند و از دست دادن اکسون را به حداقل می‌رسانند نیز ابزار درمانی مهمی

است. توسعه این راه‌های درمانی، به درک جزئیات ساز و کار رمیلیناسیون وابسته است. که به‌این‌صورت می‌توانیم دریابیم چرا فرایند ترمیم و رمیلینه شدن در بیماران MS، شکست می‌خورد. یکی از علل ناکافی بودن این رمیلیناسیون، اثر ممانعتی زخم آستروسیتی ایجاد شده در محل آسیب است [۲۱]. به‌عنوان یک شاخص، آستروسیت‌های اطراف محل زخم، پروتئین GFAP را به مقدار زیاد بیان می‌کنند [۲۲، ۲۳].

هورمون تستوسترون سبب کاهش میزان GFAP در CNS می‌شود [۲۴، ۲۵]. تستوسترون از سد خونی - مغزی به‌راحتی عبور می‌کند و به‌طور مستقیم، از طریق گیرنده آندروژنی، یا به‌طور غیرمستقیم، از طریق تبدیل به استروژن، اثر خود را روی سلول‌ها می‌گذارد. یکی از عملکردهای هورمون تستوسترون که کم‌تر مورد بررسی و شناخت قرار گرفته است، عمل حفاظت نورونی آن است. عمل حفاظتی آن در بیماری‌های آلزایمر و افسردگی، باعث کاهش عوارض این بیماری‌ها می‌شود [۳۲، ۳۳]. هورمون تستوسترون موجب افزایش ترمیم عصب فاسیال^۳ و سیاتیک^۴ آسیب دیده همستر و خرگوش می‌شود [۲۴ تا ۲۶].

باتوجه به گزارش‌های موجود از آثار حفاظت نورونی تستوسترون و تفاوت بسیار زیاد در میزان ابتلای مردان و زنان به بیماری MS، در این مطالعه سعی شده با حذف آندروژن‌های گنادی که عمده‌ترین آن‌ها تستوسترون است، از طریق جراحی گنادکتومی، به‌دنبال القای دمیلیناسیون با استفاده از گلیو توکسین لیزولستین در کیسمای بینایی، نقش احتمالی آن در حفاظت مردان در برابر بیماری MS بررسی شود. لیزولستین (آنالوگ لیزو فسفاتیدیل کولین) یک دترجنت است که با اثر اختصاصی بر سلول‌های میلینه‌کننده، سبب حل کردن لیپیدها می‌شود [۳۴ تا ۳۶] اما در دوزهای معین، سبب القا دژنراسیون والرین و قطع

1. Multiple sclerosis
2. Etiology

3. Facial
4. Sciatic

تیز ضد عفونی شده، برشی به طول ۱/۵ سانتی متر در طول پوست اسکروتوم ایجاد شد. غشای شفاف اطراف بیضه (تونیکا)، با پنس استریل گرفته و با قیچی برش داده شد تا بیضه‌ها آزاد شوند، سپس به دور وازودفران و بافت چربی اطراف آن، توسط یک نخ بخیه جذب شونده، گره محکمی زده شد. وازودفران را در فاصله بین گره و بیضه قطع کرده و بیضه جدا می‌شد. برای بیضه دیگر نیز به همین روش عمل می‌شود. شکاف ایجاد شده در پوست با ۲ یا ۳ بخیه دوخته می‌شد. حیوان در قفس‌هایی که از قبل با الکل ضد عفونی شده قرار داده می‌شود، تا دوران بهبودی را طی کند و هوشیاری لازم را به دست آورد.

۲-۳- القای موضعی دمیلیناسیون

حیوانات به صورت عمیق، با تزریق داخل صفاقی کتامین (70 mg/kg) و زایلایزین (10 mg/kg) که در محلول استریل سالین ۰/۹ درصد رقیق شده‌اند، بیهوش می‌شدند. دمیلیناسیون، با تزریق محلول ۱٪ لیزولسیتین (لیزوفسفاماتیدیل کولین، LPC) (سیگما، USA) در محلول استریل سالین ۰/۹ درصد با حجم ۱ میکرولیتر در کیاسمای بینایی القا می‌شد. موش‌ها با موقعیت سر کاملاً صاف در دستگاه استریوتاکس (Steolting, USA) قرار می‌گرفتند و ۲ میکرولیتر از محلول ۱ درصد LPC با سرنگ همیلتون $10 \mu\text{l}$ ، به کیاسمای بینایی تزریق می‌شد. موقعیت کیاسما با استفاده از اطلس موش تعیین شد. به حیوان‌های گروه کنترل، با همان مشخصات اطلس و حجم یکسان، سالین تزریق می‌شد. LPC یا سالین، با سرعت یک میکرولیتر در دقیقه، با استفاده از پمپ (Steolting, USA) تزریق شد. برای اطمینان از فراهم شدن زمان لازم برای انتشار LPC، سوزن تزریق به مدت ۵ دقیقه در محل تزریق نگه داشته می‌شد.

اکسونی نمی‌شود [۳۷]. سمومی مانند لیزولسیتین می‌توانند برای از بین بردن میلین، در ماده سفید تزریق شوند [۱۰]. سود این روش این است که یک ناحیه دمیلینه با محدوده مشخص ایجاد می‌کند. به عبارت دیگر، تزریق توکسین منجر به یک زخم آسیبی کوچک در مغز می‌شود و بنابراین با یک شکست نسبی در سد خونی مغزی و به خدمت‌گیری سلول‌های التهابی در موضع، یک مدل مناسب ایجاد می‌شود [۱۰].

به دنبال گنادکتومی و القای مدل، فنوتیپ کلی روند تخریب و ترمیم میلین در جنس نر به سمت گرایش می‌یابد که با این تغییر، می‌توان حساسیت میلین به آسیب وابسته به جنس را مقایسه کرد. عمل گنادکتومی در موش‌های صحرایی نر باعث ایجاد فنوتیپ ماده‌ها شد؛ به بیان دیگر، این موش‌ها از نظر عملکردی و ساختاری، ویژگی‌های دستگاه عصبی مرکزی ماده‌ها را پیدا کردند. برای رسیدن به این هدف، مشخصات مورفولوژیک و پتانسیل برانگیخته بینایی (VEP)، در حیوان‌های نر گنادکتومی شده و موش‌های دست نخورده ماده (در حضور آسیب میلینی ناشی از لیزولسیتین) در کیاسما و عصب بینایی بررسی شد.

۲- مواد و روش‌ها

۱-۲- حیوانات

در این تحقیق از موش‌های نر و ماده نژاد اسپراگ دالی در محدوده وزنی ۲۰۰-۳۰۰ گرم (خریداری شده از موسسه پاستور، کرج) استفاده شد. حیوانات در شرایط تاریکی-روشنایی ۱۲ ساعته با دمای کنترل شده ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) و بدون محدودیت دسترسی به آب و غذا، نگهداری شدند. همه آزمایش‌ها روی حیوانات، با رعایت اصول اخلاقی و ثبت شده بین‌المللی کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام شد.

۲-۲- گنادکتومی حیوانات نر

پس از بیهوشی و تراشیدن موهای خط وسط سطح شکمی اسکروتوم، ناحیه با الکل شست‌وشو داده شد. سپس با قیچی

۲-۴- پردازش بافت مغزی

موش‌ها در گروه‌های آزمایشی مختلف، در روزهای ۲، ۷، ۱۴ و ۲۸ پس از تزریق با تزریق داخل صفاقی دوزهای بالای کتامین و زایلازین، به‌طور عمیقی بیهوش شدند و عمل پرفیوژن^۱ تزریق از طریق بطن چپ قلب انجام شد. در ابتدا، ۲۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (PBS) ۰/۱ مولار با pH: ۷/۴، به بطن چپ حیوان تزریق و پس از خارج شدن تمامی خون موجود در عروق، از دهلیز راست، میزان ۵۰ میلی‌لیتر محلول پارافرمالدهید ۴ درصد در محلول PBS ۰/۱ مولار با pH: ۷/۴ برای تثبیت اولیه بافت، از طریق بطن چپ وارد دستگاه گردش خون حیوان و سپس مغز حیوان از مجموعه خارج می‌شد. برای بهتر ثابت شدن، بافت در محلول پارافرمالدهید ۴ درصد، به مدت یک شب در دمای ۴°C قرار داده شد. سپس بافت مغز در فرایند پردازش بافتی قرار گرفت. پس از آبیگری با سری الکل‌های ۵۰ تا ۱۰۰ درصد، هر کدام یک ساعت و شفاف‌سازی با زایلول (۲ بار و هر بار ۴۵ دقیقه)، نمونه‌ها بین ۳ تا ۶ ساعت در پارافین با دمای ۶۰°C انکوبه شدند و در انتها، بلوک‌های پارافینی از مغز تهیه و برای برش‌گیری آماده شد. برش‌های کرونال، به‌صورت سریال و به ضخامت ۵ میکرون، از ناحیه کیاسما و اعصاب بینایی تهیه و روی لام‌هایی که از قبل با چسب پلی‌لایزین آغشته شده بود، قرار داده شد.

رنگ‌آمیزی دوگانه اختصاصی میلین، با لوگول فست بلو (LFB) و کرزیل فست ویوله (CFV)، ۲۱ انجام شد برش کرونال تهیه شده از کیاسمای هر حیوان، برای رنگ‌آمیزی انتخاب شد. برای شفاف‌سازی و حذف پارافین، به مدت ۱۰ دقیقه، سه بار در محلول زایلول قرار گرفت و سپس مرحله آب‌دهی بافتی که شامل عبور از الکل مطلق ۹۵٪ به مدت ۵ دقیقه بود انجام شد پس از آن،

1. Perfusion

نمونه‌ها در محلول از قبل آماده شده LFB ۰/۱ درصد (British drug house, UK)، حل شده و در الکل ۹۵٪، به مدت ۳ ساعت، در حمام بافتی با دمای ۶۰°C قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها را در الکل ۹۵٪، به مدت ۱۰ دقیقه و برای کنتراست مناسب، در حد ۲۰ ثانیه در لیتیوم بی-کربنات ۰/۰۵ درصد قرار داده و به دنبال آن چند بار در الکل ۷۰ درصد قرار می‌دهیم. بعد از شست‌وشو با آب مقطر، آن‌ها در CFV (Merck, Germany) ۰/۱ درصد به مدت ۳ دقیقه، نگهداری و سپس آن‌ها را با آب مقطر می‌شوئیم و دو بار در الکل ۹۵٪ و ۱۰۰٪ آبیگری کرده و پس از شفاف‌سازی نهایی بافتی، دو بار هر کدام ۱۰ دقیقه در زایلول قرار داده و در نهایت با استفاده از چسب انتالن (Merck, Germany)، لامل روی لام نمونه‌ها قرار داده و صبر می‌کنیم تا خشک شوند.

تصاویر از ۲۱ نقطه مشخص از برش‌های سریال، از کیاسمای بینایی (در محدوده تقریبی ۱۲۰ میکرون جلوی برگما تا ۹۸۰ میکرون پشت برگما) با میکروسکوپ نوری (Olympus) تهیه و آنالیز شد. وسعت دمیلتاسیون، با استفاده از نرم افزار NIH Image J، اندازه‌گیری و کمی شد. در هر تصویر، نسبت وسعت ناحیه دمیلتینه به کل سطح ناحیه مورد نظر (کیاسما) اندازه‌گیری شد. داده‌های به دست آمده از هر حیوان، میانگینی از کل ۲۱ نقطه به دست آمده بود و در هر گروه آزمایشی حداقل ۳ مرتبه، تکرار روی هر حیوان، انجام شد. (n=۳)

۲-۵- ثبت الکتروفیزیولوژیک پتانسیل برانگیخته‌ی بینایی (VEP)

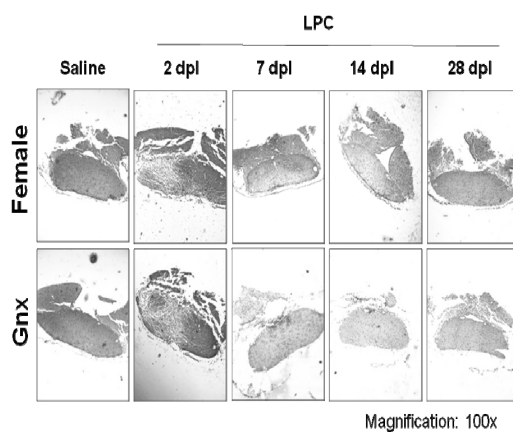
VEP، یک پتانسیل برانگیخته الکتروفیزیولوژیک است که می‌توان با استفاده از میانگین‌گیری سیگنال‌های حاصل از فعالیت الکتروانسفالوگرافیک ثبت شده از مجموعه، آن را

داده‌ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ ارائه شده و $P < 0.05$ از لحاظ آماری معنی‌دار تلقی شد.

۳- یافته‌ها

۳-۱- ارزیابی بافت‌شناسی از دمیلیناسیون القا شده به وسیله لیزولستین در گروه‌های آزمایشی مختلف

در این تحقیق، با بررسی بافت‌شناسی نشان دادیم که به دنبال دمیلیناسیون در ناحیه کیاسما و عصب بینایی، رمیلیناسیون مؤثری انجام می‌شود. همچنین در این مطالعه مشخص شد که تغییرات در میزان دمیلیناسیون، در گروه گنادکتومی شده و ماده با یک الگوی یکسان انجام می‌شود (شکل ۱).



شکل ۱ رنگ‌آمیزی اختصاصی میلین (لوگزول فست بلو LFB) در مقاطع سریال تهیه شده از مغز حیوانات در روزهای مختلف پس از تزریق لیزولستین. همان‌طور که مشاهده می‌شود بیش‌ترین میزان دمیلیناسیون در هر دو گروه نر گنادکتومی شده و ماده، در روزهای ۷ و ۱۴ پس از آسیب، دیده می‌شود و در هر دو گروه، مقداری بازسازی میلین در روز ۲۸ رخ می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، روند دمیلیناسیون و رمیلیناسیون بین دو گروه تفاوت زیادی ندارد. GnX: Gonadectomized male, بزرگنمایی: 100x

به‌دست آورد. VEP می‌تواند اطلاعات مهم تشخیصی درباره یک‌پارچگی عملکرد بینایی تهیه کند. مراحل جراحی و الکتروگذاری مشابه روش‌هایی است که پیش‌تر توصیف شده است [۳۰-۳۱]. به‌طور خلاصه، حیوانات طبق روش بالا بی‌هوش و سر حیوان در دستگاه استریوتاکس ثابت می‌شود. برای تسهیل ثبت VEP، یک الکتروود تک‌قطبی از جنس استیل لس استیل در ناحیه پس سری جمجمه کاشته شد (A: 0, L: $\pm 3\text{mm}$ نسبت به لامبدا). در انتهای قدامی جمجمه هم الکتروود رفرنس گذاشته شد و الکتروودها با سیمان دندان پزشکی در جمجمه ثابت شدند.

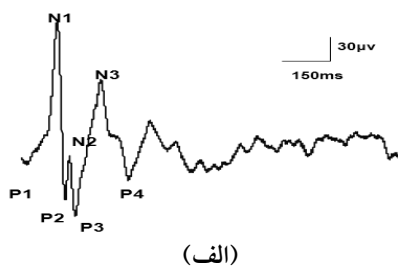
برای ثبت، ابتدا حیوان بی‌حرکت شده را، در یک جعبه تاریک به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد تا با تاریکی سازش پیدا کند و سپس محرک نوری (فلش) که با دستگاه مولد تحریک (SMP-3100, Nihon Kohden) ۳۰۰ بار با فرکانس ۱ هرتز تولید می‌شد با زاویه تابش 45° به هر دو چشم حیوان تابیده شد. شدت نور به‌طور تقریبی 4.0×10^8 بود. پاسخ‌های ده هزار برابر تقویت شده، با فیلتر بالا و پایین ۳۰ و 0.08 هرتز به ترتیب با آمپلی فایر بیوفیزیکی تنظیم شد (AVB-10, Nihon Kohden). امواج، تقویت شده، سپس میانگیری (DAT-1100, Nihon Kohden) و با نرم‌افزار Biochart آنالیز شد. هر ثبت، ما تأخیر بین محرک نوری و نخستین موج مثبت و یا منفی را اندازه‌گیری می‌کردیم. (P-Latency)

۲-۶- آنالیز آماری

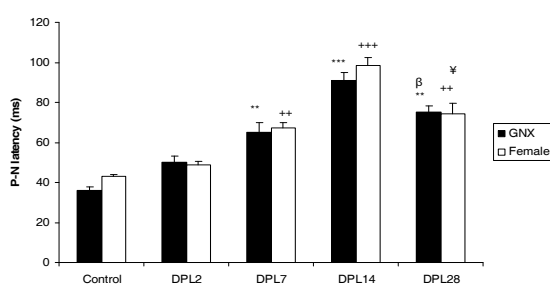
تفاوت میان گروه‌ها، در آزمایش‌های بافت‌شناسی و ثبت VEP به‌وسیله ANOVA دوطرفه، برای دو فاکتور جنسیت و زمان و سپس Post hoc Tukey HSD، با نرم‌افزار پریسم (GraphPad prism 5) بررسی شد.

در گروه‌هایی که تزریق لیزولستین در آن‌ها انجام نشده بود، نشان داد که اختلاف معنی‌داری در این کمیت‌ها ایجاد نمی‌شود. به عبارتی، انجام گنادکتومی بدون القای مدل دمیلیناسیون، اثر معنی‌داری بر کمیت‌های اندازه‌گیری شده نداشت.

این تحقیق، با بررسی (VEP) نشان داد که به دنبال دمیلیناسیون در ناحیه کیاسما و عصب بینایی، رمیلیناسیون مؤثری انجام می‌شود. همچنین در این مطالعه مشخص شد که در هر دو گروه گنادکتومی شده و ماده، به شکل تقریباً یکسانی، میزان دمیلیناسیون و رمیلیناسیون تغییر می‌کند (شکل ۳).



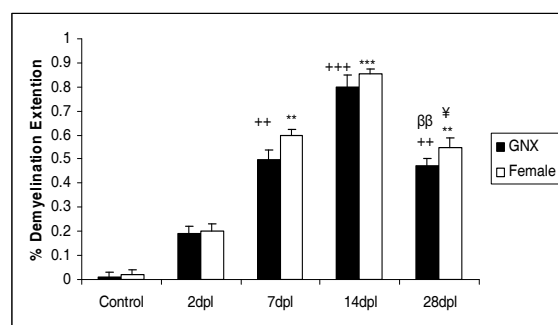
(الف)



(ب)

شکل ۳ نمونه ثبت پتانسیل برانگیخته بینایی (الف) و اختلاف زمان تأخیر موج P-N در ثبت VEP در حیوانات گنادکتومی شده و ماده، پس از تزریق لیزولستین به کیاسمای بینایی، در روزهای دوم، هفتم، چهاردهم و بیست و هشتم (ب). آزمون تجزیه و تحلیل واریانس دو طرفه و نیز آزمون Tukey هیچ اختلاف معنی‌داری را بین این دو گروه در این روزها نشان نداد (n=6). $p < 0.001$ ، $+++$ و $***$ و $p < 0.01$ ، $++$ در مقایسه با گروه کنترل، $p < 0.05$ ، $¥$ در مقایسه با گروه ۱۴ و $p < 0.05$ در مقایسه با گروه ۱۴ است. $n \geq 3$.

در دو گروه، روند افزایش وسعت دمیلیناسیون در روزهای دوم، هفتم، و چهاردهم، مشاهده شد و در روز ۱۴ به بالاترین میزان رسید. مقدار دمیلیناسیون در هر دو گروه، در روز ۱۴ نسبت به روز ۲، به‌طور معنی‌داری افزایش یافته بود ($P < 0.001$, $F = 17.2$). در روز بیست و هشتم، مقدار وسعت دمیلیناسیون، مجدداً به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد، که در جنس ماده ($P < 0.05$, $F = 11.4$) و در جنس نر گنادکتومی شده ($P < 0.01$, $F = 16.0$)، نسبت به روز ۱۴ بودند (شکل ۲).



شکل ۲ تزریق لیزولستین سبب القاء یکمنطقه‌ای دمیله‌ی موضعی در ناحیه‌ی کیاسما و عصب بینایی می‌شود. در هر حیوان، ۲۱ مقطع سریال انتخاب و میزان وسعت دمیلیناسیون در آن به صورت میانگین این مقاطع بیان شد که در هر مقطع، حاصل وسعت ناحیه دمیله‌ی به کل ناحیه‌ی کیاسما، به صورت درصد بیان شده است. وسعت در روز ۱۴ پس از آسیب، به بیش‌ترین مقدار خود رسید. نتایج به صورت میانگین \pm خطای استاندارد نشان داده شده است. $p < 0.001$ ، $+++$ و $***$ و $p < 0.01$ ، $++$ در مقایسه با گروه کنترل، $p < 0.05$ ، $¥$ در مقایسه با گروه ۱۴ و $p < 0.05$ در مقایسه با گروه ۱۴ است. $n \geq 3$.

۳-۲- ارزیابی دمیلیناسیون القا شده با لیزولستین و ترمیم بعد از آن در گروه‌های مختلف با تکنیک عملکردی پتانسیل برانگیخته بینایی (VEP)

مقایسه شاخص‌های مربوط به دمیلیناسیون و رمیلیناسیون در حیوانات ماده و گنادکتومی شده نر (۲-۳ هفته پس از گنادکتومی)،

نتایج حاصل از این مشاهده‌ها نشان داد که روند افزایش و کاهش در تأخیر امواج VEP بین گروه‌های نر گنادکتومی شده و ماده، تفاوت معنی‌داری نداشت.

۴- بحث

در این مطالعه، با حذف هورمون‌های گنادی در موش‌های نر، با استفاده از گنادکتومی، تأثیر ناشی از نبود آندروژن‌ها در بازسازی میلین کیاسما و اعصاب بینایی، با استفاده از روش‌های الکتروفیزیولوژی و بافت‌شناسی نشان داده و با حیوانات ماده مقایسه شد. نتایج این مطالعه نشان داد که به دنبال القای دمی‌لیناسیون در کیاسما و اعصاب بینایی موش صحرایی، رمیلیناسیون رخ می‌دهد و الگوی القا و ترمیم دمی‌لیناسیون در موش‌های نر گنادکتومی شده، روندی مشابه با چنین الگویی در موش‌های ماده دارد.

تحقیقات نشان داده است که سلول‌های نورونی، قادر به ساخت هورمون‌های جنسی مردانه و زنانه در مغز و نخاع هستند [۳۸]؛ با این وجود، در تحقیقی نشان داده شد که در شرایط گنادکتومی، تلاش نرونها برای جبران کردن آندروژن‌های از دست رفته، بی‌نتیجه است و مقدار ساخت نورونی آن، نمی‌تواند آندروژن مورد نیاز الیگودندروسیت‌ها را جبران کند [۲۴]. از طرفی گزارش شده که دانسیته الیگودندروسیت‌ها در بخش‌هایی از سیستم عصبی موش‌های صحرایی نر گنادکتومی شده، ۲۰ تا ۴۰ درصد کم‌تر از نرهای سالم و شبیه ماده‌هاست [۱۳، ۱۴] و همچنین مقدار پروتئین‌های PLP و MBP در میلین و الیگودندروسیت‌های نر ۱۶ تا ۲۰ درصد بیش‌تر از نرهای گنادکتومی شده و ماده‌ها بیان می‌شود [۲۵].

روند افزایش تأخیر هر دو پارامتر P و N، در روزهای دوم، هفتم، و چهاردهم، مشاهده شد و تأخیر N و P در روز چهاردهم نسبت به گروه کنترل، اختلاف معنی‌داری داشت. روز هفتم نیز، موج P اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل نشان داد. مقدار تأخیر موج N، حتی در روز ۱۴، نسبت به روز دوم و هفتم به‌طور معنی‌داری افزایش داشت ($P < 0.001$, $F = 19.5$) و این افزایش نشانه بیشینه بودن دمی‌لیناسیون در روز ۱۴ است. موج P در روز هفتم نسبت به کنترل تأخیر معنی‌داری را نشان می‌دهد. مشاهده شد که روند تأخیر یا دمی‌لیناسیون در موش‌های ماده نسبت به گروه کنترل، از روز دوم تا چهاردهم در حال افزایش است به‌طوری‌که در روز چهاردهم، به بیشینه خود می‌رسد.

در روز بیست و هشتم، مقدار تأخیر دوباره به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد که در ماده‌ها ($P < 0.05$, $F = 12.5$) و در حیوانات نر گنادکتومی شده ($P < 0.05$, $F = 9$) بود که نشانه رمیلیناسیون عصب و کیاسمای بینایی است. در روز بیست و هشتم، هنوز مقداری دمی‌لیناسیون وجود دارد، به‌طوری‌که میزان تأخیر موج‌های N و P پتانسیل برانگیخته بینایی، نسبت به گروه کنترل، بیش‌تر و نسبت به روز، ۱۴ کم‌تر است. همچنین مشاهده شد که تزریق لیزولستین در عصب و کیاسمای موش صحرایی نر باعث دمی‌لیناسیون آن طی روزهای دوم، هفتم، و چهاردهم می‌شود و در روزهای بیست و هشتم پس از تزریق، روند رمیلیناسیون غالب است. پس دمی‌لیناسیون القا شده به‌وسیله لیزولستین در عصب و کیاسمای بینایی موش صحرایی در روز چهاردهم به بیشینه خود می‌رسد و رمیلیناسیون پس از آسیب دمی‌لیناسیون، در روز بیست و هشتم رخ می‌دهد.

به‌طوری‌که در روز ۱۴ پس از آسیب، در مقایسه با روز ۷، کاهش معنی‌داری دیده شد. کاهش در تأخیر القا شده به‌دنبال دمیلیناسیون اولیه، نشان‌دهنده توانایی مجدد اکسون‌ها در ارسال ایمپالس‌های بینایی با سرعت بیش‌تر در روز ۱۴ پس از آسیب است. پس نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که دمیلیناسیون القا شده به‌وسیله لیزولستین در عصب و کیاسمای بینایی موش، در روز ۱۴ به بیشینه خود می‌رسد و به‌دنبال آن رمیلیناسیون نسبی، در روز ۲۸ قابل مشاهده است. در واقع نتایج حاصل از مطالعه الکتروفیزیولوژیک در این تحقیق، با نتایج هیستولوژیک تأیید شد که نشان می‌دهد تغییرات عملکردی اکسون‌ها با تغییرات ساختاری آن‌ها به خوبی همخوانی دارد.

نکته جالب این است که مقایسه الگوی دمیلیناسیون و رمیلیناسیون موش‌های نر گنادکتومی شده و ماده، تفاوت آماری معنی‌داری نشان نداد. در تحقیقی نشان داده شد که گنادکتومی در نرها منجر به شدیدتر شدن علائم بیماری MS در مدل EAE در موش‌ها می‌شود و این در حالی است که اوارکتومی ماده‌ها اثر خاصی روی عوارض MS در موش‌های EAE شده نداشته است. بنابراین به‌نظر می‌رسد که آندروژن‌ها دارای عمل حفاظتی زیادی در سلول‌های موجود در مغز و نخاع هستند و کاهش سطح سرمی تستوسترون، رابطه تنگاتنگی با شدیدتر شدن عوارض بیماری‌های نورودژنراتیو دارد [۸ و ۲۴]. بنابراین، آثار حفاظت نورونی تستوسترون (عدم انجام گنادکتومی) مشاهده شده در این مطالعه، منطبق با گزارش‌های متعدد از آثار حفاظت نورونی تستوسترون است.

تولید و نو شدن الیگودندروسیت‌ها در نرها و ماده‌ها تفاوت اساسی دارد، به‌طوری‌که ماده‌ها، دارای دانسیته‌ی پایین الیگودندروسیتی و سطح بیان پایین پروتئین‌های

ارزیابی‌های هیستولوژیک کیاسما و اعصاب بینایی، نشان داد که به‌دنبال تزریق داخل کیاسمای لیزولستین، دمیلیناسیون در کیاسما و اعصاب بینایی رخ می‌دهد. در واقع بخش‌هایی از سیستم عصبی مرکزی که در مجاورت نزدیک لیزولستین هستند، دمیلینه می‌شوند. پروسه رمیلیناسیون، مشابه با موارد تزریق لیزولستین در سایر ساختارهای مغزی نخاعی در جوندگان بود. ارزیابی پایه دید در موش‌ها، به‌لحاظ الکتروفیزیولوژیک، در ابتدا با دمیلیناسیون و فقدان عملکردی بینایی و سپس رمیلیناسیون و بهبود دید همزمان بود. در این مطالعه، تغییراتی در تأخیر همه اجزای موج VEP مشاهده شد ولی به‌دلیل ثبات بیش‌تر موج P1، تأخیر موج P1 به‌عنوان شاخص هدایت اندازه‌گیری در نظر گرفته شد. ارزیابی‌های الکتروفیزیولوژیک پتانسیل‌های برانگیخته بینایی، در این مطالعه نشان داد که بیش‌ترین تأخیر در موج P و بنابراین بیش‌ترین دمیلیناسیون در روز ۱۴ پس از آسیب رخ می‌دهد. پس از ثبت (VEP)، در موش‌های صحرائی نر دیابتی، این حیوانات تأخیر طولانی مدتی را در پارامترهای P و N موج VEP نشان دادند که بعد از بررسی بافت‌شناسی مشخص شد میلین و فیبر عصب بینایی این حیوانات دچار دمیلیناسیون و تخریب بافتی شده بود و ثابت شد که از این تکنیک می‌توان برای تشخیص دمیلیناسیون ثانویه استفاده کرد [۳۰]. VEP همچنین در تشخیص بیماران دارای دژنراسیون ماکولار به‌کار برده شده است. محققان با استفاده از این روش، آثار سمی جیوه را روی سیستم بینایی تشخیص داده‌اند [۳۱]. دمیلیناسیون حاصل از انفوزیون آگونیسست رسپتور AMPA/KA داخل عصب بینایی باعث تأخیر موج VEP در خرگوش هم شده است [۳۰]. در این مطالعه با گذشت زمان، از میزان تأخیر موج p کاسته شده

- [2] Bell, J.I. & Lathrop, G.M. (1996) Multiple loci for Multiple Sclerosis. *Nat. Genet.* 13, 377-378.
- [3] Frohman, E.M., Racke, M.K. & Raine, C.S. (2006) Multiple Sclerosis -The Plaque and Its Pathogenesis. *N. Engl. J. Med.* 354, 942-955.
- [4] Hafler, D.A. (2004) Multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* 113, 788-794.
- [5] McQualter, J.L. & Bernard, C.C. (2008) Multiple sclerosis: a battle between destruction and repair. *J. Neurochem.* 100, 295-306.
- [6] Rolak, L.A. (2003) Multiple Sclerosis: It's Not The Disease You Thought It Was. *Clin. Med. Res.* 1, 61-62.
- [7] Shivane A.G. & Chakrabarty, A. (2007) Multiple sclerosis and demyelination. *Curr. Diagn. Pathol.* 13, 193-202.
- [8] Wingerchuk, D.M., Lucchinetti, C.F., & Noseworthy, J.H. (2001) Multiple Sclerosis: Current Pathophysiological Concepts. *Lab. Invest.* 81, 263-281.
- [9] Keirstead, H. (2005) Stem cells for the treatment of myelin loss. *Trends Neurosci.* 28, 677-683.
- [10] Piraino, P.S., Yednock, T.A., Messersmith, E.K., Pleiss, M.A., Freedman, S.B., Hammond, R.R., & Karlik, S.J. (2005) Spontaneous remyelination following

میلین هستند؛ اما تولید الیگودندروسیت‌ها در ماده‌ها بیش‌تر از نرهاست [۱۱]. تستوسترون و آندروژن‌ها سبب افزایش تکثیر و بلوغ سلول‌های بنیادی عصبی و OPC می‌شوند [۱۳، ۲۴، ۲۵]. به‌نظر می‌رسد که یکی از مهم‌ترین عوامل وجود استعداد ابتلا به بیماری MS، سطح و نوع هورمون‌های جنسی است، به‌عبارت دیگر، هورمون‌های جنسی مردانه، با عمل محافظتی و تکثیری زیاد، می‌تواند میلین جنس خود را از نوع ماده تمایز دهد و با حذف آن، میلین تحلیل رفته و به‌سمت ویژگی‌های جنس ماده تطابق یابد.

اگرچه کاربرد درمان‌های ترمیمی یا هورمونی در بیماری‌های دمی‌لینه‌کننده نظیر MS همچنان در مرحله تجربیات حیوانی قرار دارد، نتایج حاصل از این مطالعه می‌تواند در فراهم کردن اطلاعات پایه‌ای در زمینه ویژگی‌های عملکردی و مورفولوژیک سیستم عصبی مرکزی در نبود آندروژن‌های گنادی که آثار تعیین‌کننده‌ای بر روند بازسازی میلین دارند، بسیار کمک‌کننده باشد.

۵- سپاسگزاری

به‌این‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس و ریاست محترم مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به خاطر حمایت‌های مالی از این پژوهش، سپاسگزاری می‌شود.

۶- مراجع

- [1] Annapurna, A., Kumar, V.K., Rao, P.M.M., Rao, K.S., & Rajasekhar, J. (2002) Multiple Sclerosis: the disease and its treatment. *Indian J. Pharmacol.* 34, 3-15.

- to Testosterone Therapy. *J. Immunol.* 174, 2387-2395.
- [16] Ermini, F.V. *Neural stem cell biology and neurogenesis in mouse models of aging and alzheimer's disease.* 2006. Basel University .
- [17] Verkhratsky, A. & Butt, A. (2007) *Glial Neurobiology: A Textbook.* John Wiley & Sons, England.
- [18] Marshall, C.A.G., Novitch, B.G., & Goldman, J.E. (2005) Olig2 Directs Astrocyte and Oligodendrocyte Formation in Postnatal Subventricular Zone Cells. *J. Neurosci.* 25, 7289-7298.
- [19] Nait-Oumesmar, B., Picard-Riera, N., Kerninon, C., & Baron-Van Evercooren, A. (2008) The role of SVZ-derived neural precursors in demyelinating diseases: From animal models to multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 265, 26-31.
- [20] Norenberg, M.D. (1998) Astrocyte Pathophysiology in Disorders of the Central Nervous System . In *Astrocytes in Brain Aging and Neurodegeneration* (Schipper, H.M., ed), pp. 41-70. R.G. Landes Company, Austin, Texas, U.S.A.
- [21] Leavitt, B.R., Hearn-Grant, C.S., & Macklis, J.D. (1999) Mature Astrocytes Transform into Transitional Radial Glia within Adult Mouse Neocortex That prolonged inhibition of alpha4 integrin in chronic EAE. *J. Neuroimmunol.* 167, 53-63.
- [11] Shields, S.A., Gilson, J.M., Blakemore, W.F., & Franklin, R.J.M. (1999) Remyelination Occurs as Extensively But More Slowly in Old Rats Compared to Young Rats Following Gliotoxin-Induced CNS Demyelination. *Glia* 28, 77-83.
- [12] Stangel, M. & Hartung, H.P. (2002) Remyelinating strategies for the treatment of multiple sclerosis. *Prog. Neurobiol.* 68, 361-376.
- [13] Cerghet, M., Skoff, R.P., Bessert, D., Zhang, Z., Mullins, C., & Ghandour, M.S. (2006) Proliferation and Death of Oligodendrocytes and Myelin Proteins Are Differentially Regulated in Male and Female Rodents. *J. Neurosci.* 26, 1439-1447.
- [14] Li, W.W., Penderis, J., Zhao, C., Schumacher, M., & Franklin, R.J.M. (2006) Females remyelinate more efficiently than males following demyelination in the aged but not young adult CNS. *Exp. Neurol.* 202, 250-254.
- [15] Matejuk, A., Hopke, C., Vandenbark, A.A., Hurn, P.D., & Offner, H. (2005) Middle-Age Male Mice Have Increased Severity of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Are Unresponsive

- pp. 3-14. R.G. Landes Company, Austin, Texas, U.S.A.
- [28] Karbanová, J., Mokry, J., & Kotingová, L. (2004) Neural Stem Cells transplanted into intact brains as neurospheres form solid grafts composed of neurons, astrocytes and oligodendrocyte precursors. *Biomed. Papers* 148, 217-220.
- [29] Anastasi, M., Lodato, G., & Cillino, S. (1987) VECPs and optic disc damage in diabetes. *Doc. Ophthalmol.* 66, 331-336.
- [30] Herba, E., Pojda-Wilczek, D., Plech, A.R., Pojda, S.M., & Szkilnik, R. (2004) Influence of dopamine on flash visual evoked potentials (FVEP) in prenatally mercury intoxicated rats. *Pol. J. Pharmacol.* 56, 415-419.
- [31] Magdalena, B., Pawel, Z., Kinga, K., Borowicz, & Stanislaw, J.C. (2004) Neuroprotective role of testosterone in the nervous system. *Pol. J. Pharmacol.* 56, 509-518.
- [32] Hammond, J., Le, Q., Goodyer, C., Gelfand, M., Trifiro, M., & LeBlanc, A. (2001) Testosterone - mediated neuroprotection through the androgen receptor in human primary neurons. *J Neurochem.* 77, 1319-26.
- [33] Dousset V, Brochet B, Vital A, Gross C, Benazzouz A, Boullerne A, Bidabe AM, Gin AM, Caille JM. Lysolecithin-induced Supports Directed Migration of Transplanted Immature Neurons. *Exp. Neurol.* 157, 43-57.
- [22] Sofroniew, M.V. (2005) Reactive Astrocytes in Neural Repair and Protection. *Neuroscientist* 11, 400-407.
- [23] Bates, K.A., Harvey, A.R., Carruthers, M., & Martins, R.N. (2005) Androgens, andropause and neurodegeneration: exploring the link between steroidogenesis, androgens and Alzheimer's disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 281-292.
- [24] Bialek, M., Zaremba, P., Borowicz, K.K., & Czuczwar, S.J. (2004) Neuroprotective role of testosterone in the nervous system. *Pol. J. Pharmacol.* 56, 509-518.
- [25] Jones, K.J., Brown, T.J., & Damaser, M. (2001) Neuroprotective effects of gonadal steroids on regenerating peripheral motoneurons. *Brain Res. Rev.* 37, 372-382
- [26] Husted, C. (2006) Structural insight into the role of myelin basic protein in multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 4339-4340
- [27] Goldman, J.E. (1998) Astrocyte Ontogenesis and Classification. In *Astrocytes in Brain Aging and Neurodegeneration* (Schipper, H.M., ed),

- [36] Woodruff RH, Franklin RJM. Demyelination and remyelination of the caudal cerebellar peduncle of adult rats following stereotaxic injections of lysolecithin, ethidium bromide, and complement/anti-galactocerebroside: A comparative study. *Glia* 25 (1999) 216-228.
- [37] Galbiati M, Martini L, Melcangi RC. Role of glial cells, growth factors and steroid hormones in the control of LHRH-secreting neurons. *Domestic Animal Endocrinology* 25 (2003) 101-108.
- demyelination in primates: preliminary in vivo study with MR and magnetization Transfer. *Am J Neuroradiol* 16 (1995) 225-231.
- [34] Allt G, Ghabriel MN, Sikri K. Lysophosphatidyl choline-induced demyelination A freeze-fracture study. *Acta Neuropathol (Berl)* 75 (1988) 456-464.
- [35] Low PA, Schmelz JD, Yao JK, Dyck PJ, Parthasarathy S, Baumann WJ. Structural specificity in demyelination induced by lysophospholipids. *Biochim Biophys Acta* 754 (1983) 298-304.