

بررسی غلاف میلین و پروتئین‌های مرتبط با آن (MBP، MOG، MAG و PLP) طی تخریب میلین القا شده توسط کوپریزون در سیستم عصبی مرکزی موش‌های نر نژاد C57BL/6

نیما سندگل^{۱*}، مجید کمیجانی^۲ Ph.D.

۱- دانشگاه زابل، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، زابل، سیستان و بلوچستان، ایران

۲- دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، اراک، ایران، کدپستی ۳۸۱۵۶-۸-۸۳۴۹

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: n.sanadgol@uoz.ac.ir و sanadgol.n@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۴/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۵/۱

چکیده

هدف: هدف تحقیق، بررسی دقیق اثرات وابسته به‌زمان کوپریزون بر پروتئین‌های MBP، MOG، MAG و PLP و روند تخریب میلین می‌باشد.

مواد و روش‌ها: مدل تخریب میلین با مصرف پنج هفته غذای حاوی ۰/۲ درصد کوپریزون ایجاد شد. ناحیه کورپوس کالوزوم مغز موش‌ها در هفته‌های ۳، ۴ و ۵ مورد ارزیابی بافتی و مولکولی قرار گرفت و در انتهای هفته پنجم مطالعات رفتاری توسط تست میدان باز انجام شد. **نتایج:** نتایج نشان داد بیان پروتئین‌های غلاف میلین در مقایسه با گروه کنترل به‌صورت وابسته به‌زمان کاهش یافته است. علی‌رغم کاهش کلی این پروتئین‌ها در هفته سوم، در این هفته تنها پروتئین PLP کاهش معنی‌داری با گروه کنترل نشان داد ($P < 0.01$). همچنین سایر پروتئین‌ها از هفته چهارم به بعد کاهش بیان معنی‌داری را نشان دادند. مطالعات میکروسکوپ الکترونی تغییرات معنی‌دار در کاهش قطر میلین در مقایسه با گروه کنترل را تنها پس از ۴ هفته نشان داد ($P < 0.01$). مطالعات رفتاری نیز نشان داد کوپریزون قادر به ایجاد اختلالات رفتاری معنی‌داری در حیوانات مورد مطالعه در مقایسه با گروه کنترل بود و این تغییرات از هفته سوم به بعد قابل مشاهده بودند. **نتیجه‌گیری:** این تحقیق برای اولین بار به بررسی هم‌زمان پروتئین‌های اصلی میلین پرداخته و نتایج نشان می‌دهد بهترین زمان جهت بررسی‌های دقیق مولکولی، بافتی و رفتاری هفته‌های چهارم و پنجم می‌باشند.

واژگان کلیدی: کوپریزون، کورپوس کالوزوم، غلاف میلین، تخریب میلین

مقدمه

مالتیپل اسکلروزیس (Multiple sclerosis= MS) بیماری است که در آن غلاف میلین تشکیل دهنده اکسون در نورون‌های سیستم عصبی مرکزی تخریب می‌شود. این بیماری منجر به اختلال در توانایی و صحت ارتباط سلول‌های عصبی مغز و نخاع با یکدیگر می‌شود. در ام اس سیستم ایمنی بدن غلاف میلین را غیر خودی فرض نموده، علیه پروتئین‌های اصلی میلین واکنش نشان داده و باعث تخریب آن‌ها می‌شود، ترمیم غلاف میلین توسط الیگودندروسیت‌ها به کندی صورت گرفته و در نتیجه نورون‌ها قادر به ارسال موثر سیگنال عصبی نخواهند بود (۱ و ۲). شیوع این بیماری در شمال اروپا ۶۰ تا ۲۰۰ نفر در هر یکصد هزار نفر و در شمال آمریکا ۶ تا ۲۰ نفر در هر یکصد هزار نفر می‌باشد (۳). در حال حاضر در ایران از هر یکصد هزار نفر حدود ۵۰ نفر به بیماری ام اس مبتلا هستند. شیوع این بیماری در استان‌های تهران، فارس و اصفهان بیشتر از سایر استان‌های کشور بوده و متأسفانه این میزان با سرعت زیادی رو به افزایش است (۲). بیشترین علل بروز بیماری ام اس ناشی از عوامل ژنتیکی و محیطی است. مطالعات نشان می‌دهد برخی از تغییرات ژنتیکی ریسک ابتلا و پیشرفت بیماری را افزایش می‌دهند (۴ و ۵). به‌دلیل نامشخصی سلول‌های ایمنی در بیماران ام اس می‌تواند به‌علت اختلال در عملکرد سدخونی مغزی به مغز و نخاع هجوم آورده و باعث تخریب میلین شوند. علاوه بر تخریب ماده سفید (میلین)، کورتکس و هسته‌های عمقی ماده خاکستری مغز و اکسون‌ها نیز در نتیجه انتشار آسیب تحت تاثیر قرار می‌گیرند (۶-۹). آسیب غلاف میلین منجر به اختلال در هدایت پیغام‌های عصبی و اختلال عملکرد بیمار شده و منجر به بروز حملات (عود) می‌شود. گاه مغز می‌تواند از طریق فرآیند بازآرایی نوروپلاستیک (Neuroplasticity) برخی از ضایعات ایجاد شده را جبران کند. از سوی دیگر فرآیند بازسازی مجدد میلین (Remyelination) نیز می‌تواند نقش مهمی در ترمیم

ضایعات ایجاد شده بازی کند. یکی از متداول‌ترین راه‌های القای تخریب میلین در حیوانات آزمایشگاهی استفاده از کوپریزون می‌باشد و اولین بار توسط فردی به‌نام Blakemore مطرح شد (۱۰). بعدها مطالعات بیشتری درباره تاثیرات کوپریزون بر تخریب میلین (Demyelination) در ناحیه رابط بین دو نیمکره یا همان کورپوس کالوزوم مغز انجام شد (۱۱). تغذیه موش‌های آزمایشگاهی با کوپریزون باعث ایجاد دمی‌لینیشن برگشت‌پذیر و از بین رفتن الیگودندروسیت‌های بالغ مخصوصاً در ناحیه کورپوس کالوزوم می‌شود. جالب آن‌که سایر سلول‌ها در سیستم اعصاب مرکزی تحت تاثیر آن قرار نمی‌گیرند (۱۲). الیگودندروسیت‌ها مسئول تولید میلین در سیستم عصبی مرکزی هستند و دلیل این‌که چرا فقط الیگودندروسیت‌ها نسبت به کوپریزون آسیب‌پذیرند هنوز مشخص نیست. در حین تغذیه با کوپریزون، دمی‌لینیشن رخ داده، پس از قطع کوپریزون رمی‌لینیشن خودبه‌خودی در مغز شروع می‌شود (۱۳). مهم‌ترین پروتئین‌های سازنده میلین شامل، گلیکوپروتئین همراه میلین (Myelin-Associated Glycoprotein=MAG)، گلیکوپروتئین الیگودندروسیتی میلین (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein=MOG)، پروتئین اصلی میلین (Myelin Basic Protein=MBP) و پروتئین پروتئولپیدی میلین (Myelin proteolipid protein=PLP) می‌باشند. از آن‌جایی‌که اولین تغییرات در بیان این پروتئین‌ها نشان‌دهنده فعالیت الیگودندروسیت‌ها و تغییر در ساختار غلاف میلین است اثرات حفاظتی ترکیبات مختلف با اندازه‌گیری نقش آن‌ها در افزایش بیان پروتئین‌های ذکر شده ارتباط مستقیم دارد (۱۴). هدف از این تحقیق مشخص نمودن زمان مناسب برای بررسی آسیب‌های ناشی از کوپریزون می‌باشد تا درک بهتری از روند آسیب‌ها ایجاد شده و مقایسه ترکیبات حفاظت‌کننده در زمان مناسب انجام پذیرد.

مواد و روش‌ها

ایجاد مدل کوپریزون. در این پژوهش کلیه نکات اخلاقی با توجه به موازین کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تهران و منطبق با منشور اخلاقی این دانشگاه و در جهت به حداقل رساندن آزار به حیوانات صورت گرفت. برای ایجاد مدل کوپریزون موش‌های C57BL/6 بالغ نر ۸ تا ۹ هفته در محدوده وزنی ۲۰ تا ۲۵ گرم از مرکز انستیتو پاستور ایران تهیه شد. حیوانات در خانه حیوانات با دمای 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد و دوره تاریکی - روشنایی ۱۲ ساعته به صورت ۶ تایی در قفس نگهداری شدند. سپس غذای حاوی کوپریزون ۰/۲ درصد به مدت ۵ هفته به حیوانات داده شد. به دلیل ماهیت پودری غذا برای جلوگیری از آلودگی محیط آزمایشگاه، قفس‌ها در فضای جداگانه و در زیر هود نگهداری شدند. گروه کنترل شامل موش‌های سالم بود که ۵ هفته غذای پودر شده فاقد کوپریزون را دریافت کردند و گروه آزمایشی شامل موش‌های سالمی بود که به مدت ۵ هفته با غذای حاوی کوپریزون تغذیه شدند. کلیه آزمایش‌ها بر روی هر دو گروه کنترل و آزمایشی صورت گرفت.

آماده سازی نمونه‌ها: در پایان هفته‌های ۳، ۴ و ۵، از هر گروه تعداد ۶ موش به صورت تصادفی انتخاب شدند. پس از بی‌هوشی عمیق توسط کتامین و زایلوزین قفسه سینه باز و سپس ۱۵ میلی‌لیتر محلول PBS درون بطن چپ پرفیوژ شد تا تمامی خون موجود در عروق از دهلیز راست قلب حیوان خارج شد. جهت آزمایش‌های بافتی جهت فیکس کردن ۱۵ میلی‌لیتر محلول پارافرم آلدئید ۴ درصد درون بطن چپ پرفیوژ شد، پوست سر برداشته و محل اتصال استخوان بینی به جمجمه شکسته شد. سپس مغز از درون جمجمه خارج درون محلول گلو تار آلدئید ۱۰ درصد به آزمایشگاه میکروسکوپ الکترونی منتقل شد. جهت آزمایشات مولکولی پس از پرفیوژ با PBS بخش کورپوس کالوزوم مغز جدا، در میکروتیوپ RNase free

قرار گرفته و تا انجام آزمایش در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

استخراج RNA: در این مرحله طبق پروتکل کیت استخراج RNA (Accuzol, Bioneer) استخراج RNA از بافت مغز انجام شد. جهت به دست آوردن غلظت RNA مقدار ۵ میکرولیتر از محلول RNA در ۹۵ میکرولیتر آب مقطر حل شد و سپس OD (Optical Density) آن در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر توسط دستگاه نانو دراپ (DeNovix) خوانده و نسبت RNA/DNA بیشتر از ۱/۶ قابل قبول در نظر گرفته شد و جهت سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت.

سنتز cDNA: برای رفع آلودگی قبلی با DNA، به ۲ میکرولیتر از نمونه RNA، ۱۰ میکرولیتر آب DEPC، ۱ میکرولیتر بافر X ۱۰ موجود در کیت و یک واحد آنزیم DNaseI اضافه و برای همگن شدن به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ شد. کلیه مراحل کار بر روی یخ صورت گرفت. سپس جهت انجام واکنش، میکروتیوپ حاوی این ترکیبات به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه ترمومیکسر (Eppendorf) با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در ادامه یک میکرولیتر از EDTA موجود در کیت به محتویات میکروتیوپ اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترمومیکسر با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس حجم نمونه با اضافه کردن ۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد و سنتز cDNA طبق دستورالعمل کیت (Thermo Scientific) انجام شد.

Real-time PCR: به‌طور خلاصه مخلوط واکنش‌گر شامل Green Star Master Mix Solution (۱۲/۵) میکرولیتر، پرایمرهای فوروارد و ریورس با غلظت mM ۱۰ (هر کدام ۰/۵ میکرولیتر)، cDNA (۳ میکرولیتر) و ۳/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر (حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر) بود. این آزمایش به کمک دستگاه Real time PCR (Corbet 6000) انجام شد. از ژن GAPDH به‌عنوان Housekeeping استفاده شد. توالی پرایمرها استفاده شده در این مرحله در جدول ۱ مشخص شده است.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده برای Real time PCR به همراه منابع

نام مولکول	توالی پرایمر (۵' به ۳')	منبع
MAG	F:CTGCCGCTGTTTTGGATAATGA R:CATCGGGGAAGTCGAAACGG	(۱۵)
MBP	F:ACACGAGAACTACCCATTATGGC R:CCAGCTAAATCTGCTGAGGGA	(۱۶)
MOG	F: CAAGAAGAGGCAGCAATGGAG R: CAGGAGGATCGTAGGCACAAG	(۱۷)
PLP	F:CCAGAATGTATGGTGTCTCCC R:GGCCCATGAGTTTAAGGACG	(۱۸)
GAPDH	F:GTGGAAGGGCTCATGACCACAGTCCATGCC R:TCTTACTCCTTGAGGCCATGTAGGCCATG	(۱۵)

سانتی‌متر با دیواری با ارتفاع ۳۶ سانتی‌متر تشکیل شده بود. خطوط کف جعبه به شانزده مربع ۱۸ در ۱۸ سانتی‌متر تقسیم و یک مربع مرکزی در وسط میدان کشیده شده بود. اتاق آزمون ۴/۶ در ۱/۸ متر و توسط یک لامپ قرمز ۶۰ وات برای ایجاد نور پس زمینه روشن شده بود. این فضا پس از قرار دادن هر موش و اتمام تست به وسیله الکل اتیلن ۷۰ درصد تمیز می‌شد (۲۰).

آنالیز آماری

جهت انجام محاسبات آماری، از نرم افزار SPSS version 18.0 استفاده و داده‌ها به صورت میانگین-انحراف معیار یا $\text{mean} \pm \text{SD}$ بیان شد. آزمون‌های آماری مورد استفاده، آنالیز واریانس یک‌طرفه one-way-ANOVA بود. در هر دو آنالیز $p < 0.05$ به عنوان معیار معنی‌دار بودن اختلاف در نظر گرفته شد.

نتایج

اثرات کوپریزون بر بیان گلیکوپروتئین وابسته به میلین (MAG)

نتایج حاصل از بررسی اثرات کوپریزون بر بیان گلیکوپروتئین وابسته به میلین در هفته‌های مختلف در نمودار ۱ مشخص شده است. تغییر معنی‌داری در بیان MAG در سه هفته اول تغذیه با کوپریزون دیده نشد. همان‌طور که مشاهده می‌شود تفاوت معنی‌داری در بیان MAG بین گروه آزمایشی با گروه کنترل در هفته چهارم و

میکروسکوپ الکترونی: برای بررسی اثرات کوپریزون بر میزان از دست رفتن میلین، ناحیه مدیال کورپوس کالوزوم موش‌ها در هفته‌های مختلف جداسازی و به کمک میکروسکوپ الکترونی TEM (Philips) مورد بررسی قرار گرفت و میزان تخریب میلین اندازه‌گیری شد. ابتدا بافت‌ها با محلول گلو تار آلدئید و پارافرم آلدئید (۱:۱) ۲ درصد فیکس شدند، سپس ۳ بار با محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار شستشو شدند. بافت‌ها به مدت ۲ ساعت در محلول اوسمیوم ۰/۲ مولار قرار داده شده و سپس مراحل آنگیری به صورت دو مرحله‌ای به کمک الکل (غلظت‌های ۵۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۹۵ و ۱۰۰ درصد) و هر بار ۵ دقیقه انجام شد. سپس بلوک‌های بافتی در رزین تهیه و به مدت ۳ روز در انکوباتور ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. برش‌های نازک به ضخامت ۵۰ نانومتر به وسیله اولترامیکروتوم و با استفاده از تیغه الماس تهیه و بر روی گریدهای مسی قرار داده شدند. نمونه‌ها توسط اورانیل و سرب رنگ‌آمیزی شده و اسلایدهای تهیه شده به وسیله میکروسکوپ الکترونی ترانس‌میشن با بزرگنمایی ۲۰۰۰۰ بررسی شد (۱۹).

بررسی اثرات کوپریزون بر رفتار حیوانات مورد

مطالعه: در این مرحله رفتار حیوانات مورد مطالعه بر اساس تست استاندارد میدان باز (Open Field)، در هفته‌های مختلف و مورد ارزیابی قرار گرفت. دستگاه میدان باز از جعبه چوبی سفیدی با اندازه ۷۲ در ۷۲

پنجم وجود دارد. بیشترین کاهش بیان در هفته چهارم دیده شده و در هفته پنجم نیز به همان میزان باقی مانده است.

اثرات کوپریزون بر بیان گلیکوپروتئین الیگوندروستی میلین (MOG)

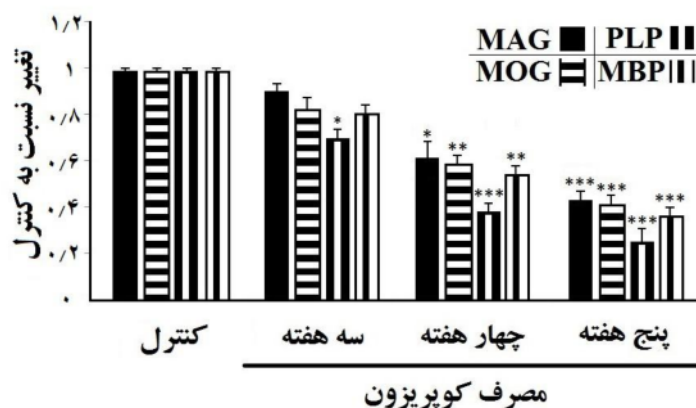
نتایج حاصل از بررسی اثرات کوپریزون بر بیان گلیکوپروتئین الیگوندروستی میلین در هفته‌های مختلف در نمودار ۱ مشخص شده است. سه هفته تغذیه با کوپریزون قادر به تغییر معنادار بیان MOG نشد. نتایج نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری در بیان MOG بین گروه آزمایشی با گروه کنترل در هفته چهارم و پنجم وجود دارد. بیشترین کاهش بیان به ترتیب در هفته پنجم و هفته چهارم دیده شد.

اثرات کوپریزون بر بیان پروتئولپید پروتئین (PLP) نتایج حاصل از بررسی اثرات کوپریزون بر بیان پروتئولپید پروتئین در هفته‌های مختلف در نمودار ۱ مشخص شده

است. نتایج نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری بین گروه آزمایشی با گروه کنترل در هفته‌های سوم، چهارم و پنجم وجود دارد. سه هفته تغذیه با کوپریزون باعث تغییر معنی‌دار بیان PLP شد. بیشترین کاهش بیان PLP مربوط به هفته‌های چهارم و پنجم بود.

اثرات کوپریزون بر بیان پروتئین اصلی میلین (MBP)

نتایج حاصل از بررسی اثرات کوپریزون بر بیان پروتئین اصلی میلین در هفته‌های مختلف در نمودار ۱ مشخص شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود تفاوت معنی‌داری بین گروه آزمایشی با گروه کنترل در هفته‌های سوم، چهارم و پنجم وجود دارد. سه هفته تغذیه با کوپریزون باعث تغییر معنادار بیان MBP شد. بیشترین کاهش بیان MBP مربوط به هفته‌های چهارم و پنجم بود.

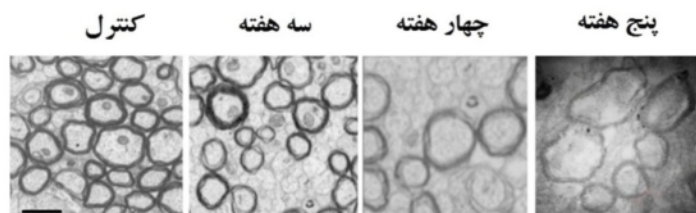


نمودار ۱: بررسی اثر کوپریزون در هفته‌های ۳ و ۴ و ۵ بر بیان MAG، MOG، PLP و MBP. با افزایش زمان، کوپریزون باعث کاهش بیان MAG، MOG، PLP و MBP در ناحیه کورپوس کالوزوم موش‌ها نسبت به گروه کنترل شد. علامت (*) نماد تفاوت با گروه کنترل است ($p < 0.001$ ، *** $p < 0.001$ ، ** $p < 0.01$ ، * $p < 0.05$ ، (n=3).

می‌شود تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل با گروه آزمایشی در هفته‌های سوم، چهارم و پنجم وجود دارد. در سه هفته اول تغذیه با کوپریزون تغییر معنی‌داری در تخریب میلین دیده نشد. بیشترین کاهش میلین در هفته پنجم مشاهده شد.

اثرات کوپریزون بر میزان تخریب میلین

تصاویر به دست آمده با میکروسکپ الکترونی برای ارزیابی میزان تخریب میلین در ناحیه مدیال کورپوس کالوزوم در اثر مصرف کوپریزون مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱) و نتایج در نمودار ۲ نشان داده شد. همان‌طور که مشاهده



شکل ۱: تصاویر میکروسکپ الکترونی مدیال کورپوس کالوزوم حیوانات مورد مطالعه (نوار مقیاس یک میکرومتر). با افزایش زمان، کورپوزون باعث افزایش تخریب غلاف میلین در ناحیه کورپوز کالوزوم موش‌ها نسبت به گروه کنترل شد.

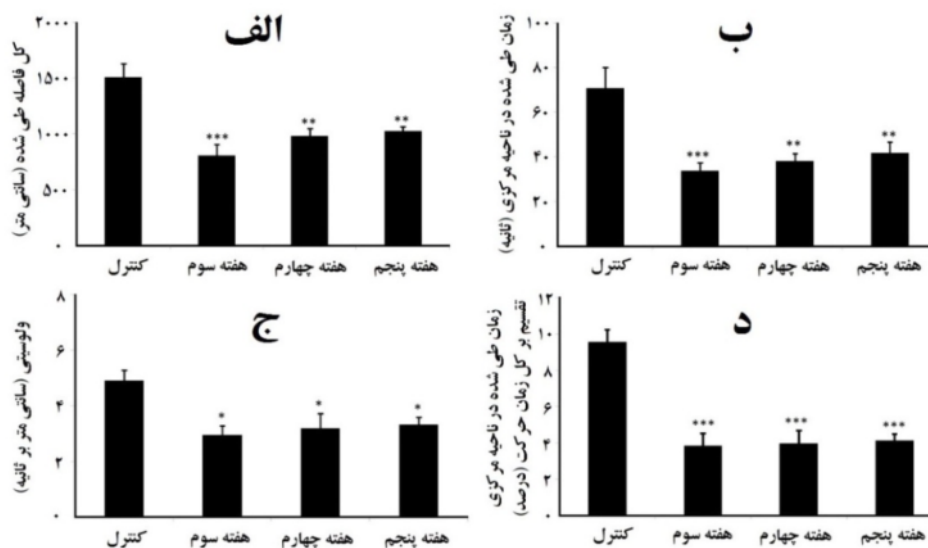


نمودار ۲: آنالیز کمی اثر کورپوزون در هفته‌های ۳ و ۴ و ۵ بر میزان تخریب میلین. با افزایش زمان، کورپوزون باعث افزایش تخریب میلین در ناحیه کورپوز کالوزوم موش‌ها نسبت به گروه کنترل شد. علامت (*) نماد تفاوت با گروه کنترل است. ($p < 0.05$), ($p < 0.01$), ($p < 0.001$). (n=3).

با کورپوزون در هفته‌های مختلف به طور معنی‌داری تغییر یافته است. همان‌طور که مشاهده می‌شود تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل با گروه آزمایشی در هفته‌های سوم، چهارم و پنجم وجود دارد. تغذیه حیوانات با کورپوزون قادر به تغییر معنی‌دار رفتار آن‌ها شد. بیشترین تغییرات رفتاری در هفته سوم دیده شد.

اثرات کورپوزون بر رفتار حیوانات در تست میدان باز

نتایج حاصل از بررسی اثرات کورپوزون بر رفتار حیوانات در تست اوپن فیلد در هفته‌های مختلف مورد مطالعه قرار گرفت (نمودار ۳). نتایج نشان داد که میزان کل حرکت (نمودار ۳، الف)، مدت حرکت در ناحیه مرکزی (نمودار ۳، ب)، سرعت حرکت (نمودار ۳، ج) و نسبت حرکت در ناحیه مرکزی به کل حرکت (نمودار ۳، د) پس از تغذیه



نمودار ۳: بررسی اثرات کوپریزون در هفته های ۳ و ۴ و ۵ بر رفتار حیوانات توسط تست اوپن فیلد. علامت (*) نماد تفاوت با گروه کنترل است. (n=۳); (*p<۰/۰۵, ** p<۰/۰۱, *** p<۰/۰۰۱)

بحث

در دهه ۱۹۶۰، کوپریزون به عنوان یک نوروتوکسین بر روی موش، رت و خوک شناخته شد. میزان استفاده از ۰/۵ درصد کوپریزون باعث ایجاد سمیت زیاد، فلج اندامها، تشنج و مرگ میر بالا شد. ادم مغزی، دمیلینیشن، آستروگلیوزیس (Astrogliosis) و هیدروسفالوس (Hydrocephalus) علائم برجسته پاتولوژیک در موش های تغذیه شده با کوپریزون بودند. این مشخصات به صورت شدیدتر در ماده سفید مخچه و مغز میانی قابل مشاهده بود (۲۱).

اولین بار دانشمندی به نام Blakemore اثربخشی تغذیه با کوپریزون را جهت القای مرگ الیگودندروسیت ها و به طور ثانویه دمیلینیشن پایک های مخچه ای فوقانی مطرح نمود. طبق تحقیق او، طی ۵ هفته تغذیه همراه با کوپریزون، بسیاری از اکسون ها دمیلینه شده ولی الیگودندروسیت های میلین ساز نیز قابل تشخیص هستند (۱۰). رمیلینیشن گسترده نیز فقط در زمان قطع کوپریزون از تغذیه حیوانات اتفاق می افتد. Hiremath و همکاران (۲۲) برای اولین بار تاثیر ۰/۲ درصد وزنی غذای روزانه کوپریزون را بر ماده سفید مخ، به خصوص کورپوس کالوزوم که میزان دمیلینیشن به وسعت بیشتری و به آسانی قابل تشخیص است، مطرح نمودند. پس از آن، تاثیرات کوپریزون بر دمیلینیشن و رمیلینیشن به طور گسترده ای بر روی کورپوس کالوزوم مورد بررسی قرار گرفت. در سال های اخیر نیز مطالعات زیادی در مورد دمیلینیشن و رمیلینیشن ماده خاکستری مخ و مخچه توسط کوپریزون صورت گرفته است (۱۱).

مکانیسم دقیق نحوه ایجاد دمیلینیشن و مرگ الیگودندروسیت ها توسط کوپریزون و متعاقب آن ایجاد دمیلینیشن هنوز شناخته نشده است. کوپریزون یک شلاتور مس بوده که منجر به کمبود مس در مغز می گردد. با این حال، مکمل های مس با غلظت های بالا نیز

نتوانستند مانع از اثرات سمی کوپریزون شوند که نشان دهنده این است که کمبود مس مکانیسم اصلی عملکرد کوپریزون نمی باشد (۲۳).

تغذیه با کوپریزون باعث ایجاد دمیلینیشن برگشت پذیر و از بین رفتن الیگودندروسیت های بالغ می شود، حال آن که سایر سلول ها در سیستم اعصاب مرکزی تحت تاثیر آن قرار نمی گیرند. تجویز دوزهای بالاتر این ماده، باعث تغییر در مورفولوژی میتوکندری گشته که منجر به شکل گیری میتوکندری بسیار بزرگ در کبد می شود (۱۲). به همین دلیل، عملکرد آنزیم های میتوکندری در مغز و کبد مانند منسواکسیداز، سیتوکروم اکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز کاهش می یابد (۲۴). از آن جایی که میتوکندری باعث تولید ATP شده و جهت همئوستازی یون کلسیم در سلول و فرایند آپوپتوزیس نقش مهمی ایفا می کند، از این رو اختلال عملکرد میتوکندری و متعاقب آن اختلال در متابولیسم انرژی می تواند دلیلی جهت از بین رفتن الیگودندروسیت ها باشد. با این حال، دلیل این که چرا فقط الیگودندروسیت ها نسبت به کوپریزون آسیب پذیرند هنوز در دست بررسی است. در حین تغذیه با کوپریزون، دمیلینیشن ایجاد شده پس از سه هفته قابل رویت بوده و به بیشترین میزان در انتهای ۵ هفته می رسد. این در حالی است که پس از قطع کوپریزون رمیلینیشن خودبه خودی در مغز شروع می شود. آپوپتوزیس اولیه الیگودندروسیت ها و فعال شدن میکروگلیا-ماکروفاژها دو مشخصه برجسته در پاتولوژی بافتی مدل حیوانی کوپریزون می باشند. سایر سازوکارهای دخیل در این مدل شامل مهار تمایز سلول های پیش ساز الیگودندروسیت ها و ترشح سایتوکاین های پیش التهابی از میکروگلیا-ماکروفاژهای فعال شده است (۱۳).

از مزیت های مهم مدل کوپریزون، مراحل دمیلینیشن و رمیلینیشن واضح و برگشت پذیر بوده که به راحتی قابل تشخیص هستند. مزیت دیگر این مدل در عدم آسیب

در این مطالعه برای اولین بار، تاثیر کوپریزون هم‌زمان بر روی بیان ۴ پروتئین‌های اصلی تشکیل دهنده میلین و تغییرات رفتاری در مدل توکسیک بیماری ام اس مورد بررسی قرار گرفت. کوپریزون ماده‌ای است که منجر به بروز پاسخ‌های متفاوت سلولی و در راس آن‌ها آپوپتوزیس الیگودندروسیت‌ها و تخریب میلین می‌شود. بررسی اخیر نشان داد پس از ۷ روز تغذیه با کوپریزون، بیان پروتئین‌های میلین که توسط الیگودندروسیت‌های بالغ ایجاد می‌شود شروع به کاستن کرده و پس از ۵ هفته تغذیه با کوپریزون به میزان ۵۰ درصد کاهش می‌یابد و بیشترین تغییرات رفتاری نیز در همین مدت مشاهده می‌شود. بر اساس مطالعات قبلی بر روی مدل کوپریزون، آپوپتوزیس الیگودندروسیت‌ها پس از چند روز تغذیه با کوپریزون آغاز می‌شود در حالی که تخریب میلین قابل رویت پس از ۵ هفته و هم‌زمان با از بین رفتن برخی پروتئین‌های میلین قابل تشخیص است (۲۶). در این تحقیق، کوپریزون بیشترین تاثیر را در کاهش PLP و نقص در عملکرد رفتاری در کوتاه‌ترین مدت (۳ هفته) در ناحیه کارپوس کالوزوم داشت ولی در این مدت تاثیری در کاهش معنادار MOG و MAG نداشت. این نتیجه بیانگر آن است که کوپریزون ممکن است از طریق دخالت در مکانیسم‌های متفاوتی باعث تغییرات سلولی شود و هم‌زمان یا اندکی پس از مشاهده تغییرات مولکولی، فرآیند نقص در عملکرد رفتاری حیوانات نیز قابل مشاهده می‌باشد. در مطالعات قبلی محققین اقدام به بررسی ترکیبات دارویی در هفته‌های مختلف نموده که این عدم تمرکز بر زمان مشخص منجر به گزارش‌های متفاوتی شده است. با توجه به تغییرات وسیع ملاحظه شده پس از پنج هفته مصرف کوپریزون توصیه می‌شود. جهت دقیق بودن نتایج حاصل از مقایسه اثرات ترکیبات حفاظتی مختلف در این مدل، ترجیها اندازه‌گیری‌ها در انتهای هفته پنجم صورت گیرد تا تغییر شرایط و زمان انجام مطالعات تاثیر کمتری در نتایج داشته باشد. نتایج حاصل از این مطالعه

پذیری BBB بوده که باعث بررسی مراحل دمیلینیشن و رمیلینیشن در مغز بدون دخالت سیستم ایمنی می‌شود (۲۵).

از معایب اصلی این مدل می‌توان به ناشناخته بودن مکانیسم ایجاد دمیلینیشن توسط کوپریزون اشاره کرد که می‌تواند باعث سختی در شناسایی عوامل موثر در از بین رفتن الیگودندروسیت‌های بالغ و در نتیجه ایجاد دمیلینیشن شود. به‌طور قطع، القای پلاک‌های دمیلینه توسط کوپریزون با پلاک‌های ایجاد شده در بیماری ام اس تا حدی متفاوت بوده و نمی‌توان به‌طور دقیق این بیماری را توسط مدل کوپریزون ایجاد کرد. با این حال، این مدل جهت بررسی مراحل رمیلینیشن بسیار مفید می‌باشد (۲۵).

پس از ایجاد دمیلینیشن توسط کوپریزون و قطع آن، ساخت مجدد میلین در طول یک هفته اتفاق می‌افتد. ابراز مجدد پروتئین‌های میلین این امکان را فراهم می‌کند که مراحل رمیلینیشن و تاثیرات آن بررسی شود. این در حالی است که با وجود اینکه مدل EAE بهترین مدل جهت بررسی التهاب سیستم عصبی مرکزی است ولی بررسی رمیلینیشن در آن بسیار مشکل بوده زیرا این پدیده هم‌زمان با ایجاد دمیلینیشن اتفاق می‌افتد در نتیجه امکان تمایز آن‌ها از هم به سختی امکان‌پذیر است (۲۵). با توجه به گزارش‌های ضد و نقیض از مکانیسم دقیق عمل کوپریزون در روند ایجاد مدل ام اس هنوز ابهامات زیادی در مورد نقش این ترکیب در تخریب و ترمیم میلین وجود دارد. این تاثیرات دوگانه می‌تواند مربوط به شرایطی از قبیل میزان التهاب موجود و یا موقعیت پاتولوژیکی سلول که در آن بسیاری از پارامترهای سلولی دخیل است باشد. به‌طور کلی کوپریزون از طریق مکانیسم‌های متعددی می‌تواند باعث تغییرات در بیان گروه‌های متنوعی از ژن‌ها شود و به‌همین دلیل بررسی دقیق تاثیر مهار این فرآیند کاری بسیار دشوار می‌نماید.

نتیجه گیری

different subtypes of multiple sclerosis. *Journal of pathogens*. 2; 2013: 013.

8. Sanadgol N, Nikravesht A, Motalleb G, Roshanzamir F, et al. Evaluation of the association between ICAM-1 gene polymorphisms and sICAM-1 serum levels in multiple sclerosis (MS) patients in Southeast Iran. *International Journal of Genetics and Molecular Biology*. 2011; 3(6): 81-6.

9. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain pathology*. 2007; 17(2): 210-8.

10. Blakemore W. Observations on oligodendrocyte degeneration, the resolution of status spongiosus and remyelination in cuprizone intoxication in mice. *Journal of neurocytology*. 1972; 1(4): 413-26.

11. Skripuletz T, Bussmann JH, Gudi V, Koutsoudaki PN, et al. Cerebellar cortical demyelination in the murine cuprizone model. *Brain pathology*. 2010; 20(2): 301-12.

12. Wakabayashi T, Asano M, Kurono C. Mechanism of the formation of megamitochondria induced by copper-chelating agents. *Pathology International*. 1975; 25(1): 15-37.

13. Kipp M, Clarner T, Dang J, Copray S, et al. The cuprizone animal model: new insights into an old story. *Acta neuropathologica*. 2009; 118(6): 723-36.

14. Steinman L. The re-emergence of antigen-specific tolerance as a potential therapy for MS. *Multiple Sclerosis Journal*. 2015; 21(10): 1223-38.

15. Oyama F, Kotliarova S, Harada A, Ito M, et al. Gem GTPase and Tau morphological changes induced by gem GTPase in cho cells are antagonized by tau. *Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279(26): 27272-7.

16. Elbaz B, Traka M, Kunjamma RB, Dukala D, et al. Adenomatous polyposis coli regulates radial axonal sorting and myelination in the PNS. *Development*. 2016; 143(13): 2356-66.

17. Sanadgol N, Golab F, Tashakkor Z, Taki N, et al. Neuroprotective effects of ellagic acid on cuprizone-induced acute demyelination through limitation of microgliosis ,adjustment

راه را برای انجام مطالعات و برنامه ریزی‌های دقیقتر جهت رسیدن به نتایجی قابل استناد فراهم می‌سازد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود واجب می‌دانند از مرکز تحقیقات علوم دارویی دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه زیست‌شناسی دانشگاه زابل و کلیه همکارانی که ما را در این پژوهش یاری نمودند تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

1. Sanadgol N, Zahedani S, Sharifzadeh M, Khalseh R, et al. Recent updates in imperative natural compounds for healthy brain and nerve function: A systematic review of implications for multiple sclerosis. *Current drug targets*. 2017;18 (13):1499-1517.

2. Sahraian MA, Khorramnia S, Ebrahim MM, Moinfar Z, et al. Multiple sclerosis in Iran: a demographic study of 8,000 patients and changes over time. *European neurology*. 2010;64(6): 331-6.

3. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol*. 2005; 23: 683-747.

4. Ramroodi N, Niazi AA, Sanadgol N, Ganjali Z, et al. Evaluation of reactive Epstein-Barr Virus (EBV) in Iranian patient with different subtypes of multiple sclerosis (MS). *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2013; 17(2): 156-63.

5. Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetics of multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*. 2004; 3(2): 104-10.

6. Ramroodi N, Khani M, Ganjali Z, Javan MR, et al. Prophylactic effect of BIO-1211 small-molecule antagonist of VLA-4 in the EAE mouse model of multiple sclerosis. *Immunological investigations*. 2015; 44(7): 694-712.

7. Ramroodi N, Sanadgol N, Ganjali Z, Niazi AA, et al. Monitoring of active human herpes virus 6 infection in Iranian patients with

of CXCL12/IL-17/IL-11 axis and restriction of mature oligodendrocytes apoptosis. *Pharmaceutical Biology*. 2017; 55(1): 1679-87.

18. Lang J, Maeda Y, Bannerman P, Xu J, et al. Adenomatous polyposis coli regulates oligodendroglial development. *Journal of Neuroscience*. 2013; 33(7): 3113-30.

19. Hussain R, Ghomari AM, Bielecki B, Steibel J, et al. The neural androgen receptor: a therapeutic target for myelin repair in chronic demyelination. *Brain*. 2013; 136(1): 132-46.

20. Walker J, Fowler S, Miller D, Sun A, et al. Spatial learning and memory impairment and increased locomotion in a transgenic amyloid precursor protein mouse model of Alzheimer's disease. *Behavioural brain research*. 2011; 222(1): 169-75.

21. Kesterson JW, Carlton WW. Cuprizone toxicosis in mice—attempts to antidote the toxicity. *Toxicology and applied pharmacology*. 1983; 22(1): 6-13.

22. Hiremath M, Saito Y, Knapp G, Ting J-Y, et al. Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *Journal of neuroimmunology*. 1998; 92(1): 38-49.

23. Carlton WW. Studies on the induction of hydrocephalus and spongy degeneration by cuprizone feeding and attempts to antidote the toxicity. *Life sciences*. 1967; 6(1): 11-9.

24. Zhang Y, Xu H, Jiang W, Xiao L, et al. Quetiapine alleviates the cuprizone-induced white matter pathology in the brain of C57BL/6 mouse. *Schizophrenia research*. 2008; 106(2): 182-91.

25. Skripuletz T, Gudi V, Hackstette D, Stangel M. De- and remyelination in the CNS white and grey matter induced by cuprizone: the old, the new, and the unexpected. *Histol Histopathol*. 2011; 26(12): 1585-97.

26. Pacifico F, Leonardi A. NF- κ B in solid tumors. *Biochemical pharmacology*. 2006; 72(9): 1142-52.

Evaluation of myelin sheath and their related proteins (MAG, MOG, MBP and PLP) during cuprizone-induced demyelination in central nervous system of male C57BL/6 mice

Sanadgol n, Ph.D.^{1*}, komijani M, Ph.D.²

1. Department of Biology, Faculty of Science, Zabol University, Zabol, Iran

2. Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran, 38156-8-8349

* Email corresponding author: sanadgol.n@gmail.com, n.sanadgol@uoz.ac.ir

Received: 8 Jul. 2017

Accepted: 23 Jul. 2017

Abstract

Aim: The aim of this study was to investigate of cuprizone time-dependent effects on MAG, MOG, MBP, and PLP proteins and demyelination process.

Materials and Methods: The myelin degradation model was created with a five week diet containing 0.2% of cuprizone. The rats brain corpus callosum region was subjected to tissue and molecular evaluation at weeks 3, 4 and 5. At the end of the fifth week, behavioral studies were performed by open field test.

Results: Results showed that the expression of myelin sheath proteins decreased time-dependently in comparison with the control group. Despite the overall reduction of these proteins in the third week, only PLP protein decreased significantly in this week comparing to control ($P<0.01$). Other proteins also showed a significant reduction in expression after the fourth week. Electron microscopy studies showed significant changes in the reduction of myelin diameter in comparison to the control group only after 4 weeks ($p<0.01$). Behavioral studies also indicated that cuprizone was able to cause significant behavioral abnormalities in the animals from the beginning of the third week compared to the control group.

Conclusion: This research was the first time to study the main myelin proteins at the same time, and the results show that the best time for accurate molecular, tissue and behavioral reviews are fourth and fifth weeks.

Keywords: Cuprizone, Corpus Callosum, Myelin Sheath, Demyelination