



# JAMS

مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک

دوره بیست و یکم، شماره شش، آذر و دی ۱۳۹۷

journal homepage: <http://jams.arakmu.ac.ir>



مقاله پژوهشی

## بررسی اثرات الایژیک اسید بر جمعیت و فعالیت سلول‌های نوروگلیال سیستم عصبی مرکزی در مالتیپل اسکلروزیس القا شده توسط کوپریزون

نیما سندگل<sup>۱\*</sup>، پریسا مالکی<sup>۳</sup>

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

۲. مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۳. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک، اراک، ایران.

### چکیده

**زمینه و هدف:** الایژیک اسید (EA) یک ترکیب آنتی اکسیدان طبیعی با ساختار فنلی است. در این مطالعه تاثیرات حفاظتی آن بر جمعیت و فعالیت سلول‌های گلیال در مدل حیوانی ام اس در شرایط استرس اکسیداتیو مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش‌ها:** موش‌های C57BL/6 بالغ نر ۸ تا ۹ هفته‌ای تهیه و در شرایط استاندارد نگهداری شدند. جهت ایجاد مدل، حیوانات به مدت شش هفته غذای حاوی ۰/۲ درصد کوپریزون (Cup) را مصرف نمودند. حیوانات به هشت گروه شامل کنترل، کنترل دریافت کننده سه دوز EA (۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، Cup و Cup دریافت کننده سه دوز EA تقسیم شدند. در انتها بافت مغز حیوانات توسط روش‌های مولکولی شامل ایمونوهیستوشیمی (IHC)، وسترن بلات (WB) و ریل تایم پی سی ار (q-PCR) جهت تجزیه و تحلیل مارکرهای اختصاصی سلول‌های گلیال مورد استفاده قرار گرفت.

**یافته‌ها:** آنالیز IHC و WB نشان داد که تنها غلظت بالای EA قادر به کاهش بیان پروتئین‌های GFAP (شاخص آستروسیت‌های فعال)، Mac-3 (شاخص میکروگلیال‌های فعال)، افزایش بیان پروتئین Olig-2 (شاخص الیگودندروسیت‌های پیش ساز) و در نهایت کاهش معنادار نسبت پروتئین APC (شاخص الیگودندروسیت‌های بالغ) به Olig-2 نسبت به گروه Cup می‌باشد. تجزیه و تحلیل q-PCR نیز نشان داد تغییرات بیان mRNA این شاخص‌ها نیز با تغییرات پروتئین‌های آن‌ها همسان بوده و از این رو نتایج قبلی تایید گردید.

**نتیجه‌گیری:** مصرف (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) EA به‌طور موثر فعالیت آستروسیت‌ها و میکروگلیال‌ها را کاهش داده و محیط را جهت مهاجرت سلول‌های پیش‌ساز الیگودندروسیتی به ناحیه عارضه و تبدیل فرآیندهای تخریبی به مکانیسم‌های ترمیمی مساعد می‌نماید.

### اطلاعات مقاله

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۲/۱۱

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۵/۰۳

تاریخ انتشار: ۹۷/۱۰/۰۱

### واژگان کلیدی

الایژیک اسید

ایمونوهیستوشیمی

کوپریزون

مالتیپل اسکلروزیس

### \*نویسنده مسئول:

نیما سندگل

آدرس پستی: ایران، زابل، دانشگاه زابل، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی.

نمابر: +98 54 3123 2187

E-mail: [n.sanadgol@uoz.ac.ir](mailto:n.sanadgol@uoz.ac.ir)

## ۱. مقدمه

در سال ۱۹۹۶ از طرف انجمن ملی ام اس آمریکا چهار نوع مختلف این بیماری مشخص شد (۸): نوع اول، عودکننده و خاموش شونده، نوع دوم پیشرونده اولیه، نوع سوم پیشرونده ثانویه و نوع چهارم عودکننده پیشرونده

علائم و نشانه‌های بیماری ام اس مختلف بوده و شامل مواردی چون تغییر حس (به شکل هایپوستزی، پاراستزی)، کاهش آستانه درد، ضعف عضلانی، اسپاسم عضلانی، اختلال حرکت، اشکال در هماهنگی اعضا و تعادل، اختلال تکلم، بلع، مشکلات بینایی (از قبیل نیستاگموس، دوبینی و التهاب عصب چشم)، خستگی، درد حاد یا مزمن، اختلال در دفع ادرار و مدفوع، اختلالات شناختی، افسردگی و خلق ناپایدار هستند (۹).

با این‌که هنوز درمان قطعی برای بیماری ام اس مشخص نشده است، هدف از اقدامات درمانی فعلی برگرداندن عملکرد سیستم عصبی به حالت اولیه، جلوگیری از بروز حملات جدید و پیشگیری از بروز ناتوانی در بیماران است. درمان‌های دیگری نیز به منظور ایجاد ترمیم در بافت عصبی از جمله ترکیبات ضد التهاب و سلول‌های بنیادی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۱۰)، (۱۱). مدل استفاده شده در این تحقیق مدل کوپریزون است. کوپریزون یک شلاتور مس بوده که استفاده از آن موجب القای مرگ برنامه ریزی شده در سلول‌های الیگودندروسیتی، التهاب مزمن، افزایش فعالیت سلول‌های آستروسیت و میکروگلیال و در نهایت تخریب میلین می‌باشد (۱۲).

در CNS سلول‌های گلیال با منشا نورواکتودرمی (ماکروگلیاها) شامل آستروسیت‌ها، سلول‌های الیگودندروگلیال (الیگودندروسیت‌ها)، سلول‌های اپاندیمال (که سطح بطنی را مفروش می‌کنند)، سلول‌های بنیادی عصبی و سلول‌های NG2 (پلی دندروسیت‌های) نابالغ می‌باشند و سلول‌های گلیال با منشا مزودرمی شامل میکروگلیاها در CNS و سلول‌های شوان در سیستم عصبی محیطی هستند (۱۳).

آستروسیت‌ها، سلول‌های گلیال ستاره‌ای شکلی هستند که طیف وسیعی از اعمال را در CNS انجام می‌دهند و حمایت فیزیکی از نورون‌ها و پاکسازی مواد پوسیده را در مغز بر عهده دارند (۱۴). هم‌چنین آن‌ها بعضی نیازهای شیمیایی جهت

مالتیپل اسکلروز یا ام اس بیماری است که در آن غلاف میلین اطراف اکسون در نورون‌های سیستم عصبی مرکزی (CNS) تخریب می‌شود. سلول‌های عصبی توسط ارسال سیگنال‌های الکتریکی در طول اکسون‌ها با هم مرتبط هستند و این بیماری منجر به اختلال در توانایی سلول‌های عصبی مغز و نخاع جهت ارتباط با یکدیگر می‌گردد. در ام اس سیستم ایمنی بدن علیه میلین عمل نموده و باعث تخریب آن می‌شود، در نتیجه سلول‌ها قادر به ارسال سیگنال عصبی به‌طور موثر نخواهند بود (۱). شیوع این بیماری در اروپای شمالی ۶۰ تا ۲۰۰ نفر از هر صد هزار نفر و در شمال آمریکا ۶ تا ۲۰ نفر از هر صد هزار نفر است (۲). در حال حاضر، در ایران از هر صد هزار نفر حدود ۵۰ نفر به بیماری ام اس مبتلا هستند و شیوع این بیماری در استان‌های تهران، فارس و اصفهان بیشتر از سایر استان‌های کشور بوده که متأسفانه این میزان رو به افزایش است (۳). مانند بسیاری از بیماری‌های خود ایمنی، این بیماری نیز در زنان شایع‌تر است، این در حالی است که در افراد بالای ۵۰ سال، ام اس در مردان و زنان به نسبت مساوی بروز می‌کند (۴).

ام اس یک بیماری موروثی نیست، با این‌حال برخی از تغییرات ژنتیکی ریسک ابتلا و پیشرفت بیماری را افزایش می‌دهند. براساس مطالعات خویشاوندی، اختلال در سیستم آنتی ژن لوکوسیت انسانی (Human leukocyte antigen, HLA) که گروهی از ژن‌ها بر روی کروموزوم ۶ هستند، امکان ابتلا به ام اس را افزایش می‌دهند (۴). ریسک بروز بیماری در خویشاوندان فرد مبتلا به‌خصوص خواهر و برادر و فرزندان بیشتر از افراد دیگر است (۵). بیماری ام اس در افرادی که دورتر از خط استوا زندگی می‌کنند شایع‌تر است، کاهش ویتامین D بدن، استرس زیاد و هم‌چنین سیگار از عوامل خطر ساز در بروز بیماری ام اس هستند (۷-۵). عفونت، رژیم غذایی و دریافت هورمون نیز می‌توانند به‌عنوان عوامل مستعدکننده بروز ام اس مطرح شوند (۷).

بیماری‌های متعددی از جمله سرطان و دیابت از طریق کاهش استرس‌های اکسیداتیو مشخص شده است (۱۶). به گفته پژوهشگران، آنتی اکسیدان‌ها می‌توانند با اختلال در مهاجرت سلول‌های ایمنی «T-cells» به دستگاه عصبی مرکزی و مهار آنزیم‌های اکسیدکننده در درمان بیماری ام اس موثر باشند (۱۷).

هدف از این تحقیق، بررسی نقش الایژیک اسید در تغییرات جمعیتی الیگوندروسیته‌ها و فعالیت سلول‌های استروستی و گلیال‌ها طی حذف میلین القا شده توسط کوپریزون در شرایط القای استرس اکسیداتیو به منظور بررسی امکان کنترل آسیب‌های عصبی توسط این ترکیب آنتی اکسیدان می‌باشد.

## ۲. ملاحظات اخلاقی

این مطالعه با کد اخلاق UOZ-GR-9517-13 به تصویب کمیته اخلاق معاونت پژوهشی دانشگاه زابل رسیده است.

## ۳. مواد و روش‌ها

در این مطالعه، موش‌های نر بالغ نژاد C57BL/6 ۸ تا ۹ هفته‌ای در محدوده وزنی ۱۸ تا ۲۳ گرم از انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. حیوانات به صورت شش تایی در قفس قرار گرفتند و در حیوان خانه با دمای  $23 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و دوره تاریکی-روشنایی ۱۲ ساعته نگهداری شدند. آب و غذا به صورت آزاد در اختیار حیوانات قرار گرفت. رعایت نکات اخلاقی با توجه به موازین کمیته اخلاق دانشگاه و منطبق با منشور اخلاقی هلسینکی در مورد کلیه حیوانات جهت به حداقل رساندن آزار به حیوانات صورت گرفت (۱۰).

در ابتدا غذای حیوان‌ها به اندازه آرد پودر شد تا پودر کوپریزون هنگام مخلوط شدن با غذا توسط حیوان تشخیص داده نشود. جهت قرار دادن غذای پودر شده در قفس حیوانات ظروف مخصوصی خریداری شد که علاوه بر گنجایش کافی، از وزن بالایی برخوردار بوده تا توسط حیوان واژگون نگردد. قفس‌ها به‌منظور سمی نکردن فضای حیوانخانه (به‌خاطر ماهیت غذا به شکل پودر) در فضای جداگانه‌ای در زیر هود

عملکرد مناسب نورون‌ها را فراهم می‌آورند و به کنترل ترکیب شیمیایی مایع اطراف نورون‌ها کمک می‌کنند. جهت ایجاد حمایت فیزیکی برای نورون‌ها، استروسیته‌ها تشکیل ماتریکسی را می‌دهند که نورون‌ها را در محل نگه می‌دارند. استروسیته‌ها برای نورون‌ها از طریق دریافت گلوکز از مویرگ‌ها، شکستن گلوکز به لاکتات (محصول شیمیایی در جریان اولین مرحله از متابولیسم گلوکز) و آزاد کردن لاکتات در مایع خارج سلولی اطراف نورون‌ها غذا تهیه می‌نمایند. دیگر اعمال سلول‌های استروگلیال در مغز شامل سهیم بودن در افزایش فعالیت سیناپسی، بیان رسپتورهای نوروترانسمیتری یونوتروپیک (ionotropic) و متابوتروپیک (metabotropic)، افزایش تعداد و نگهداری سیناپس‌ها و هم‌چنین پاسخ به نوروترانسمیترها و آزاد کردن سریع ترکیباتی است که باعث افزایش تحریک نورون و انتقال سیناپسی می‌شوند. به‌علاوه، در جریان بلوغ سیناپسی، استروسیته‌ها فاکتورهایی آزاد می‌کنند که بر ترکیب دانسیته پس سیناپسی تاثیر دارند.

میکروگلیاها کوچک‌ترین سلول‌های گلیالی هستند و بعضی از آن‌ها به‌عنوان فاگوسیت‌ها، مواد پوسیده CNS را پاک‌سازی می‌کنند و بیشتر به‌عنوان نماینده سیستم ایمنی در مغز عمل می‌نمایند. میکروگلیاها، مغز را از تهاجم میکروارگانسیم‌ها محافظت می‌کنند و ذاتاً مشابه ماکروفاژها در سیستم خونی در نظر گرفته می‌شوند. در مغز طبیعی، میکروگلیاها تقریباً ۲۰ درصد از کل سلول‌های گلیال را تشکیل می‌دهند. در مغز سالم، میکروگلیاها در یک حالت استراحت و راکد قرار دارند. آن‌ها با سطح سلولی وسیع خود به انشعابات سلولی ظریف متعدد چین می‌خورند و بافت‌های پیرامون را بازدید و سرکشی می‌کنند. پاسخ میکروگلیاها به آسیب سلول عصبی از طریق افزایش در تعداد با تقسیم سلولی و مهاجرت به‌طرف سطح سلول عصبی آسیب دیده، تغییر در شکل سلولی و حذف سیناپس‌ها از سطح سلول عصبی آسیب دیده صورت می‌پذیرد (۱۵).

الایژیک اسید یک ترکیب فنلی و آنتی اکسیدانی طبیعی است که اخیراً خواص ضدالتهابی و اثرات مهارکنندگی آن در ایجاد

مرحله بعد، لامها به مدت ۵ دقیقه در  $H_2O_2$  با غلظت ۵ درصد غوطه ور شده تا پراکسیداز داخلی مهار شود. در مرحله بعد، لامها ۵ دقیقه در محلول بافر نمکی فسفات قرار گرفتند و سپس آنتی بادی اولیه موردنظر با غلظت مناسب روی آن ریخته شد و به مدت ۱۲ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. اطلاعات جزئی در مورد این مرحله برای هر مارکر در جدول ۲ آمده است. سپس برای شستشو از دو محلول استفاده گردید. محلول اول که همان بافر شستشو است به مدت ۵ دقیقه با حرکات ملایم لامها در درون محلول و سپس لامها وارد محلول بافر نمکی فسفات شدند و به مدت ۵ دقیقه لامها به آرامی چندین بار در محلول تکان داده شدند. آنتی بادی ثانویه موردنظر را با غلظت مناسب روی لام ریخته و به مدت ۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمودیم. اطلاعات جزئی در مورد این مرحله برای هر مارکر در جدول ۲ آمده است. شستشوی این مرحله دقیقاً مشابه مرحله قبل می‌باشد و اهمیت شستشو بسیار بالاست و مانع ایجاد رنگ زمینه در لامها می‌شود. لامها پس از شستشو با آب مقطر به مدت ۲ دقیقه وارد رنگ DAPI شده، سپس با آب مقطر شستشو داده می‌شوند. در نتیجه هسته سلولها با فلورسانت آبی مشخص می‌گردد. در مرحله آب‌گیری نهایی، هرکدام از لامها جهت فیکس نمودن به ترتیب در الکل ۷۰، الکل ۱۰۰ و زایلین به مدت ۵ دقیقه قرار داده شده، سپس فیکس شده و به کمک میکروسکوپ فلورسنت مطالعه و عکس‌برداری شدند. آنتی‌بادی‌های به کار رفته در آزمایش و غلظت هر کدام در جدول ۱ آمده است. عکس‌های گرفته شده توسط میکروسکوپ فلورسانس توسط نرم‌افزار Image J مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (۱۸).

نگهداری شدند. جهت ایجاد مدل، غذای حاوی کوپریزون ۰/۲ درصد (Sigma، آلمان) به مدت شش هفته به صورت خوراکی به حیوانات داده شد و در دو هفته آخر تزریق داخل صفاقی الایژیک اسید (Sigma، آلمان) در گروه‌های درمانی صورت گرفت. لازم به ذکر است که تزریقات در ساعات معینی هنگام ظهر، انجام گردید. هشت گروه مورد مطالعه عبارت بودند از: گروه‌های مورد آزمایش گروه کنترل: موش‌های سالمی بودند که شش هفته غذای پودر شده معمولی را به همراه تزریق داخل صفاقی حلال الایژیک اسید ( $1-\mu\text{L}/\text{injection}/\text{day}$ ) ۱۰۰ (PBS:DMSO) در دو هفته آخر دریافت نمودند. گروه کنترل+الایژیک اسید: موش‌های سالمی بودند که سه دوز الایژیک اسید شامل ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم در کیلوگرم را در دو هفته آخر دریافت نمودند. گروه کوپریزون (مدل): موش‌هایی بودند که شش هفته غذای پودر شده حاوی کوپریزون را به همراه تزریق داخل صفاقی حلال الایژیک اسید در دو هفته آخر دریافت نمودند. گروه کوپریزون+الایژیک اسید: شامل موش‌های مدلی بودند که سه دوز الایژیک اسید شامل ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم در کیلوگرم را در دو هفته آخر دریافت نمودند.

#### آزمون ایمونوهیستوشیمی

روز انجام آزمون، بافت‌ها از فریزر به دستگاه کرایوسکشن انتقال داده شدند و چند دقیقه در دمای دستگاه (۲۰- درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند و سپس با ضخامت مناسب (۵ تا ۱۰ میکرومتر) برش داده شدند. برش‌ها در محلول بافر نمکی فسفات (Merck، آلمان) غوطه ور گشته و سپس بر روی لام سیلانه چسبانده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت نگهداری گردیدند تا خشک شده و در حین رنگ‌آمیزی از روی لام جدا نشوند. لامها به مدت ۲۴ ساعت در از کلروفورم و اتر (نسبت حجمی ۱ به ۱)، چربی‌زدایی شدند. در

**جدول ۱:** اطلاعات مربوط به آنتی بادی‌های استفاده شده در آزمون ایمونوهیستوشیمی

نام مولکول	شرکت تولید کننده آنتی بادی ثانویه (کونجوگه)/اولیه	غلظت آنتی بادی‌های ثانویه/اولیه
GFAP	Santa Cruz/ Santa Cruz (HRP)	1:300/1:1000
Mac-3	Santa Cruz/ Santa Cruz (HRP)	1:400/1:1000

## آزمون وسترن بلات

اولیه (جدول ۱) رقیق شده در بافر آنتی بادی، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در این مرحله آنتی بادی‌های اولیه مربوط به پروتئین‌های Olig-2، APC، و  $\alpha$ -Tubulin به‌عنوان ژن رفرنس مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). روز بعد آنتی بادی اولیه جمع‌آوری شده و جهت خارج کردن آنتی بادی‌های اضافی، سه بار شستشو با بافر نمکی فسفات انجام گرفت. سپس غشاها به مدت یک ساعت و نیم در معرض غلظت مناسب آنتی بادی ثانویه (جدول ۲) رقیق شده در بافر آنتی بادی، در دمای محیط و روی شیکر قرار گرفتند. پس از سه بار شستشو با بافر نمکی فسفات باندهای پروتئینی منتقل شده به کاغذ توسط پراکسید هیدروژن و DAB قابل مشاهده گردیدند (قهوه‌ای مایل به زرد) و اسکن شدند. دانسیته باندها اندازه‌گیری گردید و توسط نرم‌افزار Image J مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (۱۹).

در پایان هفته ششم، تعداد پنج سر موش به‌صورت تصادفی از هر گروه انتخاب شدند. موش‌ها ابتدا توسط کتامین و زایلازین بی‌هوش و توسط محلول بافر نمکی فسفات پرفیوز شدند. سپس پوست سر برداشته شده و مغز حیوان از استخوان جمجمه درآورده شد و بخش میال کورپوس کالوزوم مغز خارج و جهت انجام آزمایش‌های مولکولی در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بافت‌های جدا شده توسط بافر لیزکننده لیز و هموژن شدند و پس از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد، محلول رویی برای مراحل بعد جدا شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پروتئین‌ها توسط الکتروفورز SDS-PAGE جدا شده و سپس به غشا PVDF منتقل گردیدند. غشاها به مدت نیم ساعت در بافر مسدودکننده قرار داده شده و سپس به‌صورت Overnight در معرض غلظت مناسب آنتی بادی

جدول ۲: اطلاعات مربوط به آنتی بادی‌های استفاده شده در آزمون وسترن بلات

نام مولکول	شرکت تولید کننده آنتی بادی ثانویه (کونجوگه) / اولیه	غلظت آنتی بادی‌های ثانویه / اولیه
APC	Santa Cruz/ Santa Cruz (HRP)	1:1000/1:3000
Olig-2	Santa Cruz/ Santa Cruz (HRP)	1:1000/1:3000
$\alpha$ -Tubulin	Santa Cruz/ Santa Cruz (HRP)	1:1000/1:4000

## آزمون Real-Time PCR

پرایمرهای به‌کار رفته و برنامه‌های تکثیر در جدول ۳ آمده است. بیان‌های اندازه‌گیری شده توسط روش Real-Time PCR مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (۲۰).  
تحلیل آماری جهت انجام محاسبات آماری داده‌ها، از نرم‌افزار Graphpad Prism 6 استفاده شد. آزمون آماری مورد استفاده، آنالیز واریانس یک‌طرفه یا در صورت لزوم آنوای دو طرفه به‌همراه آزمون مقایسه‌های چندگانه یا تست تعقیبی از نوع Bonferroni بود.  $p < 0.05$  به‌عنوان معیار معنی‌دار بودن اختلاف در نظر گرفته شد (۱۰).

کلیه مراحل روی یخ و در زیر هود و در شرایط استریل انجام گرفت. استخراج RNA از بافت‌های مغز توسط محلول Acuzol (Bioneer، کره جنوبی) طبق پروتکل کیت انجام گرفت. با اندازه‌گیری غلظت RNAهای استخراج شده در هر نمونه، حجمی از آن که معادل ۱۰۰۰ نانوگرم RNA است برای سنتز cDNA برداشته شد. جهت سنتز cDNA نیز از کیت اختصاصی استفاده گردید (Thermo Scientific، آلمان). با انتخاب پرایمرهای موردنظر (۱۰، ۱۲، ۲۰-۱۸) واکنش Real-Time PCR در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر توسط دستگاه کوربت ۶۰۰ انجام شد (جدول ۳). توالی

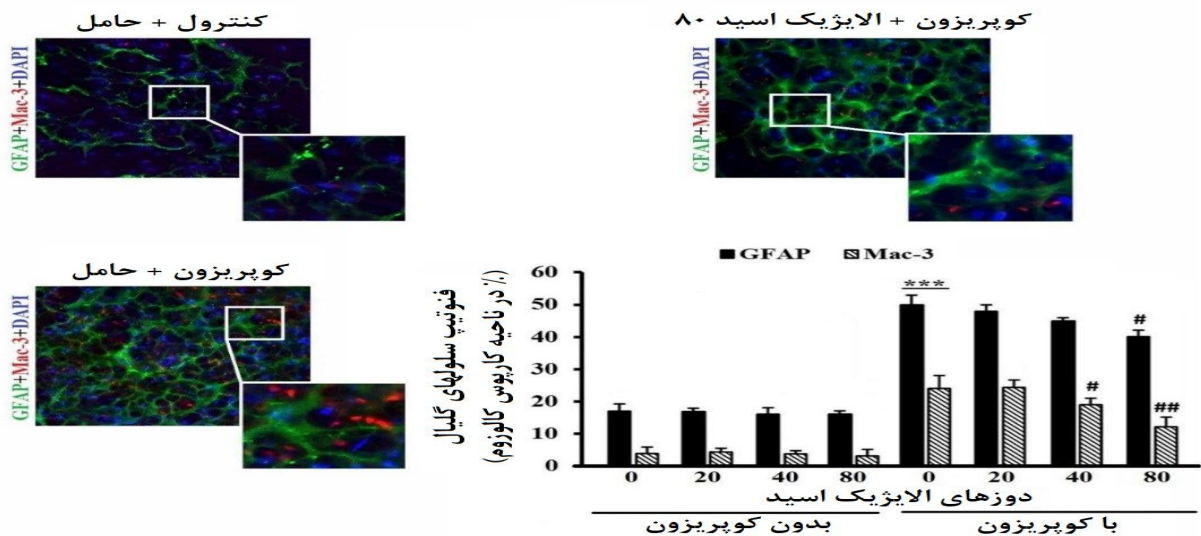
جدول ۳: اطلاعات مربوط به پرایمرها و برنامه آزمون Real-Time PCR

نام مولکول	توالی پرایمرها	برنامه تکثیر
APC	F: 5'-CAAGAAGAGGCAGCAATGGAG-3' R: 5'-CAGGAGGATCGTAGGCACAAG-3'	95°C for 10 min, 95°C for 20 s, 58.5°C for 45 s followed by 40 amplification cycles at 95°C for 30 s.
MOG	F: 5'-CAAGAAGAGGCAGCAATGGAG-3' R: 5'-CAGGAGGATCGTAGGCACAAG-3'	95°C for 10 min, 95°C for 20 s, 58°C for 45 s followed by 40 amplification cycles at 95°C for 30 s.
Olig-2	F: 5'-CAAGAAGAGGCAGCAATGGAG-3' R: 5'-CAGGAGGATCGTAGGCACAAG-3'	95°C for 10 min, 95°C for 20 s, 56°C for 45 s followed by 40 amplification cycles at 95°C for 30 s.
GFAP	F: 5'-CAAGAAGAGGCAGCAATGGAG-3' R: 5'-CAGGAGGATCGTAGGCACAAG-3'	95°C for 10 min, 95°C for 20 s, 56°C for 45 s followed by 40 amplification cycles at 95°C for 30 s.
Mac-3	F: 5'-CAAGAAGAGGCAGCAATGGAG-3' R: 5'-CAGGAGGATCGTAGGCACAAG-3'	95°C for 10 min, 95°C for 20 s, 58°C for 45 s followed by 40 amplification cycles at 95°C for 30 s.
$\beta$ -actin	F: 5'-TGAAGATCAAGATCATTGCTCCTC-3' R: 5'-TCAGTAACAGTCCGCTAGAAG-3'	95°C for 10 min, 95°C for 20 s, 57°C for 45 s followed by 40 amplification cycles at 95°C for 30 s.

## ۴. یافته‌ها

ناحیه مدیال کورپوس کالوزوم گروه‌های مختلف حیوانات در آزمایش ایمونوهیستوشیمی مورد ارزیابی قرار گرفتند و میزان بیان پروتئین Mac-3 که مارکری برای ماکروفاژهای فعال در مغز است (میکروگلیال) در آن ناحیه اندازه‌گیری شد. تفاوت معنی‌داری بین گروه کوپریزون با گروه کنترل و گروه الایژیک اسید با دوز بالا و کوپریزون مشاهده شد (شکل ۱). همچنین تیمار موش‌های سالم با الایژیک اسید تأثیر معناداری بر بیان فاکتورهای موردنظر در ناحیه کورپوس کالوزوم بر اساس نتایج این تست‌ها نداشت.

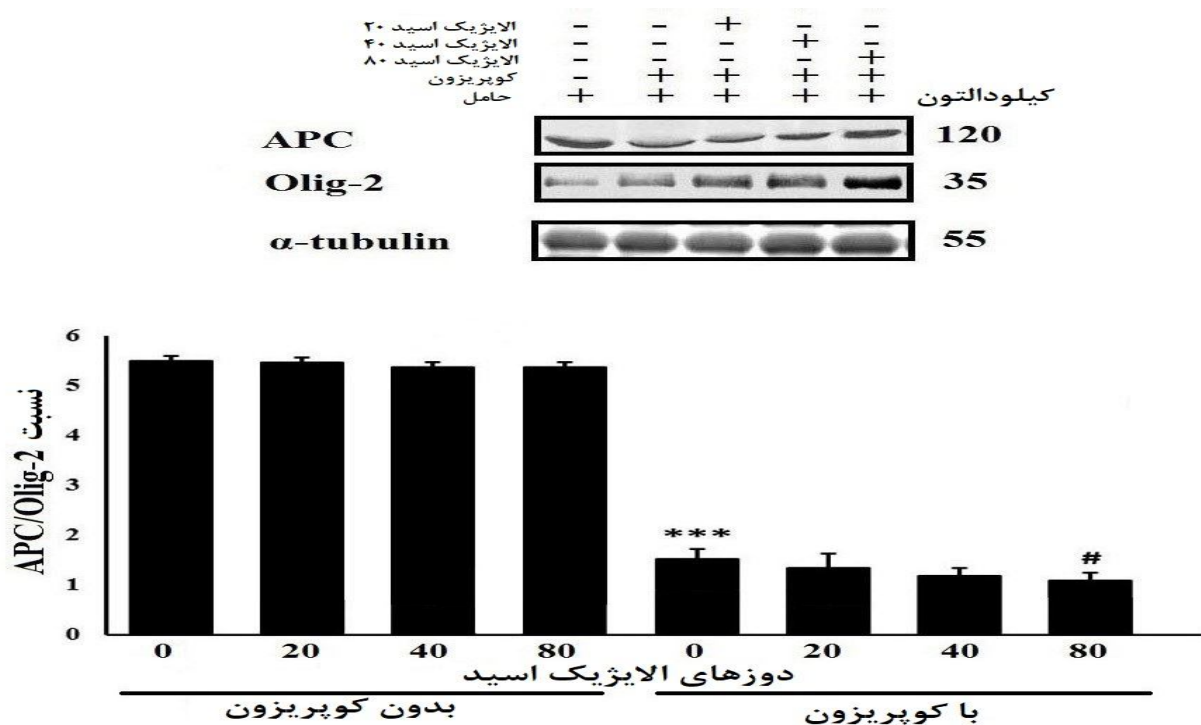
بررسی اثر الایژیک اسید بر جمعیت آستروسیت‌ها و میکروگلیال‌ها ناحیه مدیال کورپوس کالوزوم گروه‌های مختلف حیوانات در آزمایش ایمونوهیستوشیمی مورد ارزیابی قرار گرفتند و میزان بیان پروتئین GFAP که مارکری برای آستروسیت‌های فعال در مغز است در آن ناحیه اندازه‌گیری شد (شکل ۱). تفاوت معنی‌داری بین گروه کوپریزون با گروه کنترل و گروه الایژیک اسید با دوز بالا و کوپریزون مشاهده شد (شکل ۱). همچنین



شکل ۱: بررسی جمعیت آستروسیت‌های فعال (GFAP positive cells) و ماکروفاژهای فعال (Mac-3 positive cells) در ناحیه مدیال کورپوس کالوزوم در گروه‌های کنترل، کوپریزون و الایژیک اسید (دوزهای مختلف) به روش ایمونوهیستوشیمی. تفاوت معنی‌داری بین دوزهای بالای الایژیک اسید و کاهش ماکروفاژهای فعال (سلول‌های میکروگلیال) و آستروسیت‌های فعال در مقایسه با گروه کوپریزون مشاهده شد. تصاویر با مقیاس خطی ۲۰ میکرومتر نشان داده شد و داده‌ها براساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش گردید. علامت (\*) نماد تفاوت با گروه کنترل و علامت (#) نماد تفاوت با گروه کوپریزون است ( $n=5$  و  $p < 0.001$  و  $***p < 0.001$  و  $##p < 0.01$  و  $###p < 0.001$ ).

معنی داری بین گروه کوپریزون با گروه کنترل و گروه الایژیک اسید با دوز بالا و کوپریزون مشاهده شد (شکل ۲). همچنین تیمار موش‌های سالم با الایژیک اسید تاثیر معناداری بر جمعیت الیگوندروسیت‌های بالغ شده و پیش‌ساز در ناحیه کورپوس کالوزوم بر اساس نتایج این تست نداشت.

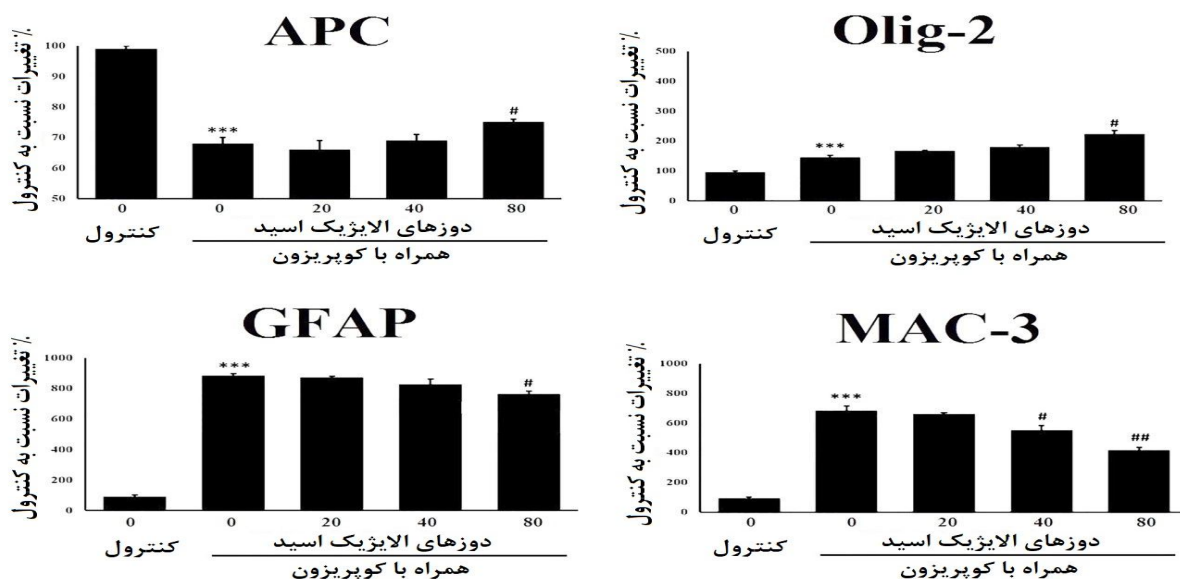
بررسی اثر الایژیک اسید بر جمعیت سلول‌های الیگوندروسیتی جهت بررسی جمعیت الیگوندروسیت‌های بالغ شده (APC) و پیش‌ساز (Olig-2) در ناحیه مدیال کورپوس کالوزوم، حیوانات در گروه‌های مختلف در آزمایش وسترن بلات مورد ارزیابی قرار گرفتند و میزان نسبت پروتئین‌های APC/Olig-2 در آن‌ها اندازه‌گیری شد (شکل ۲). تفاوت



**شکل ۲:** بررسی تنوع الیگوندروسیت‌ها توسط اندازه‌گیری بیان مارکر الیگوندروسیت‌های بالغ (APC) و پیش‌ساز (Olig-2) به روش وسترن بلات در گروه‌های کنترل، کوپریزون و الایژیک اسید (دوزهای مختلف). تفاوت معنی‌داری بین دوز بالای الایژیک اسید (۸۰) و کاهش نسبت APC/Olig-2 در مقایسه با گروه کوپریزون مشاهده شد که بیشتر ناشی از افزایش سلول‌های پیش‌ساز الیگوندروسیتی می‌باشد. داده‌ها بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش گردید. علامت (\*) نماد تفاوت با گروه کنترل و علامت (#) نماد تفاوت با گروه کوپریزون است (n=5 و  $p < 0.001$  و  $p < 0.05$  و  $p < 0.01$ ).

گرفت (شکل ۳) و در برخی موارد تفاوت معنی‌داری بین گروه کوپریزون با گروه کنترل و گروه‌های مختلف الایژیک اسید با گروه کوپریزون مشاهده شد و باعث تایید نتایج قبلی گردید.

بررسی اثر الایژیک اسید بر بیان mRNA مولکول‌های مورد مطالعه میزان بیان mRNA تمامی پروتئین‌های مورد مطالعه جهت تایید نتایج قبلی در ناحیه مدیال کورپوس کالوزوم حیوانات در گروه‌های مختلف توسط آزمون RT-PCR مورد ارزیابی قرار



**شکل ۳:** بررسی میزان بیان mRNA پروتئین‌های مورد مطالعه به روش ریل تایم پی سی ار در گروه‌های کنترل، کوپریزون و الایژیک اسید (دوزهای مختلف). داده‌ها براساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش گردید. علامت (\*) نماد تفاوت با گروه کنترل و علامت (#) نماد تفاوت با گروه کوپریزون است ( $n=5$  و  $p < 0.05$  # و  $p < 0.01$  ##).

یکی از معضلات جامعه امروز، تخصیص درصد بالایی از بودجه خدمات درمانی کشورها به درمان و توانبخشی بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروز است. به‌علاوه، درمان‌های رایج این بیماری بهبود کامل را به‌دنبال نداشته و قطعی نیستند. بنابراین مطالعات همه‌جانبه و دقیق‌تر در زمینه طراحی و بررسی استراتژی‌های درمانی مناسب ضروری است. لازمه دستیابی به روش‌های درمانی جامع و قطعی، شناخت و شناسایی مکانیسم‌های دخیل در روند بیماری است.

مدل کوپریزون به‌طور وسیعی در بررسی اثرات ترکیبات دارویی روی مرگ الیگودندروسیت‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد، با این وجود، دلیل این‌که چرا فقط الیگودندروسیت‌ها نسبت به کوپریزون آسیب پذیر هستند هنوز در دست بررسی است. در حین تغذیه با کوپریزون، رمیلینیشن ایجاد شده پس از سه هفته از لحاظ مولکولی قابل رویت بوده و به بیشترین میزان در انتهای هفته پنجم مصرف آن می‌رسد. این در حالی است که پس از قطع کوپریزون رمیلینیشن خودبه‌خودی در مغز شروع می‌شود. آپوپتوز اولیه الیگودندروسیت‌ها و فعال شدن میکروگلیال-ماکروفاژها دو مشخصه برجسته در آسیب‌شناسی بافتی مدل حیوانی کوپریزون می‌باشند. سایر

## ۵. بحث

مالتیپل اسکلروز (ام اس) یک بیماری خود ایمنی است که در آن، علاوه بر الیگودندروسیت‌ها، اکسون‌ها نیز دچار آسیب می‌شوند. گاه مغز قادر است از طریق فرآیند نورو پلاستیستی برخی از ضایعات را جبران کند. فرآیند رمیلینیشن نیز می‌تواند نقش مهمی در ترمیم بازی کند و می‌تواند یکی از دلایلی باشد که در فازهای اولیه بیماری، علائم به‌طور موقت ناپدید می‌شوند. در طی رمیلینیشن، سیستم عصبی مرکزی به فراخوان سلول‌های بنیادی الیگودندروسیتی پرداخته و آن‌ها را پس از تکثیر و تمایز به مناطق آسیب دیده هدایت می‌کند و در نهایت باعث ساخت صفحات جدید میلین می‌شود که از نظر ضخامت، نازک‌تر از نوع اولیه بوده و تأثیر کمتری در عایق‌بندی اکسون اعمال می‌کند. بنابراین با حمله مجدد زودتر تخریب می‌شوند و به‌همین دلیل در حملات تکراری و تداوم التهاب مزمن، پدیده رمیلینیشن خودبه‌خودی در ترمیم اکسون موثر نخواهد بود. به‌علاوه، نشان داده شده است التهاب ناشی از واکنش سلول‌های ایمنی در شرایط آزمایشگاهی خود می‌تواند موجب مهار تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی در مناطق آسیب دیده شود (۱).



مشاهدات ما نشان دادند دوزهای بالای ایژیک اسید توانایی تنظیم فعالیت سلول‌های گلیال فعال شده توسط کوپریزون را دارند و مخصوصاً غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ایژیک اسید قادر است جمعیت هر دو گروه آستروسیت‌های فعال (آستروگلیوزیس - GFAP cells) و میکروگلیال‌های فعال (میکروگلیوزیس - Mac3 cells) را به‌طور معناداری کاهش دهد (شکل ۱). کنترل هر دو فرآیند القای آسیب شامل آستروگلیوزیس و میکروگلیوزیس همواره به‌عنوان راهی برای کاستن از التهاب مزمن و توسعه تخریب غلاف میلین به‌شمار می‌روند (۲۴).

مطالعات قبلی نشان داده‌اند سلول‌های ایگودندروسیتی پیش‌بالغ با بیان مارکر سلولی APC به آخرین مراحل تمایز رسیده و قادر به تبدیل به سلول‌های بالغ میلین‌ساز می‌باشند. این سلول‌ها با استفاده از فعال نمودن مسیرهای وابسته و مستقل از بتا کاتنین قادر به انتقال پیام‌های تمایزی و بلوغ نهایی می‌باشند (۲۵). بررسی جمعیت سلول‌های پیش‌ساز ایگودندروسیتی (Olig2 cells) مشخص نمود که با افزایش دوز ایژیک اسید جمعیت این سلول‌ها افزایش یافته و حتی در دوز بالای آن (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) رده‌های پایین‌تر با شتاب بیشتری به رده‌های بالاتر میلین‌ساز (APC cells) تبدیل می‌گردند (شکل ۲).

مطالعه انجام شده اولین مطالعه در مورد اثرات حفاظتی ایژیک اسید در مدل کوپریزون می‌باشد و هیچ گزارشی از تحقیقات مشابه در ایران و جهان در دست نیست. اخیراً گزارشات متعددی از اثرات مفید ایژیک اسید در مدل‌های دیگر منتشر شده است. به‌عنوان مثال، همسو با نتایج این پژوهش در سال ۲۰۱۷، لیو و همکارانش نشان دادند ایژیک اسید تکثیر سلول‌های بنیادی نوروینی را از طریق فعال‌سازی مسیر پیام‌رسانی Wnt/ $\beta$ -catenin در مدل حیوانی نارسایی عصبی و هم‌چنین در محیط کشت سلولی حمایت می‌نماید (۲۶). هم‌چنین در سال ۲۰۱۸ بوستو و همکارانش نشان دادند اورولیتین‌ها که متابولیت‌های محلول در پلاسمای ایژیک اسید هستند باعث تحریک سنتز سرامید در سلول‌های گلیوما

سازوکارهای دخیل در این مدل شامل مهار تمایز سلول‌های پیش‌ساز ایگودندروسیت‌ها و ترشح سایتوکاین‌های پیش‌التهابی از میکروگلیال-ماکروفاژهای فعال شده است. هرچند این مدل با مدل خودایمنی ام اس تفاوت دارد، ولی نقش سیستم ایمنی در شکل‌گیری آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو در این مدل نیز به‌طور وسیعی گزارش شده است (۲۱).

در سیستم عصبی مرکزی آسیب باعث می‌شود آستروسیت‌ها هیپرتروفی شوند و مجدداً برای تشکیل زخم گلیالی که سدی را در برابر ترمیم تشکیل می‌دهند سازماندهی شوند و در این ارتباط هم آستروسیت‌ها و هم ایگودندروسیت‌ها فاکتورهایی را بیان می‌کنند که به‌طور بالقوه رشد مجدد آکسون‌ها را متوقف می‌نمایند (۲۲). میکروگلیال‌ها سلول‌های ماکروفاژی مقیم در مغز هستند و حدود ۱۰ تا ۱۵ درصد از سلول‌های بافت مغز را در شرایط طبیعی تشکیل می‌دهند. این سلول‌ها به‌عنوان خط اصلی و ابتدایی دفاع ایمنی فعال در CNS می‌باشند و در نواحی وسیعی از سرتاسر مغز پراکنده شده‌اند (۲۳). برخلاف آستروسیت‌ها که عملکرد حمایتی و ارتباط آن‌ها با نورون‌ها از جنبه‌های مختلف کاملاً مشخص نشده است، عملکرد ایگودندروسیت‌ها نسبتاً آشکار است. با این‌که مسئولیت اصلی این سلول‌ها ساختن میلین و حمایت از آکسون‌ها در سیستم عصبی مرکزی است، اما پیام‌های مولکولی که این فرآیندها را تسهیل یا تعدیل می‌نماید به‌خوبی مشخص نشده است. در طی مراحل اولیه ساخته شدن میلین، ایگودندروسیت‌ها فرآیندهای پیوسته و وسیعی را که شامل تماس با آکسون، احاطه نمودن آکسون و تشکیل غلاف میلین است طی می‌نمایند و این فرآیند وابسته به تعامل بین ایگودندروسیت‌ها، آستروسیت‌ها و نورون‌ها است. بنابراین پیام‌های صادره از آکسون نقش تعیین‌کننده‌ای در زمان تمایز ایگودندروسیت‌ها و فعال شدن فرآیند ساخت میلین دارند. خنثی‌سازی عوامل مهاری و به کارگیری فاکتورها و عواملی که ترمیم را پیش می‌برند شروعی برای حصول نتایج امیدبخش هستند.

آماده گردد و تخریب میلین جای خود را به ترمیم موثر آن دهد.

#### ۷. تقدیر و تشکر

این مطالعه با حمایت مالی مشترک مرکز تحقیقات علوم دارویی دانشگاه علوم پزشکی تهران و دانشگاه زابل انجام گرفته است (گرت شماره 13-9517-GR-UOZ). نویسندگان مراتب قدردانی خود را از تمامی عزیزانی که در انجام این مطالعه مساعدت داشتند اعلام می‌نمایند.

#### ۸. سهم نویسندگان

تمامی نویسندگان معیارهای استاندارد نویسندگی بر اساس پیشنهادات کمیته بین المللی ناشران مجلات پزشکی را دارا بودند.

#### ۹. تضاد منافع

بدین وسیله نویسندگان تصریح می‌نمایند که هیچ‌گونه تضاد منافی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

و الیگوندروگلیوما می‌شوند. هم‌چنین این گروه تحقیقاتی بیان نمودند ترکیبات فوق از طریق سنتز اسفنگولیپیدها باعث حفاظت در برابر تخریب میلین القا شده در مدل حیوانی ام اس (EAE) می‌گردند (۲۷). در مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۸ گزارش گردید استفاده از الایژیک اسید تولید رادیکال‌های آزاد و گونه‌های اکسیژن فعال را به صورت وابسته به دوز کاهش داده و بیان مارکرهای آپوپتوزی و التهابی را در مدل حیوانی سمیت القا شده توسط آرسنیک تعدیل می‌نماید (۲۸). اثرات ضدالتهابی و خنثی‌کنندگی فرآیند استرس اکسیداتیو ناشی از مصرف الایژیک اسید هم‌چنین منجر به التیام و بهبود آسیب‌های شناختی و رفتاری در مدل‌های بیماری‌هایی مانند پارکینسون و آسیب‌های ترومانیک مغزی می‌گردد (۲۹، ۳۰).

#### ۶. نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد الایژیک اسید باعث ایجاد تغییرات مهمی در فرآیند الیگوندروژنزیس و فعالیت سلول‌های آستروسیتی و میگروگلیال می‌گردد که در مجموع این فرآیندها به سمتی سوق داده می‌شوند که از التهاب مزمن مغز کاسته شده، محیط محل عارضه جهت مهاجرت و بلوغ الیگوندروسیت‌ها

## References

1. Sanadgol N, Zahedani SS, Sharifzadeh M, Khalseh R, Barbari GR, Abdollahi M. Recent Updates in Imperative Natural Compounds for Healthy Brain and Nerve Function: A Systematic Review of Implications for Multiple Sclerosis. *Curr Drug Targets*. 2017; 18(13): 1499-1517.
2. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol*. 2005; 23: 683-747.
3. Sahraian MA, Khorramnia S, Ebrahim MM, Moinfar Z, Lotfi J, Pakdaman H. Multiple sclerosis in Iran: a demographic study of 8,000 patients and changes over time. *European neurology*. 2010; 64(6): 331-6.
4. Handel AE, Giovannoni G, Ebers GC, Ramagopalan SV. Environmental factors and their timing in adult-onset multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology*. 2010; 6(3): 156-66.
5. Miller DH, Leary SM. Primary-progressive multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*. 2007; 6(10): 903-12.
6. Lauer K. Environmental risk factors in multiple sclerosis. Expert review of neurotherapeutics. 2010; 10(3): 421-40.
7. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. *Annals of neurology*. 2007; 61(6): 504-13.
8. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis results of an international survey. *Neurology*. 1996; 46(4): 907-11.
9. Tillery EE, Clements JN, Howard Z. What's new in multiple sclerosis? *Ment Health Clin*. 2018; 7(5): 213-220.
10. Sanadgol N, Golab F, Mostafaie A, Mehdizadeh M, Khalseh R, Mahmoudi M, et al. Low, but not high, dose triptolide controls neuroinflammation and improves behavioral deficits in toxic model of multiple sclerosis by dampening of NF- $\kappa$ B activation and acceleration of intrinsic myelin repair. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2018; 342: 86-98.
11. Von Wunster B, Bailey S, Wilkins A, Marks DI, Scolding NJ, Rice CM. Advising patients seeking stem cell interventions for multiple sclerosis. *Pract Neurol*. 2018; 001956.
12. Sanadgol N, Golab F, Tashakkor Z, Taki N, Moradi Kouchi S, Mostafaie A, et al. Neuroprotective effects of ellagic acid on cuprizone-induced acute demyelination through limitation of microgliosis, adjustment of CXCL12/IL-17/IL-11 axis and restriction of mature oligodendrocytes apoptosis, *Pharmaceutical Biology*. 2017; 55:1679-1687.
13. Kettenmann, H, and Verkhratsky A. Neuroglia—living nerve glue. *Fortschr. Neurol. Psychiatr*. 2011; 79: 588-597.
14. Binder DK. Astrocytes: Stars of the Sacred Disease. *Epilepsy Curr*. 2018; 18(3): 172-179.
15. Jha MK, Jo M, Kim JH, Suk K. Microglia-Astrocyte Crosstalk: An Intimate Molecular Conversation. *Neuroscientist*. 2018; 1073858418783959.
16. Derosa G, Maffioli P, Sahebkar A. Ellagic Acid and Its Role in Chronic Diseases. *Adv Exp Med Biol*. 2016; 928: 473-479.
17. Lepka K, Berndt C, Hartung HP, Aktas O. Redox Events As Modulators of Pathology and Therapy of Neuroinflammatory Diseases. *Front Cell Dev Biol*. 2016 ; 23: 4:63.
18. Sanadgol N, Golab F, Mostafaie A, Mehdizadeh M, Abdollahi M, Sharifzadeh M, Ravan H. Ellagic acid ameliorates cuprizone-induced acute CNS inflammation via restriction of microgliosis and down-regulation of CCL2 and CCL3 pro-inflammatory chemokines. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2016; 62(12): 24-30.
19. Sanadgol N, Golab F, Askari H, Moradi F, Ajdary M, Mehdizadeh M. Alpha-lipoic acid mitigates toxic-induced demyelination in the corpus callosum by lessening of oxidative stress and stimulation of polydendrocytes proliferation. *Metab Brain Dis*. 2018; 33(1): 27-37.
20. Ramroodi N, Khani M, Ganjali Z, Javan MR, Sanadgol N, Khalseh R, et al. Prophylactic Effect of BIO-1211 Small-Molecule Antagonist of VLA-4 in the EAE Mouse Model of Multiple Sclerosis. *Immunol Invest*. 2015; 44(7): 694-712.
21. Patel M. Targeting Oxidative Stress in Central Nervous System Disorders. *Trends Pharmacol Sci*. 2016; 37(9): 768-78.
22. Fan TK, Gundimeda U, Mack WJ, Gopalakrishna R. Counteraction of Nogo-A and axonal growth inhibitors by green tea polyphenols and other natural products. *Neural Regen Res*. 2016; 11(4): 545-6.
23. Filiano Anthony J, Gadani Sachin P, Kipnis Jonathan. Interactions of innate and adaptive immunity in brain development and function. *Brain Research*. 2015; 1617: 18-27.

24. Poorebrahim M, Asghari M, Abazari MF, Askari H, Sadeghi S, Taheri-Kafrani A, et al. Immunomodulatory effects of a rationally designed peptide mimetic of human IFN $\beta$  in EAE model of multiple sclerosis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2018; 82: 49-61.
25. Lang J, Maeda Y, Bannerman P, Xu J, Horiuchi M, Pleasure D, Guo F. Adenomatous Polyposis Coli Regulates Oligodendroglial Development. *J Neurosci*. 2013; 33(7): 3113-3130.
26. Liu QS, Li SR, Li K, Li X, Yin X, Pang Z. Ellagic acid improves endogenous neural stem cells proliferation and neurorestoration through Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in vivo and in vitro. *Mol Nutr Food Res*. 2017; 61(3).
27. Busto R, Serna J, Perianes-Cachero A, Quintana-Portillo R, García-Seisdedos D, Canfrán-Duque A, et al. Ellagic acid protects from myelin-associated sphingolipid loss in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biochim Biophys Acta*. 2018; 1863: 958-967.
28. Firdaus F, Faraz Zafeer M, Anis E, Ahmad M, Afzal M. Ellagic acid attenuates arsenic induced neuro-inflammation and mitochondrial dysfunction associated apoptosis. *Toxicol Re*. 2018; 5: 411-417.
29. Farbood Y, Sarkaki A, Dolatshahi M, Mansouri SMT, Khodadadi A. Ellagic Acid Protects the Brain Against 6-Hydroxydopamine Induced Neuroinflammation in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Basic Clin Neurosci*. 2015; 6(2): 83-89.
30. Mashhadizadeh SH, Farbood Y, Dianat M, Khodadadi A, Sarkaki A. Therapeutic effects of ellagic acid on memory, hippocampus electrophysiology deficits, and elevated TNF- $\alpha$  level in brain due to experimental traumatic brain injury. *Iran J Basic Med Sci*. 2017; 20(4): 399-407.

Archive of SID

## ORIGINAL RESEARCH

### Study of the Effects of Ellagic Acid on Population and Activity of Central Nervous System Neuroglia Cells in the Cuprizone-induced Multiple Sclerosis

Nima Sanadgol<sup>1,2\*</sup>, Parisa Maleki<sup>3</sup>

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

2. Pharmaceutical Science Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3. Department of Biology, Faculty of Sciences, Arak University, Arak, Iran.

#### ARTICLE INFORMATION

##### Article history

Received: 01 May 2018

Accepted: 25 July 2018

Published online: 22 December 2018

##### Keywords

Cuprizone

Ellagic acid

Immunohistochemistry

Multiple Sclerosis (MS)

##### \* Corresponding Author:

Nima Sanadgol; Department of Biology,  
Faculty of Sciences, University of Zabol,  
Zabol, Iran.

Fax: +98 54 3123 2187

Email: [n.sanadgol@uoz.ac.ir](mailto:n.sanadgol@uoz.ac.ir)

#### ABSTRACT

**Background and Aim:** Ellagic acid (EA) is a natural antioxidant with phenolic structure. In this study, we evaluate the effects of EA consumption on population and activation of neuroglia cells in the animal model of MS under oxidative stress.

**Materials and Methods:** Mature male mice with age of between 8 to 9 weeks were kept in the standard conditions. For model induction, animals received powder normal diet containing 0.2% Cuprizone (Cup) for six weeks. Mice were divided into eight groups containing control, control receiving three doses of EA (20, 40 and 80 mg/kg), Cup and Cup receiving three doses of EA. Finally, specific glial cell markers in the animal brain tissues were analyzed by molecular methods such as immunohistochemistry (IHC), western blotting (WB) and Real Time-PCR (RT-PCR).

**Findings:** IHC and WB analysis have shown that only high concentration of EA is able to reduce protein expression of GFAP (activated astrocytes marker), Mac-3 (activated microglial marker), increase protein expression of Olig-2 (oligodendrocytes precursor marker) and ultimately significant reduction on APC (mature oligodendrocytes marker)/Olig-2 ratio in comparison with Cup group. In addition, RT-PCR evaluation indicated that changes in the mRNA expression of target markers were consistent with observed changes in their protein expression and therefore, IHC and WB results were confirmed.

**Conclusion:** Consumption of 80 mg/kg of EA effectively decreased activation of astrocytes and microglial and so appropriates environment for migration of oligodendrocyte precursor cells to the lesion area and shifting from damage course into the repair progressions.

© Copyright (2018) Arak University of Medical Sciences

##### Cite this article as:

Sanadgol N., Maleki P. Study of the Effects of Ellagic Acid on Population and Activity of Central Nervous System Neuroglia Cells in the Cuprizone-induced Multiple Sclerosis. J Arak Uni Med Sci. 2018; 21(6): 34-46.