

مطالعه هیستولوژیک و الکتروفیزیولوژیک دمیلیناسیون موضعی القا شده با لیزولستین در کیاسمای بینایی موش

فرشته پورعبدلحسین^۱، صباح مظفری^۱، محمد جوان^{۱*}، سید جواد میرنجفی زاده^۱، ابوالحسن احمدیانی^۲

۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲. مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

پذیرش: ۱ شهریور ۸۹

دریافت: ۱۸ اردیبهشت ۸۹

چکیده

مقدمه: دمیلیناسیون یک علت عمده ناتوانی نورولوژیکی در جمعیت انسانی و محصول نهایی شمار زیادی از پروسه های پاتولوژیکی - شایعترین آنها MS - می باشد. دستگاه بینایی در بیش از ۷۰ درصد افراد مبتلا به MS درگیر می شود. تاکنون تلاشهای زیادی در ارائه مدلی مناسب از دمیلیناسیون در دستگاه بینایی صورت گرفته است. این مقاله علاوه بر مطالعه روند تخریب و ترمیم درونزاد میلین، تکنیکی بهینه شده از ایجاد دمیلیناسیون، بدون تخریب غیر هدف سایر ساختارهای مغزی ارائه می دهد.

روش ها: کیاسما و اعصاب بینایی موش C57/BLJ6 با استفاده از تزریق مستقیم گلیوتوکسن لیزولستین در کیاسما بدون انتشار به نواحی دیگر مغزی، دمیلینه شد. بررسی تغییرات عملکردی و ساختاری این مدل با استفاده از ارزیابی الکتروفیزیولوژیک پتانسیل برانگیخته بینایی و رنگ آمیزی اختصاصی میلین توسط Luxol fast blue انجام شد.

یافته ها: بررسی بافت شناسی با رنگ آمیزی اختصاصی میلین نشان داد که بیشترین میزان دمیلیناسیون در روز ۷ پس از آسیب صورت گرفته و ۱۴ روز پس از آسیب، ترمیم نسبی اما معنی داری رخ می دهد. مطالعات بافت شناسی با بررسی عملکردی توسط ثبت پتانسیل برانگیخته بینایی تایید گردید.

نتیجه گیری: نتایج نشانگر ترمیم درونزاد و قابل توجه میلین در کیاسمای بینایی موش است. این مدل همچنین قادر است در یافتن منابع جدید سلولهای میلینه کننده در مغز بزرگسالان و دستکاری های بعدی آنها ابزاری مناسب را فراهم آورد.

واژه های کلیدی: لیزولستین، دمیلیناسیون، ترمیم میلین، کیاسمای بینایی، پتانسیل برانگیخته بینایی (VEP)، موش

مقدمه

(MS) می گردد [۴۸]. MS شایعترین بیماری دمیلینه کننده اکتسابی در انسان و یکی از ناتوان کننده ترین بیماریها در ابتدای بزرگسالی جوان (۵۰-۱۵) می باشد [۵۶]. این بیماری با التهاب مزمن و تخریب انتخابی میلین در سیستم عصبی مرکزی شناخته می شود [۴۸]. از لحاظ بافت شناسی، مشخصه برجسته MS ایجاد پلاکهای متعدد در CNS است [۵۴]. این پلاکها عمدتاً در ماده سفید ایجاد می شوند و بار آسیب بطور عمده متوجه نخاع، عصب بینایی، کیاسما و ساقه مغز می باشد.

میلیناسیون اکسونها در سیستم عصبی مرکزی مهره داران جهت هدایت پالسهای جهشی مورد نیاز است و دمیلیناسیون سبب ایجاد بیماریهای شدیدی نظیر مولتیپل اسکلروزیس

mjavan@modares.ac.ir
www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:
وبگاه مجله:

قابل شناسایی می باشد [۵۸] اما مطالعات تجربی رفتاری [۵۸] و الکتروفیزیولوژیک [۶۸] نشان داده اند که این رمیلیناسیون قادر به بازگرداندن هدایت جهشی و عملکرد اکسونی می باشد و ارتقاء رمیلیناسیون خود یک وسیله بالقوه موثر در ممانعت از فقدان اکسونها و در نتیجه پیشگیری از فاز ناتوان کننده بعدی می باشد [۶۷]. در راستای راهبرد ارتقا رمیلیناسیون درونزاد، شناسایی منبع سلولهای بنیادی عصبی درونزاد در CNS بالغین با ظرفیت بالای تکثیر، مهاجرت و تمایز به الیگودندروسیت‌های مولد میلین [۱۸، ۴۴، ۶۷] به توسعه استراتژی‌های جدید برای ترمیم کمک شایانی نموده است. شواهدی مبنی بر مشارکت سلولهای بنیادی درونزاد در فرایند بازسازی میلین گزارش شده است [۴۴، ۴۵، ۵۵]. این سلولها در اپاندیمیای طناب نخاعی، Subventricular Zone (SVZ) بطنهای جانبی و سوم و نیز در هیلوس هیپوکمپ قرار دارند [۵۴، ۶۲، ۶۵]. جهت مطالعه فرضیات مختلف در رابطه با مکانیسمهای ترمیمی در MS از مدل‌های حیوانی استفاده می شود. برخی مدلها مخصوصاً برای فهم بیولوژی سلولی و مولکولی دمیلیناسیون و رمیلیناسیون مورد استفاده اند، مانند مدل موضعی کوچک که جداسازی مشخص و مناسب مکانیسم های خاص بیماری را ممکن می سازند و بر پایه تزریق مستقیم گلیوتوکسین به داخل ماده سفید جهت از بین بردن گلیاهای میلین ساز ایجاد می شوند. از طرفی، دمیلیناسیونهای القا شده با توکسین از رایج ترین مدلها جهت بررسی ظرفیت ترمیمی مغز در MS می باشند [۱۵، ۴۱، ۴۴، ۴۵، ۵۸]. تزریق توکسین منجر به یک زخم آسیبی کوچک در مغز می شود و بنابراین با یک شکست نسبی در سد خونی مغزی و به خدمت گیری سلولهای التهابی در موضع، یک مدل مناسب ایجاد می گردد [۵۸]. لیزولسیتسین (آنالوگ لیزو فسفاتیدیل کولین) (LPC) یک دترجنت است که با اثر اختصاصی بر سلولهای میلینه کننده، سبب حل کردن لیبیدها می شود [۴۲، ۴۸] اما در دوزهای معین سبب القا دژنراسیون والرین و قطع اکسونی نمی گردد [۶۳].

تا کنون نواحی مختلفی از سیستم عصبی مرکزی نظیر طناب نخاعی [۲۷، ۳۰، ۵۷]، کورپوس کالوزوم [۴۵، ۶۱] و همچنین عصب بینایی [۶۲] با استفاده از این گلیوتوکسین دمیلمینه شده اند. در حالیکه بدلیل اهمیت ویژه کیاسما و عصب بینایی در بیماری MS و سایر نوروپاتیهای بینایی، تلاشهای

تاکنون داروی کاملی برای درمان MS وجود ندارد [۶۸]، شاید به دلیل این حقیقت که اتیولوژی دقیق بیماری هنوز ناشناخته است [۶۲]. فقدان میلین یک واحد بین گرهی جهت بلوک هدایتی کافی است و اگر تعداد کافی از اکسونها به این طریق متأثر شوند علائم شدید بروز می کنند [۵۲]. علائم و نشانه های MS، بسته به اینکه پلاکها کجا تشکیل شوند، بسیار متنوع است. مهمترین علائم این بیماری عبارتند از: اختلالات حسی و حرکتی، فلج، خستگی، نقایص شناختی و اختلالات بینایی [۶۳]. دستگاه بینایی، مخصوصاً عصب و کیاسمای بینایی، در ۷۰٪ بیماران MS تحت تاثیر قرار می گیرد [۲۷]. نوریت بینایی پیشرفت سریع نقص در دید است که معمولاً با درد و افزایش نشانه ها طی ۳-۴ هفته همراه است و سپس طی ۲-۳ ماه برگشت دید در بیشتر از ۹۰٪ بیماران رخ می دهد [۶۲]. تصویر برداری به روش MRI، لیژنهایی را در عصب و کیاسمای بینایی اغلب بیماران MS نشان می دهد، حضور این لیژنها معمولاً از اولین نشانه هایی است که می تواند حتی قبل از اینکه MS تشخیص داده شود در این ناحیه مشاهده شود [۶۲].

در MS بطور معمول دوره های راجعه نقص دید و بهبودی رخ می دهد، اما باید دانست که سرانجام ظرفیت اعصاب بینایی برای رمیلیناسیون به اتمام می رسد و یک نقص دید ثابت حاصل می گردد. پاسخ پتانسیل برانگیخته بینایی (VEP)، مخصوصاً در افرادی که مستعد MS بوده و تاخیر در پاسخهای برانگیخته دارند تست ارزیابی کننده حساس و مهمی است [۲۷]. الگوی VEP در بسیاری از ناهنجاری های عصب بینایی مثل دمیلیناسیون آن، دچار اختلال است. بطوری که از ثبت VEP، برای تشخیص ناهنجاری دمیلیناسیون عصب بینایی در بیماران MS و حتی در مواردی در تشخیص بیماری MS، استفاده گسترده می شود [۴۴].

در مقیاس های مورفولوژیک، رمیلیناسیون در بسیاری از مدل‌های حیوانی و نیز در سیستم عصبی انسان به خوبی نشان داده شده است [۴۵]. در واقع CNS بالغین ظرفیت میلین سازی مجدد در پاسخ به یک رویداد دمیلمینه کننده را دارد، اما باید دانست که اگرچه میلین جدید تشکیل شده معمولاً فاقد تناسب طبیعی بین ضخامت میلین و طول بین گرهی با قطر آکسون است و به سادگی توسط غلاف میلین کوتاه و نازک

سالین تزریق می شد. LPC یا سالین با سرعت یک میکرولیتر در دقیقه با استفاده از پمپ (Steolting, USA) تزریق شد. جهت اطمینان از فراهم نمودن زمان لازم برای انتشار LPC، سوزن تزریق به مدت ۵ دقیقه در محل تزریق نگه داشته می شد. مطالعه با تزریق رنگ کوماسی بلو ۲ درصد در کیاسمای بینایی، جهت یافتن موقعیت دقیق تزریق متناسب با مشخصات اطلس و همچنین تخمین تقریبی میزان انتشار رنگ در محل تزریق انجام شد.

برای تهیه نمونه های بافت شناسی، موش ها در گروه های آزمایشی مختلف در روزهای مورد نظر (۳، ۷ و ۱۴ پس از تزریق) با تزریق داخل صفاقی دوزهای بالای کتامین و زایلازین بطور عمیقی بیهوش شدند و عمل پرفیوژن از طریق بطن چپ قلب انجام شد. در ابتدا ۲۵ ml 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 ml محلول پارافرمالدهید ۴ درصد در محلول PBS ۰/۱ مولار با pH: ۷/۴ به منظور تثبیت اولیه بافت از طریق بطن چپ وارد دستگاه گردش خون حیوان می شد و سپس مغز حیوان از مجمه خارج می گردید. برای بهتر فیکس شدن، بافت در محلول پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت طول یک شب در دمای ۴°C قرار داده شد. سپس بافت مغز در فرایند پردازش بافتی قرار گرفت. پس از آب گیری با سری الکل های ۵۰ تا ۱۰۰ درصد هر کدام یک ساعت و شفاف سازی با زایلول (۲ بار ۴۵ دقیقه)، نمونه ها بین ۳-۶ ساعت در پارافین با دمای ۶۰°C انکوبه شده و در انتها بلوک های پارافینی از مغز تهیه و جهت برش گیری آماده گردید. برش های کرونال به صورت سریال و به ضخامت ۶ میکرون از ناحیه کیاسما و اعصاب بینایی تهیه و روی لام هایی که از قبل با چسب پلی لایزین آغشته شده بود، قرار داده شد.

رنگ آمیزی دوگانه اختصاصی میلین توسط لوگول فست بلو (LFB) و کرزیل فست ویوله (CFV) ۲۱ برش کرونال تهیه شده از کیاسمای هر حیوان جهت رنگ آمیزی انتخاب شد. برای شفاف سازی و حذف پارافین به مدت ۱۰ دقیقه، سه بار در محلول زایلول قرار گرفت و سپس مرحله آب دهی بافتی که شامل عبور از الکل مطلق و ۹۵ درصد به مدت ۵ دقیقه بود و سپس نمونه ها در محلول از قبل آماده شده LFB ۰/۱ درصد

گسترده ای جهت القا دمیلیناسیون در دستگاه بینایی ارائه شده اند [۶۱، ۶۲، ۲۷]، روشی که با آن بتوان بطور همزمان کیاسما و اعصاب بینایی را بدون آسیب رساندن به ساختارهای ناخواسته دیگری از کف مغز دمیلینه نمود تا کنون گزارش نشده است. در اینجا با پوششدهی نقاط ضعف مدلهای ارائه شده قادر خواهد بود که بطور قابل اعتماد و با تکرارپذیری مناسب، نه تنها برای ارزیابی استراتژیها جهت ارتقا رمیلیناسیون به کار رود، بلکه همچنین مدلی مناسب برای بررسی جنبه های ساختاری و عملکردی دمیلیناسیون و رمیلیناسیون با استفاده از آزمونهای الکتروفیزیولوژیک حساس و عینی، از جمله VEP در عصب و کیاسمای بینایی باشد. همچنین به لحاظ موقعیت آناتومیکی در مغز، این مدل می تواند به منظور یافتن منابع جدید سلولهای میلین ساز و دستکاری های فارماکولوژیکی-فیزیکی بعدی آنها مورد استفاده قرار گیرد

مواد و روشها

در این تحقیق از موش های نر نژاد C57/BLJ6 در محدوده وزنی ۳۰-۲۵ گرم (خریداری شده از موسسه پاستور، کرج) استفاده شد. حیوانات در شرایط تاریکی/روشنایی ۱۲ ساعته با دمای کنترل شده (۲۲±۲°C) و بدون محدودیت دسترسی به آب و غذا نگه داری شدند. کلیه آزمایشات روی حیوانات با رعایت اصول اخلاقی و ثبت شده بین المللی کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام شد.

حیوانات به صورت عمیق با تزریق داخل صفاقی کتامین (۷۰ mg/kg) و زایلازین (۱۰ mg/kg) که در محلول استریل سالین ۰/۹ درصد رقیق شدند، بیهوش می شدند. دمیلیناسیون با تزریق محلول ۱ درصد LPC (سیگما، USA) در محلول استریل سالین ۰/۹ درصد با حجم ۱ میکرولیتر در کیاسمای بینایی القا می شد [۴۵]. موش ها با موقعیت سر کامل صاف در دستگاه استریوتاکس (Steolting, USA) قرار می گرفتند و ۱ میکرولیتر از محلول ۱ درصد LPC با سرنگ همیلتون ۱۰ µl به کیاسمای بینایی تزریق می شد. موقعیت کیاسما با استفاده از اطلس موش: ۳/۹ mm جلوی لامبدا با موقعیت جانبی صفر نسبت به لامبدا و با عمق ۵/۷۵ mm از دورا بود [۵۲]. در حیوانات گروه کنترل با همان مشخصات اطلس و حجم یکسان

که توسط دستگاه مولد تحریک (SMP-3100, Nihon Kohden) ۳۰۰ بار با فرکانس ۱ Hz تولید می شد با زاویه تابش 45° به هر دو چشم حیوان تابیده می شد. شدت نور به طور تقریبی ۴۰ lx بود. پاسخ های ده هزار برابر تقویت شده، با فیلتر بالا و پایین ۳۰ و ۰/۰۸ هرتز به ترتیب با آمپلی فایر بیوفیزیکی تنظیم می شد (AVB-10, Nihon Kohden). امواج تقویت شده سپس میانگیری می شد (DAT-1100, Nihon Kohden) و توسط نرم افزار Biochart آنالیز می شد. در هر ثبت ما، تاخیر بین محرک نوری و اولین موج مثبت و یا منفی را اندازه گیری می کردیم. (P-Latency).

برای بررسی عملکرد میلیناسیون (دمیلیناسیون و رمیلیناسیون) در حیوان زنده با استفاده از ثبت الکتروفیزیولوژیکی VEP ۱۲ گروه آزمایشی وجود داشت (در هر گروه $n \geq 6$ می باشد). ۳ گروه اول (کنترل)، حیواناتی بودند که ۱ میکرولیتر سالین به کیاسما و ۵ میکرولیتر سالین به صورت داخل بطنی دریافت می کردند و در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ پس از تزریق ثبت گرفته می شد. ۳ گروه بعدی حیواناتی که ۱ میکرولیتر لیزولستین ۱٪ در کیاسمای آنها تزریق می شد و در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ پس از تزریق ثبت گرفته می شد و در نهایت ۳ گروه ششم که در حیوانات این گروه سوزن تزریق را تا کیاسما برده ولی تزریقی صورت نمی گرفت و در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ پس از آن ثبت گرفته می شد که این گروه برای بررسی اثر آسیب ناشی از سوزن انجام شد. ۳ گروه نیز حیوانات سالم در همان روزها برای مقایسه با گروه ششم ثبت گرفته شد.

در بررسی میزان میلیناسیون (دمیلیناسیون و رمیلیناسیون) با استفاده از مطالعات بافت شناسی (رنگ آمیزی Luxol Fast Blue)، ۴ گروه آزمایشی استفاده شد (در هر گروه $n \geq 3$ می باشد). گروه اول (کنترل) حیواناتی بودند که ۱ میکرولیتر سالین به کیاسما و ۵ میکرولیتر سالین به صورت داخل بطنی دریافت می کردند و در روز ۷ پس از تزریق، نمونه بافتی جهت رنگ آمیزی میلین خارج می شد. ۳ گروه بعدی حیواناتی که ۱ میکرولیتر لیزولستین ۱٪ در کیاسمای آنها تزریق می شد و در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ پس از تزریق، نمونه بافتی جهت رنگ آمیزی میلین خارج می شد.

تفاوت میان گروهها در آزمایشات بافت شناسی و ثبت VEP توسط آنالیز واریانس یکطرفه و سپس Post hoc

(British drug house, UK) حل شده در الکل ۹۵ درصد به مدت ۳ ساعت در حمام بافتی با دمای 60°C قرار گرفتند و پس از آن در الکل ۹۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه و برای کنتراست مناسب آنها را در حد ۲۰ ثانیه در لیتیوم بی کربنات ۰/۰۵ درصد قرار داده و به دنبال آن چند بار در الکل ۷۰ درصد قرار می دهیم [۳۵]. بعد از شستشو با آب مقطر آنها در CFV (Merck, Germany) ۰/۱ درصد به مدت ۳ دقیقه گذاشته و بعد نمونه ها را با آب مقطر می شویم و دوبار در الکل ۹۵ درصد و ۱۰۰ درصد آب گیری کرده و و پس از شفاف سازی نهایی بافتی در زایلول دو بار ۱۰ دقیقه قرار داده و در نهایت با استفاده از چسب انتالن (Merck, Germany) لامل روی لام نمونه ها گذاشته و می گذاریم تا خشک شوند.

تصاویر از ۲۱ نقطه مشخص از برش های سریال از کیاسمای بینایی (در محدوده تقریبی ۱۲۰ میکرون جلوی برگما تا ۹۸۰ میکرون پشت برگما) توسط میکروسکوپ نوری Olympus تهیه و آنالیز شد. وسعت دمیلیناسیون با استفاده از نرم افزار NIH Image J اندازه گیری و کمی شد و در هر تصویر نسبت وسعت ناحیه دمیلینه به کل سطح ناحیه مورد نظر (کیاسما) اندازه گیری گردید [۳۵، ۵۵]. داده های به دست آمده از هر حیوان میانگینی از کل ۲۱ نقطه به دست آمده بود و در هر گروه آزمایشی حداقل ۳ حیوان تکرار شد ($n=3$).

VEP یک پتانسیل برانگیخته الکتروفیزیولوژیکی است که می تواند با استفاده از میانگین گیری سیگنال های حاصل از فعالیت الکتروانسفالوگرافیک ثبت شده از مجموعه به دست می آید. VEP می تواند اطلاعات مهم تشخیصی در مورد یکپارچگی عملکرد بینایی تهیه کند. مراحل جراحی و الکتروود گذاری مشابه روش هایی است که قبلا توصیف شده است [۵۹، ۶۴]. بطور خلاصه، حیوانات طبق روش بالا بیهوش و سر حیوان در دستگاه استریوتاکس ثابت می شود. برای تسهیل ثبت VEP یک الکتروود تک قطبی از جنس فولاد ضد زنگ در ناحیه پس سری مجموعه کاشته می شد (A: 0, L: $\pm 3\text{mm}$) نسبت به لامبدا [۵۲]. در انتهای قدامی مجموعه هم الکتروود رفرنس گذاشته می شد و الکتروود ها توسط سیمان دندان پزشکی در مجموعه ثابت می شدند. برای ثبت ابتدا حیوان بی حرکت شده را در یک جعبه تاریک به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده تا با تاریکی سازش پیدا کند و سپس محرک نوری (فلش)

اجزای P1-N1 دارای ثبات بیشتر و جهت اندازه گیری هدایت موج در سیستم بینایی قابل اعتماد است که در این جا ما تاخیر موج P1 به عنوان شاخص هدایت سیستم بینایی در نظر گرفتیم. در این مطالعه تغییراتی در تاخیر همه اجزای موج VEP مشاهده شد ولی به دلیل ثبات بیشتر موج P1، ما تاخیر موج P1 را به عنوان شاخص هدایت اندازه گیری کردیم. در مقایسه گروه سالین با گروه های LPC، افزایش تاخیر موج P در همه روز های ۳، ۷ و ۱۴ مشاهده شد. بیشترین افزایش در زمان تاخیر موج P در روز ۷ پس از تزریق بود و تغییرات آن نسبت به گروه سالین معنی دار بود ($P < 0.001$). در روز ۳ هم افزایش تاخیر را داشتیم ($P < 0.01$)، اما در روز ۱۴ پس از تزریق در گروه LPC، میزان تاخیر موج P نسبت به روز ۷ که بیشترین تاخیر را داشت کاهش معنی داری نشان داد ($P < 0.05$). جهت بررسی اثر جراحی بر روی ثبت VEP، ثبت در روزهای مختلف گروه های شم و سالم انجام شد که تغییرات معنی داری بین این گروه ها مشاهده نشد. داده ها در شکل ۳ نمایش داده شده است.

بحث

در بخش مقدمه مزایای توسعه یک تکنیک برای القا دمیپلیناسیون در قسمتی از سیستم عصبی مرکزی که بتواند به لحاظ عملکردی به راحتی مورد ارزیابی قرار بگیرد مورد توجه قرار گرفت. علاوه بر ارزیابیهای هیستولوژیک روتین، به منظور عملی نمودن یک چنین ارزیابی هایی، دستگاه بینایی جایگاه مناسبی است. علاوه بر اینها، تستهای رفتاری نظیر ارزیابیهای دید "ماز"، قادرند با بکارگیری این مدل متدهای بیشتری برای تحقیق فراهم نمایند [۲۷]. تا کنون تلاشهای گسترده ای به منظور تکوین یک چنین مدلهایی در دستگاه بینایی حیوانات صورت گرفته است. در این مطالعه جهت آسیب به غلافهای میلین و سلولهای میلینه کننده عصب و کیاسمای بینایی از LPC [۶۶] استفاده شد. به منظور تعیین جایگاه مورد نظر در دستگاه بینایی و تخمین میزان انتشار محلول تزریقی از رنگ کوماسی بلو ۲ درصد استفاده و به این طریق مشاهده شد که انتشار رنگ محدود به جایگاه مورد نظر در کیاسما و بخشهای ابتدایی هر دو عصب بینایی بوده و به سایر

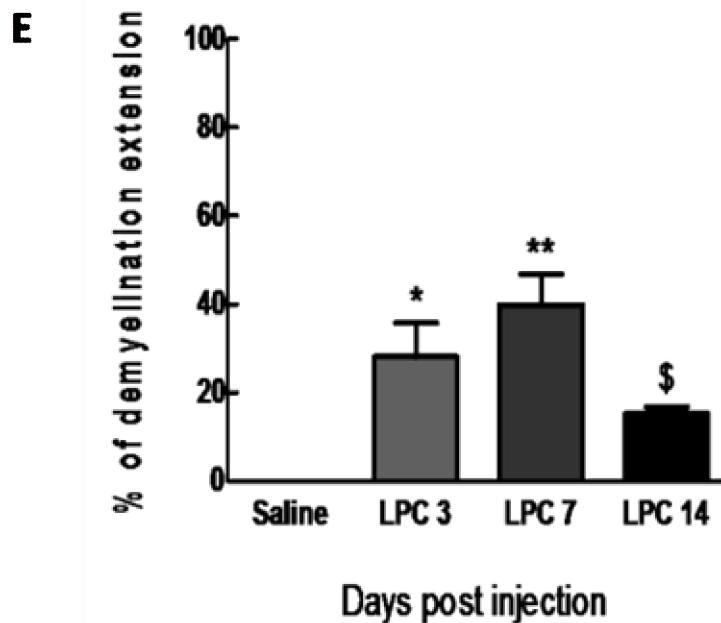
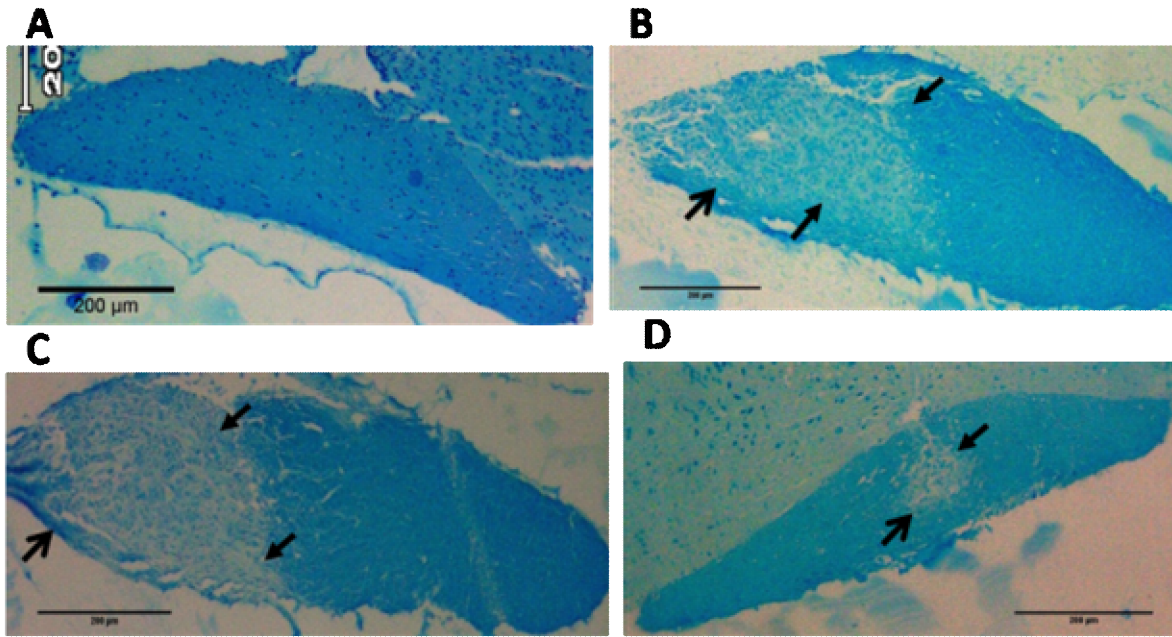
Tukey HSD توسط نرم افزار پرسم مورد بررسی قرار گرفتند. داده ها بصورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ ارائه شده و $P < 0.05$ از لحاظ آماری معنی دار تلقی شد.

یافته ها

اطلس استریوتاکسیک مغز موش نشان می دهد که سطح برگما (۰ میکرومتر) در مقطع کروئال معادل جایگاه دوشاخه شدن اعصاب بینایی از کیاسما است [۵۲]. مطالعه با رنگ کوماسی بلو جهت تایید محل تزریق کیاسما نشان داد که، تزریق به کیاسما بدون انتشار به ساختارهای اطراف و مایع مغزی نخاعی دور آن صورت پذیرفته است. نتایج به دست آمده از رنگ آمیزی میلین مقاطع سریال مغز نشان داده است که LPC قادر بوده است در ناحیه ای به طول $1200 - 800 \mu\text{m}$ منتشر شود. همچنین محل تزریق طبق اطلس مغز موش حدود $3/9 \text{ mm}$ جلوی لامبدا و با عمق $5/75 \text{ mm}$ نسبت به دورا بود [۵۲]. ۲۱ مقطع کروئال با فواصل برابر برای آنالیز کمی دمیپلیناسیون القا شده با LPC و ترمیم حاصل از آن انتخاب شد. وسعت دمیپلیناسیون در روزهای ۱۴ و ۷، ۳ پس از تزریق LPC بررسی و آنالیز شد. (تعداد حیوانات در هر گروه حداقل ۳ بود) دمیپلیناسیون در کیاسما و عصب بینایی گروهی که سالین دریافت کرده بودند مشاهده نشد (شکل ۱- A).

آنالیز مقاطع مغزی برای تعیین وسعت دمیپلیناسیون در گروه LPC نشان داد که آسیب به صورت پیشرونده ای در روزهای ۳ و ۷ پس از تزریق افزایش می یابد ولی حداکثر وسعت دمیپلیناسیون در روز ۷ پس از تزریق مشاهده شد (شکل ۱- C). در روز ۱۴ پس از تزریق وسعت دمیپلیناسیون بطو قابل توجه ای کاهش یافت و این پدیده در شکل ۱، بخش D قابل مشاهده است.

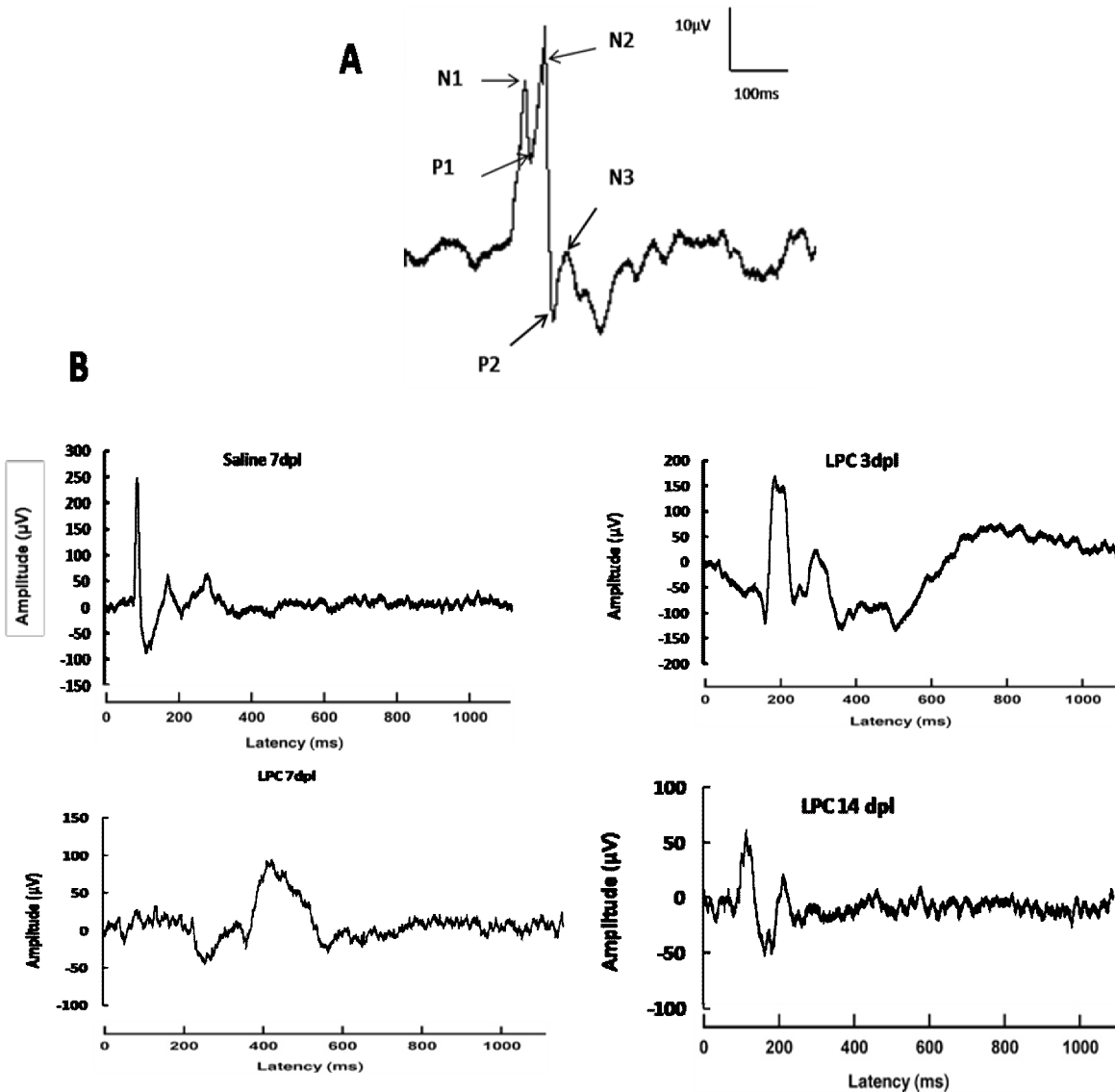
ثبت VEP می تواند جهت بررسی عملکرد مسیره های بینایی شامل: اعصاب و کیاسمای بینایی وحتى قشر بینایی مورد استفاده قرار می گیرد. در این مطالعه برای ارزیابی عملکردی میزان دمیپلیناسیون و رمیپلیناسیون VEP ثبت و آنالیز شد. شکل ۲- A نمونه ای از موج ثبت شده در حیوانات گروه کنترل را با اجزای آن نشان می دهد. اجزای امواج VEP ثبت شده از قشر پس سری موش شامل: P1-N1, P2-N2, P3-N3 می باشد،



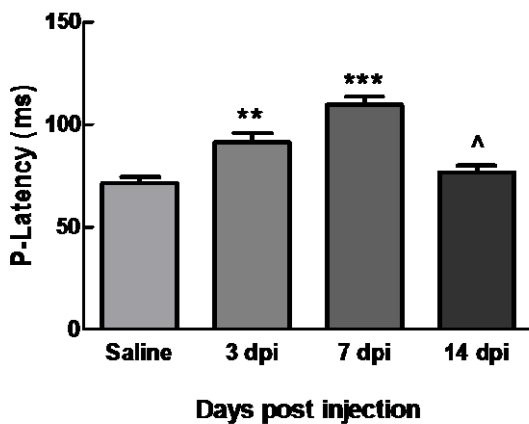
شکل ۱- رنگ آمیزی اختصاصی میلین (لوگزول فست بلو (LFB) در مقاطع سریال تهیه شده از مغز حیوانات در روزهای مختلف پس از تزریق لیزولستین. A- مقطع کیاسما در حیوانی که سالین دریافت کرده، همین طور که واضح است دمیلائسیون در گروهی که سالین تزریق شده دیده نمی شود. B- مقطع کیاسما در گروه LPC در زمان ۳ روز پس از تزریق که دمیلائسیون واضحی دیده می شود. C- مقطع کیاسما در گروه LPC در زمان ۷ روز پس از تزریق، که حداکثر دمیلائسیون در ای روز اتفاق افتاد. D- مقطع کیاسما در گروه LPC در زمان ۱۴ روز پس از تزریق، که کاهش وسعت دمیلائسیون قابل ملاحظه است. (Scale bar در همه عکس ها ۲۰۰ میکرومتر است). E- این گراف مقایسه بین گروه های مختلف را نشان می دهد. تعداد حیوانات در هر گروه حداقل ۳ بود. آنالیز آماری با روش آنالیز واریانس یک طرفه با تست بعدی Tukey انجام شد. داده ها به صورت Mean±SE نمایش داده شده است. در هر حیوان ۲۱ مقطع سریال انتخاب و میزان وسعت دمیلائسیون در آن به صورت میانگین این مقاطع بیان شد که در هر مقطع حاصل: وسعت ناحیه دمیلنه به کل ناحیه کیاسما که به صورت درصد بیان شده است. در مقایسه گروه LPC با سالین، میزان دمیلائسیون در روز ۳ و ۷ به ترتیب معنی دار بود و حداکثر دمیلائسیون در روز ۷ بود. در روز ۱۴ کاهش وسعت دمیلائسیون نسبت به روز ۷ با $pp < 0.01$ معنی دار بود. ($P < 0.05$)*، ($P < 0.01$)**

میلین نشان داده شد که در موشهایی که دوز سمی LPC را دریافت داشتند انتشار LPC مشابه انتشار رنگ بود.

ساختارهای مغزی از جمله بطن سوم و بدرون مایع مغزی- نخاعی انتشار نمی یابد. با استفاده از رنگ آمیزی اختصاصی



C



شکل ۲- مقایسه ثبت های VEP در روزهای مختلف گروه آزمایشی LPC. A- یک ثبت نمونه از حیوان سالم با شرح جزئیات را نشان می دهد، طبق قرار داد اولین موج بالا رو، N₁ و اولین موج پایین رو، P₁ نامیده می شود و باقی موج ها هم به ترتیب با تغییر اعداد نام گذاری می شوند. در این جا ما فاصله بین تحریک و موج P₁ را به عنوان شاخص هدایت اندازه گیری کردیم. B- نمونه یک ثبت در گروه سالین ۷ روز پس از تزریق است که به لحاظ تاخیر موج P با موش سالم تفاوتی ندارد و مقایسه آن با نمونه ثبت های VEP در روزهای مختلف پس از تزریق LPC را نشان می دهد، بیشترین تاخیر در روز ۷ نسبت به بقیه واضح است. محور عمودی دامنه با واحد µV و محور افقی زمان با واحد ms را نشان می دهند. C- این گراف مقایسه گروه های مختلف در ثبت VEP را نشان می دهد. ثبت در هر حیوان میانگین ۳۰۰ ثبت است و تعداد حیوانات در هر گروه ۶ بود. میزان تاخیر موج P بعنوان شاخص هدایت عصبی اندازه گیری شد. در گروه LPC در مقایسه روزهای مختلف با سالین میزان تاخیر موج P افزایش یافته بود. تاخیر موج P در روزهای ۳ و ۷ به ترتیب با (**P<0.01 و ***P<0.001) نسبت به سالین معنی دار بود، اما روز ۱۴ تغییر معنی داری نسبت به سالین نشان نداد، اما نسبت به گروه روز ۷ که بیشترین تاخیر را داشت، کاهش معنی داری در تاخیر موج P نشان داد (p<0.05). آنالیز آماری با روش آنالیز واریانس یک طرفه با تست بعدی Tukey انجام شد. داده ها به صورت Mean±SE نمایش داده شده است.

تخریب نماید. بنابراین نه تنها ارزیابی عملکردی و هیستولوژیک ترمیم در چنین مدلی به سختی میسر و قابل انتساب به تغییرات لیژن در دستگاه بینایی است بلکه به لحاظ آسیب وسیعی که سلولهای پیشساز بطنی و غیر بطنی در پی القا مدل متحمل شده اند ارزیابی منشا این سلولها نیز با استفاده از چنین مدلی عملاً میسر نیست. علاوه بر آن متعاقب تزریق اتیدیوم بروماید، بدلیل آسیب دیدن سلولهایی نظیر آستروسیتها [۶۳] که حضورشان برای ترمیم ناشی از دمی‌لیناسیون ثابت شد [۶۰]، طول مدت زمان پروسه القا آسیب و ترمیم بعدی به تأخیر می انجامد که خود از معایب یک مدل حیوانی محسوب می شود.

در اینجا ما مدلی را تکوین داده ایم که با استفاده از LPC قادر به القا هدفمند دمی‌لیناسیون در کیاسما و اعصاب بینایی بوده و با بهره گیری از تکنیکهای الکتروفیزولوژیک و هیستولوژیک تغییرات ناشی از دمی‌لیناسیون و رمیلیناسیون ردیابی گردد.

با استفاده از دو پارامتر تأخیر موج P و N، در بیماران MS می توان مرحله دمی‌لیناسیون عصب بینایی را از مرحله تخریب اکسونی آن جدا کرد. از آنجا که تأخیر N و P دو جز مهم موج (VEP)، به عنوان شاخص دمی‌لیناسیون و رمیلیناسیون در نظر گرفته می شود، هرگاه تأخیر یکی یا هر دو پارامتر موج VEP، افزایش یابد، دمی‌لیناسیون صورت گرفته است و هرگاه این میزان تأخیر کم شود و به مقدار آن در گروه کنترل نزدیک شود، یعنی، پدیده رمیلیناسیون رخ داده است [۴۴]. در این مطالعه تغییراتی در تأخیر همه اجزای موج VEP مشاهده شد ولی به دلیل ثبات بیشتر موج P1، تأخیر موج P1 را به عنوان شاخص هدایت اندازه گیری در نظر گرفته شد.

ارزیابیهای الکتروفیزولوژیک ثبت پتانسیلهای برانگیخته بینایی در این مطالعه نشان داد که بیشترین تأخیر در موج P و لذا بیشترین دمی‌لیناسیون در روز ۷ پس از آسیب رخ می دهد. 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 بافت شناسی مشخص شد که میلین و فیبر عصب بینایی این حیوانات دچار دمی‌لیناسیون و تخریب بافتی شده بود و نشان داد که از این تکنیک می توان برای تشخیص دمی‌لیناسیون ثانویه استفاده نمود [۵۴]. VEP

ارزیابی های هیستولوژیک کیاسما و اعصاب بینایی نشان داد که بدنبال تزریق داخل کیاسمای لیزولسیتین دمی‌لیناسیون در کیاسما و اعصاب بینایی رخ می دهد. در واقع بخشهایی از سیستم عصبی مرکزی که در مجاورت نزدیک لیزولسیتین هستند دمیلینه می شوند. پروسه رمیلیناسیون مشابه با موارد تزریق لیزولسیتین در سایر ساختارهای مغزی نخاعی در جوندگان بود. ارزیابی پایه دید در موشها به لحاظ الکتروفیزولوژیک در ابتدا با دمی‌لیناسیون و فقدان عملکردی بینایی و سپس بدنبال آن رمیلیناسیون و بهبود دید همزمان بود. تکوین این مدل جدید، تکنیکی مناسب برای آزمودن فاکتورهای رشد فعال گلیالی و رمیلیناسیون فراهم می آورد. کارول و همکارانش در سال ۱۹۸۳ در موش صحرائی [۶۲] و بعدها لاچاپل و همکارانش در سال ۲۰۰۵ در میمون [۶۱] لیزولسیتین را، در محلی نسبتاً دور از مغز، در یک عصب بینایی تزریق نمودند اما باید دانست که این مدلها مشابهت نزدیک زیادی با آنچه در دستگاه اپتیک بیماری MS رخ می دهد ندارد، زیرا گزارش شده است که MS مخصوصاً اعصاب و کیاسمای بینایی را متاثر می نماید [۶، ۲۷، ۵۷، ۶۲]. علاوه بر این، محلی از عصب که آنها مدل را در آن القا نمودند، به لحاظ فاصله ای که از مغز و لذا سایر منابع بالقوه سلولهای میلین ساز دارد، این مدل را در استفاده به عنوان وسیله ای جهت کشف منابع جدید سلولهای مولد میلین با محدودیت مواجهه نموده است. بعدها در تلاشی پیگیر جهت رفع این نقایص و ارائه مدلی مناسبتر، گازو و همکارانش تکنیکی برای القا دمی‌لیناسیونی وسیعتر در کیاسما و اعصاب بینایی تکوین دادند که عبارت بود از تزریق مستقیم توکسین اتیدیوم برماید بدرون فضای زیر عنکبوتیهای دور کیاسمای موش صحرائی [۲۷]. اگر چه این مدل به لحاظ توانایی در القا همزمان دمی‌لیناسیون نه تنها در هر دو عصب بینایی بلکه در کیاسما و مسیره های بینایی موفق گردید. اما باید دانست که متعاقب القا این مدل به دلیل تزریق اتیدیوم برماید در CSF و لذا انتشار گسترده توکسین، تقریباً کل ناحیه کف مغز دچار آسیب و دمی‌لیناسیون گردید که شامل نه تنها دستگاه بینایی بلکه همچنین بسیاری از ساختارهای غیر هدف از جمله بطنها می شد. همانطور که پیشتر در مقدمه ذکر گردید اتیدیوم برماید قادر است که بطور غیر اختصاصی سلولهایی را که در معرض آن قرار می گیرند را

تقسیم می شوند و در turnover الیگودندروسیتی شرکت می کنند، اگر چه مشاهده شده که سلولهای پیشساز الیگودندروسیتی ساکن در نواحی اطراف آسیب می توانند با تغییر در مورفولوژی و بیان ژنهایشان به فرم فعال تبدیل گردند [۴۰] و با مهاجرت به ناحیه آسیب دیده [۶۵] در پروسه ریمیلیناسیون شرکت کنند. علاوه بر این سلولها، نشان داده شده که سلولهای بنیادی عصبی ساکن در نواحی بطنی توانایی بالایی جهت مهاجرت و تولید میلین پس از آسیب دارند [۴۴، ۵۷]. در واقع اخیرا محققان چنین پتانسیلی را در سلولهای نواحی زیر بطنی در انسان نیز نشان داده اند [۶۰].

محققان گزارش نمودند که در دوران تکوین جنینی، میلیناسیون اکسونهای سلولهای گانگلیونی شبکه توسط مهاجرت سلولهای پیشساز الیگودندروسیتی منشا گرفته از ناحیه ای در کف بطن سوم صورت می گیرد [۴۹] و نقش اکسونهای سلولهای گانگلیونی در فراخوانی این سلولها توسط سایر محققان گزارش شده است [۵۹]. Chang و همکارانش گزارش نمودند که در سیستم عصبی بزرگسالان، اشتقاق سلولهای پیشساز الیگودندروسیتی از سلولهای بنیادی عصبی ساکن در نواحی زایای مغز ممکن است به سیکنالهای اکسونی موضعی بستگی داشته باشد [۴۵]. لذا منابع مختلفی از جمله سلولهای پیشساز الیگودندروسیتی موضعی ساکن در داخل [۵۸] یا خارج از لیژن [۱۰، ۳۶]، سلولهای بنیادی عصبی ساکن در کیاسما و اعصاب بینایی [۳۳]، سلولهای بنیادی عصبی نواحی بطنی [۵۳]، و یا سایر منابع ناشناخته دیگر ممکن است در ریمیلیناسیون کیاسما و عصب بینایی شرکت کنند.

مطالعات نشان داده اند که شوان سل ها نیز می توانند در ریمیلیناسیون CNS پس از آسیبهای دمیلینه کننده شرکت کنند. گزارش ها نشان می دهد که به دنبال آسیب با گلیوتوکسین لیزولسیتین در ابتدا حدود ۸۰٪ از ریمیلیناسیون از نوع الیگودندروسیتی است نه سلول های شوان [۶۳]، اگر چه در نهایت تمام ریمیلیناسیون از نوع الیگودندروسیتی خواهد شد.

نتایج ارائه شده در این مقاله نه تنها با پیشنهاد متدی جدید برای القا و بررسی دمیلیناسیون و ریمیلیناسیون در نواحی کیاسما و عصب بینایی با استفاده از ارزیابیهای بافت شناسی و الکتروفیزیولوژیک دید عمیقتری در رابطه با فرایند دمیلیناسیون و ریمیلیناسیون سیستم عصبی ارائه می نماید بلکه امکان

همچنین در تشخیص بیماران دارای دژنراسیون ماکولار بکار برده شده است. محققین با استفاده از این روش، اثرات سمی جیوه بر روی سیستم بینایی تشخیص داده اند [۳۲]. دمیلیناسیون حاصل از انفوزیون آگونیست رسپتور AMPA/KA در داخل عصب بینایی هم باعث تاخیر موج VEP در خرگوش شده است [۵۷].

در این مطالعه با گذشت زمان از میزان تاخیر موج p کاسته شده به طوری که در روز ۱۴ پس از آسیب در مقایسه با روز ۷ کاهش معنی داری نشان داد. کاهش در تاخیر القا شده دنبال دمیلیناسیون اولیه نشانده توانایی مجدد اکسونها در ارسال ایمپالسهای بینایی با سرعت بیشتر در روز ۱۴ پس از آسیب می باشد. لذا نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که دمیلیناسیون القا شده توسط لیزولسیتین در عصب و کیاسمای بینایی موش در روز هفتم به حداکثر خود می رسد و به دنبال آن ریمیلیناسیون نسبی، در روز چهاردهم قابل مشاهده است.

در واقع نتایج حاصل از مطالعه الکتروفیزیولوژیک در این مطالعه توسط نتایج هیستولوژیک تایید گردید که این نشان می دهد که تغییرات عملکردی اکسونها با تغییرات ساختاری آنها در این مدل به خوبی هم خوانی دارد. نتایج حاصل از ارزیابی وسعت دمیلیناسیون توسط رنگ آمیزی اختصاصی میلین نشان داد که اندازه ناحیه دمیلینه شده به نسبت کل ناحیه در روز ۷ پس از تزریق لیزولسیتین به بیشترین میزان خود می رسد و پس از آن کاهش می یابد. در روز ۱۴ پس از آسیب، ترمیم قابل توجه، هرچند ناکاملی، در ناحیه صورت می گیرد. نتایج تحقیقات طولانی مدت (۶- ۳/۵ ماه) بروی پایک تحتانی مخچه دمیلینه شده با لیزولسیتین نشان داد که آن ناحیه در طولانی مدت تحت ریمیلیناسیون کامل قرار می گیرد [۶۳]. در واقع تحقیقات نشان داده اند که مغز بزرگسالان پتانسیل خود را جهت تولید پیشسازهای الیگودندروگلیالی با ظرفیت میلیناسیون وسیع حفظ می کند [۶۷].

محققان نشان دادند که سلولهای پیش ساز الیگودندروسیتی و الیگودندروسیتتهای post-mitotic که در محل آسیبهای دمیلینه کننده حضور دارند، غیر فعال بوده و در ریمیلیناسیون شرکت نمی کنند [۵۱]. از سوی دیگر سلولهای پیش ساز الیگودندروسیتی که در سراسر ماده سفید و خاکستری CNS سالم جمعیت های تقریبا خاموشی را تشکیل می دهند به ندرت

سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس و شبکه تحقیقات علوم اعصاب ایران به خاطر حمایت های مالی و ارائه امکانات آزمایشگاهی سپاسگزاریم.

مطالعات رفتاری دید (نظیر ماز) در کنار این مطالعات جهت ارزیابی اثرات درمانهای دارویی، سلولی، ژنی یا فیزیکی بر روی دمی‌لیناسیون و رمیلیناسیون وسیله ای مناسب فراهم می کند. این مدل علاوه بر آن می تواند در شناسایی ظرفیتهای درونزاد جدید مولد میلین به خدمت گرفته شود.

References

- [1] Allt G, Ghabriel MN, Sikri K. Lysophosphatidyl choline-induced demyelination A freeze-fracture study. *Acta Neuropathol* 75 (1988) 456-464.
- [2] Altmann DM, Boyton JB. Models of multiple sclerosis. *Drug Discov Today: Disease Models* 1 (2004) 405-410.
- [3] Anastasi M, Lodato G, & Cillino S. VECs and optic disc damage in diabetes. *Doc. Ophthalmol* 66 (1987) 331-336.
- [4] Arezzo JC, Brosnan CF, Schroeder CE, Litwak MS, Bornstein MB. Electrophysiological analysis of factors involved in the primary demyelinating diseases: the rabbit eye model system. *Brain Res* 462 (1988) 286-300.
- [5] Baumann N and Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 81 (2001) 871-927.
- [6] Beck R, Schatz N, Savino J. Involvement of the optic chiasm, optic tract and geniculocalcarine visual system in multiple sclerosis. *Bull Soc Belge Ophthalmol* 208 (1983) 159-191.
- [7] Blakemore W F, Franklin RJ M. Remyelination in experimental models of toxin-induced demyelination. *Curr Top Microbiol Immunol* 318 (2008) 193-212.
- [8] Blakemore WF, Eames RA, Smith KJ, McDonald WI. Remyelination in the spinal cord of the cat following intraspinal injections of lysolecithin. *J Neurol Sci* 33 (1977) 31-43.
- [9] Carroll WM, Jennings A and Mastaglia FL. Experimental demyelinating optic neuropathy: a model for combined morphological and electrophysiological studies. *Clin Exp Neurol* 19 (1983) 17-28.
- [10] Carroll WM, Jennings AR, Ironside LJ. Identification of the adult resting progenitor cell by autoradiographic tracking of oligodendrocyte precursors in experimental CNS demyelination. *Brain* 121 (1998) 293-302.
- [11] Cayre M, Bancila M, Virard I, Borges A, Durbec P. Migrating and myelinating potential of subventricular zone neural progenitor cells in white matter tracts of the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci* 31 (2006) 748-758.
- [12] Chang A, Tourtellotte WW, Rudick R, Trapp BD. Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 346 (2002) 165-173.
- [13] Chang A, Nishiyama A, Peterson J, Prineas J, Trapp BD. NG2-positive oligodendrocyte progenitor cells in adult human brain and multiple sclerosis lesions. *J Neurosci* 20 (2000) 6404-6412.
- [14] Chitnis T, Imitola J, Wang Y, Elyman W, Chawla P, Sharuk M, Raddussi K, Bronson RT, Koury SJ. Elevated neural expression of CD 200 protects wlds mice from inflammation-mediated neurodegeneration. *Am J Pathol* 170 (2007) 1675-1712.
- [15] Decker L, Picard-Riera N, Lachapelle F, Baron-Van Evercooren A, Growth factor treatment promotes mobilization of young but not aged adult subventricular zone precursors in response to demyelination. *J Neurosci Res* 69 (2002) 763-771.
- [16] Dousset V, Brochet B, Vital A, Gross C, Benazzouz A, Boullerne A, Bidabe AM, Gin AM, Caille JM. Lysolecithin-induced demyelination in primates: preliminary in vivo study with MR and magnetization Transfer. *Am J Neuroradiol* 16 (1995) 225-231.
- [17] Dubois-Dalcq M, French-Constant C, and Franklin RJM. Enhancing central nervous system remyelination in multiple sclerosis. *Neuron* 48 (2005) 9-12.
- [18] Emsley JG, Mitchell BD, Kempermann G, Macklis JD. Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells. *Prog Neurobiol* 75 (2005) 321-41.
- [19] Ernst C, Christie BR. Nestin-expressing cells and their relationship to mitotically active cells in the subventricular zones of the adult rat. *Eur J Neurosci* 22 (2005) 3059-3066.

- [20] Ewing C and Bernard CCA. Insights into the aetiology and pathogenesis of multiple sclerosis. *Immunol Cell Biol* 76 (1998) 47-54.
- [21] Feinstein A. The clinical neuropsychiatry of multiple sclerosis. 1st Edition, Cambridge, Cambridge University Press (1999) p 11
- [22] Franklin RJM, Gilson JM, and Blakemore WF. Local recruitment of remyelinating cells in the repair of demyelination in the central nervous system. *J Neurosci Res* 50 (1997) 337-344.
- [23] Gao I, Miller RH. Specification of optic nerve oligodendrocyte precursors by retinal ganglion cell axons. *J Neurosci* 26 (2006) 7619-7628.
- [24] Gensert JM, Goldman JE. Endogenous progenitors remyelinate demyelinated axons in the adult CNS. *Neuron* 19 (1997) 197-203.
- [25] Goudarzvand M, Javan M, Mirnajafi zadeh J, Mozafari S, Taki T. Vitamins E and D3 attenuate demyelination and potentiate remyelination processes of hippocampal formation of rats following local injection of ethidium bromide. *Cell Mol Neurobiol* 30 (2010) 289-299.
- [26] Gregson NA. Lysolipids and membranes damage: lysolecithin and its interaction with myelin. *Biochem Soc Trans* 17 (1989) 280-283.
- [27] Guazzo EP. A technique for producing demyelination of the rat optic nerves. *J Clin Neurosci*, 2 (2005) 54-8.
- [28] Guazzo EP. Myelin: myelination, demyelination and remyelination, 2:5-38 in- Growth factors and remyelination in the rat spinal cord. MD thesis, University of Queensland (2001).
- [29] Hafler DA. Multiple sclerosis. *Am Soc Clin Investig* 113 (2004) 788-794.
- [30] Hall S. The effect of injections of lysophosphatidyl choline into white matter of the adult mouse spinal cord. *J Cell Sci* 10 (1972) 535-546.
- [31] Heckenlively JR & Arden GB. Principle and practice of clinical electrophysiology of vision, Second ed (2006).
- [32] Herba E, Pojda-Wilczek D, Plech AR, Pojda SM, & Szkilnik R. Influence of dopamine on flash visual evoked potentials (FVEP) in prenatally mercury intoxicated rats. *Pol. J Pharmacol* 56 (2004) 415-419.
- [33] Imitola J, Snyder EY, Houry SJ. Genetic programs and responses of neural stem/progenitor cells during demyelination: potential insights into repair mechanisms in multiple sclerosis. *Physiol Genomics* 14 (2003) 171-197.
- [34] Ishikawa T, Fujiwara A, Takechi K, Ago J, Matsumoto N, Rahman MA, Kamei C. Changes of visual evoked potential induced by lateral geniculate nucleus kindling in rats. *Epilepsy Res* 79 (2008) 146-150.
- [35] Jeffery ND, Blakemore WF. Locomotor deficits induced by experimental spinal cord demyelination are abolished by spontaneous remyelination. *Brain* 120 (1997) 27-37.
- [36] Jennings AR, Kirilak Y, Carroll WM. In situ characterization of oligodendrocyte progenitor cells in adult mammalian optic nerve. *J Neurocytol* 31 (2002) 27-39.
- [37] Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, and Frisén J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96 (1999) 25-34.
- [38] Kamei C, Kuroda K, Fujiwara A, Takeda Y. Effects of narcotics, including morphine, on visual evoked potential in rats. *E J Pharmacol* 602 (2009) 294-297.
- [39] Lachapelle F, Bachelin C, Moissonnier P, Nait-Oumesmar B, Fontaine D, Baron-Van Evercooren A. Failure of remyelination in the nonhuman primate optic nerve. *Brain Pathol* 15 (2005) 198-207.
- [40] Levine JM, Reynolds R, and Fawcett JW. The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. *Trends Neurosci* 24 (2001) 39-47.
- [41] Levine JM, Reynolds R. Activation and proliferation of endogenous oligodendrocyte precursor cells during ethidium bromide-induced demyelination. *Exp Neurol* 160 (1999) 333-347.
- [42] 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.
- [43] McQualter JL and Bernard CC. Multiple sclerosis: a battle between destruction and repair. *J Neurochem* 100 (2007) 295-306.
- [44] 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* 26 (2006) 7907-7918.
- [45] Nait-Oumesmar B, Decker L, Lachapelle F, Avellana-Adalid V, Bachelin C, Baron-Van Evercooren A. Progenitor cells of the adult mouse subventricular zone proliferate, migrate and differentiate into oligodendrocytes after demyelination. *Eur J Neurosci* 11 (1999) 4357-4366.

- [46] Nait-Oumesmar B, Picard-Riéra N, Kerninon C, Baron-Van Evercooren A. The role of SVZ-derived neural precursors in demyelinating diseases: From animal models to multiple sclerosis. *J Neurologi Sci* 265 (2008) 26-31.
- [47] Nait-Oumesmar B, Picard-Riera N, Kerninon C, Decker L, Seilhean D, Höglinger G U, Hirsch EC, Reynolds R, Baron-Van Evercooren A. Activation of the subventricular zone in multiple sclerosis: Evidence for early glial progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 104 (2007) 4694-4699.
- [48] Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343 (2000) 938-52.
- [49] Ono K, Yasui Y, Rutishauser U, Miller RH. Focal Ventricular Origin and Migration of Oligodendrocyte Precursors into the Chick Optic Nerve. *Neuron* 19 (1997) 283-292.
- [50] Otradovec J. Chiasmatic and retrochiasmatic neuritis in multiple sclerosis. (Contribution to the problem of the origin of functional disorders of the optical tract in multiple sclerosis). *Cesk Neurol* 28 (1965) 389-95.
- [51] Pavelko KD, Van Engelen B G M, Rodriguez M. Acceleration in the rate of CNS remyelination in lysolecithin- induced demyelination. *J Neurosci* 18 (1998) 2498-2505.
- [52] Paxinos G, Franklin KBJ. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. 2ed Edition, Sandeigo, California Academic press 2004.
- [53] Picard-Riera N, Decker L, Delarasse C, Goude K, Nait-Oumesmar B, Liblau R, Pham-Dinh D, Baron-Van Evercooren A. Experimental autoimmune encephalomyelitis mobilizes neural progenitors from the subventricular zone to undergo oligodendrogenesis in adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (2002) 13211-6.
- [54] Picard-Riera N., Nait-Oumesmar B, and Baron-Van Evercooren A. Endogenous adult neural stem cells: Limits and potential to repair the injured central nervous system. *J Neurosci Res* 76 (2004) 223-231.
- [55] Schmandt T, Goßrau G, Kischlat T, Opitz T, Brüstle O. Animal models for cell and gene therapy in myelin disease. *Drug Discov Today: Disease Models* 3 (2006) 349-358.
- [56] Shivane, AG and Chakrabarty A. Multiple sclerosis and demyelination. *Curr Diagno Pathol* 13(2007) 193-202.
- [57] Soto A, Pérez-Samartín AL, Etxebarria E, & Matute C. Excitotoxic insults to the optic nerve alter visual evoked potentials. *Neuroscience* 123 (2004) 441-449.
- [58] Stangel M and Hartung HP. Remyelinating strategies for the treatment of multiple sclerosis. *Prog Neurobiol* 68 (2002) 361-376.
- [59] Steinman L. Assessment of animal models for MS and demyelinating disease in the design of rational therapy. *Neuron* 24 (1999) 511-514.
- [60] Talbott JF, Loy DN, Liu Y, Qiu MS, Bunge MB, Rao MS, Whittemore SR. Endogenous Nkx2. 2+/Olig2+ oligodendrocyte precursor cells fail to remyelinate the demyelinated adult rat spinal cord in the absence of astrocytes. *Exp Neurol* 192 (2005) 11-24.
- [61] Waxman SG, Kocsis JD, Nitta KC. Lysophosphatidyl choline induced focal demyelination in the rabbit corpus callosum. *J Neurol Sci* 44 (1979) 45-53.
- [62] Weiss S, Dunne C, Hewson J, Wohl C, Wheatley M, Peterson AC, Reynolds BA. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci* 16 (1996) 7599-609.
- [63] 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.
- [64] Woodruff RH, Franklin RJM. The expression of myelin protein mRNAs during remyelination of lysolecithin-induced demyelination. *Neuropathol Appl Neurobiol* 25 (1999) 226-235.
- [65] Xu Y, Tamamaki N, Noda T, Kimura K, Itokazu Y, Matsumoto N, Dezawa M, Ide C. Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle. *Exp Neurol* 192 (2005) 251-264.
- [66] Zamvil SS, Steinman L. Diverse Targets for Intervention during Inflammatory and Neurodegenerative Phases of Multiple Sclerosis. *Neuron* 38 (2003) 685-688.
- [67] Zhang SC, Ge B, and Duncan ID. Adult brain retains the potential to generate oligodendroglial progenitors with extensive myelination capacity. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (1999) 4089-94.
- [68] Zhao C, Fancy SPJ, Kotter MR, Li WW, Franklin RJM. Mechanisms of CNS remyelination—the key to therapeutic advances. *J Neurol Sci* 233 (2005) 87-91.