

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

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

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

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

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

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

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

E-mail: m118medical@yahoo.com

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

چکیده

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

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

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

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

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

مقدمه

دمیلیناسیون واقعه پاتولوژیک سیستم عصبی مرکزی (CNS) می باشد که می تواند با رمیلیناسیون خودبخودی و جایگزینی میلین از دست رفته همراه باشد و به بازگشتن هدایت جهشی و عملکرد نوروں کمک کند (۱). بازسازی CNS به دلایل مختلف همچون اثر مولکول های مهاری حاصل از فعالیت میکروگلیاها، با شکست مواجه می شود و پتانسیل بازسازی به دلیل آسیب اکثر اکسون ها بسیار کم است. مطالعات مختلف نشان می دهد که CNS قدرت بازسازی خود را تحت شرایط محیطی مناسب و یا مداخلات مناسب حفظ می کند (۲).

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

دمیلیناسیون القاء شده با مواد شیمیایی مدل مناسبی جهت بررسی اثر عوامل مؤثر بر میلیناسیون و دمیالیناسیون است که در بیماری های دمیالینه کننده مانند MS اتفاق می افتد. تزریق مستقیم اتیدیوم، مدل ساده و قابل تکراری است که به دنبال آن فرآیندهای دمیالیناسون، رمیلیناسیون و ترمیم عصبی را می توان بررسی کرد (۸،۹). از طرفی، MBP خانواده ای از پروتئین هایی با بار مثبت اند که در تشکیل و تراکم کردن غلاف میلین نقش

دارند. پروتئین های MBP در الیگودندروسیت های میلینه کننده CNS یافت می شوند و در هنگام میلیناسیون، پروتئین های میلینی به میزان زیادی بیان می شوند. از ۴ ایزوفرم اصلی MBP، مقدار ایزوفرم های ۲۱/۵ و ۱۷ کیلودالتون در هنگام میلیناسیون افزایش می یابد (۱۰-۱۲). آنتی اکسیدان آلفا-توکوفرول (ویتامین E) به عنوان جمع آوری کننده گونه های فعال اکسیژن تحت شرایط *in vivo* و *in vitro* عمل می کند. فعالیت حفاظتی آلفا-توکوفرول از طریق جلوگیری از آسیب اکسیداتیو بافتی ناشی از رادیکال های آزاد است که با شکستن زنجیره رادیکال های آزاد صورت می گیرد و از این طریق اثر حفاظتی خود را اعمال می کند (۱۳-۱۶). بنابراین، موجود را در برابر آپوپتوز و نکروز محافظت می کند (۱۷،۱۸).

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

مواد و روش ها

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

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

تکنیک وسترن بلات: بافت هیپوکمپ راست حیوان که در آن اتیدیوم بروماید (در گروه کنترل سالیین) تزریق شده بود، توسط بافر لیز (تریس - 50 mM HCl با 150 mM NaCl، pH=8، Triton 0/1 X-100 درصد، سدیم دی اکسی کولات ۰/۲۵ درصد، سدیم دی اکسی سولفات (SDS) ۰/۱ درصد، ۱ mM EDTA، مهارکننده پروتئازها ۱ درصد) در شرایط سرما هموزن گردید و سپس سانتیفریوژ شد. قسمت فوقانی نمونه جمع آوری و غلظت پروتئین با روش برادفورد مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه های پروتئینی در ژل پلی آکریل آمید - SDS حل و الکتروفورز گردید. سپس بر روی کاغذ PVDF (Amersham Bioscience) ترانسفر شد. بلات (کاغذ) در ۰/۲ ماده بلاک کننده کیت ECI advanced بلاک شد. سپس بلات ها با آنتی بادی اولیه منوکلونال خرگوشی علیه Caspase-3 و یا آنتی بادی های اولیه پلی کلونال خرگوشی علیه MBP و Actin در دمای ۴ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. بعد از شستشوی کافی، بلات ها به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق با آنتی بادی ثانویه کونجوگه با HRP انکوبه شدند. سپس با استفاده از کیت ECI advanced باندهای فوق آشکار شدند.

آنالیز آماری:

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

استفاده شد. در هر قفس، ۴ حیوان تحت شرایط ۱۲ ساعت تاریکی / روشنایی در دمای کنترل شده اتاق (۲۳±۲) نگهداری شدند که دسترسی کامل به آب و غذا داشتند. پروتکل های پژوهش و مراقبت از حیوانات مورد تأیید کمیته اخلاق در کار با حیوانات آزمایشگاهی وابسته به دانشگاه تربیت مدرس قرار گرفت.

جراحی و تزریق گلیوتوکسین: حیوانات با کلرات هیدرات (80mg/kg) به صورت داخل صفاقی بیهوش و در دستگاه استرئوتاکس قرار داده شدند. مختصات محل تزریق با توجه به اطلس پاکسینوس (AP= -2.8, ML=±1.8, DV=+2.5) تعیین گردید (۲۳). دمیلیناسیون با تزریق مستقیم ۳ میکرولیتر اتیدیوم بروماید (۰/۱) درصد در نرمال سالیین ۰/۹ درصد (۲۴) در ژيروس دنداندار هیپوکمپ راست موش صحرایی با سرعت نیم تا یک میکرولیتر در دقیقه ایجاد شد.

حیوانات گروه درمان ویتامین E (100 mg/kg) (۲۵،۲۶) و ویتامین D₃ (5 μg/kg) (۲۱) را به مدت ۷ روز پس از ضایعه به صورت توأم دریافت نمودند. همچنین از روغن سویا نیز به عنوان حلال ویتامین های E و D₃ استفاده گردید (۲۷). سر حیوانات در زمان مناسب تحت بیهوشی با CO₂ جدا شده و مغز حیوان برداشته شد تا در نیتروژن مایع نگهداری شود و در زمان مناسب تحت مطالعه بافت شناسی و یا ایمونوبلاتینگ قرار گیرد.

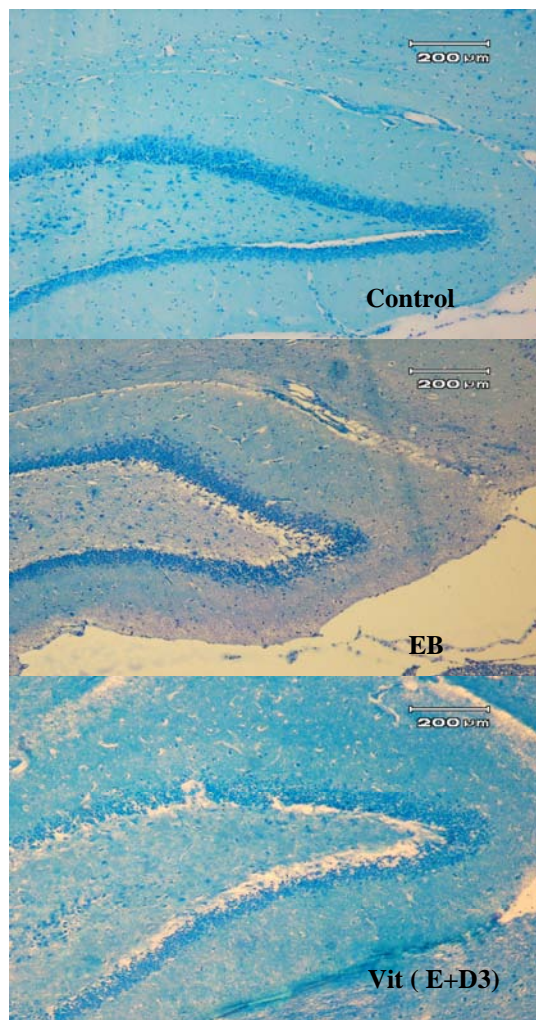
بافت شناسی: هفت روز پس از ایجاد ضایعه، حیوانات بیهوش شده و سپس با بافر سالیین فسفات (PBS) ۰/۱ مولار و پارافرمالدئید (PFA) ۴ درصد در PBS ۰/۱ مولار تازه فیکس شدند. نیمکره راست حیوان جدا و به مدت ۲۴ ساعت در PFA ۴ درصد در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

پس از پاساژ نمونه، بلوک پارافینی تهیه و برش های سائیتال ۵ میکرونی از نمونه ها تهیه شد. سپس برش ها با رنگ آمیزی اختصاصی میلین Luxol Fast Blue و رنگ آمیزی هسته ها با Cryseal Vioet آماده شدند. برای

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

اثر تجویز توأم ویتامین‌های E و D₃ بر میزان

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



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

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

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

یافته‌ها

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

اثر تجویز توأم ویتامین‌های E و D₃ بر میزان

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

اثر تجویز توأم ویتامین‌های E و D₃ بر میزان

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

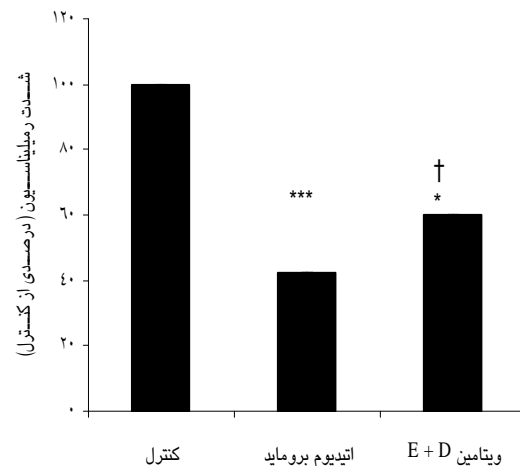
(نمودار ۴).

بحث

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

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

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

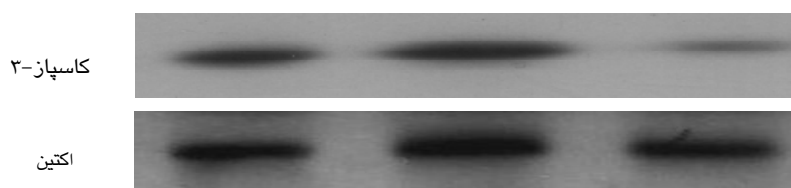
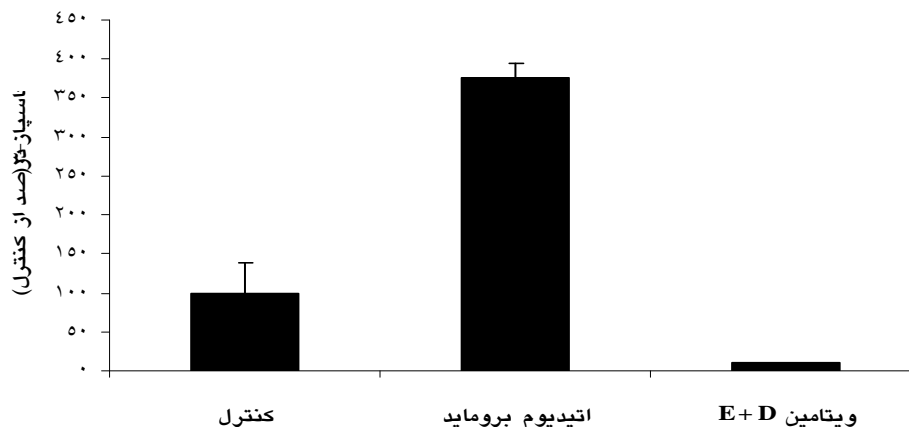


نمودار ۴: مقایسه میانگین شدت رمیلیناسیون در خره‌های کنترل، EB و دریافت‌کننده توأم ویتامین‌های E+D₃ در مقایسه با گروه کنترل و †: P<0.05* و †: P<0.001*** در مقایسه با گروه کنترل و †: P<0.05 در مقایسه با گروه EB می‌باشد.

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

اثر تجویز توأم ویتامین‌های E و D₃ بر میزان

بیان MBP: میزان بیان MBP به عنوان شاخصی از میزان میلین‌سازی و فعالیت سلول‌های میلین ساز مورد بررسی قرار گرفت. تزریق EB موجب کاهش معنادار بیان MBP در روز ۷ پس از تزریق (۶۰±۸/۴) در مقایسه با گروه کنترل (۱۰۰±۱۲/۲) شد (p<0/005). کاربرد توأم ویتامین‌های E و D₃ در طی این هفت روز باعث افزایش شدید (۲۳۶±۳) و معنادار سطوح MBP در منطقه آسیب‌دیده هیپوکمپ در مقایسه با گروه کنترل (p<0/001) و گروه دریافت‌کننده EB (p<0/001) گردید. همچنین نمونه‌ای از باندهای مربوط به بیان پروتئین MBP در گروه‌های کنترل، ضایعه و دریافت‌کننده توأم ویتامین‌های E و D با استفاده از تکنیک وسترن بلات این افزایش را نشان می‌دهد



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

مطالعات متعددی نقش حفاظت عصبی ویتامین E را در

برابر استرس اکسیداتیو در بیماری های تحلیل برنده

سیستم عصبی نشان می دهد (۳۷-۳۹).

MBP در سلول های میلینه کننده و همچنین در

سلول با سرنوشت مشخص شده الیگودندروسیتی بیان

می شود. میزان MBP شاخصی از فعالیت سلول های

الیگودندروسیتی میلین کننده می باشد. میزان بیان MBP در

هیپوکمپ به طور معناداری در ۷ روز پس از تزریق EB

به طور معناداری کاهش یافت. کاهش MBP در روز ۷ پس

از تزریق EB ناشی از مرگ الیگودندروسیت ها می باشد.

احتمال دیگری که برای کاهش MBP می توان داد، نقش

سلول های ایمنی فعال می باشد. سلول های ایمنی فعال

میزان بیان MBP را با ترشح سیتوکاین ها کاهش می دهند

(۴۰). ناحیه زیربطنی (SVZ) و هیپوکمپ منابع اصلی

سلول های بنیادی مغز می باشند (۵,۲۲). سموم گوناگون

مانند EB موجب مرگ سلولی سلول های بنیادی در محل

آسیب می شود و ترمیم CNS در محل آسیب عمدتاً از

(۳۳-۳۵).

در این مطالعه، اثرات ویتامین های E و D₃ بر

فرآیند رمیلیناسیون مشخص گردید. در حالی که سطح

بیان Caspase-3 فعال در روز ۷ پس از ضایعه نسبت به

گروه کنترل افزایش معناداری را نشان داد، سطح این

پروتئین در حیواناتی که ویتامین های E و D₃ را به صورت

توأم دریافت نمودند نسبت به گروهی که فقط EB

دریافت کردند، کاهش یافت. همچنین تغییرات سطح

Caspase-3 اثرات آنتی اکسیدانی و حفاظتی این ویتامین ها

را در برابر آپوپتوز همانند مطالعات قبلی گزارش می کند

(۳۶). این یافته با یافته های متعدد محققین دیگر که اثر

ضد التهابی و حفاظت عصبی ویتامین های E و D را در

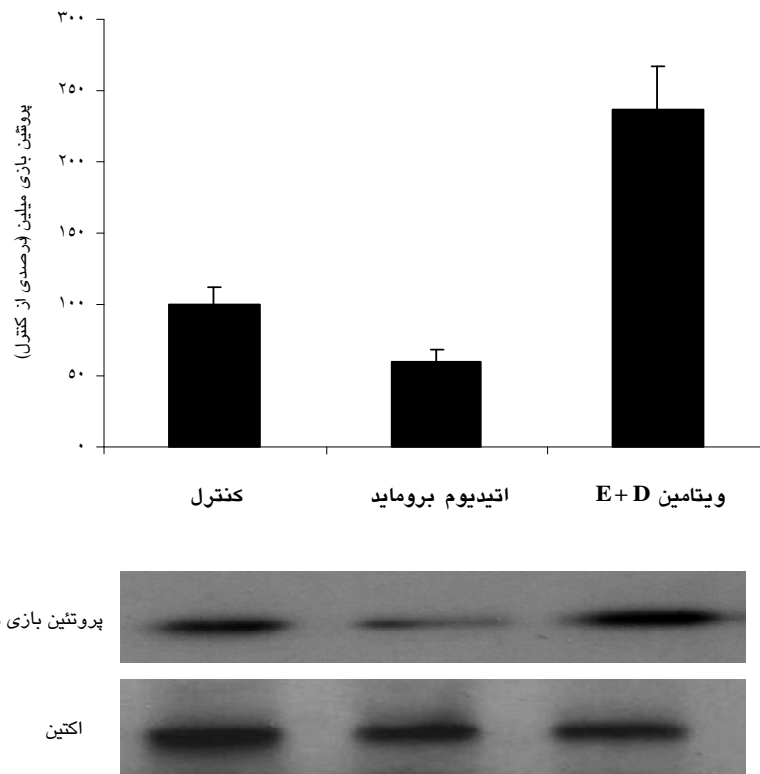
مدل های حیوانی MS و بیماری های تحلیل برنده سیستم

عصبی نشان داده اند، مطابقت دارد (۳۷). برای مثال، تیمار

با ویتامین E در موش هایی که ساقه مغز آن ها از قبل با

EB آسیب دیده است، ناحیه دمیله کوچک تری را در

مقایسه با گروه ضایعه نشان داده است (۳۸). همچنین



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

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

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

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

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

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

تشکر و قدردانی

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

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

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

References

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

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

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