Evaluation of the Neurotrophic Factors in Animal Model of Myelin Destruction Induced by Cuprizone in C57bl/6 Mice

Arefeh Shirazi[1], Fereshteh Golab[2*], Nima Sanadgol[3], Mahmood Barati[4], Reza Mohammad Salehi[5], Gelareh Vahabzadeh[6], Zeinab Shadalui[2], Saeed Rezaei Zarchi[1]

[1]Biology Department, Payame Noor University, Tehran, Iran
[2]Cellular and Molecular Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3]Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran
[4]Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[5]Molecular Microbiology Research Center, Shahed University, Tehran, Iran
[6]Department of Pharmacology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Article Info:

Received: **9 Feb 2016** ***Accepted*****: 8 Jun 2016**

ABSTRACT

Introduction: Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS) with unknown etiology. Neurotrophins are polypeptides belonging to the neurotrophic factor family. Neurotrophins mediate cell survival and proliferation in the nervous system. In this study, we determined the production of various neurotrophins, including brain-derived neurotrophic factor (BDNF), ciliary neurotrophic factor (CNTF), and glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) in Cuprizone model of demyelination. ***Materials and Methods:*** In order to induce demyelination, animals were treated by Cuprizone. The mice were divided into three groups. The first group was treated by Cuprizone for 5 weeks. The second group was treated by Cuprizone for 5 weeks and normal diet for 1 week. The third (control) group received normal diet for 6 weeks. After the mice were sacrificed, cerebral corpus callosum was removed and evaluated for expression of neurotrophic factors by real time PCR and histological evaluation. ***Results:*** After five weeks, we detected a significant increase of BDNF and GDNF compared to the control group. No changes were observed in CNTF expression. After six weeks, expression of BDNF and GDNF were decreased but they had still higher levels compared to control group. ***Conclusion:*** This study suggests that neurotrophins may play a role in pathogenesis of MS.

Key words:

1. Multiple Sclerosis
2. Nerve Growth Factors
3. Cuprizone

Corresponding Author: Fereshteh Golab

E-mail: *frgol@yahoo.com*

بررسی فاکتورهای نوروتروفیک در مدل حیوانی تخریب میلین القاء شده با کوپریزون در موش‌های C57bl/6

عارفه شیرازی[۱]، فرشته گلاب[۲*]، نیما سندگل[۳]، محمود براتی[۴]، رضا محمد صالحی[۵]، گلاره وهاب زاده[۶]، زینب شادالویی[۲]، سعید رضایی زارچی[۱]

[۱]گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
[۲]مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
[۳]گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زابل، زابل، ایران
[۴]گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
[۵]مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مولکولی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
[۶]گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

اطلاعات مقاله:
تاریخ دریافت: ۲۰ بهمن ۱۳۹۴
تاریخ پذیرش: ۱۹ خرداد ۱۳۹۵

چکیده

مقدمه: مالتیپل اسکلروز یک بیماری دمیلینه کنندهٔ التهابی مزمن سیستم عصبی مرکزی با سبب‌شناسی ناشناخته می‌باشد. نوروتروفین‌ها پلی‌پپتیدهای متعلق به خانوادهٔ فاکتور نوروتروفیک هستند. نوروتروفین‌ها واسطهٔ بقاء و تکثیر سلول در سیستم عصبی می‌باشند. در این مطالعه، ما تولید نوروتروفین‌های مختلف، از جمله فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز، فاکتور نوروتروفیک مژگانی، فاکتور نوروتروفیک مشتق از سلول گلیال در مدل دمیلیناسیون با کوپریزون را شناسایی کردیم. **مواد و روش‌ها:** به‌منظور القاء دمیلیناسیون، حیوانات با کوپریزون تیمار شدند. موش‌ها به سه گروه تقسیم شدند. گروه اول توسط کوپریزون به مدت ۵ هفته تحت درمان قرار گرفت. گروه دوم با کوپریزون به مدت ۵ هفته و رژیم غذایی طبیعی برای ۱ هفته درمان شد. گروه سوم (کنترل) رژیم غذایی طبیعی را به مدت ۶ هفته دریافت کرد. بعد از کشته شدن موش‌ها، جسم پینه‌ای مخ برداشته شد و برای بیان فاکتورهای نوروتروفیک توسط Real Time PCR و ارزیابی بافت‌شناسی مورد بررسی قرار گرفت. **یافته‌ها:** پس از پنج هفته، ما افزایش قابل‌توجهی را در فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز و فاکتور نوروتروفیک مشتق از سلول گلیال در مقایسه با گروه کنترل مشخص کردیم. در بیان فاکتور نوروتروفیک مژگانی تغییری مشاهده نشد. پس از شش هفته، بیان فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز و فاکتور نوروتروفیک مشتق از سلول گلیال کاهش یافت؛ اما آن‌ها هنوز هم سطوح بالاتری در مقایسه با گروه کنترل داشتند. **نتیجه‌گیری:** این مطالعه پیشنهاد می‌کند که نوروتروفین‌ها ممکن است نقشی را در بیماری‌زایی مالتیپل اسکلروز بازی کنند.

کلید واژه‌ها:
۱. مالتیپل اسکلروز
۲. فاکتورهای رشد عصبی
۳. کوپریزون

*نویسنده مسئول: فرشته گلاب
آدرس الکترونیکی: *frgol@yahoo.com*

مقدمه

مالتیپل اسکلروز (MS)[1] یکی از بیماری‌های مزمن سیستم عصبی مرکزی و یک بیماری خود ایمنی است که علت آن ناشناخته است و عواملی چون استعداد ژنتیکی، مکانیسم‌های ایمنی و عفونت‌های ویروسی ممکن است در بیماری‌زایی بیماری نقش داشته باشند (۱). در MS، میلین سیستم عصبی مرکزی دچار تخریب شده و مشخصهٔ بارز این بیماری، متعدد بودن ضایعات از نظر زمانی و مکانی و رخداد علایم به صورت رفت و برگشتی[2] است (۲). با وجود مطالعات و پژوهش‌های جدید، هنوز علت اصلی این بیماری مشخص نشده و درمان قطعی برای این بیماری وجود ندارد. محققان معتقدند شاید عوامل ارثی، تغذیه‌ای، محیطی و یا عفونی در آن دخیل باشند. به طور مثال: فاکتورهای عفونی نظیر عوامل ویروسی به دلیل دارا بودن آنتی‌ژن‌هایی مشابه میلین سبب تحریک سیستم ایمنی بدن و تشکیل آنتی‌بادی علیه میلین بافت عصبی می‌شود، در نتیجه میلین اعصاب از بین رفته و منجر به بروز علایم عصبی می‌گردد (۳).

در سیستم عصبی مرکزی الیگودندروسیت‌ها مسئول ساخت میلین هستند. عدم توانایی ساخت میلین حتی در حضور الیگودندروسیت‌ها هم ممکن است اتفاق بیافتد. بنابراین عدم توانایی ساخت میلین می‌تواند در نتیجهٔ عدم بلوغ سلول‌های پیش‌ساز الیگودندروسیت‌ها و یا عدم تمایز آن‌ها به سلول طبیعی باشد. این امر ممکن است مربوط به فاکتورهای محیطی باشد که باعث عدم بلوغ الیگودندرسیت‌ها می‌شود. اگرچه مطالعات زیادی در مورد فاکتورهای دخیل در القاء و تمایز الیگودندروسیت‌ها صورت گرفته است ولی در مورد کنترل مولکولی میلیناسیون اطلاعات کمی وجود دارد (۴).

مطالعات اخیر نشان‌دهندهٔ نقش مهم فاکتورهای نوروتروفیک در میلین‌سازی است. این خانواده از فاکتورهای رشد شامل: فاکتور رشد عصبی (NGF)[3]، فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز(BDNF)[4] و LIF[5] و غیره می‌باشد (۵). نشان داده شده است که NGF نقش مهمی در تنظیم تولید میلین در سلول‌های شوان و اولیگودندروسیت‌ها در محیط کشت دارند. NT3[6] یا BDNF باعث افزایش رشد آکسون، تکثیر سلول‌های اجدادی اولیگودندروسیت و تولید میلین در نخاع موش بالغ بعد از آسیب می‌شود (۵).

BDNF یکی از اعضاء خانوادهٔ فاکتورهای رشد است. گیرندهٔ آن از نوع Trk[7] است. مطالعات نشان می‌دهند که موش‌های Knockout در ژن BDNF نقایصی در سیستم قلبی تنفسی دارند که باعث مرگ آنان می‌شود. تعداد کمی از این موش‌ها که تا ۳ هفته جان سالم به در می‌برند؛ نقایصی در میزان میلین در قسمت‌های مختلف نظیر هیپوکامپ، مخچه، کورتکس و عصب اپتیک دارند. این مسئله نشان می‌دهد که BDNF نقش مهمی در میلیناسیون دارد. اثرات BDNF بر روی میلیناسیون در سیستم عصبی محیطی هم بررسی شده است (۵). NGF و BDNF باعث تنظیم میلیناسیون در سلول‌های شوآن می‌شود که این امر به وسیلهٔ فعال کردن گیرنده‌های نورونی صورت می‌پذیرد. به‌علاوه اثرات In vitro آن هم بررسی شده است که نشان می‌دهد BDNF باعث افزایش تکثیر[8] و تمایز سلول‌های پیش‌ساز الیگودندروسیت‌های مشتق از مغز قدامی[9] می‌شود (۵).

CNTF[10] یک فاکتور نوروتروفیک است که ابتدا به‌عنوان نوروسایتوکینی که می‌تواند باعث بقاء نورونی و تمایز و بلوغ الیگودندروسیت‌ها شود معرفی شد. اخیراً مطرح شده است که در بیماری‌های التهابی دمیلینه می‌تواند یک فاکتور حفاظتی باشد. اکثر ناتوانی‌های بالینی به علت صدمات آکسونی و دمیلینه شدن آن در مراحل اولیهٔ حملهٔ التهابی می‌باشد (۶). بنابراین CNTF می‌تواند در درمان آن‌ها به کار رود. CNTF به‌عنوان یک عامل بقاء و تمایز برای نورون‌ها و الیگودندروسیت‌ها می‌تواند باعث میلیناسیون و کاهش آسیب نورونی شود (۶). در موش‌های فاقد ژن CNTF، میزان الیگودندروسیت‌ها و میزان میلین کمتر از حد طبیعی است (۴).

GDNF[11] نیز یکی دیگر از اعضاء خانوادهٔ فاکتورهای رشد است. مطالعات نشان می‌دهند پس از قطع نسبی و یا کامل نخاع، GDNF باعث رشد آکسون و ترمیم میلین می‌شود. نشان داده شده است NGF باعث سنتز میلین توسط الیگودندروسیت‌ها در CNS[12] و توسط سلول‌های شوآن در PNS[13] و همچنین باعث تمایز سلول‌های الیگودندروسیت در انسفالومیلیت اتوایمیون[14] تجربی می‌شود (۷). همچنین تجویز داخل بطنی NGF می‌تواند باعث به تأخیر افتادن انسفالومیلیت شود. در بیماری MS تعداد زیادی از سلول‌های ایمنی حاوی BDNF در منطقهٔ دمیلینه شده یافت شده است (۷). همچنین افزایش سطح NGF و CNTF در مایع مغزی نخاعی در طی فاز بهبود، یافت شده است. تولید BDNF توسط سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در طی

[1] Multiple sclerosis
[2] Relapsing-remitting
[3] Nerve growth factor
[4] Brain derived neurotrophic factor
[5] Leukemia Inhibitory Factor
[6] Neurotrophin-3
[7] Tyrosine receptor kinase
[8] Proliferation
[9] Forebrain
[10] Ciliary neurotrophic factor
[11] Glial cell-derived neurotrophic factor
[12] Central nervous system
[13] Peripheral nervous system
[14] Autoimmune encephalomyelitis

فـاز بهبـود نسـبت بـه فـاز اولیـه در بیمـاری MS بیشـتر اسـت (۷).

معرفـی نمایـش جدیـد مبتنـی بـر داروهـای خوراکـی و عملکـرد آن‌هـا همـراه بـا نمایـش موجـود می‌توانـد بـرای درمـان MS بسـیار مفیـد باشـد (۸). بـرای رسـیدن بـه نمایـش جدیـد اسـتفاده از مدل‌هـای حیوانـی از اهمیـت بالایـی برخـوردار اسـت تـا جایـی کـه تقریبـاً تمامـی داروهـای کنونـی، مرحلـهٔ مطالعـه روی مدل‌هـای حیوانـی را بـا موفقیـت سـپری کرده‌انـد. یکـی از راه‌هـای بررسـی تأثیـر ترکیبـات مختلـف روی فرایندهـای تخریـب و بازسـازی میلیـن، اسـتفاده از تخریـب میلیـن القـاء شـده توسـط سـموم در مدل‌هـای حیوانـی اسـت کـه در آن‌هـا از عوامـل نوروتوکسـیک بـرای دمیلیناسـیون نورون‌هـا در نواحـی مشـخصی از CNS اسـتفاده می‌گردنـد. پـر اسـتفاده‌ترین ترکیبـات تخریـب کننـدهٔ میلیـن در مدل‌هـای حیوانـی لیزولسـتین[15]، اتیدیـوم بروماید و کوپریـزون[16] می‌باشـند (۹).

بـا توجـه بـه اینکـه کوپریـزون از طریـق خوراکـی و از طریـق غـذا بـه موش‌هـا داده می‌شـود لـذا می‌توانـد روش مناسـبی باشـد. هـدف از ایـن مطالعـه، بررسـی نقـش فاکتورهـای نوروتروفیـک در مـدل کوپریـزون و اندازه‌گیـری بیـان آن در بافـت ناحیـهٔ جسـم پینـه‌ای مـخ[17] مـوش در مراحـل مختلـف تغذیـهٔ حیـوان بـا کوپریـزون اسـت.

مواد و روش‌ها

در ایـن تحقیـق از ۲۱ سـر مـوش نـر نـژاد C57bl/6، ۱۰-۸ هفتـه‌ای بـا محـدودهٔ وزنـی ۲۲-۱۸ گـرم کـه از موسسـهٔ پاسـتور ایـران تهیـه شـده بـود اسـتفاده شـد. ایـن موش‌هـا تحـت شـرایط اسـتاندارد بـا درجـه حـرارت کنتـرل شـده (۲ ± ۲۳ درجـهٔ سـانتی‌گراد) و دورهٔ نـوری ۱۲ سـاعت تاریکـی و ۱۲ سـاعت روشـنایی نگهـداری شـدند. تمامـی موش‌هـا بـه مـدت یـک هفتـه بـرای سـازش بـا محیـط در حیوان‌خانـهٔ دانشـگاه علـوم پزشـکی ایـران نگهـداری و بـا غذای اسـتاندارد بـه صـورت پـودر شـده تغذیـه شـدند.

ایجاد مدل کوپریزون

در ابتـدا جهـت ایجـاد مـدل بیمـاری توسـط کوپریـزون، غـذای حیوان‌هـا پـودر شـد تـا پـودر کوپریـزون هنـگام مخلـوط شـدن بـا غـذا توسـط حیـوان تشـخیص داده نشـود. جهـت قـرار دادن غـذای پـودر شـده در قفـس حیوانـات، ظـروف مخصوصـی خریـداری شـد کـه عـلاوه بـر گنجایـش کافـی، از وزن بالایـی برخـوردار بـوده کـه توسـط حیـوان واژگـون نگـردد. قفس‌هـا به‌منظـور سـمی نکـردن فضـای حیوان‌خانـه (بـه خاطـر ماهیـت غـذا بـه شـکل پـودر(در فضـای جداگانـه‌ای در زیـر هـود نگـه‌داری شـدند. جهـت ایجـاد مـدل، غـذای حـاوی ۰/۲٪ کوپریـزون بـه صـورت پـودر مخلـوط و بـه مـدت ۵ هفتـه بـه حیوانـات داده شـد.

گروه‌بندی حیوانات

موش‌هـای آزمایشـگاهی نـر بالـغ نـژاد C57bl/6 بـه تعـداد ۲۱ سـر بـه صـورت تصادفـی بـه ۳ گـروه تقسـیم شـدند:

۱- گـروه کنتـرل: ایـن گـروه شـامل موش‌هـای سـالمی بودنـد کـه بـه مـدت ۶ هفتـه بـا جیـرهٔ غذایـی طبیعـی تغذیـه شـدند و در پایـان هفتـهٔ ۶ کشـته شـدند.

۲- گـروه بیمـار ۱: ایـن گـروه شـامل موش‌هایـی بودنـد کـه بـا جیـرهٔ غذایـی حـاوی ۰/۲٪ کوپریـزون بـه مـدت ۵ هفتـه تغذیـه شـدند و در پایـان هفتـهٔ ۵ کشـته شـدند.

۳- گـروه بیمـار ۲: ایـن گـروه شـامل موش‌هایـی بودنـد کـه بـا جیـرهٔ غذایـی حـاوی ۰/۲٪ کوپریـزون بـه مـدت ۵ هفتـه تغذیـه شـدند و در هفتـهٔ ششـم بـا جیـرهٔ غذایـی طبیعـی تغذیـه شـدند. و در پایـان هفتـهٔ ۶ کشـته شـدند.

آماده‌سازی نمونه‌ها برای Real Time PCR

در پایـان هفته‌هـای ۵ و ۶ موش‌هـا از هـر گـروه انتخـاب شـدند و تحـت بیهوشـی عمیـق توسـط کتامیـن و زایلازیـن (بـه نسـبت ۴ بـه ۱) قـرار گرفتنـد. قفسـهٔ سـینهٔ آن‌هـا بـاز شـد و سـپس ۱۵ سـی سـی محلـول PBS[18] درون بطـن چـپ پرفیـوژ شـد تـا تمامـی خـون موجـود در عـروق از دهلیـز راسـت قلـب حیـوان خـارج گـردد؛ سـپس پوسـت سـر برداشـته شـده و محـل اتصـال اسـتخوان بینـی بـه جمجمـه شکسـته شـد. مغـز از درون جمجمـه خـارج گشـته و بخـش جسـم پینـه‌ای از آن جـدا گردیـد و در ادامـه در میکروتیـوب حـاوی مهارکننـدهٔ پروتئـاز DNase/RNase-Free قـرار داده شـده و جهـت انجـام آزمایش‌هـای مولکولـی در فریـزر ۸۰- درجـهٔ سـانتی‌گراد نگهـداری شـد.

ابتـدا RNA هـر نمونـه اسـتخراج گردیـد (توسـط کیـت Bioneer) و تبدیـل بـه cDNA (کیـت Bioneer) شـد و سـپس میـزان بیـان ژن‌هـا توسـط روش Real time PCR (کیـت Trans Gen Biotech) مـورد بررسـی قـرار گرفـت. آنالیـز داده‌هـا توسـط روش ΔΔ CT طبـق روش Livak انجـام پذیرفـت (۱۰). میـزان بیـان ژن‌هـای BDNF، GDNF و CNTF پـس از انجـام آزمایـش بـه صـورت نسـبی در مقایسـه بـا ژن کنتـرل بتـا اکتیـن[19] اندازه‌گیـری گردیـد (جـدول ۱).

آماده‌سازی نمونه‌ها برای رنگ‌آمیزی

تمامـی مراحـل ماننـد قبـل انجـام شـد. پـس از برداشـتن پوسـت سـر، مغـز از درون جمجمـه خـارج گردیـد. سـپس بافـت مغـز در محلـول پارافرمالدئیـد ۴٪ و بافـر فسـفات ۰/۱ مـولار و pH=۷/۴ بـه مـدت ۲۴ سـاعت قـرار داده شـد و بعـد از آن در شـیب سـوکروز ۳۰٪ بـه مـدت ۲۴ سـاعت قـرار گرفـت و سـپس بـه درون قالـب آمـادهٔ کرایـوت انتقـال داده

[15] Lysolecithin
[16] Cuprizone
[17] Cerebral corpus callosum
[18] Phosphate buffered saline
[19] βActin

جدول ۱- ترادف پرایمرها و درجهٔ دمای آنلینگ آن‌ها.

اسم ژن	پرایمر رفت	پرایمر برگشت	مقیاس چگالی نوری[20]	دمای آنلینگ	وزن محصول
CNTF	CTTGCCTCTGTCTCCCTCTTTG	CTACTTGACGAAATATGCCTGTGG	۲	۶۰	۱۱۴
BDNF	AATGATGTGTCAAGTTGCTTAGGC	GAAATGGGATGGAGGCTATAAATGG	۲	۵۹	۱۱۹
GDNF	ACGCTTGGTGGTTGATTCTGG	GTTTCTGAGGGCACGAAGGAG	۲	۶۱	۱۲۴
β-actin	TGAAGATCAAGATCATTGCTCCTC	TCAGTAACAGTCCGCCTAGAAG	۲	۵۸	۱۷۰

شد و به آن محلول نگهدارندهٔ OCT[21] اضافه گردید و به فریزر ۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد منتقل شد.

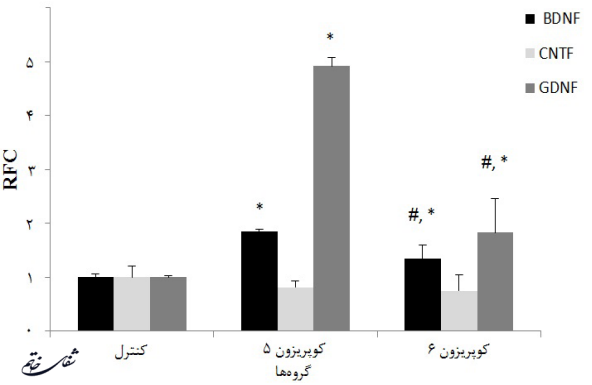
سپس برش‌های ۵ میکرومتر توسط دستگاه Cryostat در دمای پایین انجام گرفت و سنجش تخریب میلین با رنگ‌آمیزی لوکسال فست بلو (LFB)[22] و PAS[23] توسط میکروسکوپ نوری مشاهده شد.

بررسی ایمنوهیستوشیمی MOG

برش‌های ۵ میکرومتری ابتدا دپارافینه شدند و سپس توسط PBS ری هیدراته شدند. در مرحلهٔ بعد در محلول بلاکینگ انکوبه شدند. و سپس شسته شده و با آنتی‌بادی اولیه (آنتی‌بادی ضد MOG[24]) در ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت یک شب انکوبه شدند. بعد شسته شده و با آنتی‌بادی ثانویه انکوبه شدند و سپس سوبسترای مناسب (دی آمینوبنزیدین) DAB[25] اضافه گردید و توسط میکروسکوپ نوری مشاهده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

پس از جمع‌آوری داده‌ها، تجزیه و تحلیل آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 انجام گرفت. قبل از انجام آزمون آماری، داده‌ها از نظر نرمال بودن بررسی شدند که توزیع نرمال داشتند. آزمون آماری مورد استفاده Anova و تعقیبی Tukey بود. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شد و سطح معنی‌داری تجزیه وتحلیل آماری تحقیق حاضر $P<0/05$ در نظر گرفته شد.



نمودار ۱- مقایسهٔ بیان ژن‌های BDNF، CNTF و GDNF در ناحیهٔ جسم پینه‌ای مغز گروه کوپریزون ۵ و ۶ هفته نسبت به گروه کنترل. پس از نرمال‌سازی بیان ژن‌های BDNF و GDNF در موش‌های تحت تغذیه با کوپریزون در هفتهٔ پنجم افزایش معنی‌داری نشان داد. در هفتهٔ ششم بیان BDNF و GDNF نسبت به گروه ۵ هفته کاهش معنی‌داری پیدا کرد ولی باز هم نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت. نتایج به شکل میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است. $P<0/05$ * نسبت به گروه کنترل و $P<0/05$ # نسبت به گروه ۵ هفته را نشان می‌دهد. (RFC بیانگر Relative Fold Changes می‌باشد).

یافته‌ها

بیان ژن‌های BDNF، CNTF و GDNF در موش‌های گروه کوپریزون در هفته‌های ۵ و ۶ نسبت به گروه کنترل

بیان ژن‌های BDNF و GDNF در موش‌های تحت تغذیه با کوپریزون در هفتهٔ پنجم نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت و افزایش GDNF به میزان بالاتری بود ($BDNF(F(۲، ۱۹)=۳۲/۸، P<۰/۰۰۱)$ و $GDNF(F(۲، ۱۹)=۹۳/۷، P<۰/۰۰۱)$) در میزان بیان CNTF تغییر معنی‌داری مشاهده نشد ($P=۰/۱۵$). اما به‌تدریج با افزایش زمان در هفتهٔ ششم بیان BDNF و GDNF نسبت به گروه ۵ هفته کاهش معنی‌داری پیدا کرد ولی باز هم نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت ($BDNF(F(۲، ۱۹)=۳۲/۸، P=۰/۰۰۸)$ و $GDNF(F(۲، ۱۹)=۹۳/۷، P=۰/۰۳۱)$).

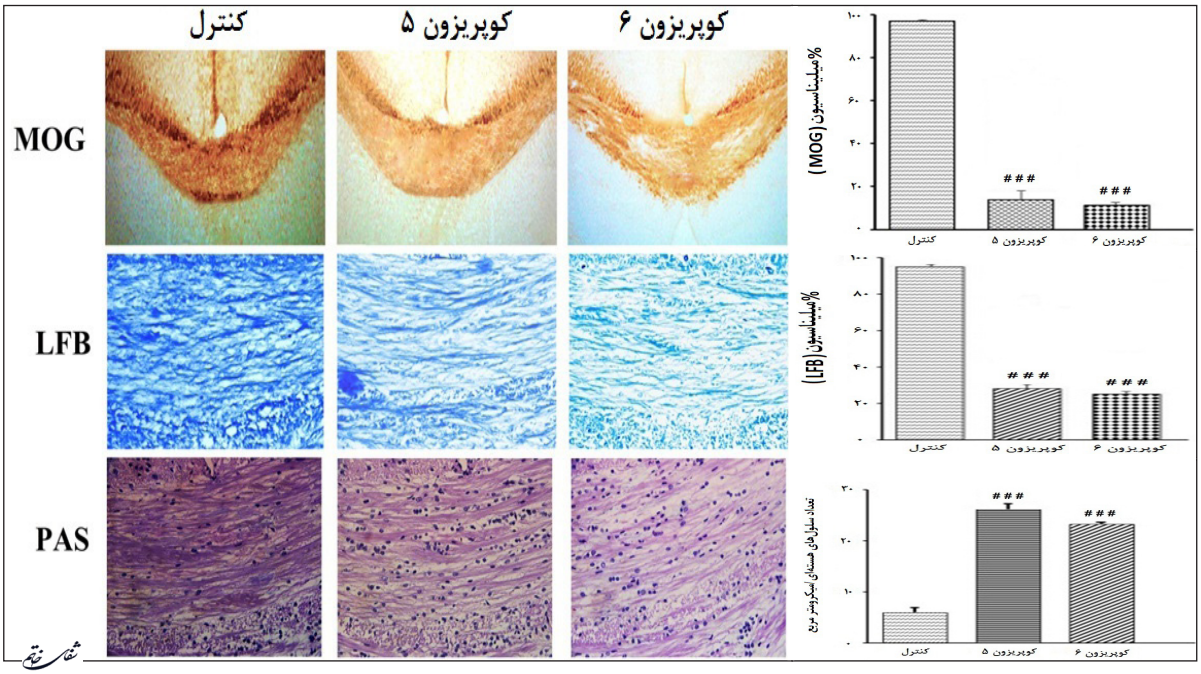
نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی LFB و PAS

بررسی بخش جسم پینه‌ای با رنگ‌آمیزی LFB نشان داد که با القاء بیماری، ادم و پلاک‌های دمیلینه دیده می‌شود. در گروه کنترل هیچ دمیلینه شدنی دیده نشد ولی در گروه کوپریزون در هفتهٔ پنجم دمیلینه شدن وسیعی مشاهده شد. در هفتهٔ ششم دمیلینه شدن خفیف‌تر شده بود. همچنین رنگ‌آمیزی اختصاصی PAS نشان می‌دهد ضایعات سلولی در هفتهٔ ۶ نسبت به هفتهٔ ۵ کمتر است (تصویر ۱).

نتایج حاصل از بررسی ایمنوهیستوشیمی MOG

بررسی ایمنوهیستوشیمی نشان داد که نشانگر[26] الیگودندروسیت بالغ (MOG) در هفتهٔ ۵ نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است و در هفتهٔ ۶ کمی بهبود یافته است (تصویر ۱).

[20] Scale optical density; scale OD
[21] Optimum cutting temperature
[22] Luxol fast blue
[23] Periodic-acid schiff
[24] Myelin-oligodendrocyte glycoprotein
[25] 3,3'-Diaminobenzidine
[26] Marker



تصویر ۱- در این مطالعه رنگ‌آمیزی LFB جهت نشان دادن میزان شدت دمیلینه شدن در ناحیهٔ جسم پینه‌ای به کار برده شد. کم شدن مقدار رنگ در ناحیهٔ جسم پینه‌ای در گروه کوپریزون در هفتهٔ ۵ و ۶ نسبت به گروه کنترل به‌عنوان شاخص دمیلینه شدن در نظر گرفته شد. همچنین رنگ‌آمیزی اختصاصی PAS نشان می‌دهد ضایعات سلولی در هفتهٔ ۶ نسبت به هفتهٔ ۵ کمتر است. علاوه بر این بررسی ایمنوهیستوشیمی نشان داد که نشانگر الیگودندروسیت بالغ (MOG) در هفتهٔ ۵ نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است و در هفتهٔ ۶ کمی بهبود یافته است. تصاویر با بزرگنمایی (×۱۰۰) Scale bar; ۱۰۰ µm نشان داده شده‌اند.

بحث و نتیجه‌گیری

مالتیپل اسکلروز شایع‌ترین بیماری التهابی سیستم عصبی مرکزی است. دمیلینه شدن و آسیب‌های آکسون ناشی از ضایعات التهابی تعیین کنندهٔ طیف گسترده‌ای از علایم بالینی بیماری می‌باشد (۱۲، ۱۱). نوروتروفین‌ها یک گروه از پروتئین‌های بیان شده در سیستم عصبی مرکزی و محیطی در بدن مهره‌داران می‌باشند که نقش مهمی در تکامل، نگهداری و ترمیم سیستم عصبی دارند (۱۲).

هدف از مطالعهٔ حاضر اندازه‌گیری سطح GDNF، CNTF و BDNF در مدل MS و بررسی ارتباط آن با پارامترهای بالینی در مراحل مختلف این بیماری در مدل کوپریزون بود. نتایج نشان داد که سطح این فاکتورها در هفتهٔ ۵ افزایش و سپس در انتهای هفتهٔ ششم کاهش می‌یابد ولی باز هم نسبت به گروه کنترل افزایش نشان می‌دهد. با توجه به اینکه تا هفتهٔ پنجم موش‌ها کوپریزون مصرف می‌کردند و در طول هفتهٔ ششم از رژیم غذایی طبیعی استفاده کردند، بنابراین اوج تخریب در انتهای هفتهٔ پنجم می‌باشد. همانطور که تصویر ۲ نشان می‌دهد بیشترین میزان افزایش در BDNF و GDNF نیز در انتهای هفتهٔ پنجم بوده است. و در هفتهٔ ششم این میزان کاهش یافته است. این بدان معنی است که این فاکتورها به موازات افزایش تخریب و میزان ضایعات افزایش می‌یابند و سپس در هنگام کاهش میزان ضایعه، کاهش نشان می‌دهند و در طول زمان افزایش، اثرات ترمیمی خود را اعمال می‌کنند. همانطور که نتایج بافت‌شناسی هم نشان می‌دهد در انتهای هفتهٔ ششم میزان ضایعات کمتر است. میزان CNTF در این مطالعه تغییرات معنی‌داری نداشت و این بدین معنی است که احتمالاً در این مدل از MS، این فاکتور نقش معنی‌داری ندارد.

نورون‌ها منبع اصلی BDNF هستند. سلول‌های ایمنی نیز می‌توانند BDNF تولید کنند، اما نقش آن در بیماری‌های خود ایمنی هنوز مشخص نیست (۱۳). گروه زیادی از مطالعات نشان می‌دهند که BDNF در MS نقش مهمی دارد (۱۴). به‌عنوان مثال: BDNF در سلول‌های ایمنی و در CNS در ضایعات دمیلینه مشاهده شده است. نشان داده شده است Trk B[27]، یکی از گیرنده‌های BDNF، در سلول‌های عصبی در اطراف ضایعات فعال بیان شده است (۱۵). در بیماران مبتلا به MS نشان داده شده است که مایع رویی[28] کشت سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در طول دورهٔ عود بیماری در مقایسه با دورهٔ بهبودی حاوی سطوح بالاتری از BDNF بودند (۱۶). علاوه بر این، Weinstock و همکاران (به نقل از Calza و همکاران) نشان دادند که BDNF با فعالیت‌های التهابی در مادهٔ سفید بیماران MS ارتباط مثبت دارد (۱۷). در مقابل، Sarchielli و همکاران (به نقل از Sofroniew و همکاران) یک رابطهٔ معکوس بین سطح BDNF در گردش و اسکورهای EDSS[29] نشان دادند (۱۸). مطالعات دیگر نیز نشان می‌دهند درمان MS نیز با تولید BDNF در ارتباط است (۲۰، ۱۹). به‌عنوان مثال، سلول‌های تک هسته‌ای در بیماران MS که از گلاتیرامر استات (GA)[30] استفاده می‌کنند نسبت به بیماران تحت درمان با دیگر داروهای سیستم ایمنی سطوح بالاتری از BDNF را دارند

[27] Tropomyosin receptor kinase B
[28] Supernatant
[29] Expanded disability status scale
[30] Glatiramer acetate

(۲۰). به طور کلی این نتایج نشان می‌دهند در ضایعات التهابی حاد، BDNF نقش مهمی نشان می‌دهد. در مطالعهٔ ما، افزایش BDNF می‌تواند به یک نقش محافظت نورونی BDNF در MS اشاره کند. مطالعات بیشتری برای تأیید این فرضیه لازم است.

مطالعات نشان می‌دهند که GDNF باعث بقاء بسیاری از انواع سلول‌های عصبی مانند نورون‌های دوپامینرژیک و نورون‌های حرکتی می‌شود (۱۳). علاوه بر این، GDNF قادر به جلوگیری از مرگ سلولی نورون‌های حرکتی و همچنین بازسازی آکسون نورون‌های حسی پس از آسیب نخاع می‌باشد (۲۱).

BDNF و NTN[31] دو فاکتور مهم هستند که معمولاً برای درمان بیماری‌های تحلیل برندهٔ عصبی به کار می‌روند. مطالعات نشان می‌دهد که این عوامل می‌توانند دوپامین را در سلول‌های عصبی در مدل‌های حیوانی بیماری پارکینسون و همچنین نورون‌های حرکتی حفظ کنند (۲۲، ۱۳). علاوه بر این، GDNF می‌تواند از تخریب نورون‌های حرکتی در مدل حیوانی اسکلروزیس آمیوتروفیک جانبی (ALS)[32] جلوگیری کند، همچنین یک عامل تروفیک بسیار قوی برای نورون‌های حرکتی ستون فقرات (۲۳، ۲۲) و سلول‌های عصبی نورآدرنرژیک مرکزی می‌باشد (۲۴). مطالعات نشان می‌دهند که سلول‌های ایمنی و محصولات آن‌ها در بیماری‌زایی MS نقش دارند. یک مطالعه نشان می‌دهد که سلول‌های ایمنی، لیگاندهای مختلف از خانوادهٔ GDNF و همچنین ایزوفرم‌های مختلف از گیرنده‌های آن را بیان می‌کنند (۲۵). بنابراین با این داده‌ها امید زیادی است که لیگاندهای خانوادهٔ GDNF ممکن است به‌عنوان یک عامل درمانی در درمان مؤثر تعدادی از بیماری‌های تحلیل برندهٔ عصبی مانند MS مؤثر باشند.

CNTF اولین عامل نوروتروفیک است که توانایی حمایت از بقاء نورون‌های حرکتی و سلول‌های عصبی پاراسمپاتیک را دارد (۲۶). علاوه بر این، CNTF همچنین می‌تواند باعث پیشبرد تمایز نورون‌های کولینرژیکی و آستروسیتی و افزایش بقاء نورون‌های حسی و حرکتی، پیش گانگلیونی[33] سمپاتیکی و نورون‌های هیپوکامپ شود (۲۹-۲۷). بر خلاف دیگر اعضاء سایتوکین‌های نوروتروفیک مانند LIF، غلظت بالایی از CNTF مشخص شده است که در نورون‌های سالم وجود دارد (۳۰).

بنابراین مکانیسم حفاظتی درون‌زا در مقابل آسیب آکسونی و آپوپتوز الیگودندروسیت بستگی به افزایش بیان CNTF در MS دارد (۳۲، ۳۱). مطالعات قبلی نشان می‌دهد که هر چند به نظر نمی‌رسد جهش در ژن CNTF با پیشرفت MS مرتبط باشد ولی بیماران مبتلا به یک جهش در ژن CNTF، افزایش شدت این بیماری را نشان می‌دهند (۳۳). البته در مطالعهٔ ما افزایش معنی‌دار در میزان CNTF مشاهده نشد که احتمالاً نشان دهندهٔ این است که در این مدل از MS نقش چندانی ندارد.

به طور کلی این مطالعه نشان داد که شاید فاکتورهای مختلف نوروتروفیک نقش مهمی در بیماری‌زایی MS داشته باشند. این مطالعه نشان داد که هم‌زمان با افزایش پیشرفت بیماری میزان بیان این فاکتورها هم افزایش نشان می‌دهند و تا حدودی می‌توانند باعث بهبود و ترمیم ضایعات شوند؛ و سپس با کم شدن میزان ضایعات این عوامل هم کاهش نشان می‌دهند. مطالعات بیشتری لازم است تا نقش دقیق این فاکتورها در درمان بیماری‌های تحلیل برندهٔ عصبی مانند MS مشخص شود.

منابع

1. Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple Sclerosis--the plaque and its pathogenesis. N Engl J Med. 2006; 354(9): 942-55.

2. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, et al. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing Multiple Sclerosis. N Engl J Med. 2006; 354(9): 899-910.

3. Olson JK, Croxford JL, Calenoff MA, Dal Canto MC, Miller SD. A virus-induced molecular mimicry model of Multiple Sclerosis. J Clin Invest. 2001; 108(2): 311-8.

4. Stankoff B, Aigrot MS, Noël F, Wattilliaux A, Zalc B, Lubetzki C. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) enhances myelin formation: a novel role for CNTF and CNTF-related molecules. J Neurosci. 2002; 22(21): 9221-7.

5. Weihui Huang, Yadan Li, Yufeng Lin, Xue Ye, Dawei Zang. Effects of leukemia inhibitory factor and basic fibroblast growth factor on free radicals and endogenous stem cell proliferation in a mouse model of cerebral infarction. Neural Regen Res. 2012; 7(19): 1469-74.

6. Fang M, He D, Zhang F, Hu Z, Yang J, Jiang H. Antineuroinflammatory and neurotrophic effects of CNTF and C16 peptide in an acute experimental autoimmune encephalomyelitis rat model. Front Neuroanat. 2013; 7: 44. doi: 10.3389/fnana.2013.00044.

7. Caggiula M, Batocchi AP, Frisullo G, Angelucci F, Patanella AK, Sancricca C, et al. Neurotrophic factorsand clinical recovery in relapsing-remitting Multiple Sclerosis. Scand J Immunol. 2005; 62(2): 176-82.

8. Costello F, Stüve O, Weber MS, Zamvil SS, Frohman E. Combination therapies for Multiple Sclerosis: scientific rationale, clinical trials, and clinical practice.

[31] Neurturin
[32] Amyotrophic lateral sclerosis
[33] Preganglionic

Curr Opin Neurol. 2007; 20(3): 281-5.

9. Blakemore WF, Franklin RJ. Remyelination in experimental models of toxin-induced demyelination. Curr Top Microbiol Immunol. 2008; 318: 193-212.

10. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C (T)) method. Methods. 2001; 25(4): 402-8.

11. Ebers G. Natural history of Multiple Sclerosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2001; 71(2): 16-9.

12. Frota ER, Rodrigues DH, Donadi EA, Brum DG, Maciel DR, Teixeira AL. Increased plasma levels of brain derived neurotrophic factor (BDNF) after Multiple Sclerosis relapse. Neurosci Lett. 2009; 460(2): 130-2.

13. Razavi S, Nazem G, Mardani M, Esfandiari E, Salehi H, Esfahani SH. Neurotrophic factors and their effects in the treatment of Multiple Sclerosis. Adv Biomed Res. 2015; 4: 53. doi: 10.4103/2277-9175.151570.

14. Götz R, Köster R, Winkler C, Raulf F, Lottspeich F, Schartl M, et al. Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. Nature. 1994; 372(6503): 266-9.

15. Urschel BA, Hulsebosch CE. Hulsebosch, Schwann cell-neuronal interactions in the rat involve nerve growth factor. J Comp Neurol. 1990; 296(1): 114-22.

16. Hardy K, Spanos S. Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo. J Endocrinol, J Endocrinol. 2002; 172(2): 221-36.

17. Calzà L, Giardino L, Pozza M, Micera A, Aloe L. Time-course changes of nerve growth factor, corticotropin-releasing hormone, and nitric oxide synthase isoforms and their possible role in the development of inflammatory response in experimental allergic encephalomyelitis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997; 94(7): 3368-73.

18. Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. Annu Rev Neurosci. 2001; 24: 1217-81.

19. Shooter EM. Early days of the nerve growth factor proteins. Annu Rev Neurosci. 2001; 24: 601-29.

20. Althaus HH, Klöppner S, Schmidt-Schultz T, Schwartz P. Nerve growth factor induces proliferation and enhances fiber regeneration in oligodendrocytes isolated from adult pig brain. Neurosci Lett. 1992; 135(2): 219-23.

21. Ramer MS, Priestley JV, McMahon SB. Priestley, and S.B. McMahon, Functional regeneration of sensory axone into the adult spinal cord. Nature. 2000; 403(6767): 312-6.

22. Gash DM, Zhang Z, Ai Y, Grondin R, Coffey R, Gerhardt GA. Trophic factor distribution predicts functional recovery in Parkinsonian monkeys. Ann Neurol. 2005; 58(2): 224-33.

23. Henderson CE, Phillips HS, Pollock RA, Davies AM, Lemeulle C, Armanini M, et al. GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. Science. 1994; 266(5187): 1062-4.

24. Arenas E, Trupp M, Akerud P, Ibáñez CF. GDNF prevents degeneration and promotes the phenotype of brain noradrenergic neurons in vivo. Neuron. 1995; 15(6): 1465-73.

25. Vargas-Leal V, Bruno R, Derfuss T, Krumbholz M, Hohlfeld R, Meinl E. Expression and function of glial cell line-derived neurotrophic factor family ligands and their receptors on human immune cells. J Immunol. 2005; 175(4): 2301-8.

26. Lin LF, Mismer D, Lile JD, Armes LG, Butler ET 3rd, Vannice JL, et al. Purification, cloning, and expression of ciliary neurotrophic factor (Cntf). Science. 1989; 246(4933): 1023-5.

27. Ernsberger U, Sendtner M, Rohrer H. Proliferation and differentiation of embryonic chick sympathetic neurons: effects of ciliary neurotrophic factor. Neuron. 1989; 2(3): 1275-84.

28. Saadat S, Sendtner M, Rohrer H. Rohrer, ciliary neurotrophic factor induces cholinergic differentiation of rat sympathetic neurons in culture. J Cell Biol. 1989; 108(5): 1807-16.

29. Lillien LE, Sendtner M, Rohrer H, Hughes SM, Raff MC. Type-2 astrocyte development in rat-brain cultures is initiated by a cntf-like protein produced by type-1 astrocytes. Neuron. 1988; 1(6): 485-94.

30. Stöckli KA, Lottspeich F, Sendtner M, Masiakowski P, Carroll P, Götz R, et al. Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor. Nature. 1989; 342(6252): 920-3.

31. Schönrock LM, Gawlowski G, Brück W. Interleukin-6 expression in human Multiple Sclerosis lesions. Neurosci Lett. 2000; 294(1): 45-8.

32. Vanderlocht J, Hellings N, Hendriks JJ, Vandenabeele F, Moreels M, Buntinx M, et al. Leukemia inhibitory factor is produced by myelin-reactive T cells from Multiple Sclerosis patients and protects against tumor necrosis factor-alpha-induced oligodendrocyte apoptosis. J Neurosci Res. 2006; 83(5): 763-74.

33. Giess R, Mäurer M, Linker R, Gold R, Warmuth-Metz M, Toyka KV, et al. Association of a null mutation in the CNTF gene with early onset of Multiple Sclerosis. Arch Neurol. 2002; 59(3): 407-9.