

Molecular Study of the Effect of Progesterone on Optic Chiasm in Male Rat Following Ethidium Bromide-Induced Demyelination

Shiva Khezri¹,
Sepideh Samadi²,
Fatemeh Rahmani³,
Sepideh Tarbali²

¹ Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran

² MSc in Animal Physiology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran

³ Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran

(Received June 8, 2015 Accepted December 6, 2015)

Abstract

Background and purpose: Optic neuritis is one of the appearances of Multiple Sclerosis (MS). Progesterone has a protective effect in central nervous system, so, in this study we aimed at investigating the effect of progesterone on myelin repair of the optic chiasm in male rats by studying the genes expression of *Olig 2* (marker of oligodendrocyte precursor cells), *GFAP* (marker of astrocyte) and *NogoA* (axon growth inhibitor) following ethidium bromide-induced demyelination.

Materials and methods: An experimental study was performed in which gonadectomy was conducted to remove endogenous sex hormones. Demyelination was induced by injection of 1 microliter of ethidium bromide during stereotactic surgery in the optic chiasm of rats. Then, the animals received 1mM progesterone (ICV) for 3 and 21 days. On days 3 and 21 the *Olig 2*, *GFAP* and *Nogo* genes expression were evaluated by RT-PCR molecular study.

Results: RT-PCR analysis indicated that ethidium bromide injection increased expressions of *Olig2*, *GFAP* and *Nogo-A* genes especially on day 21 post demyelination induction. Progesterone treatment decreased *Olig2* and *GFAP* genes expression ($P<0.001$) and *Nogo-A* gene expression ($P<0.01$) compared to the ethidium bromide group on day 21 post lesion.

Conclusion: Our data demonstrated that progesterone can cause myelin repair and axon growth by decreasing the expression of inhibitory genes such as *Nogo-A* and *GFAP* and enhancing differentiation of oligodendrocyte precursor cells to oligodendrocyte. Therefore, progesterone may exert neuroprotection effect on various neurological disorders including MS.

Keywords: ethidium bromide, demyelination, myelin repair, progesterone, optic chiasm

بررسی مولکولی اثر پروژسترون بر کیاسمای بینایی موش صحرائی نر پس از القای دمیالیناسیون با اتیدیوم بروماید

شیوا خضری^۱سپیده صمدی^۲فاطمه رحمانی^۳سپیده ترابالی^۲

چکیده

سابقه و هدف: درگیری عصب بینایی از جمله تظاهرات بیماری مالتیپل اسکلروزیس (MS) می باشد. با توجه به اثر محافظتی پروژسترون در سیستم عصبی مرکزی، بر آن شدیم تا اثر پروژسترون را بر روند ترمیم میلین ناحیه کیاسمای بینایی موش های صحرائی نر با بررسی بیان ژن های *Olig 2* (مارکر سلول های پیش ساز اولیگودندروسیتی)، *GFAP* (مارکر آستروسیتی) و *Nogo-A* (مهارکننده رشد آکسون) به دنبال القای دمیالیناسیون با تزریق موضعی اتیدیوم بروماید بررسی نماییم.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، به منظور حذف هورمون های جنسی درون زاد، جراحی گنادوکتومی بر روی موش ها انجام گرفت. برای القای دمیالیناسیون، ۱ میکرولیتر اتیدیوم بروماید طی جراحی استریوتاکسی در ناحیه کیاسمای بینایی موش صحرائی تزریق شد. حیوانات تحت درمان، بعد از القای دمیالیناسیون با اتیدیوم بروماید، به مدت ۳ و ۲۱ روز، 1mm پروژسترون داخل بطن مغزی دریافت کردند. در روزهای ۳ و ۲۱، سطح بیان ژن های *Olig 2* و *Nogo-A* به روش مولکولی RT-PCR ارزیابی شد.

یافته ها: آنالیز RT-PCR نشان داد که تزریق اتیدیوم بروماید موجب افزایش بیان ژن های *GFAP*، *Olig2* و *Nogo-A* به خصوص در روز ۲۱ بعد از القای دمیالیناسیون شد. تیمار با پروژسترون باعث کاهش معنی دار بیان ژن *Olig2* و *GFAP* ($p < 0.001$) و *Nogo* ($p < 0.01$) نسبت به گروه اتیدیوم بروماید در روز ۲۱ شد.

استنتاج: نتایج ما نشان داد که پروژسترون می تواند با کاهش بیان ژن های مهار *Nogo* و *GFAP* و افزایش تمایز سلول های پیش ساز اولیگودندروسیتی به اولیگودندروسیت ها، باعث ترمیم میلین و رشد آکسون شود و می تواند حفاظت عصبی را در عارضه های نورولوژیکی مثل MS اعمال کند.

واژه های کلیدی: اتیدیوم بروماید، دمیالیناسیون، ترمیم میلین، پروژسترون، کیاسمای بینایی

مقدمه

(در زنان دو تا سه برابر مردان). مهم ترین علائم این بیماری عبارتند از: فلج، فقدان حس، خستگی، نقایص شناختی و اختلالات بینایی. در این بیماری دمیالینه کننده

مالتیپل اسکلروزیس (Multiple Sclerosis (MS) یکی از شایع ترین بیماری های عصبی در انسان است که با فراوانی قابل توجهی در اوایل بزرگسالی بروز می کند

E-mail: sh.khezri@urmia.ac.ir

مؤلف مسئول: شیوا خضری - ارومیه: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه

۱. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲. کارشناس ارشد فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳. دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۳/۱۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۴/۳/۱۸ تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۹/۱۵

و التهابی مزمن، به علت فعالیت سیستم ایمنی، التهاب بافتی و مرگ سلول بیماری‌های عصبی ایجاد می‌گردد. مشکلات بینایی در بیش‌تر بیماران از نشانه‌های اولیه بیماری است. دویینی، تاری دید و درد حرکات چشم از مشکلات چشمی شایع این بیماری بوده که ممکن است بعد از دوره عود بیماری برطرف شود (۱-۳). دستگاه عصبی مرکزی (CNS) بالغ، از چندین نوع سلول تشکیل شده است که از جمله آن‌ها می‌توان به نورون‌ها، الیگودندروسیت‌ها، آستروسیت‌ها و میکروگلیاها اشاره کرد. یکی از عوارض بیماری MS، دمیلیناسیون است که پس از آن مقداری رمیلیناسیون خود به خودی نیز دیده می‌شود. یکی از علل ناکافی بودن این رمیلیناسیون، اثر ممانعتی زخم آستروسیتی ایجاد شده در محل آسیب است. به عنوان یک شاخص، آستروسیت‌های اطراف محل زخم، پروتئین (Glial Fibrillary Acidic Protein-GFAP) را به مقدار زیاد بیان می‌کنند (۴). رده‌های سلولی اولیه مشتق شده از سلول‌های بنیادی که از شاخصه‌های آن بیان پروتئین (Oligodendrocyte transcription factor 2-Olig2) می‌باشد، تمایل زیادی برای تبدیل شدن به الیگودندروسیت و تا حدی به آستروسیت را دارند (۵). یکی از مهم‌ترین مهارکننده‌های میلینی در بیماری MS، Nogo-A است. چندین استراتژی درمانی برای ترمیم ضایعات آکسونی، Nogo-A را هدف قرار داده‌اند و سعی در مهار اثر متقابل Nogo و گیرنده اش داشته‌اند (۶). تا به حال استراتژی‌هایی که جلوی دمیلیناسیون را می‌گرفتند، به عنوان عمده‌ترین راه درمان MS مورد توجه بودند. این در حالی است که روش‌هایی که رمیلینه شدن را پیش می‌برند و از دست دادن اکسون را به حداقل می‌رسانند، نیز ابزار درمانی مهم می‌باشند. پروژسترون به گروه نورواستروئیدها تعلق دارد و می‌تواند توسط CNS ساخته شود و به عنوان پیش‌ساز سایر نورواستروئیدها قرار گیرد. نقش پروژسترون شامل عملکردهای سیناپسی، محافظت نورونی و اثر بر میلین‌سازی است. اثر

پروژسترون در مدل تجربی بیماری MS یا EAE1 (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis) در نخاع بررسی شده است. نتایج نشان داده که پروژسترون شدت بیماری را تضعیف کرده و میزان پاسخ التهابی را کاهش می‌دهد و می‌تواند دمیلینه شدن در نخاع را تقلیل دهد (۷).

با توجه به گزارشات موجود از اثرات حفاظت نورونی پروژسترون و تفاوت فاحش در میزان ابتلای مردان و زنان به بیماری MS، در این مطالعه سعی شده است اثر پروژسترون بر روند ترمیم میلین ناحیه کیاسمای بینایی موش‌های صحرایی نر بالغ با ارزیابی میزان بیان ژن‌های Olig 2 (مارکر سلول‌های پیش‌ساز اولیگودندروسیتی)، GFAP (مارکر آستروسیتی) و Nogo A (مهارکننده رشد آکسون) به دنبال القای دمیلیناسیون با تزریق موضعی اتیدیوم بروماید (Ethidium Bromide -EB) بررسی گردد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق تجربی، از موش‌های نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم (خریداری شده از دانشگاه علوم پزشکی ارومیه) استفاده شد. آب و رژیم غذایی استاندارد، بدون محدودیت در اختیار حیوانات قرار گرفت. حیوان خانه‌ای با نور ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، رطوبت نسبی ۲۰ تا ۳۰ درصد با دمای بین ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. به منظور سازش با محیط، تمامی آزمایش‌ها پس از اسقرار حیوانات در قفس به انجام رسید و بعد از انجام جراحی‌ها، موش‌ها در قفس‌های انفرادی نگه داری شدند. در این مطالعه کلیه موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی طبق قوانین مصوب کمیته اخلاق در پژوهش‌های پزشکی و مطابق معاهده هلسینکی رعایت شد. این تحقیق به جهت این که روی حیوانات انجام شده است، لازم بود ابتدا منشاء اصلی هورمون‌های جنسی درون‌زاد برای جلوگیری از هرگونه تداخل عمل

با پروژسترون برداشته می‌شد. بنابراین در همه حیوانات، ابتداء بیضه‌ها یا غدد تناسلی به عنوان اصلی‌ترین منشاء هورمون‌های جنسی، حذف شدند. البته زمان کافی برای دوره نقاهت و نیز بر طرف شدن اثرات قبلی هورمون‌های جنسی رعایت گردید.

حیوانات با تزریق داخل صفاقی کتامین (Ketamine) (۷۰ mg/kg) و زایلازین (Xylazine) (۱۰ mg/kg) که در محلول ۰/۹ درصد رقیق شده بودند، بیهوش شدند. حیوان پس از حصول بیهوشی کامل، به روی سطح صفحه فلزی دستگاه الکتروکوتر متصل به دستگاه آن قرار گرفته و پاهای عقبی با استفاده از چسب بر روی صفحه فوق ثابت شد. پوشش بیضه یا اسکروتوم با محلول بتادین ضد عفونی شد. برای ایجاد جریان فرکانسی جهت جراحی، دستگاه الکتروکوتر با یک پنبه خیس شده با آب مقطر که در زیر دم حیوان قرار می‌گرفت، به مدار الکتروکوتر اتصال فیزیکی یافت. اسکروتوم در حد فاصل بین دو بیضه توسط چاقوی رادیوفرکانسی دستگاه کوتر در امتداد خط طولی به اندازه ۱ سانتی‌متر بریده شده و بافت زیرین آن توسط پنس و با کشیده شدن جدا شد. بیضه‌ها به نوبت و با دقت توسط چاقوی کوتر بریده شده و از بدن حیوان جدا گردیدند. برای جلوگیری از خون‌ریزی در این حالت سیستم انعقادی دستگاه الکتروکوتر مورد استفاده قرار گرفت. فضای مورد جراحی با پنبه آغشته به بتادین ضد عفونی شده و بخش خارجی با نخ بخیه استریل بخیه زده شد. دوباره بخش خارجی محل جراحی ضد عفونی گردیده و ۲ میلی گرم به ازاء هر کیلو گرم وزن حیوان، آنتی‌بیوتیک جنتاماکس (Gentamax) به منظور جلوگیری از بروز عفونت به صورت عضلانی به حیوان تزریق شده و تزریق آن به مدت هفت روز تکرار شد. حیوانات جراحی شده به طور انفرادی به قفس کوچک انتقال یافته و برای بهبودی، ۲ هفته دوره نقاهت آن‌ها سپری شد.

جراحی استریوتاکسی

حیوانات با تزریق داخل صفاقی کتامین (۷۰ mg/kg) و زایلازین (۱۰ mg/kg) رقیق شده در محلول ۰/۹ درصد، بیهوش شدند. دمیلیناسیون با تزریق محلول ۱ درصد اتیدیوم بروماید (۸) در محلول استریل سالیین ۰/۹ درصد با حجم ۱ میکرولیتر در کیاسمای بینایی القا شد. موش‌ها با موقعیت سر کاملاً صاف، در دستگاه استریوتاکس (Japan, Narishigo) قرار گرفته و تزریق EB با کمک سرنگ همپلتون با سرعت نیم میکرولیتر در دقیقه در کیاسمای بینایی انجام گرفت. موقعیت کیاسمای بینایی حدود ۰/۱۲ میلی‌متر پشت برگما و ۸/۸ میلی‌متر جلوتر از محور اینتراورال، موقعیت جانبی صفر و عمق ۹ میلی‌متر نسبت به سطح دورا در نظر گرفته شد. به منظور اطمینان از فراهم نمودن زمان لازم برای انتشار داروها، سوزن قبل از خروج، به مدت ۵ دقیقه در محل نگه‌داشته شد. با توجه به مختصات استریوتاکسیک پاکسینوس و واتسون موقعیت استقرار کانول‌های راهنمای تزریق به بطن‌های جانبی ۰/۷۲ میلی‌متر پشت برگما و موقعیت ۱/۸ میلی‌متر از خط میانی به راست و چپ و عمق ۱/۴ از سطح دورا در نظر گرفته شدند (۹) و ۱ mM پروژسترون به مدت ۳ و ۲۱ روز از طریق کانول‌های راهنما به بطن‌های جانبی تزریق شد. ۳ و ۲۱ روز بعد از القای دمیلیناسیون با اتیدیوم بروماید، حیوانات کشته شده و کیاسمای بینایی آن‌ها برای آنالیز ژن‌های مورد نظر خارج شد. حیوانات به طور تصادفی در گروه‌های زیر قرار گرفتند (n=۶).

۱- گروه sham که تحت عمل جراحی استریوتاکسی قرار گرفتند، ولی هیچ تیماری دریافت نکردند.

۲- گروه کنترل سالیین که پس از جراحی استریوتاکسی و قرار دادن کانول راهنما در ناحیه بطن‌های جانبی، در ۲ زیرگروه ۳ و ۲۱ روزه، ۱ میکرولیتر سالیین ۰/۹ درصد (حلال EB) در کیاسمای بینایی تزریق شد.

۳- گروه کنترل روغن زیتون که پس از جراحی استریوتاکسی و قرار دادن کانول راهنما در ناحیه بطن‌های

جانبی، در ۲ زیرگروه ۳ و ۲۱ روزه، ۱ میکرولیتر روغن زیتون (حلال پروژسترون) در بطن‌های جانبی تزریق شد. ۴- گروه بیمار EB که پس از جراحی استریوتاکسی و قراردادن کانول راهنما در ناحیه بطن‌های جانبی، به منظور القای دمیله‌ناسیون، ۱ میکرولیتر EB (از محلول ۰/۰۱ درصد اتیدیوم بروماید در سالین ۰/۹ درصد) در ناحیه کیاسمای بینایی دریافت کردند. این گروه شامل ۲ زیرگروه EB ۳ و ۲۱ روزه بودند، به‌طوری‌که در روزهای ۳ و ۲۱ پس از تزریق EB، بررسی شدند. ۵- گروه تحت درمان با پروژسترون که پس از جراحی استریوتاکسی و قرار دادن کانول راهنما در ناحیه بطن‌های جانبی و تزریق EB در کیاسمای بینایی، در ۲ زیرگروه به مدت ۳ و ۲۱ روز، ۱ میکرولیتر پروژسترون در هر کانول دریافت نمودند.

بررسی‌های مولکولی با روش RT-PCR

نمونه‌ها بعد از خارج شدن از فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد، در هاون‌های استریل و با کمک ازلت مایع پودر شده و بعد از انجام کدگذاری، درون میکروتیوب‌ها ریخته شد. به ازای ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم، ۱۰۰۰ میکرولیتر تریزول بر روی نمونه ریخته شد. سپس به مدت ۳ دقیقه به آرامی تکان داده و سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm انجام گرفت. در مرحله بعد لایه بالایی به آرامی جدا شده و به میکروتیوب‌های جدید انتقال یافت و مقدار ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپیل الکل به آن اضافه شد. سپس به آرامی تکان داده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. در مرحله بعد به آرامی ۱۰۰۰ میکرولیتر از محلول برداشته و دور ریخته شد. سپس ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول به توده RNA موجود اضافه شده، به مدت چند ثانیه ورتکس کرده و پس از ۵ دقیقه سانتریفیوژ با دور ۷۵۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، لایه بالایی را به آرامی درو ریخته و اجازه داده شد توده RNA به آرامی در دمای اتاق خشک

شود. در مرحله آخر RNAase free را اضافه کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰ دمای درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. اندازه‌گیری مقدار غلظت RNA با اسپکتوفتومتر انجام گرفت.

تهیه cDNA

کیت مخصوص سنتز cDNA از شرکت Thermo scientific خریداری شده و آماده کردن نمونه طبق دستورالعمل ارائه شده انجام گرفت. ابتدا مخلوط RNA و پرایمر با آب دیونیزه، به حجم ۱۲ میکرولیتر رسید و در میکروتیوب‌های ۲۰۰ میکرولیتری ریخته شد. به مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و سپس به مدت دو دقیقه روی یخ قرار داده شد، در این فاصله زمانی cDNA سنتتاز آماده شد. بدین ترتیب که ۴ میکرولیتر 5x reaction buffer، ۱ میکرولیتر RibolockRnase inhibitor، ۲ میکرولیتر dNTP ۱۰ مولار و ۱ میکرولیتر RevertAID M-MuLV RT با هم میکس شده و بر روی مخلوط RNA و پرایمر ریخته شد و مخلوط حاصل به ترتیب ۵ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۱ ساعت در ۴۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. محصول واکنش حاصله می‌تواند به طور مستقیم به عنوان نمونه جهت واکنش PCR استفاده شود.

واکنش PCR

واکنش PCR جهت بررسی بیان ژن‌های *Nogo-A*, *GFAP*, *Olig2*, *GAPDH* انجام گرفت. پرایمرهای مربوط به این ژن‌ها، طراحی شده و با توالی‌های ذکر شده از شرکت GENE ray خریداری شد. ترتیب توالی‌ها در جدول شماره ۱ شرح داده شده است. برای انجام واکنش PCR، از ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس که شامل dNTP، $MgCl_2$ ، PCR buffer و Taq polymerase بود، استفاده گردید. ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از جفت پرایمرها با ۱ میکرولیتر cDNA

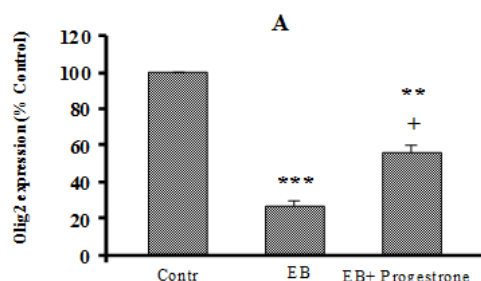
به *GAPDH* برای هر گروه محاسبه و توسط آزمون ANOVA یک طرفه و سپس Turkey مقایسه شد. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار میانگین ارائه شده و $p < 0.05$ به عنوان حداقل سطح معنی دار بودن در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

به دلیل این که تفاوت معنی‌داری در میزان بیان ژن‌های مورد نظر بین گروه‌های sham، کنترل سالیین (حلال EB) و کنترل روغن زیتون (حلال پروژسترون) مشاهده نشد، میانگین داده‌های آن‌ها به عنوان گروه کنترل در نتایج وارد شد.

بررسی تغییرات بیان ژن *Olig2*

اندازه‌گیری میزان بیان ژن *Olig2* (مارکر سلول‌های پیش‌ساز الیگودندروسیتی) در کیاسمای بینایی موش‌های صحرایی نر در روز سوم بعد از القای دمی‌لیناسیون با اتیدیوم بروماید، کاهش معنی‌داری را در بیان این ژن نسبت به گروه کنترل نشان داد ($p < 0.001$). هم‌چنین میزان بیان این ژن در گروه دریافت‌کننده پروژسترون نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.01$). با این وجود تزریق داخل بطنی پروژسترون به مدت ۳ روز باعث افزایش معنادار بیان ژن *Olig2* نسبت به گروه اتیدیوم بروماید شد ($p < 0.05$) (نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱: مقایسه بیان ژن *Olig2* بین گروه‌های کنترل، بیمار (اتیدیوم بروماید: EB) و بیمار با پروژسترون (EB+Progesterone) در روز ۳ بعد از دمی‌لیناسیون. داده‌ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ بیان شده‌اند. $p < 0.001$ ، $p < 0.01$ ، $p < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل، $p < 0.05$ در مقایسه با گروه EB در همان روز.

ترکیب شده و با آب به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. برای انجام واکنش، ابتدا نمونه‌ها به صورت گراداننت گذاشته شد، تا بهترین دما برای واکنش نمونه‌ها با ۴ جفت پرایمر به دست آید.

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای ژن های *Nogo-A*, *GFAP*, *Olig2* و *GAPDH* در واکنش PCR

Primers sequence	Primer	ژن
5'- ACACCCACCACGTGTCGGCTA -3'	Forward	Olig2
5'- CTGCGTCTCTTCTAAGCCCAGA -3'	Reverse	
5'- CTCGTGTGGATCTGGAGAGAA -3'	Forward	GFAP
5'- GCCCTCCAGCAATTTCTGTAG -3'	Reverse	
5'- AAACACCCACATCAACTGCA -3'	Forward	Nogo-A
5'- GTCTCTGCTTTGGAACCTCAGA -3'	Reverse	
5'- AGAACATCCCTGCATCC -3'	Forward	GAPDH
5'- AGCCGTATTCATTGCATACC -3'	Reverse	

برای انجام PCR، سیکل‌های دمایی به ترتیب ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳ دقیقه و ۳۵ سیکل در ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۶۱ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه گذاشته شد و در نهایت هم ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای بسط نهایی قرار داده شد (۱۰).

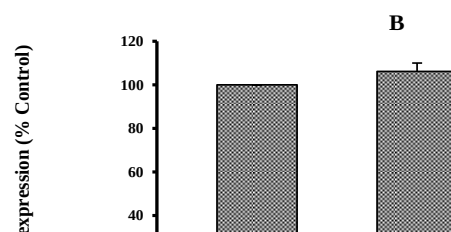
الکتروفورز

جهت انجام الکتروفورز، ابتدا ژل مورد نیاز آن تهیه گردید. برای این کار محلول حاصل از ۱۰۰ ml بافر TBE (Tris-Boric acid-EDTA) و ۱/۳-۰/۸ گرم آگارز (بسته به نیاز و بر اساس کیفیت باندهای در حال بررسی بهینه می‌شد)، در ماکروویو جوشانده شد و بعد از اضافه کردن حدود ۳ μl اتیدیوم بروماید به آن، در تشتک الکتروفورز ریخته شد. بدین منظور از ۲ μl بافر ویژه (Loading Buffer)، ۲ میکرولیتر مارکر DNA (Ladder 50bp) نیز استفاده شد. بعد از سپری شدن زمان مورد نظر، دستگاه الکتروفورز خاموش شده و ژل به دستگاه عکس‌برداری از ژل منتقل و در زیر اشعه UV بررسی باندها انجام گرفت (۱۱).

روش تجزیه و تحلیل آماری

برای بررسی تغییرات سطح mRNA مربوط به ژن *Olig2*، *Nogo* و *GFAP* بین گروه‌های آزمایشی، میانگین نسبت تراکم باندهای *Olig2*، *Nogo* و *GFAP*

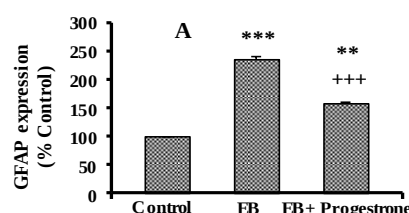
۲۱ روز بعد از القای دمیلیناسیون با EB، میزان بیان ژن *Olig2* افزایش یافت و به حد گروه کنترل رسید. تزریق ۲۱ روز پروژسترون بعد از القای دمیلیناسیون، باعث کاهش معنی داری در بیان ژن *Olig2* نسبت به کنترل و گروه EB شد ($p < 0/001$) (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۲: مقایسه بیان ژن *Olig2* بین گروه های کنترل، بیمار (اتیدیوم بروماید: EB) و تیمار با پروژسترون (EB+Progestrone) در روز ۲۱ بعد از دمیلیناسیون، داده ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ بیان شده اند. $p < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل، $p < 0/001$ در مقایسه با گروه EB در همان روز.

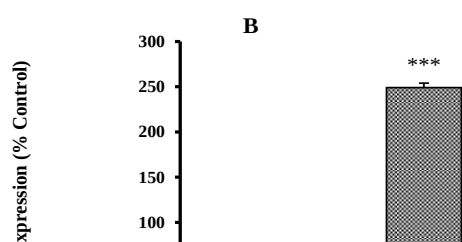
بررسی تغییرات بیان ژن GFAP

اندازه گیری میزان بیان ژن GFAP (مارکر آستروسیت های فعال) در کیاسمای بینایی موش های صحرایی نر در روز سوم نشان داد که تزریق EB باعث افزایش بیان این ژن نسبت به گروه کنترل گردید ($p < 0/001$). این در حالی است که تزریق داخل بطنی پروژسترون به مدت ۳ روز، باعث کاهش معنی دار بیان ژن GFAP نسبت به گروه EB شد ($p < 0/001$) (نمودار شماره ۳).



نمودار شماره ۳: مقایسه بیان ژن GFAP بین گروه های کنترل، بیمار (اتیدیوم بروماید: EB) و تیمار با پروژسترون (EB+Progestrone) در روز ۳ بعد از دمیلیناسیون، داده ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ بیان شده اند. $p < 0/01$ $p < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل، $p < 0/001$ در مقایسه با گروه EB در همان روز.

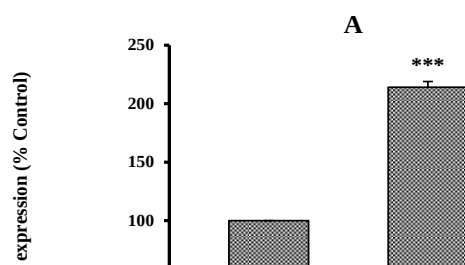
در روز ۲۱ نتایج نشان داد که تزریق EB باعث افزایش بیان این ژن نسبت به گروه کنترل گردید ($p < 0/001$). تزریق ۲۱ روز پروژسترون باعث کاهش شدیدتر این ژن شد، به طوری که بیان آن هم نسبت به گروه کنترل ($p < 0/05$). و هم نسبت به گروهی که فقط EB دریافت کرده بودند، کاهش معنی داری را نشان داد ($p < 0/001$) (نمودار شماره ۴).



نمودار شماره ۴: مقایسه بیان ژن GFAP بین گروه های کنترل، بیمار (اتیدیوم بروماید: EB) و تیمار با پروژسترون (EB+Progestrone) در روز ۲۱ بعد از دمیلیناسیون، داده ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ بیان شده اند. $p < 0/05$ $p < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل، $p < 0/001$ در مقایسه با گروه EB در همان روز.

بررسی تغییرات بیان ژن Nogo-A

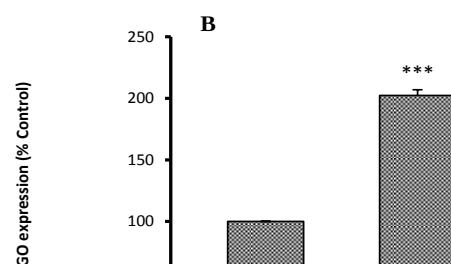
اندازه گیری میزان بیان ژن Nogo-A (یکی از مهارکننده های رشد مجدد آکسونی) در کیاسمای بینایی موش های صحرایی نر نشان داد که تزریق EB باعث افزایش بیان این ژن نسبت به گروه کنترل می شود ($p < 0/001$). تزریق داخل بطنی پروژسترون به مدت ۳ روز اختلاف معنی داری را نسبت به گروه دریافت کننده EB نشان نداد، ولی میزان بیان این ژن نسبت به گروه کنترل در همین روز تفاوت معنی داری داشت ($p < 0/001$) (نمودار شماره ۵).



نمودار شماره ۵: مقایسه بیان ژن Nogo-A بین گروه های کنترل، بیمار (اتیدیوم بروماید: EB) و تیمار با پروژسترون (EB+Progestrone)

در روز ۳ بعد از دمیلیناسیون، داده ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ بیان شده اند. $p < 0.001$ *** در مقایسه با گروه کنترل در همان روز

نتایج در روز ۲۱ نشان داد که تزریق EB باعث افزایش بیان این ژن نسبت به گروه کنترل شد ($p < 0.001$). تزریق پروژسترون به مدت ۲۱ روز، باعث کاهش معنی داری در بیان این ژن نسبت به گروه EB شد ($p < 0.001$) (نمودار شماره ۶).



نمودار شماره ۶: مقایسه بیان ژن *Nogo A* بین گروه های کنترل، بیمار (اتیديوم بروماید: EB) و تیمار با پروژسترون (EB+Progestrone) در روز ۲۱ بعد از دمیلیناسیون، داده ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ بیان شده اند. $p < 0.001$ *** در مقایسه با گروه کنترل، $p < 0.05$ * در مقایسه با گروه EB در همان روز

بحث

در این مطالعه با توجه به اهمیت پروژسترون در حفاظت عصبی، اثر آن روی دمیلیناسیون القا شده با EB و فرآیند ریمیلیناسیون، با استفاده از اندازه گیری بیان *Olig2* (مارکر سلول های پیش ساز الیگودندروسیتی) و *GFAP* (مارکر فعالیت آستروسیتی) و *Nogo-A* (مهارکننده رشد مجدد آکسونی) در روزهای ۳ و ۲۱ بعد از تزریق EB در کیاسمای بینایی موش صحرایی نر بررسی شد.

نتایج حاصل از بررسی مولکولی در این تحقیق نشان داد که متعاقب تزریق اتیديوم بروماید، بیان mRNA مربوط به *Olig2* در روز ۳ به طور معنی داری ($p < 0.001$) نسبت به گروه کنترل کاهش یافت، ولی در روز ۲۱ و با طولانی تر شدن اثر EB، میزان بیان آن افزایش یافت و به حد کنترل رسید. این نتایج حاکی از این هستند که دمیلیناسیون متعاقب تزریق EB باعث از

بین رفتن سلول های میلین ساز بالغ و در نتیجه به کارگیری بیش تر سلول های OPCs برای ساخت و تمایز الیگودندروسیت ها شده است. بنابراین میزان بیان *Olig2* توسط سلول های پیش ساز الیگودندروسیتی متعاقب تزریق EB، افزایش یافته است. Dehghan و همکاران در سال ۲۰۱۲ گزارش کردند که بیان *Olig2* در روزهای بعد از ضایعه افزایش یافته است که می تواند نشان دهنده مهاجرت و فعالیت شمار زیادی از سلول های OPCs در جایگاه های دمیینه شده برای ساخت الیگودندروسیت های بالغ باشد (۱۲). هم چنین Fancy و همکاران نیز نشان دادند که بیان ژن *Olig2* در روزهای بعد از القای دمیلیناسیون در حیوانات بیمار افزایش یافته است و اعلام کردند که این فاکتور برای توسعه دودمان الیگودندروسیتی ضروری است (۱۳). در مطالعه دیگری که توسط مظفری و همکاران در سال ۲۰۱۱ انجام شد، نشان داده شد که بیان *Olig2* در روز ۷ بعد از القای دمیلیناسیون با لیزولستین، بیش ترین میزان را به خود اختصاص داده است. آن ها اعلام کردند که بیان بالای آن به منظور به کارگیری بیش تر سلول های زایای الیگودندروسیتی است تا به الیگودندروسیت های بالغ میلین ساز متمایز شوند (۱۴). نتایج مطالعه حاضر مبنی بر افزایش میزان بیان ژن *Olig2* متعاقب دمیلیناسیون ناشی از EB، با نتایج مطالعات قبلی مطابقت دارد. نتایج به دست آمده از آنالیز RT-PCR در این تحقیق، نشان داد که بیان ژن *Olig2* در گروه تحت تیمار با پروژسترون، در روز ۳، به صورت معنی داری ($p < 0.05$) بالاتر از گروه EB بود. اما در روز ۲۱ ام نسبت به کنترل و EB، کاهش معنی داری داشت ($p < 0.001$). کاهش در بیان ژن *Olig2* در گروه تیمار نسبت به گروه بیمار، ممکن است در نتیجه کاهش تعداد OPCs که این ژن را بیان میکنند و یا تنظیم پایین این فاکتور در خطوط سلولی الیگودندروسیتی باشد که نشان می دهد طی این روزها و در اثر تیمار با پروژسترون، سلول های پیش ساز بیش تری به الیگودندروسیت های بالغ متمایز شده اند و سلول های

بالغ بیش‌تری در محل ضایعه وجود دارد، در نتیجه بیان این فاکتور کاهش یافته است. بنابراین نتایج حاکی از اثر حفاظتی پروژسترون علیه عارضه دمیلینه‌کننده و نیز پیشرفت روند ترمیم میلین می‌باشد. سلول‌های OPCs، به طور وسیعی در میان ماده سفید و خاکستری CNS پراکنده هستند و می‌توانند باعث بازسازی میلین در ناحیه محدودی اطراف ضایعه شوند. مناطق تحت بطنی، به خصوص نواحی جانبی (SVZ-L) و (SVZ-3) به عنوان مناطق نورونیک معرفی شده‌اند (۱۵). این سلول‌ها، می‌توانند در پاسخ به اختلالات دمیلیناسیونی و هم‌چنین در فرآیند رمیلیناسیون CNS بالغ شرکت کنند. بنابراین SVZ منبعی برای آستروسیت‌ها، الیگودندروسیت‌ها و نورون‌ها می‌باشد. القای دمیلیناسیون در CNS، سلول‌های OPCs را وادار به تکثیر، مهاجرت و تمایز برای ذخیره‌سازی غلاف‌های میلینی جدید اطراف آکسون‌های دمیلینه شده می‌کند. نشان داده شده که پروژسترون می‌تواند باعث افزایش تکثیر، مهاجرت و تمایز سلول‌های زایای عصبی شود و این سلول‌های زایا به انواع تخصص یافته مثل نورون‌ها و سلول‌های گلیال متمایز می‌شوند (۱۶،۷). بدین ترتیب احتمالاً پروژسترون با افزایش سرعت تمایز و نورونز می‌تواند در رمیلیناسیون نقش تحریکی داشته باشد. GFAP، یک نوروفیلانت واسطه‌ای است که به عنوان مارکر آستروسیت‌های فعال شناخته می‌شود (۱۷). نتایج حاصل از مطالعه مولکولی در مطالعه حاضر، نشان داد که سطح بیان GFAP در روزهای ۳ و ۲۱ پس از القای دمیلیناسیون با EB، در ناحیه کیاسمای بینایی، در گروه بیمار که تنها EB دریافت کرده بودند، به صورت معنی‌داری ($p < 0.001$) در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت که حاکی از فعالیت آستروسیت‌ها در محل ضایعه می‌باشد. این افزایش در بیان GFAP نشان دهنده تشدید فعالیت آستروسیت‌ها و رهاکردن فاکتورهای التهابی از سوی آن‌ها می‌باشد که رخداد پاتولوژیکی و دمیلینه شدن بیش‌تر کیاسمای بینایی را متعاقب تزریق EB در پی داشته است.

این نتایج با مطالعات مظفری و همکاران که نشان دادند سطح بیان GFAP بعد از القای دمیلیناسیون در اپتیک کیاسما و اعصاب بینایی توسط لیزولستین، در روزهای ۲ و ۷ بیش‌ترین میزان را دارد، مطابقت دارد. آن‌ها هم چنین اعلام کردند که فعالیت آستروسیت‌ها در محل آسیب دیده، در پاسخ به دمیلیناسیون القا شده با لیزولستین افزایش می‌یابد و در نتیجه افزایش در بیان GFAP را به دنبال دارد (۱۸).

Zaaraoui و همکاران در سال ۲۰۰۸، بیان کردند که میزان GFAP با محتوای میلین در طول روند میلین‌سازی مرتبط است. تنظیم افزایشی بیان GFAP یکی از ویژگی‌های اصلی و مهم آستروسیت هاست که معمولاً بعد از ضایعه CNS دیده می‌شود (۱۹).

نتایج مولکولی در این پژوهش نشان داد که بیان GFAP در روز ۳ بعد از تزریق EB در گروه تحت تیمار با پروژسترون، نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشته است ($p < 0.001$)، ولی در روز ۲۱، سطح بیان این ژن نسبت به گروه‌های کنترل و EB کاهش داشته است. مقایسه بین گروه‌های بیمار و تیمار نشان داد، میزان بیان GFAP در تمام روزهای بعد از ضایعه، در گروه تحت تیمار با پروژسترون، به صورت معنی‌داری ($p < 0.001$) نسبت به گروه EB پایین‌تر بود که حاکی از ترمیم میلین و کاهش دمیلیناسیون می‌باشد، چرا که میزان GFAP طی ضایعه ایجاد شده افزایش می‌یابد. بنابراین پروژسترون، توانسته علیه عارضه دمیلینه‌کننده که مرگ سلول‌های عصبی و میلین‌ساز را به دنبال دارد، اثر حفاظت عصبی داشته باشد. آستروسیت‌ها به آسیب‌های مغزی شیمیایی و تروماتیک، با تغییرات بیوشیمیایی و مورفولوژیکی از جمله، گلیکولیز فعال، به صورت افزایش تعداد، پاسخ می‌دهند (۲۰).

مطالعات نشان داده‌اند که پس مانده‌های میلین در آسی‌ها، دارای پروتئین‌های میلینی نظیر MAG، Nogo و MOG بوده که همگی هم فرآیند رمیلیناسیون و هم فرآیند بازسازی آکسونی را مهار می‌کنند. این فاکتورها

در مجموع «فاکتورهای مهار میلینی» نامیده می‌شوند. یکی از مهم‌ترین مهارکننده‌های میلینی، Nogo-A است. چندین استراتژی درمانی برای ترمیم ضایعات آکسونی، Nogo-A را هدف قرار داده‌اند و سعی در مهار اینترکشن Nogo و گیرنده اش داشته‌اند (۶).

NgR^۱ گیرنده اختصاصی Nogo در سال ۲۰۰۱ شناسایی گردید و ساختار کامل آن در سال ۲۰۰۳ مشخص شد. NgR یک گیرنده مشترک برای مهارکننده‌های میلینی (MAG, Nogo, OMgp) است و با فعال کردن مسیر سیگنالینگ Rho A، باعث مهار رشد نوریت و کلاپس مخروط رشد می‌شود (۲۱، ۲۲). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سطح بیان Nogo-A در روز ۳ و ۲۱ بعد از تزریق EB، در گروه بیمار به‌طور معنی‌داری ($p < 0.001$) نسبت به گروه کنترل افزایش یافت که نشان‌دهنده مهار بیش‌تر رمیلیناسیون و رشد آکسونی است. بررسی‌های RT-PCR هم چنین نشان داد تیمار با پروژسترون به مدت طولانی‌تر از ۲۱ روز، توانسته میزان بیان این ژن مهار را کاهش دهد.

خضری و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که مهار سیگنالینگ ژن NgR توسط siRNA می‌تواند باعث کاهش علائم بالینی مدل EAE (مدل آزمایشگاهی بیماری MS در موش) شود (۲۳).

Wang و همکارانش بیان NgR را در سلول‌های بنیادی کاهش دادند و این سلول‌ها را به بافت نخاع آسیب دیده منتقل کردند و مشاهده نمودند که عملکرد

نورولوژیکی رت‌ها بهبودی چشمگیری می‌یابد (۲۴). پس پروژسترون با کاهش ژن Nogo-A می‌تواند اثرات مهار را آن را از روی ترمیم عصبی برداشته و رشد آکسون را تسریع دهد. گزارش‌های متعدد دیگری هم نشان می‌دهد که پروژسترون به عنوان یک عامل محافظتی برای نورون‌ها در آسیب ترومایی عمل کرده و می‌تواند میزان تخریب نورونی را کم تر نماید (۲۵). در موش‌های آزمایشگاهی اسپراگ داوولی نشان دادند که پیش تیمار و درمان حیوانات آسیب دیده در نخاع، با پروژسترون به راحتی می‌تواند علائم مربوط به فلجی نسبی حرکتی در حیوانات را کاهش داده و به‌طور معنی‌داری اثرات محافظتی در بروز آسیب ترومایی نخاع نشان دهد (۲۶). به طور کلی نتایج ما نشان داد که پروژسترون می‌تواند با کاهش بیان ژن مهار Nogo-A و GFAP و افزایش تمایز سلول‌های پیش ساز اولیگودندروسیتی به اولیگودندروسیت‌های بالغ، باعث ترمیم میلین و رشد آکسون شود و می‌تواند حفاظت عصبی را در عارضه‌های نورولوژیکی مختلف مثل MS اعمال کند.

سپاسگزاری

این مطالعه با استفاده از حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه در قالب طرح تحقیقاتی با کد ۹۲/ع/۰۰۸ انجام گردیده است که بدین وسیله نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسئولین آن مرکز ابراز می‌دارند.

References

1. Annapurna A, Kumar VK, Rao PMM, Rao KS, Rajasekhar J. Multiple Sclerosis: the disease and its treatment. Indian J Pharmacol 2002; 34: 3-15.
2. Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple Sclerosis-The Plaque and Its Pathogenesis. N Engl J Med 2006; 354(9): 942-955.
3. Shivane AG, Chakrabarty A. Multiple sclerosis and demyelination. Curr Diagn Pathol 2007; 13(3): 193-202.
4. Sofroniew MV. Reactive astrocytes in neural repair and protection. Neuroscientist 2005; 11(5): 400-407.

5. Copray S, Balasubramaniyan V, Levenge J, De Bruijn J, Liem R, Boddeke E. Olig2 overexpression induces the in Vitro differentiation of neural stem cells into mature oligodendrocytes. *Stem Cells* 2006; 24(4): 1001-1010.
6. Fontoura P, Steinman L. Nogo in multiple sclerosis: growing roles of a growth inhibitor. *J Neurol Sci* 2006; 245(1-2): 201-210.
7. Garay L, Deniselle MC, Lima A, Roig P, De Nicola AF. Effects of progesterone in the spinal cord of a mouse model of multiple sclerosis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 107(3-5): 228-237.
8. Riet-Correa, Fernandes CG, Pereira LAV, Graça DL. Ethidium bromide-induced demyelination of the sciatic nerve of adult Wistar rats. *Braz J Med Biol Res* 2002; 35(1): 99-104.
9. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6thed. New York USA: Academic Press; 2007.
10. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, et al. *Short Protocols in Molecular Biology*. 4th ed. New York: Wiley; 1999.
11. Sharp PA, Sugden B, Sambrook J. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 1973; 12(16): 3055-3063.
12. Dehghan S, Javan M, Pourabdolhossein F, Mirnajafi-Zadeh J, Baharvand H. Basic fibroblast growth factor potentiates myelin repair following induction of experimental demyelination in adult mouse optic chiasm and nerves. *J Mol Neurosci* 2012; 48(1): 77-85.
13. Fancy S P, Zhao C, Franklin RJ. Increased expression of Nkx2. 2 and Olig2 identifies reactive oligodendrocyte progenitor cells responding to demyelination in the adult CNS. *Mol and Cell Neurosci* 2004; 27(3): 247-254.
14. Mozafari S, Javan M, Sherafat MA, Mirnajafi-Zadeh J, Heibatollahi M, Pour-Beiranvand S, et al. Analysis of structural and molecular events associated with adult rat optic chiasm and nerves demyelination and remyelination: possible role for 3rd ventricle proliferating cells. *Neuromolecular Med* 2011; 13(2): 138-150.
15. McTigue DM, Tripathi RB. The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS. *J Neurochem* 2008; 107(1): 1-19.
16. Ghomari AM, Baulieu EE, Schumacher M. Progesterone increases oligodendroglial cell proliferation in rat cerebellar slice cultures. *Neuroscience*. 2005; 135(1): 47-58
17. Sherafat MA, Javan M, Mozafari S, Mirnajafi-Zadeh J, Motamedi F. Castration attenuates myelin repair following lysolecithin induced demyelination in Rat Optic Chiasm: An Evaluation using visual evoked potential, marker genes expression and myelin staining. *Neurochem Res* 2011; 36(10): 1887-1895.
18. Mozafari S, Sherafat MA, Javan M, Mirnajafi-Zadeh J, Tiraihi T. Visual evoked potentials and MBP gene expression imply endogenous myelin repair in adult rat optic nerve and chiasm following local lysolecithin induced demyelination. *Brain Res* 2010; 1351: 50-56.
19. Zaaraoui W, Deloire M, Merle M, Girard C, Raffard G, Biran M, et al. Monitoring demyelination and remyelination by magnetization transfer imaging in the mouse brain. *MAGMA* 2008; 21(5): 357-362.
20. Aschner M. Astrocytic functions and physiological reactions to injury: the potential to induce and/or exacerbate

- neuronal dysfunction-a forum position paper. *Neurotoxicology* 1998; 19(1): 7-17.
21. Lee D, Strittmatter S, Sah D. Targeting the Nogo receptor to treat central nervous system injuries. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2(11): 872-878.
22. He Z, Koprivica V. The Nogo signaling pathway for regeneration block. *Annu Rev Neurosci* 2004; 27: 341-368.
23. Khezri Sh, Javan M, Goudarzvand M, Semnanian S, Baharvand H. Dibutyl Cyclic AMP inhibits the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis and potentiates recruitment of endogenous neural stem cells. *J Mol Neurosci* 2013; 51(2): 298-306.
24. Wang F, Zhu Y. The interaction of Nogo-66 receptor with Nogo-P4 inhibits the neuronal differentiation of neural stem cells. *Neuroscience* 2008; 151(1): 74-81.
25. Sayeed I, Stein DG. Progesterone as a neuroprotective factor in traumatic and ischemic brain injury. *Prog Brain Res* 2009; 175: 219-237.
26. Thomas AJ, Nockels RP, Pan HQ, Shaffrey CI, Chopp M. Progesterone is neuroprotective after acute experimental spinal cord trauma in rats. *Spine (Phila Pa 1976)* 1999; 24(20): 2134-2138.