

مقاله پژوهشی

تعیین دقیقترین روش از بین چند روش مختلف بافت‌شناسی جهت ارزیابی اثربخشی ترکیبات محافظ نرونی در مدل حیوانی بیماری مولتیپل اسکلروزیس

نیما سندگل^{۱*}، محمد شریف‌زاده^۲، پریسا مالکی^۳

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زابل، زابل، ایران

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

۳. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک، اراک، ایران

پذیرش: ۱۱ شهریور ۱۳۹۷

دریافت: ۱۹ اردیبهشت ۱۳۹۷

چکیده

زمینه و هدف: در این مطالعه دقیقترین روش بافت‌شناسی جهت ارزیابی اثربخشی ترکیبات محافظ نرونی در مدل حیوانی بیماری ام اس بررسی گردیده است.

روش‌ها: موش‌های C57BL/6 به مدت ۶ هفته در گروه‌های: کنترل، کنترل + بنزوآریک اسید (۸۰ mg/kg، ۴۰ و ۲۰ در ۲ هفته آخر)، کوپریزون (۰/۲٪) جهت تخریب نرونی (مدل ام اس) و کوپریزون + بنزوآریک اسید تحت بررسی قرار گرفتند. در پایان هفته ششم میزان آسیب میلین توسط آزمون‌های ایمونوهیستوشیمی (IHC)، رنگ‌آمیزی‌های هماتوکسیلین-ئوزین (H & E) و لوکسال فست بلو (LFB) و همچنین تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) ارزیابی گردید.

یافته‌ها: در گروه کوپریزون هر چهار روش تخریب معنادار میلین را در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند ($p < 0/001$). در روش LFB حتی بالاترین غلظت بنزوآریک اسید نیز نتوانست در مقایسه با گروه کوپریزون بهبود معناداری را نشان دهد. سایر روش‌ها شامل IHC، H & E و TEM همگی تفاوت معناداری در اثرات حفاظتی غلظت زیاد بنزوآریک اسید در مقایسه با گروه کوپریزون نشان دادند. تنها در نتایج حاصل از روش TEM بود که در غلظت متوسط بنزوآریک اسید نیز اثرات حفاظتی معناداری مشاهده شد ($p < 0/05$).

نتیجه‌گیری: TEM به‌عنوان حساس‌ترین و LFB به‌عنوان ضعیف‌ترین روش شناخته شدند. همچنین نتایج این مطالعه استفاده همزمان از روش‌های دیگر چون H & E جهت بررسی میزان التهاب عصبی و IHC جهت تایید نتایج TEM را پیشنهاد می‌کند. توصیه می‌شود در صورت عدم دسترسی به روش‌های فوق به‌روش‌های دارای دقت زیاد مانند TEM و IHC اتکا شود.

واژه‌های کلیدی: اسکلروز مولتیپل، ایمونوهیستوشیمی، کوپریزون، لوکسال فست بلو، هماتوکسیلین-ئوزین

مقدمه

عصبی مغز و نخاع جهت ارتباط با یکدیگر می‌شود. در حال حاضر، در ایران از هر صد هزار نفر حدود ۵۰ نفر به بیماری ام اس مبتلا هستند و شیوع این بیماری در استان‌های تهران، فارس و اصفهان بیشتر از سایر استان‌های کشور بوده و متأسفانه این میزان رو به افزایش است [۱].

ام اس یک بیماری موروثی نیست با این حال برخی از

مولتیپل اسکلروزیس^۱ یا ام اس بیماری است که در آن غلاف میلین اطراف اکسون در نورون‌های سیستم عصبی مرکزی^۲ تخریب شده و منجر به اختلال در توانایی سلول‌های

¹ Multiple sclerosis (MS)

² CNS

EAE، بهترین مدل جهت بررسی التهاب سیستم عصبی مرکزی است ولی بررسی رemyelination در آن بسیار مشکل بوده زیرا این پدیده همزمان با ایجاد demyelination اتفاق می‌افتد در نتیجه امکان تمایز آن‌ها از هم به سختی امکان‌پذیر است [۶]. بنزواریک اسید (BA) یک ترکیب فنلی و آنتی‌اکسیدانی طبیعی است که اخیراً خواص ضدالتهابی و اثرات مهارکنندگی آن در ایجاد بیماری‌های متعددی از جمله سرطان و دیابت از طریق کاهش استرس‌های اکسیداتیو مشخص شده است [۷]. به گفته پژوهشگران آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند با اختلال در مهاجرت سلول‌های ایمنی خصوصاً لنفوسیت‌های T به دستگاه عصبی مرکزی و مهار آنزیم‌های اکسیدکننده در درمان بیماری ام اس موثر باشند [۸]. این مطالعه با هدف بررسی بهترین روش بافتی نشان‌دهنده نقش حفاظتی BA بر تخریب میلین ایجاد شده در مدل حیوانی ام اس القا شده توسط کوپریزون انجام گردید.

مواد و روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی

تعداد ۴۸ سر موش C57BL/6 بالغ نر ۸-۹ هفته در محدوده وزنی ۲۳-۱۸ گرم از انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. حیوانات به صورت شش‌تایی در قفس قرار گرفتند و در حیوانخانه بادمای $23 \pm 2^\circ\text{C}$ و دوره تاریکی-روشنایی ۱۲ ساعته در دانشگاه علوم پزشکی تهران نگهداری شدند. آب و غذا به صورت آزاد در اختیار حیوانات قرار می‌گرفت. رعایت نکات اخلاقی منطبق با منشور اخلاقی هلسینکی در مورد کلیه حیوانات جهت به حداقل رساندن آزار به حیوانات (کد ۹۵۱۷-۱۳) صورت گرفت [۹].

ایجاد مدل کوپریزون

در ابتدا جهت ایجاد مدل کوپریزون، غذای حیوان‌ها به اندازه آرد پودر گردید و در ظروف مخصوصی قرار داده شد. قفس‌ها به منظور سمی‌نکردن فضای حیوانخانه در فضای جداگانه‌ای در زیر هود نگهداری شدند. جهت ایجاد مدل، غذای حاوی کوپریزون ۰/۲٪ به مدت شش هفته به حیوانات داده شد و در دو هفته آخر مداخلات دارویی به صورت تزریق داخل

تغییرات ژنتیکی ریسک ابتلا و پیشرفت بیماری را افزایش می‌دهند [۲]. با این‌که هنوز درمان قطعی برای بیماری ام اس مشخص نشده است هدف از اقدامات درمانی فعلی برگرداندن عملکرد سیستم عصبی به حالت اولیه، جلوگیری از بروز حملات جدید و پیشگیری از بروز ناتوانی در بیماران است. درمان‌های دیگری نیز به‌منظور ایجاد ترمیم در بافت عصبی از جمله فاکتورهای رشد و سلول‌های بنیادی مورد استفاده قرار گرفته‌اند که درمان قطعی را به دنبال نداشته و مشکلات رد پیوند و مهار ایمنی را به دنبال دارند [۳].

کوپریزون یک شلاتور مس می‌باشد که استفاده از آن موجب مرگ اختصاصی الیگودندروسیت‌ها و تخریب میلین^۳ با قابلیت برگشت‌پذیری یا رemyelination^۴ خود به خودی (پس از یک هفته توقف مصرف کوپریزون) می‌گردد [۴]. تغذیه همراه با کوپریزون به میزان ۰/۲٪ وزن غذا، یکی از رایج‌ترین مدل‌های مورد استفاده برای آزمایش demyelination و رemyelination است. در این مدل از میان نواحی مختلف مغز، بیشتر تحقیقات بر روی کورپوس کالوزوم^۵ و پایک‌های مخچه‌ای فوقانی^۶ به عنوان ماده سفید مغز انجام می‌شود. کوپریزون به دلیل آسیب به سیستم انتقال الکترولیت میتوکندری و مهار فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز وابسته به مس باعث اختلال در تولید آدنوزین تری فسفات شده و همچنین منجر به ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو در سلول می‌گردد [۵].

از مزیت‌های مهم مدل کوپریزون، مراحل demyelination و رemyelination واضح و برگشت‌پذیر بدون آسیب سدخونی و مغزی است که به راحتی قابل تشخیص هستند. از معایب اصلی این مدل می‌توان به ناشناخته بودن مکانیسم ایجاد demyelination توسط کوپریزون اشاره کرد که می‌تواند باعث سختی در شناسایی عوامل موثر در از بین رفتن الیگودندروسیت‌های بالغ و در نتیجه ایجاد demyelination گردد [۴، ۵].

پس از ایجاد demyelination توسط کوپریزون و توقف تجویز آن، ساخت مجدد میلین در طول یک هفته اتفاق می‌افتد. بیان مجدد پروتئین‌های میلین این امکان را فراهم می‌کند که مراحل رemyelination و تأثیرات آن بررسی شود. این در حالی است که با وجود این که مدل آنسفالومیلیت آلرژیک تجربی^۷ یا

³ Demyelination

⁴ Remyelination

⁵ Corpus callosum

⁶ Superior cerebellar peduncles

⁷ Encephalomyelitis experimental allergic

صفاقی^۸ در ساعات معینی هنگام ظهر، روزانه به مدت چهارده روز صورت گرفت [۱۰].

گروه‌های مورد آزمایش

گروه کنترل: شامل موش‌های سالمی که شش هفته غذای پودر شده فاقد کوپریزون به همراه تزریق داخل صفاقی ۱۰۰ μ L حلال BA (دی متیل سولفوکساید^۹: بافر نمکی فسفات^{۱۰}) را در دو هفته آخر دریافت نمودند.

گروه کنترل + BA: شامل موش‌های سالم بوده که به سه زیر گروه تقسیم می‌شوند:

(۱) موش‌های سالم دریافت‌کننده BA (۲۰ mg/kg) در دو هفته آخر.

(۲) موش‌های سالم دریافت‌کننده BA (۴۰ mg/kg) در دو هفته آخر.

(۳) موش‌های سالم دریافت‌کننده BA (۸۰ mg/kg) در دو هفته آخر.

گروه کوپریزون: شامل موش‌های سالم که شش هفته غذای پودر شده حاوی ۰/۲٪ کوپریزون به همراه تزریق حلال BA را در دو هفته آخر دریافت نمودند.

گروه کوپریزون + BA: این گروه شامل موش‌های تغذیه‌شونده با غذای حاوی ۰/۲٪ کوپریزون برای شش هفته بوده که در دو هفته آخر BA را نیز به صورت تزریق دریافت کردند. این گروه شامل سه زیر گروه بود:

(۱) موش‌های مدل دریافت‌کننده BA (۲۰ mg/kg) در دو هفته آخر.

(۲) موش‌های مدل دریافت‌کننده BA (۴۰ mg/kg) در دو هفته آخر.

(۳) موش‌های مدل گروه دریافت‌کننده BA (۸۰ mg/kg) در دو هفته آخر.

آماده سازی نمونه‌های بافتی

در پایان هفته ششم، تعداد پنج سر موش به‌صورت تصادفی از هر گروه انتخاب شدند. پس از ایجاد بی‌هوشی عمیق توسط کتامین و زایلازین (هر دو از شرکت Sigma-Aldrich، انگلستان) قفسه سینه باز و سپس

۱۵ میلی‌لیتر محلول PBS سرد درون بطن چپ پرفیوژ شد تا تمامی خون موجود در عروق از دهلیز راست قلب حیوان خارج گردد. سپس ۱۵ میلی‌لیتر محلول پارافرم آلدئید (شرکت Merck، آلمان) ۴٪ سرد درون بطن چپ پرفیوژ شد. مغز از درون مجسمه خارج شد و ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در محلول پارافرم آلدئید ۴٪ در دمای ۴ °C قرار گرفت و سپس به مدت ۲۴ ساعت در محلول سوکروز ۱ مولار (شرکت Merck، آلمان) در دمای ۴ °C قرار گرفت. در مرحله بعد، مغز در قالب‌های مخصوص قرار داده شد و روی آن محلول فیکس‌کننده OCT^{۱۱} ریخته شد تا کاملاً آن را بپوشاند. سپس بافت مغز بلافاصله به فریزر ۸۰ °C منتقل گردید و جهت آزمایش TEM^{۱۲}، ناحیه کورپوس کالوزوم جدا (در قطعات یک میلی‌متر) و در محلول گلو تار آلدئید ۳٪ در بافر Cacodylate در دمای ۴ °C قرار داده شد [۱۱].

بررسی التهاب با استفاده از رنگ‌آمیزی همتوکسیلین/اُئوزین

به منظور بررسی بافت آسیب‌دیده و تاثیر مداخلات دارویی، برش‌های بافتی ۵ میکرونی از ناحیه مدیال کورپوس کالوزوم توسط دستگاه کرایو سکشن (شرکت Wetzlar، آلمان) تهیه شدند و سپس رنگ میزی معمول همتوکسیلین-اُئوزین (شرکت Merck، آلمان) به روش استاندارد با افزودن رنگ‌های اختصاصی انجام گرفت. لام‌ها بعد از خشک‌شدن فیکس‌شده و با میکروسکوپ نوری بررسی شدند. با این روش رنگ‌آمیزی هسته سلول‌ها رنگ آبی کم‌رنگ تا بنفش و سیتوپلاسم‌ها رنگ صورتی پررنگ به خود گرفتند. از هر نمونه تعداد ۱۲ برش توسط میکروسکوپ نوری و بزرگنمایی ۴۰ ارزیابی شد [۱۲].

بررسی دمی‌لینیشن توسط رنگ‌آمیزی لوکسال فست بلو^{۱۳}

در مرحله اول محلول رنگ آماده شد به این ترتیب که لوکسال فست بلو (شرکت Sigma، آلمان) و اسید استیک (شرکت Merck، آلمان)، به همراه الکل ۹۵٪ (ایران) مخلوط و صاف شد. سپس برش‌ها در محلول رنگ آماده‌شده قرار داده شدند (دمای ۶۰ °C). در مرحله بعد برش‌ها در معرض الکل و

¹¹ Optimal cutting temperature (OCT)

¹² Transmission electron microscopy (TEM)

¹³ LFB

⁸ i.p.

⁹ DMSO

¹⁰ PBS

(۱:۱۰۰۰) روی لام ریخته، به مدت ۶ ساعت در 37°C انکوبه نمودیم. لکه‌های پروتئین MOG توسط پراکسید هیدروژن و دی‌آمینو بنزیدین قابل مشاهده گردیدند (قهوه‌ای مایل به زرد). مرحله آبیگری انجام، سپس لام‌ها فیکس شده و با میکروسکوپ نوری مطالعه و عکس‌های گرفته‌شده با بزرگنمایی ۲۰۰ برابر جهت ارزیابی درصد پیکسل‌ها یا همان تعداد سلول‌های مثبت توسط نرم افزار Image J مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند [۱۳]. به منظور بررسی سلول‌های MOG مثبت، سه نمونه از هر گروه و در هر نمونه ۱۰ برش سریال از منطقه مدیال کورپوس کالوزوم ارزیابی شد. میانگین تعداد پیکسل‌های مثبت در واحد سطح (میلی متر مربع) منطقه مدیال کورپوس کالوزوم در گروه کنترل محاسبه شد و به عنوان رفرنس، ۱۰۰ درصد تعیین گردید. تغییرات ایجاد شده در گروه‌های دیگر نسبت به گروه کنترل به درصد گزارش گردید.

بررسی غلاف میلین توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری^{۱۷}

قطعات مغز حاوی ناحیه کورپوس کالوزوم همان روز به آزمایشگاه میکروسکوپ الکترونی جهت انجام مراحل بعدی انتقال داده شد. کلیه مراحل شستشو، آبیگری، نفوذ تدریجی با حلال (اکسیدروپیلن)، نفوذ تدریجی با رزین، قالبگیری، برش و در نهایت قرار دادن در گرید در آزمایشگاه گروه آناتومی دانشگاه علوم پزشکی ایران توسط تکنیسین مربوطه انجام و عکسبرداری‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی مدل DSM-960A (شرکت Zeiss، آلمان) انجام پذیرفت. عکس‌ها توسط نرم افزار Image J ارزیابی و نتیجه به عنوان G-ratio (نسبت شعاع داخلی غلاف میلین به شعاع خارجی آن) در ناحیه کورپوس کالوزوم گزارش گردید [۱۴].

آنالیز داده‌ها

جهت انجام محاسبات آماری داده‌ها، از نرم‌افزار GraphPad Prism 6 استفاده شد. آزمون آماری مورد استفاده، آنالیز واریانس یک طرفه یا در صورت لزوم دو طرفه به همراه آزمون مقایسه‌های چندگانه یا post-hoc از نوع Bonferroni بود. $p < 0.05$ به عنوان معیار معنی‌دار بودن در نظر گرفته شد [۱۵].

آب قرار گرفتند تا کاملاً شستشو شوند. تمایز رنگ بافت‌ها با کربنات لیتیم ۰/۵٪ (برای چند ثانیه) و الکل ۷۰٪ (۳۰-۲۰ ثانیه) انجام گرفت. برش‌ها در آب مقطر برای ۲ دقیقه شیک شده و سپس با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. در این مرحله بافت خاکستری مغز رنگ نگرفت و ماده سفید به دلیل تمایل زیاد لوکسال فست بلو به چربی موجود در میلین به رنگ آبی در آمد. برای بررسی بافت از میکروسکوپ نوری و بزرگنمایی ۱۰ استفاده شد. مناطق دمیلینه به رنگ صورتی و مناطق سالم به رنگ آبی در این رنگ‌آمیزی مشخص شدند. نسبت دو ناحیه آبی و صورتی در ناحیه مدیال کورپوس کالوزوم توسط نرم افزار Image J مورد ارزیابی قرار گرفت و نتیجه تحت عنوان percentage of volume fraction در ناحیه آسیب دیده نسبت به کل منطقه مدیال کورپوس کالوزوم گزارش شد. از هر نمونه، تعداد ۱۲ برش مورد ارزیابی میزان دمیلینیشن قرار گرفت [۱۳].

بررسی دمیلینیشن توسط رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی^{۱۸} مارکر MOG^{۱۹}

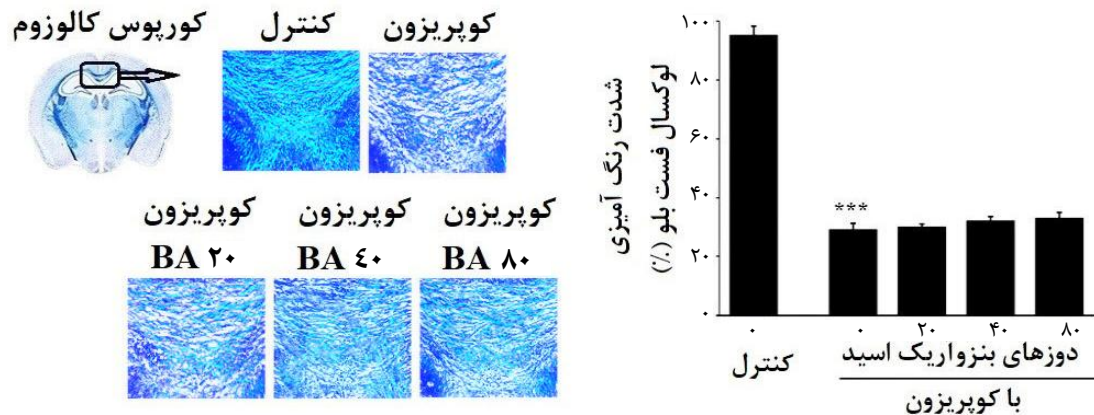
برش‌های بافتی ۵ میکرونی از ناحیه مدیال کورپوس کالوزوم توسط دستگاه کرایوسکشن برای رنگ‌آمیزی آماده شدند. برش‌ها در محلول PBS غوطه‌ور گشته و سپس بر روی لام سیلانه چسبانده شدند و در دمای 37°C به مدت ۲ ساعت نگه‌داری گردیدند. در مرحله بعد، لام‌ها به مدت ۵ دقیقه در آب اکسیژنه (۸٪) غوطه‌ور شده تا پراکسیداز داخلی مهار شود. در مرحله بعد، لام‌ها ۵ دقیقه در محلول PBS شسته شده و سپس آنتی‌بادی اختصاصی علیه گلیکوپروتئین اصلی میلین و مارکر الیگودندروسیت‌های بالغ میلین‌ساز (شرکت Merck، آلمان) با غلظت مناسب (۱:۲۵۰) روی آن ریخته شد و به مدت ۱۲ ساعت در دمای 4°C انکوبه گردید. سپس برای شستشو از دو محلول استفاده گردید. محلول اول که همان بافر شستشو است و به مدت ۵ دقیقه با حرکات ملایم لام‌ها در درون آن قرار گرفتند و سپس لام‌ها در محلول دوم که همان PBS است به مدت ۵ دقیقه به آرامی چندین بار تکان داده شدند. آنتی‌بادی ثانویه متصل به HRP^{۲۰} با غلظت مناسب

¹⁴ IHC

¹⁵ Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)

¹⁶ Horseradish peroxidase (HRP)

¹⁷ TEM



شکل ۱- اندازه‌گیری میزان تخریب میلین توسط رنگ‌آمیزی لوکسال فست بلو در گروه‌های کنترل، کوپریزون و کوپریزون + بنزوآریک اسید (دوزهای مختلف). مناطق آبی در ناحیه مدیال کورپوس کالوزوم نشان‌دهنده ناحیه سالم (در گروه کنترل) می‌باشد در حالی که مناطق آسیب‌دیده به رنگ آبی کم‌رنگ یا سفید (در گروه کوپریزون) تغییر رنگ داده‌اند. کوپریزون به صورت معناداری باعث تخریب میلین گردید ولی تفاوت معنی‌داری بین هیچ یک از دوزهای بنزوآریک اسید در مقایسه با گروه کوپریزون مشاهده نشد. تصاویر با اندازه مقیاس ۵۰ μm و بزرگنمایی (۲۵ $\times$) نشان داده شد و داده‌ها براساس میانگین $\pm$ انحراف معیار از میانگین گزارش گردید. علامت (*) نماد تفاوت با گروه کنترل است ($0.001 < p < 0.05$).

یافته‌ها

تایید ایجاد مدل کوپریزون

پس از شش هفته، نتایج حاصل از هر سه روش رنگ‌آمیزی LFB (شکل ۱)، ایمونوهیستوشیمی MOG (شکل ۲) و تصویربرداری TEM (شکل ۳) کاهش معنی‌دار میزان میلین در مقایسه با گروه کنترل را نشان داد ($p < 0.001$).

بررسی اثرات حفاظتی بنزوآریک اسید با روش LFB

در این مطالعه، رنگ‌آمیزی LFB تفاوت معناداری را در کاهش تخریب میلین پس از درمان با غلظت‌های متفاوت بنزوآریک اسید در مقایسه با گروه کوپریزون در ناحیه کورپوس کالوزوم نشان نداد (شکل ۱). بر اساس نتایج، این روش تیمار موش‌های مدل با غلظت‌های متفاوت بنزوآریک اسید تاثیر حفاظتی معناداری بر دمیلینشن ناشی از کوپریزون در ناحیه کورپوس کالوزوم نداشت. از طرف دیگر، تیمار موش‌های سالم با بنزوآریک اسید اثر آماری معناداری را بر مقدار میلین با روش رنگ‌آمیزی LFB در ناحیه کورپوس کالوزوم در مقایسه با موش‌های سالم نشان نداد.

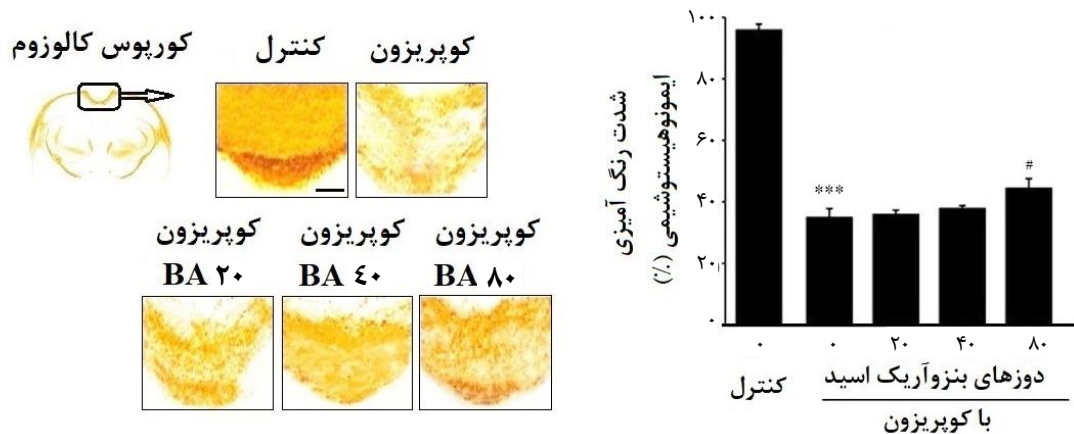
بررسی اثرات حفاظتی بنزوآریک اسید با روش IHC

در این مطالعه، رنگ‌آمیزی IHC تنها تفاوت آماری معناداری ($p < 0.05$) را در کاهش تخریب میلین پس از درمان با غلظت بالای بنزوآریک اسید (۸۰ mg/kg) در مقایسه با

گروه کوپریزون در ناحیه کورپوس کالوزوم نشان داد (شکل ۲). بر اساس نتایج، این روش، تیمار موش‌های مدل با غلظت‌های پایین (۲۰ mg/kg) و متوسط (۴۰ mg/kg) بنزوآریک اسید تاثیر حفاظتی معناداری بر دمیلینشن ناشی از کوپریزون در ناحیه کورپوس کالوزوم نداشت (شکل ۲). از طرف دیگر تیمار موش‌های سالم با بنزوآریک اسید اثر آماری معناداری را بر مقدار میلین با روش رنگ‌آمیزی IHC مولکول MOG در ناحیه کورپوس کالوزوم در مقایسه با موش‌های سالم نشان نداد.

بررسی اثرات حفاظتی بنزوآریک اسید با روش TEM

در این مطالعه، مشاهدات میکروسکوپ الکترونی عبوری تفاوت آماری معناداری را در کاهش تخریب میلین پس از درمان با هر دو غلظت بالا (۸۰ mg/kg، $p < 0.01$) و متوسط بنزوآریک اسید (۴۰ mg/kg، $p < 0.05$) در مقایسه با گروه کوپریزون در ناحیه کورپوس کالوزوم نشان داد (شکل ۳). بر اساس نتایج، این روش، تنها تیمار موش‌های مدل با غلظت پایین (۲۰ mg/kg) بنزوآریک اسید تاثیر حفاظتی معناداری بر دمیلینشن ناشی از کوپریزون در ناحیه کورپوس کالوزوم نداشت (شکل ۳). از طرف دیگر، تیمار موش‌های سالم با بنزوآریک اسید اثر آماری معناداری را بر مقدار میلین با روش میکروسکوپ الکترونی عبوری در ناحیه کورپوس کالوزوم در مقایسه با موش‌های سالم نشان نداد.

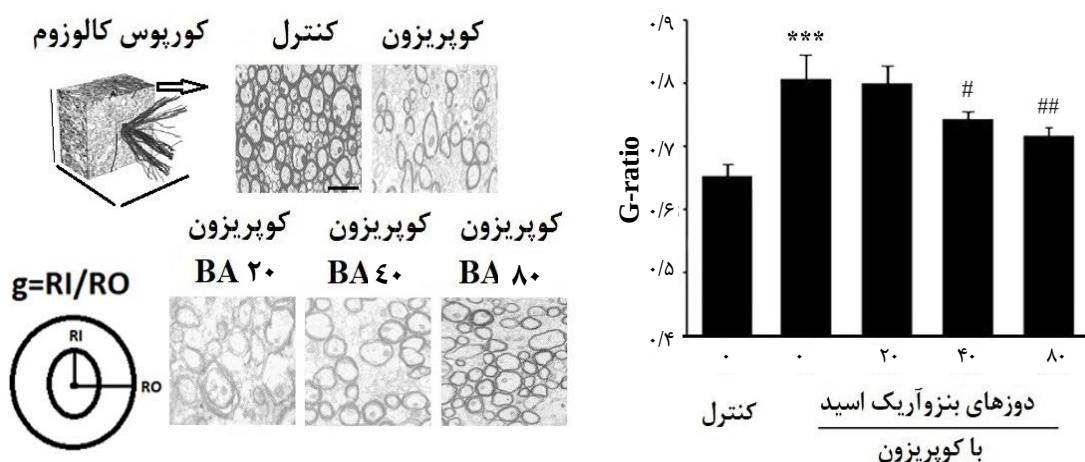


شکل ۲- اندازه‌گیری میزان تخریب میلین توسط رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی مولکول MOG در گروه‌های کنترل، کوپریزون و کوپریزون + بنزوآریک اسید (دوزهای مختلف). مناطق قهوه‌ای پررنگ در ناحیه مدیال کورپوس کالوزوم نشان‌دهنده ناحیه سالم (در گروه کنترل) می‌باشد در حالی که مناطق آسیب‌دیده به قهوه‌ای کم‌رنگ یا رنگ سفید (در گروه کوپریزون) تغییر رنگ داده‌اند. کوپریزون به صورت معناداری باعث تخریب میلین گردید و همچنین تفاوت معنی‌داری بین دوز بالای بنزوآریک اسید در مقایسه با گروه کوپریزون مشاهده شد. تصاویر با اندازه مقیاس $50 \mu\text{m}$ و بزرگنمایی $(\times 25)$ نشان داده شد و داده‌ها براساس میانگین $\pm$ انحراف معیار از میانگین گزارش گردید. علامت (*) نماد تفاوت با گروه کنترل و علامت (#) نماد تفاوت با گروه کوپریزون است ($p < 0.001$ و $p < 0.05$).

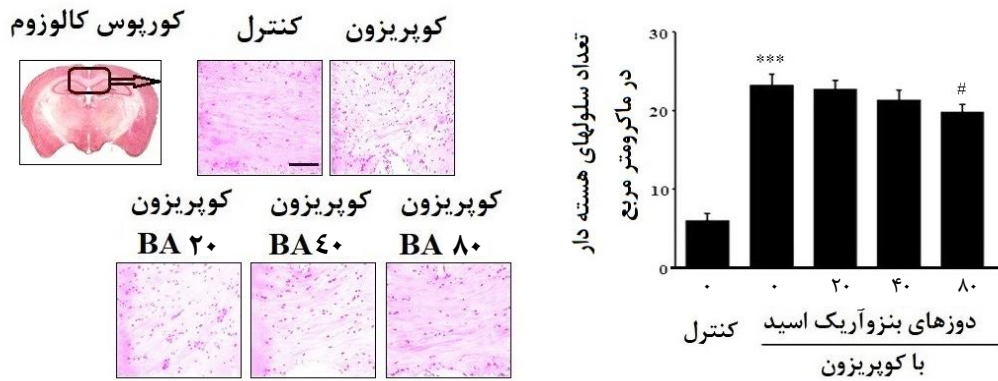
(شکل ۴). علی‌رغم کاهش حضور سلول‌های خونی در منطقه کارپوس کالوزوم به صورت وابسته به دوز، تنها بنزوآریک اسید با غلظت بالا (80 mg/kg) به مدت دو هفته باعث کاهش آماری معنی‌داری ($p < 0.05$) در این سلول‌ها گردید (شکل ۴). همچنین براساس نتایج، این تست تیمار موش‌های سالم با

بررسی اثرات حفاظتی بنزوآریک اسید با روش H&E

در این مطالعه، رنگ‌آمیزی H&E نشان داد میزان حضور سلول‌های خونی در بخش مدیال کورپوس کالوزوم پس از شش هفته تغذیه به همراه کوپریزون به‌طور معنی‌داری ($p < 0.001$) در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته است



شکل ۳- اندازه‌گیری میزان تخریب میلین توسط میکروسکوپ الکترونی عبوری در گروه‌های کنترل، کوپریزون و کوپریزون + بنزوآریک اسید (دوزهای مختلف). RI = شعاع داخلی، RO = شعاع خارجی. حلقه‌های تیره در ناحیه مدیال کورپوس کالوزوم نشان‌دهنده ناحیه سالم و قطر میلین (در گروه کنترل) می‌باشد در حالی که مناطق آسیب‌دیده دارای حلقه‌های کمتر با قطر پایین‌تر (در گروه کوپریزون) می‌باشند. کوپریزون به صورت معناداری باعث تخریب میلین گردید و همچنین تفاوت معنی‌داری بین دوزهای بالا و متوسط بنزوآریک اسید در مقایسه با گروه کوپریزون مشاهده شد. تصاویر با اندازه مقیاس 5 nm نشان داده شد و داده‌ها براساس میانگین $\pm$ انحراف معیار از میانگین گزارش گردید. علامت (*) نماد تفاوت با گروه کنترل و علامت (#) نماد تفاوت با گروه کوپریزون است ($p < 0.001$ و $p < 0.05$ و $p < 0.01$).



شکل ۴- اندازه‌گیری میزان مهاجرت سلول‌های خونی توسط رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین در گروه‌های کنترل، کوپریزون و کوپریزون + بنزوآریک اسید (دوزهای مختلف). نقاط تیره در ناحیه مدیال کورپوس کالوزوم نشان‌دهنده هسته‌های سلول‌های خونی می‌باشند. کوپریزون به صورت معناداری باعث تخریب میلین گردید و همچنین تفاوت معنی‌داری بین دوز بالای بنزوآریک اسید و کاهش سلول‌های خونی در مقایسه با گروه کوپریزون مشاهده شد. تصاویر با اندازه مقیاس ۵۰ μm و بزرگنمایی ($\times 40$) نشان داده شد و داده‌ها براساس میانگین $\pm$ انحراف معیار از میانگین گزارش گردید. علامت (*) نماد تفاوت با گروه کنترل و علامت (#) نماد تفاوت با گروه کوپریزون است ($p < 0.001$ و $p < 0.05$).

فرآیندهای پیوسته و وسیعی را که شامل تماس با آکسون، احاطه نمودن آکسون و تشکیل غلاف میلین است طی می‌نمایند و این فرآیند وابسته به تعامل بین الیگودندروسیت‌ها، آستروسیت‌ها و نورون‌ها است. بنابراین پیام‌های صادره از آکسون نقش تعیین‌کننده‌ای در زمان تمایز الیگودندروسیت‌ها و فعال شدن فرآیند ساخت میلین دارند [۱۷]. MOG یکی از سه پروتئین اصلی تشکیل‌دهنده میلین است و فقط الیگودندروسیت‌های بالغ و تمایز یافته قادر به تولید آن در کنار سایر پروتئین‌های غلاف میلین یعنی MBP^{۱۹} و MAG^{۲۰} هستند. سلول‌های بالغ الیگودندروسیتی قادر به ساخت میلین بوده و افزایش بیان فاکتور MOG نشان‌دهنده افزایش ساخت میلین و به راه افتادن مکانیسم‌های ترمیمی در محل آسیب است [۱۸].

آپوپتوز اولیه الیگودندروسیت‌ها و فعال شدن میکروگلیال-ماکروفاژها دو مشخصه برجسته در پاتولوژی بافتی مدل حیوانی کوپریزون می‌باشند. سایر سازوکارهای دخیل در این مدل شامل مهار تمایز سلول‌های پیش‌ساز الیگودندروسیت‌ها و ترشح سایتوکاین‌های پیش‌التهابی از میکروگلیال-ماکروفاژهای فعال شده است. در حین تغذیه با کوپریزون، دمی‌لینیشن ایجاد شده پس از سه هفته از لحاظ مولکولی قابل رویت بوده و به بیشترین میزان در انتهای ۵ هفته مصرف آن می‌رسد. شایان ذکر است در تحقیق حاضر مصرف همزمان بنزوآریک اسید به

بنزوآریک اسید تاثیر آماری معناداری بر میزان مهاجرت سلول‌ها به ناحیه کورپوس کالوزوم در مقایسه با موش‌های سالم نداشت.

بحث

ام اس یک بیماری خود ایمنی است که در آن، علاوه بر الیگودندروسیت‌ها، اکسون‌ها نیز می‌توانند دچار آسیب شوند. گاه مغز می‌تواند از طریق فرآیند نورو پلاستیستی^{۱۸} برخی از ضایعات را جبران کند. فرآیند رemyelination نیز می‌تواند نقش مهمی در ترمیم بازی کند. این فرآیند می‌تواند یکی از دلایلی باشد که در فازهای اولیه بیماری، علائم به‌طور موقت ناپدید می‌شوند. در طی رemyelination، CNS به فراخوان سلول‌های بنیادی الیگودندروسیت‌ها پرداخته و آن‌ها را پس از تکتیر و تمایز به مناطق آسیب دیده هدایت می‌کند و در نهایت باعث ساخت صفحات جدید میلین می‌شود. این صفحات از نظر ضخامت، نازکتر از نوع اولیه بوده و تأثیر کمتری در عایق‌بندی اکسون اعمال می‌کنند. با اینکه مسئولیت اصلی الیگودندروسیت‌ها ساختن میلین و حمایت از اکسون‌ها در سیستم عصبی مرکزی است ولی پیام‌های مولکولی که این فرایندها را تسهیل یا تعدیل می‌نماید به‌خوبی مشخص نشده است [۱۶].

در طی مراحل اولیه ساخته‌شدن میلین، الیگودندروسیت‌ها

¹⁹ Myelin basic protein

²⁰ Myelin associated glycoprotein

¹⁸ Neuroplasticity

پاتوبیولوژی یکسان به دلیل تغذیه متفاوت حیوانات، در صورت بی‌توجهی به انتخاب روش صحیح احتمال نتایج ضد و نقیض مطالعات مشابه می‌رود.

همچنین با توجه به ماهیت و توانایی هر روش پیشنهاد می‌شود از روش LFB تنها برای تایید مدل و ارزیابی میزان تخریب غلاف میلین در مدل استفاده شود. همچنین روش H&E تنها کارایی خوبی برای تعیین میزان التهاب و مهاجرت سلول‌های ایمنی به ناحیه مورد مطالعه دارد و نقش مستقیمی در مشخص نمودن میزان تخریب یا ترمیم میلین چه در مدل و چه در گروه‌های درمانی ندارد. هرچند در این روش نقطه‌های بنفش تیره نشان‌دهنده هجوم لنفوسیت‌ها به بافت سفید CNS در اثر مصرف کوپریزون و شروع آپوپتوز اختصاصی الیگودندروسیت‌ها می‌باشد ولی این فرایندها می‌توانند هم در مراحل اولیه آسیب جایی که هنوز تخریب قابل مشاهده غلاف میلین رخ نداده و هم در زمان شروع تخریب قابل توجه غلاف میلین دیده شوند. بنابراین تفکیک التهاب حاد (مفید) و مزمن (مضر) توسط این تکنیک ممکن نیست و تنها حضور و عدم حضور سلول‌های التهابی از نظر کمی و در نهایت میزان التهاب قابل تخمین می‌باشد. باید یادآوری نمود روش H&E به صورت غیرمستقیم در صورت افزایش التهاب بیان‌کننده افزایش تخریب میلین و آسیب الیگودندروسیت‌های بالغ می‌باشد. جهت بررسی تأثیرات مستقیم ترکیبات بر جمعیت الیگودندروسیت‌های بالغ و در پی آن میزان دقیق تخریب و ترمیم میلین بهتر است از روش‌های دقیقی مثل ایمونوهیستوشیمی مولکول MOG و را نشان می‌دهد استفاده گردد. استفاده از روش‌های مبتنی بر آنتی بادی‌های اختصاصی مانند ایمونوهیستوشیمی مولکول MOG، دارای دقت بسیار بالایی بوده ولی در عین حال مراحل تهیه نمونه نیاز به دقت و زمان داشته و در مجموع گران قیمت نیز هستند. البته در صورت تامین هزینه استفاده از سایر مارکرهای الیگودندروسیت‌های بالغ مانند MAG، MBP و ³³PLP می‌تواند برای تاکید بیشتر نتایج مفید باشد. بطور کلی، مولکول MOG در اولین مراحل مصرف کوپریزون دچار آسیب شده و نسبت به سایر مارکرهای الیگودندروسیت‌های بالغ بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد.

عنوان ترکیب محافظ‌کننده و سم کوپریزون این امکان را می‌دهد تا تأثیرات ممانعت از پیشروی عارضه را همزمان با تأثیرات درمانی بررسی نماییم، هرچند بدون حذف کامل کوپریزون درمان قطعی توسط هیچ ترکیبی امکان‌پذیر نیست. این در حالیست که بررسی انجام شده توسط پاتل²¹ نشان داد پس از قطع کوپریزون رemyelination خودبخودی در مغز با فعال شدن مکانیسم‌های ترمیمی داخلی شروع می‌شود [۱۹].

همان‌طور که نتایج این مطالعه نشان داد رنگ‌آمیزی LFB به دلیل حساسیت پایین نتوانست تفاوت معنی‌داری در میزان حفاظت و تجدید میلین پس از تیمار با بنزوآریک اسید نشان دهد ولی روش‌های دقیق‌تر مثل ایمونوهیستوشیمی مولکول MOG و مهمتر از آن نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی TEM به‌خوبی اثرات حفاظتی دوزهای بالای بنزوآریک اسید را با افزایش میزان ترمیم میلین نشان دادند.

در راستای تایید این نتایج، لیو²² و همکاران نشان دادند BA تکثیر سلول‌های بنیادی نورونی درونی را در محیط آزمایشگاهی از طریق فعال‌سازی مسیر پیام‌رسانی Wnt/ β -catenin حمایت می‌نماید [۲۰]. التهاب ناشی از واکنش سلول‌های ایمنی در شرایط آزمایشگاهی خود می‌تواند موجب مهار تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی در مناطق آسیب‌دیده شود و تعدیل آن باعث افزایش توان ترمیمی بافت می‌گردد. در این راستا، رنگ‌آمیزی H&E مشخص نمود تنها غلظت بالای بنزوآریک اسید قادر به کاهش معنی‌دار التهاب در محل آسیب بوده است. مطالعات تکمیلی ایمونوهیستوشیمی نشان دادند دوزهای متوسط و بالای BA توانایی افزایش میزان الیگودندروسیت‌های بالغ بیان‌کننده MOG را دارند و مخصوصاً غلظت ۸۰ mg/kg BA قادر است جمعیت این سلول‌ها را بطور قابل ملاحظه‌ای افزایش دهد و منجر به تولید مجدد غلاف میلین گردد.

بر اساس نتایج، مشخص می‌شود در صورت عدم استفاده از روش‌های دقیق برای ارزیابی میزان آسیبه‌ها و ترمیم‌های صورت گرفته در این مدل احتمال گزارش‌های نادرست افزایش می‌یابد. با توجه به تنوع دوزهای بکار برده شده در مطالعات مربوط به ترکیبات گیاهی و دارویی و همچنین عدم امکان ایجاد مدل کوپریزون در زمان‌های مختلف با تظاهرات

²¹ Patel

²² Liu

²³ Proteolipid protein

نتیجه‌گیری

از یافته‌های این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت اتکا به تنها یک روش در صورتی می‌تواند دقیق و قانع‌کننده باشد که با استفاده از TEM عکس‌های با کیفیت و دقیقی از غلاف میلین در محل عارضه در اختیار محقق قرار گیرد. البته تهیه نامناسب نمونه‌ها، انجام برش‌هایی به موازات غلاف میلین و پارگی و از دست‌رفتن نمونه‌ها در هنگام عکس‌برداری می‌توانند از عوامل عدم حصول به نتایج دقیق در هنگام استفاده از TEM قلمداد گردد. از طرف دیگر، نتایج مطالعه اهمیت استفاده همزمان از تمامی روش‌های فوق را به دلیل کاربردهای مختلف نشان داده، توصیه می‌شود در شرایط عدم دسترسی به تمامی روش‌ها به روش‌های دارای دقت بیشتر مانند TEM و IHC اتکا شود.

ملاحظات مالی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی تهران و دانشگاه زابل انجام گرفته است (UOZ-GR-9517-13). نویسندگان مراتب قدردانی خود را اعلام می‌نمایند.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

نقش نویسندگان

ن.س: انجام مطالعه، آنالیز آماری و نگارش مقاله؛ م.ش: نظارت بر انجام مطالعه؛ پ.م: نگارش مقاله و کمک در آنالیز داده‌ها.

فهرست منابع

- [1] Tillery EE, Clements JN, Howard Z, What is new in multiple sclerosis? *Ment Health Clin* 7 (2018) 213-220.
- [2] Lauer K, Environmental risk factors in multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother* 10 (2010) 421-440.
- [3] De Angelis F, Plantone D, Chataway J, Pharmacotherapy in secondary progressive multiple sclerosis: An overview. *CNS Drugs* 2 (2018) 499-526.
- [4] Doan V, Kleindienst AM, McMahon EJ, Long BR, Matsushima GK, Taylor LC, Abbreviated exposure to cuprizone is sufficient to induce demyelination and oligodendrocyte loss. *J Neurosci Res* 91 (2013) 363-373.
- [5] Kojima W, Hayashi K, Changes in the axo-glial junctions of the optic nerves of cuprizone-treated mice. *Histochem Cell Biol* 149 (2018) 529-536.
- [6] Bittner S, Afzali AM, Wiendl H, Meuth SG, Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG35-55) induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. *J Vis Exp* 86 (2014) e51275.
- [7] Derosa G, Maffioli P, Sahebkar A, Ellagic acid and its role in chronic diseases. *Adv Exp Med Biol* 928 (2016) 473-479.
- [8] Lepka K, Berndt C, Hartung HP, Aktas O, Redox events as modulators of pathology and therapy of neuroinflammatory diseases. *Front Cell Dev Biol* 4 (2016) 63.
- [9] Ramroodi N, Khani M, Ganjali Z, Javan MR, Sanadgol N, Khalseh R, Ravan H, Sanadgol E, Abdollahi M, Prophylactic effect of BIO-1211 small-molecule antagonist of VLA-4 in the EAE mouse model of multiple sclerosis. *Immunol Invest* 44 (2015) 694-712.
- [10] Sanadgol N, Golab F, Mostafaie A, Mehdizadeh M, Abdollahi M, Sharifzadeh M, Ravan H, Ellagic acid ameliorates cuprizone-induced acute CNS inflammation via restriction of microgliosis and down-regulation of CCL2 and CCL3 pro-inflammatory chemokines. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 62 (2016) 24-30.
- [11] Sanadgol N, Golab F, Askari H, Moradi F, Ajdary M, Mehdizadeh M, Alpha-lipoic acid mitigates toxic-induced demyelination in the corpus callosum by lessening of oxidative stress and stimulation of polydendrocytes proliferation. *Metab Brain Dis* 33 (2018) 27-37.
- [12] Shirazi A, Golab F, Sanadgol N, Barati M, Mohammad-Salehi R, Vahabzadeh G, Shadalui Z, Rezaei-Zarchi S, Evaluation of the neurotrophic factors in animal model of myelin destruction induced by cuprizone in C57bl/6 mice. *Neurosci J Shafaye Khatam* 4 (2016) 47-54.
- [13] Sanadgol N, Golab F, Mostafaie A, Mehdizadeh M, Khalseh R, Low, but not high, dose triptolide controls neuroinflammation and improves behavioral deficits in toxic model of multiple sclerosis by dampening of NF- κ B activation and acceleration of intrinsic myelin repair. *Toxicol Applied Pharmacol* 342 (2018) 86-98.
- [14] Stikov N, Campbell JS, Stroh T, Lavelée M, Frey S, Novek J, Nuara S, Ho MK, Bedell BJ, Dougherty RF, Leppert IR, Boudreau PA, Narayanan S, Duval T, Cohen-Adad J, Picard AM, Gasecka A, Côté D, Pike GB, Quantitative analysis of the myelin g-ratio from electron microscopy images of the macaque corpus callosum. *Data Brief* 4 (2015) 368-373.
- [15] Sanadgol N, Golab F, Tashakkor Z, Taki N, Moradi-Kouchi S, Mostafaie A, Mehdizadeh M, Abdollahi M, Taghizadeh G, Sharifzadeh M, Neuroprotective effects of ellagic acid on cuprizone-induced acute demyelination through limitation of microgliosis, adjustment of CXCL12/IL-17/IL-11 axis and restriction of mature oligodendrocytes apoptosis. *Pharm Biol* 55 (2017) 1679-1687.
- [16] Bove RM, Green AJ, Remyelinating pharmacotherapies in multiple sclerosis. *Neurotherapeutics* 14 (2017) 894-904.

- [17] Sanadgol N, Zahedani SS, Sharifzadeh M, Khalseh R, Barbari GR, Abdollahi M, Recent updates in imperative natural compounds for healthy brain and nerve function: a systematic review of implications for multiple sclerosis. *Curr Drug Targets* 18 (2017) 1499-1517.
- [18] Sahraian MA, Khorramnia S, Ebrahim MM, Moinfar Z, Lotfi J, Pakdaman H, Multiple sclerosis in Iran: a demographic study of 8,000 patients and changes over time. *Eur Neurol* 64 (2010) 331-336.
- [19] Patel M, Targeting oxidative stress in central nervous system disorders. *Trends Pharmacol Sci* 37 (2016) 768-778.
- [20] Liu QS, Li SR, Li K, Li X, Yin X, Pang Z, Ellagic acid improves endogenous neural stem cells proliferation and neurorestoration through Wnt/ β -catenin signaling *in vivo* and *in vitro*. *Mol Nutr Food Res* 61 (2017) 3.

Research paper

Determination of the most accurate technique among various histological methods for evaluation of the efficacy of neuroprotective agents in animal model of multiple sclerosis

Nima Sanadgol^{1, 2*}, Mohammad Sharifzadeh², Parisa Maleki³

1. Department of Biology, Faculty of Science, University of Zabol, Zabol, Iran
2. Pharmaceutical Sciences Research Center, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, Iran

Received: 9 May 2018

Accepted: 2 September 2018

Abstract

Background and aims: Here we aimed to comprise several histological methods to determine the most accurate technique for evaluation of efficacy of neuroprotective agents in animal model of multiple sclerosis (MS).

Methods: Male C57BL/6 mice were treated for 6 weeks in control, control + Benzoraic acid (BA, as neuroprotective agent) 20, 40, 80 mg/kg during last 2 weeks, Cuprizone (0.2%) as demyelinating agent, and Cuprizone (0.2%) + BA (20, 40, 80 mg/kg during last 2 weeks) groups. At the end of experiment, histological examinations including immunohistochemistry (IHC), Hematoxylin & Eosin (H & E) staining, Luxol Fast Blue (LFB) staining, and Transmission Electron Microscopy (TEM) techniques were performed for evaluation of myelin damages.

Results: Significant myelin damage was detected by all of the used histological methods in Cuprizone group ($p < 0.001$ compared to control group). LFB technique could not show improvement in damages by all doses of BA. The H & E, IHC and TEM methods showed significant protective effects of the high BA dose compared to Cuprizone group. Only the TEM method could show significant ($p < 0.05$) protective effect of the medium BA dose.

Conclusion: TEM was the most and LFB was least sensitive methods. Present study suggests simultaneous using of methods such as H & E for better assessment of neuroinflammation and IHC for confirmation of TEM results. Moreover, in the case of restriction in methods, TEM and IHC are the most sensitive methods and could provide reliable results related to efficacy of neuroprotective agents in this model.

Keywords: Multiple sclerosis, Immunohistochemistry, Cuprizone, Luxol Fast Blue, Hematoxylin & Eosin

Please cite this article as follows:

Sanadgol N, Sharifzadeh M, Maleki P, Determination of the most accurate technique among various histological methods for evaluation of the efficacy of neuroprotective agents in animal model of multiple sclerosis. *Iran J Physiol Pharmacol* 3 (2019) 41-51.

*Corresponding author: n.sanadgol@uoz.ac.ir (ORCID ID: 0000-0002-4509-5336)