



## Reaction of subventricular zone stem cells to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in mouse

Shiva Khezri<sup>1</sup>, Mohammad Javan<sup>1\*</sup>, Hossein Baharvand<sup>2</sup>, Saeed Semnanian<sup>1</sup>

1. Dept. Physiology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

2. Dept. Stem Cells, Dev. Biol., Royan Institute, Tehran, Iran

Received: 22 Dec 2010

Accepted: 9 March 2011

### Abstract

**Introduction:** Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory demyelinating disease. In the present study, we investigated the response of subventricular zone (SVZ) adult stem cells in the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an animal model of MS, and also the differentiation fate of these stem cells.

**Methods:** Mice were immunized with MOG peptide emulsified in complete Freund's adjuvant (CFA) and pertussis toxin (PT). Control mice received CFA and PT. To study SVZ stem cells migration, mice received seven i.p. injections of BrdU at 2-h intervals on the day before EAE induction. Demyelination was studied using specific staining with luxol fast blue. The number of BrdU<sup>+</sup> cells in SVZ and olfactory bulb (OB) was counted using immunohistochemical staining. To understand the fate of the stem cells, NG<sub>2</sub> marker was used to detect oligodendrocyte precursors.

**Results:** Lumbar spinal cord of EAE animals showed significant demyelination and the volume of demyelinated areas was increased on days 14 to 21 post lesion. In the EAE group, more BrdU<sup>+</sup> cells were observed in the OB compared to the SVZ. The number of BrdU<sup>+</sup>/NG<sub>2</sub><sup>+</sup> cells in OB was significantly increased after EAE induction.

**Conclusion:** The demyelinating context of EAE promotes the migration of SVZ stem cells to the OB. These cells mostly differentiate to oligodendrocyte precursors and may contribute to myelin repair.

**Key words:** Cell migration, subventricular zone, Stem cells, Experimental autoimmune encephalomyelitis model, Mouse

\* Corresponding author e-mail: [mjavan@modares.ac.ir](mailto:mjavan@modares.ac.ir)  
Available online at: [www.phypha.ir/ppj](http://www.phypha.ir/ppj)

## پاسخ سلول های بنیادی درونزاد ناحیه زیر بطنی مغز موش به القای مدل EAE بیماری ام اس

شیوا خضری<sup>۱</sup>، محمد جوان<sup>۱\*</sup>، حسین بهاروند<sup>۲</sup>، سعید سمناپان<sup>۱</sup>  
۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران  
۲. گروه سلول های بنیادی و زیست شناسی تکوینی، پژوهشگاه رویان، تهران  
پذیرش: ۱۸ اسفند ۸۹ دریافت: ۱ دی ۸۹

### چکیده

**مقدمه:** ام اس بیماری التهابی دمیالینه کننده مزمن CNS است. در این مطالعه رفتار سلول های SVZ (Subventricular Zone) در پاسخ به القای EAE (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis) (مدل حیوانی بیماری ام اس) بررسی و سرنوشت این سلول ها از نظر تمایز به سلول های اجدادی اولیگودندروسیتی مطالعه شده است.

**روش ها:** برای القا EAE، MOG (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein) با CFA (complete freund's adjuvant) مخلوط و به صورت زیر جلدی به موشها تزریق شد. همزمان با تزریق اول و ۴۸ ساعت بعد از آن، سم سیاه سرفه (pertussis toxin: PT) بصورت i.p. تزریق شد. موشهای گروه کنترل فقط PT و CFA را دریافت کردند. برای مطالعه سرنوشت سلول های SVZ از ۷ بار تزریق Brdu به فواصل ۲ ساعت در روز قبل از القا EAE استفاده شد. در آزمایشات هیستولوژی برای مطالعه دمیالیناسیون از رنگ آمیزی Luxol-fast-blue استفاده شد. با ایمونوهیستوشیمی تعداد سلول های Brdu<sup>+</sup> در برشهای ساجیتال نواحی SVZ و پیاز بویایی (OB) شمارش شد. سرنوشت سلول ها با کمک مارکر سلول های اجدادی اولیگودندروسیتی (NG2) بررسی شد.

**یافته ها:** القا EAE باعث ایجاد پلاکهای دمیالینه در بخش کمری نخاع شد و حجم ناحیه دمیالینه با پیشرفت بیماری (روز ۱۴ تا ۲۱) افزایش یافت. در گروه EAE سلول های Brdu<sup>+</sup> کمتری در SVZ دیده شدند اما تعداد سلول بیشتری به OB رسید. تعداد سلول های Brdu<sup>+</sup>/NG2<sup>+</sup> در OB افزایش یافت و با پیشرفت بیماری از روز ۱۴ تا ۲۱ بر تعداد این سلول ها در OB افزوده شد.

**نتیجه گیری:** دمیالیناسیون ناشی از EAE باعث افزایش مهاجرت سلول های بنیادی از SVZ به OB می شود. این سلول ها می توانند در شرایط وجود دمیالیناسیون به سلول های ترمیم کننده میلین تبدیل شوند.

**واژه های کلیدی:** مهاجرت سلولی، ناحیه زیر بطنی، سلول های بنیادی، مدل EAE، موش

### مقدمه

شده و لنفوسیت های اختصاصی علیه میلین فعال می شود. ورود این سلول ها به مغز در ایمونوپاتولوژی بیماری و تشدید واکنشهای التهابی در مغز نقش دارد. شیوع این بیماری در زنان ۲ تا ۳ برابر مردان می باشد و اغلب در سنین ۲۰ تا ۴۰ سالگی بروز می کند [۳۰]. مهمترین علائم این بیماری فلج حرکتی، تخریب حسی بویژه اختلالات بینایی، نقایص شناختی و غیره می باشد [۲۱].

تاکنون درمان قطعی برای ام اس پیدا نشده و تنها برخی

Multiple Sclerosis (ام اس) بیماری دمیالینه کننده

التهابی مزمن سیستم عصبی مرکزی است که با تظاهرات خود ایمنی همراه است. به دلایل نامشخص سیستم ایمنی تحریک

mjavan@modares.ac.ir

www.phypha.ir/ppj

\* نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

(SGZ) هیپوکمپ می باشند. نواحی دیگری همچون لایه زاینده (ژرمینال) مخچه و لایه اپاندیمال طناب نخاعی نیز دارای NSCs می باشند. می توان گفت که این سلول ها به عنوان پتانسیل فیزیولوژیک مغز در ترمیم سیستم عصبی مرکزی موثر هستند و به محل ضایعه مهاجرت می کنند و به اولیگودندروسیت ها، نورون ها و یا آستروسیت ها ( بسته به فنوتیپ سلولی خاصی که هر بیماری القا می کند) متمایز می شوند. این سیگنالها شامل انواعی از مولکول ها و فاکتورهای رشد آزاد شده از نورون های آسیب دیده، آستروسیت ها و سلول های ایمنی هستند [۱۸، ۱۹، ۲۷].

هر کدام از سلول ها پروتئین های اختصاصی را بیان می کنند که به عنوان مارکر شناسایی آنها قابل استفاده اند. از مارکرهای مورد استفاده سلول های بنیادی عصبی nestin، سلول های اجدادی اولیگودندروسیتی NG2 و سلول های اجدادی نورونی PSA-NCAM را می توان نام برد. با استفاده از ۵-برمو ۲-دی اکسی یوریدین (BrdU) سلول های تکثیر شونده نشاندار شده و مهاجرت آنها از ذخایر NSCs مغز به نواحی آسیب دیده قابل ردیابی می گردد [۲۷، ۳۱].

انواعی از مدل ها جهت مطالعه فرآیندهای التهابی دمیلینه کننده و نورودژنراتیو بیماری ام اس وجود دارد که شامل EAE (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis)، دمیلیناسیون القا شده توسط عفونتهای ویروسی مثل ویروس Theiler، دمیلیناسیون ناشی از تزریق ترکیبات سمی مانند اتیدیوم بروماید و لیزولستین و همچنین دمیلیناسیون ناشی از پرتو X می باشد [۱۹، ۱۱].

EAE یک مدل حیوانی برای بررسی شاخص های التهابی و رفتاری بیماری ام اس است. این مدل بوسیله مواجهه مستقیم حیوان با آنتی ژنها و یا بطور غیر فعال با انتقال سلول های T خاص میلینی القا می شود. در مدل EAE سلول های T بر علیه آنتی ژن های میلینی فعال شده و دمیلیناسیون را القا می کنند [۲، ۷، ۱۶]. در این مدل، NSCs های SVZ تکثیر شده و به ناحیه آسیب مهاجرت می کنند و بیشتر به آستروسیت ها و اولیگودندروسیت ها متمایز می شوند. تکثیر در SVZ بوسیله FGF، TNF $\alpha$  و EGF تحریک می شود [۲۷]. سلول های بنیادی SVZ در شرایط معمولی تکثیر و از طریق RMS (Rostral Migratory Stream) به پیاز بویایی (Olfactory

داروها جهت بهبود علائم و کند نمودن سیر بیماری در دسترس است. در درمان ام اس دو هدف اصلی مد نظر است: اولاً ممانعت از پیشرفت بیماری (کنترل بیماری) که برای این منظور از کورتون ها استفاده می شود تا میزان التهاب کاهش یابد. ثانیاً ترمیم آسیبهای ایجاد شده با روشهایی مانند سلول درمانی که از میان انواع سلول ها، سلول های بنیادی عصبی Neural Stem Cells (NSCs) از اهمیت ویژه ای برخوردارند و باعث تحریک رمیلیناسیون و کاهش آسیب آکسونی می شوند [۵]. شناسایی سلول های بنیادی عصبی درونزاد در سیستم عصبی مرکزی انسان و چونندگان راهبردهای جدیدی برای ترمیم آسیب های مغزی ایجاد کرده است.

در بیماری ام اس التهاب حاد که با دمیلیناسیون همراه است به عنوان محرک قوی برای بسیج Oligodendrocyte Precursor Cells (OPCs) عمل می کند. سرکوب پاسخهای التهابی می تواند باعث نقص در پدیده ترمیم شود. شاید یک دلیل نقص رمیلیناسیون در بیماران این باشد که با داروهای ضد التهابی مثل کورتیکواستروئیدها درمان می شوند. در این شرایط التهاب سرکوب شده، رمیلیناسیون ناتمام مانده و دمیلیناسیون مزمن می شود [۱۱]. مغز بالغ در شرایط طبیعی اجازه مهاجرت طولانی و بقا سلول های بنیادی عصبی را نمی دهد، ولی مغز ملتهب مهاجرت و هماهنگی این سلول ها را تحریک می کند [۱].

در طی تکوین، سیستم عصبی از سلول های بنیادی عصبی (NSCs) که پتانسیل خود تجدید شونده (Self-renewing) و تمایز به نورون و انواع سلول های گلیال را دارند، پدید می آید. مغز بالغین ساختاری است که علیرغم داشتن NSCs ظرفیت ترمیم محدودی دارد و علت اصلی این محدودیت حضور عوامل مهاری و تشکیل اسکار در محل آسیب می باشد، ولی با این وجود سلول هایی در نواحی مختلف مغز تولید می شوند که بر روند ترمیم موثر می باشند. آسیب عصبی فعالیت NSCs را تحریک می کند و موجب می شود که این سلول ها تکثیر و به سلول های پیش ساز (progenitors) چند توانی (Multipotent) متمایز شوند [۲۷]. سلول های پیش ساز پس از مهاجرت به محل ضایعه به انواع سلول های عصبی متمایز می شوند. دو ناحیه اصلی تمرکز NSCs، ناحیه زیر بطنی Subventricular Zone (SVZ) و منطقه ساب گرانولار

روزانه مورد بررسی قرار گرفت. شدت بیماری بصورت صفر (عدم ابتلا به بیماری)، ۰/۵ (اختلال در تون دم)، ۱ (فلج شدن دم)، ۲ (اختلال در راه رفتن)، ۳ (فلج اندامهای عقبی)، ۴ (ضعف اندامهای جلویی همراه با فلج اندام های عقبی)، ۵ (مرگ) درجه بندی شد [۲۷].

برای مطالعه مهاجرت سلول های SVZ، ۷ بار Brdu (۶۰ mg/kg) (Sigma-Aldrich) به فواصل ۲ ساعت و یک روز قبل از القا EAE بصورت داخل صفاقی تزریق شد [۲۷] تا سلول های تکثیر شونده نشان دار شوند. موشها ۱۴ و ۲۱ روز بعد از القا کشته شدند. با استفاده از این پروتکل سلول های تکثیر شونده مغزی که عمدتاً در SVZ و RMS می باشند علامت دار می شوند. شناسایی سلول های نشان دار در نواحی بجز SVZ و RMS دلالت بر این دارد که سلول ها از SVZ و RMS منشا گرفته اند.

حیوانات گروه های آزمایشی مختلف در روزهای ۱۴ و ۲۱ روز بعد از القا با تزریق داخل صفاقی کتامین و زایلوزین بطور عمیق بیهوش شدند و عمل پرفیوژن از طریق بطن چپ قلب ابتدا با PBS برای خارج کردن خون درون رگها و سپس با پارافرمالدهید (PFA) ۴٪ برای تثبیت اولیه بافت مغز و نخاع انجام شد. پس از نمونه برداری برای فیکس شدن بهتر، بافت در PFA ۴٪ به مدت ۲۴ ساعت در دمای C ۴۰ قرار داده شد. پس از آگیری با الکل و شفاف سازی با زایلول، بلوک پارافینی از بافت مغز تهیه شد و جهت برش گیری آماده گردید. برش های ساجیتال سریال به ضخامت ۵ میکرون از مغز کامل و تا حدود ۲ میلیمتر از خط وسط و برش های کروئال از ناحیه کمری نخاع تهیه شد و بر روی لام های از قبل آغشته به چسب پلی لایزین قرار داده شد [۱۲،۲۸].

برای رنگ آمیزی برشهای نخاع با (Luxol Fast Blue) LFB و (Crysel Fast Violet) CFV، لام های تهیه شده از نخاع پس از شفاف سازی با زایلول و آب دهی با الکل مطلق ۹۵٪ با LFB ۱٪ (حل شده در الکل ۹۵٪) به مدت ۳ ساعت در حمام آبی C ۶۰ و سپس با CFV ۱٪ به مدت ۳ دقیقه رنگ آمیزی شدند. حجم ناحیه دمیلینه در هر گروه با نرم افزار Image محاسبه شد. در هر برش نسبت وسعت ناحیه دمیلینه به کل سطح نخاع اندازه گیری شد. برای هر نمونه ۱۶ برش ۵ میکرونی بررسی گردید ( $n \geq 3$ ) [۱۲،۲۸].

Balb) مهاجرت می کنند و جانشین نوروون های آنها می شوند [۱، ۱۳، ۲۰]. نشان داده شده که در مدل های حیوانی که نارسایی نورونی دارند مثل صرع، ایسکمی و تروما، تعداد سلول های SVZ افزایش می یابد و سلول های اجدادی نورونی به محل آسیب رفته و به نوروون و آستروسیت متمایز می شوند [۲۶، ۲۷]. همچنین در مدل های حیوانی دمیلیناسیون القا شده با لیزولستین و دمیلیناسیون التهابی این سلول ها به سلول های گلیال مخصوصاً اولیگودندروسیت ها متمایز می شوند و می توانند در رمیلیناسیون CNS نقش داشته باشند [۸، ۲۲، ۲۷].

شواهد مختلفی نشان می دهد که نوروزن در مغز بالغ می تواند در شرایط پاتولوژیکی مختلف مثل خود ایمنی و التهاب مغزی تغییر کند. مطالعات انجام شده روی موش ترانس ژنیک حاکی از آن است که EAE باعث افزایش تعداد سلول های SVZ و RMS می شود و این افزایش در RMS ۴ برابر SVZ است [۲۷] ولی بعضی گزارش های دیگر کاهش تکثیر این سلول ها را در SVZ نشان می دهند [۱۵].

در این مطالعه رفتار سلول های SVZ در پاسخ به القای EAE که ایجاد دمیلیناسیون و التهاب می کند بررسی شده و مهاجرت سلول های بنیادی موجود در SVZ به OB و میزان تمایز این سلول ها به سلول های اجدادی اولیگودندروسیتی مطالعه شده است.

## مواد و روش ها

موشهای ماده نژاد C57BL/6 در محدوده وزنی ۱۹-۲۲ گرم از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. برای القا EAE، ۳۰۰  $\mu\text{g}$  پپتید MOG 35-55 (GL Biochem, Shanghai) در ۱۰۰  $\mu\text{l}$  بافر فسفات سالین و ۱۰۰  $\mu\text{l}$  complete CFA (freund's adjuvant) (Sigma-Aldrich) مخلوط و بصورت زیر جلدی در ناحیه پشت به هر موش تزریق گردید. همزمان با تزریق اول و ۴۸ ساعت بعد از آن، ۵۰۰ ng pertussis toxin (PT) (Sigma-Aldrich) در حجم ۲۰۰  $\mu\text{l}$  بافر فسفات سالین بصورت داخل صفاقی تزریق شد. سم سیاه سرفه نفوذپذیری سد خونی مغزی را افزایش می دهد. در گروه کنترل CFA و PT طبق مراحل فوق تزریق شد. ایجاد و پیشرفت بیماری

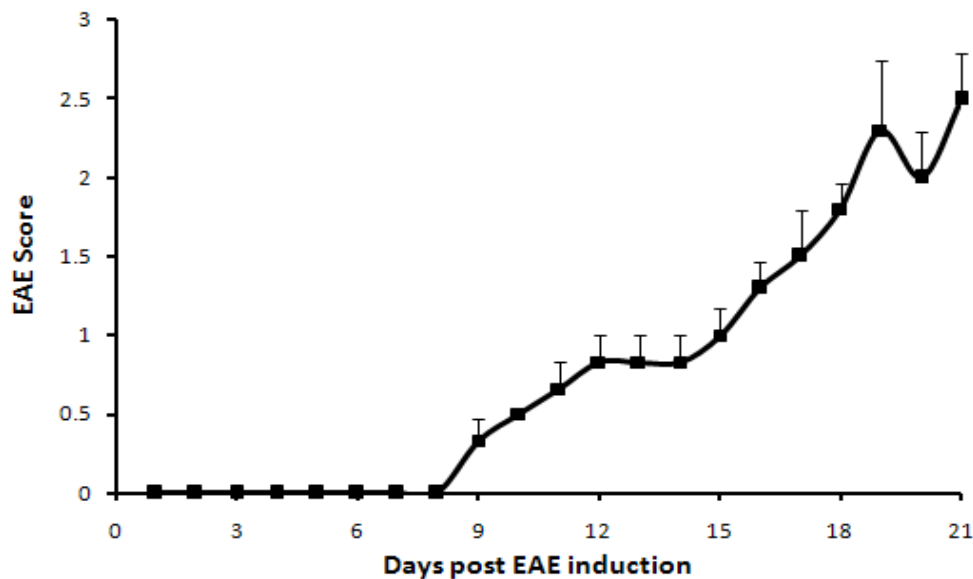
Brdu<sup>+</sup> و سلول های دارای دو نشانه در ناحیه SVZ و OB در ۳ لام که هر کدام ۳ برش متوالی داشتند شمارش و میانگین گرفته شد ( $n \geq 3$ ). آزمون t-test برای مقایسه دو گروه و ANOVA و پس آزمون Tukey برای مقایسه سه گروه استفاده شد. داده ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای میانگین ارائه شده و  $P < 0.05$  به عنوان حداقل سطح معنی دار بودن در نظر گرفته شد.

## یافته ها

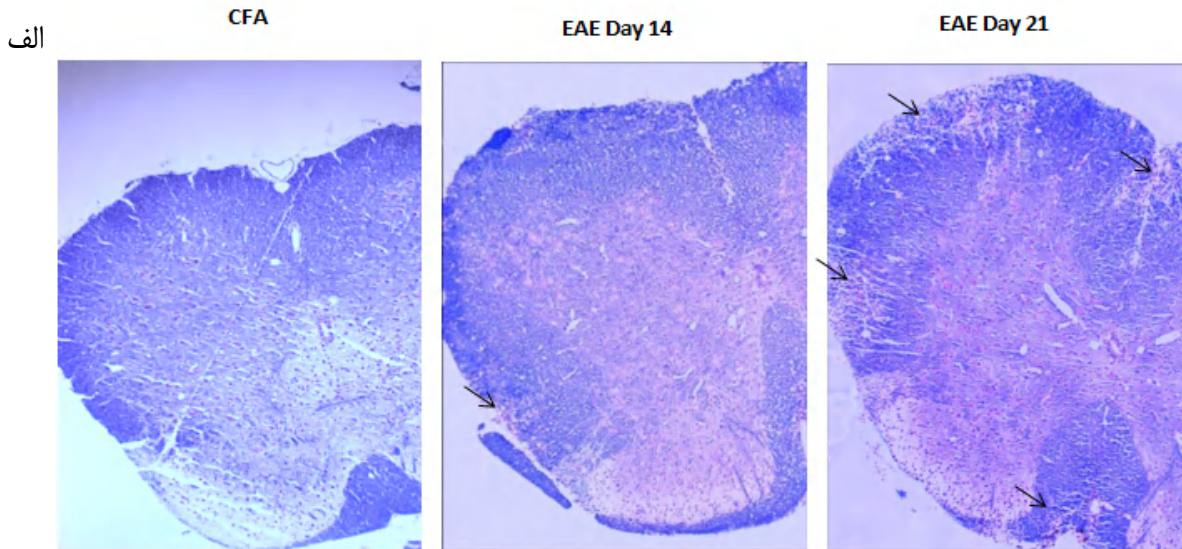
موشهای ایمونیزه شده با MOG، مدلی از EAE را نشان دادند که با التهاب بافتی و دمیالیناسیون در CNS همراه بود و علائم کلینیکی از روز ۹  $\pm 0.16$  بعد از ایمونیزاسیون شروع و سستی دم دیده شد. به تدریج با گذشت زمان دم فلج کامل شد و اختلال در راه رفتن مشاهده شد (روز ۲۵  $\pm 0.15$  بعد از القا). در نهایت اندام های عقبی نیز فلج شدند. همانطور که در شکل ۱ مشخص است علائم بیماری بتدریج حادتر شد.

در مطالعه هیستولوژیک بخش کمری نخاع، پس از القا EAE پلاک های دمیالینه در CNS دیده شد. میلین در بافت توسط رنگ آمیزی اختصاصی آن LFB (luxol Fast Blue) قابل مشاهده است. کم شدن مقدار رنگ در ناحیه پلاک در مقایسه با رنگ ناحیه سالم (کنترل داخلی) همان مقطع بافتی

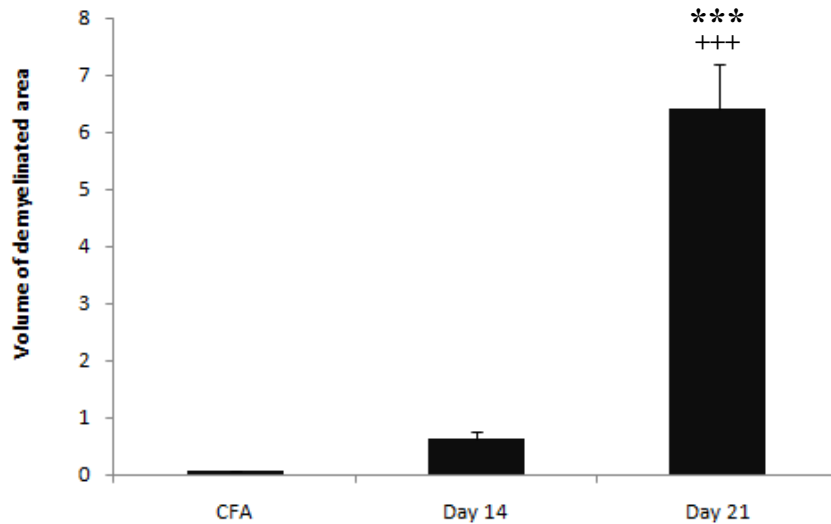
برش های مغز که در بر گیرنده SVZ و OB بودند برای ایمونوهیستوشیمی انتخاب شدند. پس از شفاف سازی لام ها با زایلول و آب دهی بافت ها با الکل مطلق، ۹۰٪، ۸۰٪، ۷۰٪، از HCl ۲ نرمال (۶۰ دقیقه) و بافر بورات (۱۰ دقیقه) استفاده شد. سپس لامها در محلول سیترات بافر ۱۰ میلی مولار (۱۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد) اتوکلاو و در 2x-SSC (sodium standard citrat) (۵ دقیقه) قرار گرفتند. در مرحله بعد، از محلول فرمامید (۶۰ دقیقه در دمای ۶۰°C آون) استفاده شد. بعد از شستشو با 2x-SSC (۵ دقیقه) و شستشو با PBS (۵ دقیقه)، مقاطع با محلول سرم بز ۱۰٪ محتوی تریتون ۰.۳٪ (۶۰ دقیقه) (به عنوان محلول بلوک کننده) انکوبه شدند. بافت ها در معرض آنتی بادی های اولیه Rabbit anti-NG2 (Abcam ۱:۱۰۰) overnight در یخچال قرار گرفتند. سپس از آنتی بادی ثانویه Rhodamin ، Goat anti-rabbit (Chemicon ، ۱:۲۰۰) به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق و محفظه تاریک و مرطوب استفاده شد. برای نشان دار کردن سلول های تکثیر شونده از آنتی بادی Sheep anti-Brdu (Abcam ، ۱:۵۰) overnight در یخچال و سپس آنتی بادی ثانویه Donkey anti-sheep, IgG (Chemicon, ۱:۱۰۰) ۲ ساعت در دمای اتاق استفاده شد. در نهایت لام ها با بافر گلیسرول پوشیده شده و بعد از گذاشتن لامل با میکروسکوپ فلورسنت (Nikon-E800) بررسی شدند. تعداد سلول های



شکل ۱- میانگین شدت بیماری در روزهای مختلف پس از ایمونیزاسیون با MOG. علائم کلینیکی از روز ۹ شروع شده و با گذشت زمان علائم بیشتر شد.



ب.



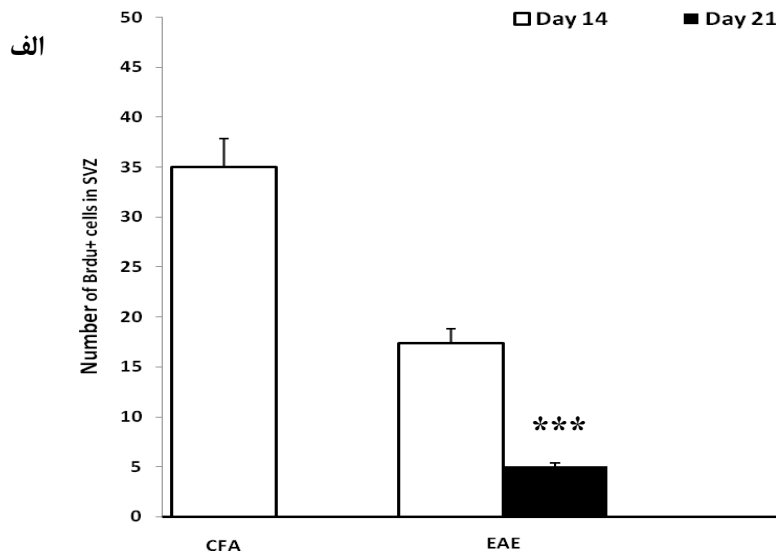
شکل ۲- میزان دمیلائسیون در بخش کمری نخاع EAE در روزهای ۱۴ و ۲۱ بعد از القا. الف) نمونه تصویر مقاطع رنگ آمیزی شده با LFB و CFV (× ۱۰۰) را نشان می‌دهد. در گروه کنترل CFA هیچ دمیلائسیونی دیده نشد ولی در گروه EAE روز ۱۴ آسیب خفیف ایجاد شد، با پیشرفت روند بیماری در روز ۲۱ دمیلائسیون وسیعی مشاهده شد. ب) مقایسه حجم ناحیه دمیلائنه در گروه EAE در روزهای ۱۴ و ۲۱ پس از القا،  $p < 0.001$  \*\*\* در مقایسه با گروه کنترل،  $p < 0.001$  +++ در مقایسه با گروه EAE14.

روز ۱۴ پس از القا  $0.11 \pm 0.64$  و در روز ۲۱ پس از القا  $0.79$   $\pm 0.4$  بود ( $n \geq 3$ ) (شکل ۲- ب).

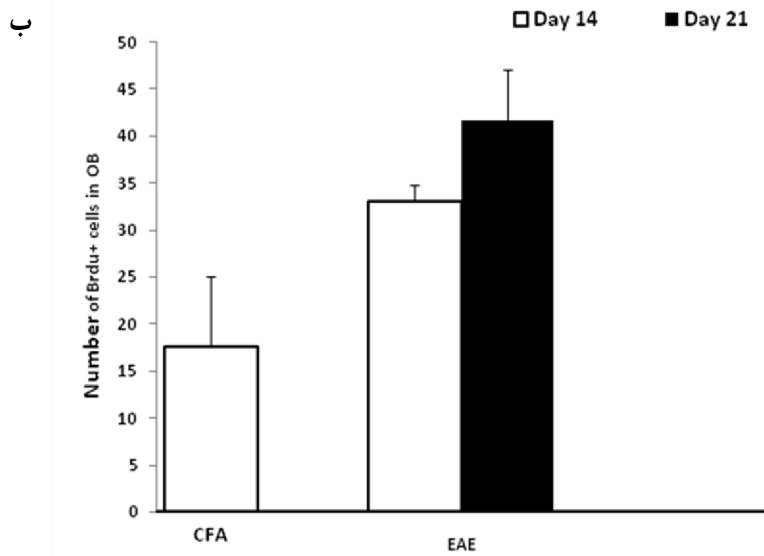
برای ردیابی سلول های SVZ ۷ بار تزریق داخل صفاقی Brdu<sup>+</sup> یک روز قبل از القا EAE انجام گرفت و در روزهای ۱۴ و ۲۱ پس از القا با مطالعه ایمونوهیستوشیمی تعداد سلول های Brdu<sup>+</sup> در برش های ساجیتال مغزی در نواحی SVZ و OB شمارش شد. تعداد سلول های Brdu<sup>+</sup> شمارش شده در SVZ گروه کنترل  $2/8 \pm 35$ ، گروه EAE ۱۴،  $1/45 \pm 17/33$  و در

بعنوان شاخص کم شدن میلین (دمیلائسیون) مورد محاسبه قرار گرفت (شکل ۲- الف).

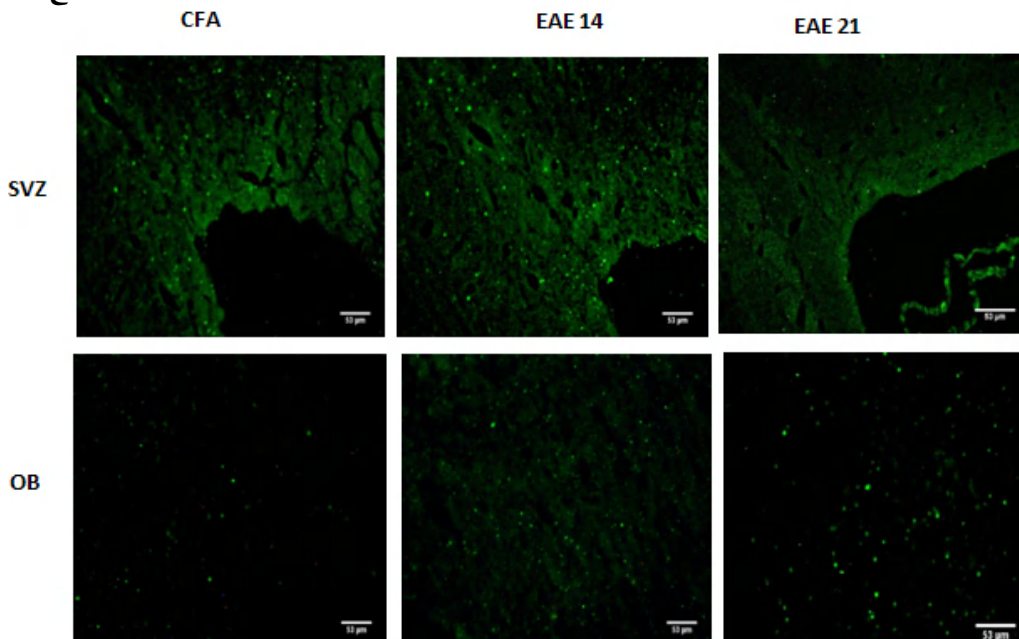
بررسی بخش کمری نخاع با رنگ آمیزی LFB و CFV نشان داد که با القا بیماری، التهاب، ادم و پلاک های دمیلائنه دیده می شود و با پیشرفت علایم بیماری میزان پلاکها و وسعت آنها بیشتر می شود. درصد حجم ناحیه دمیلائنه به حجم کل نخاع در جمعا ۴۸ برش ۵ میکرونی از ناحیه کمری بررسی شد (با کمک نرم افزار z Image). درصد حجم ناحیه دمیلائنه در

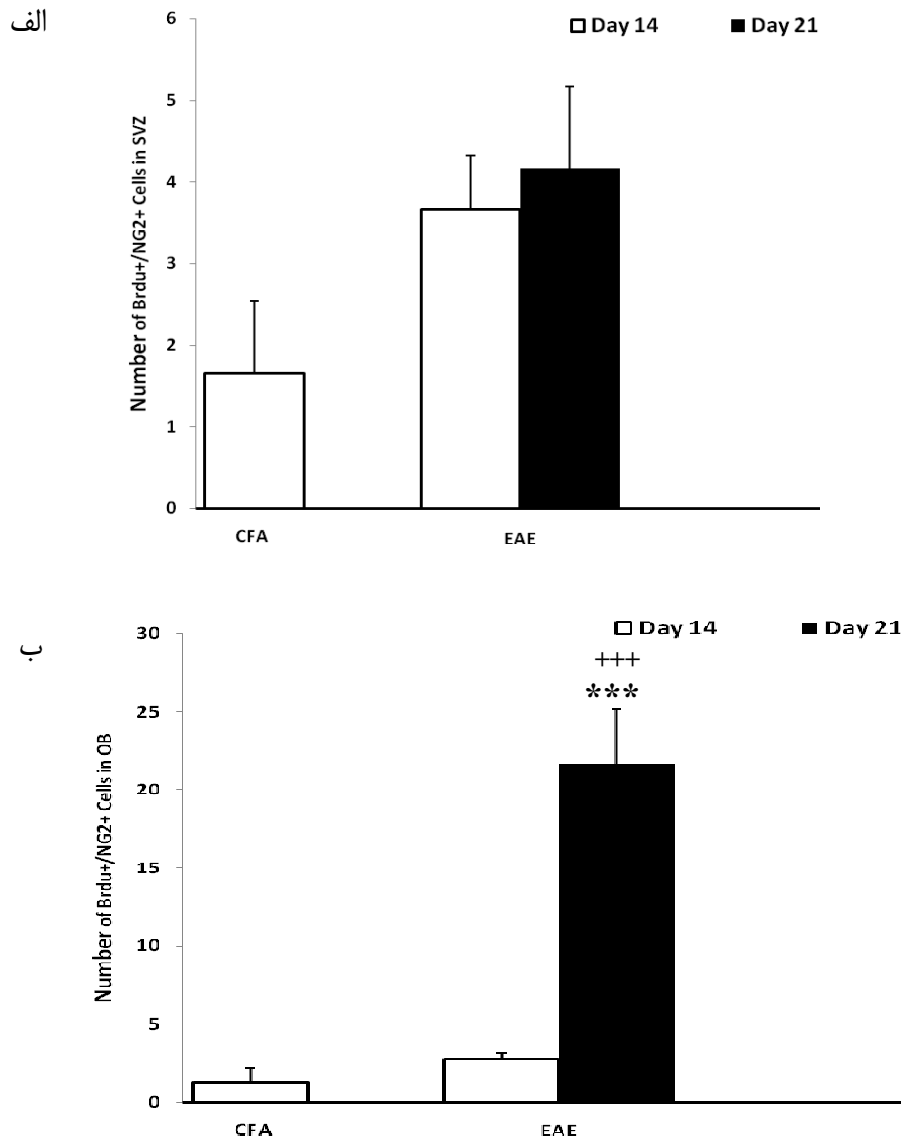


**شکل ۳-** مقایسه تعداد سلول های Brdu+ در ناحیه زیر بطنی (SVZ) (الف) و پیاز بویایی (OB) (ب) در گروه های کنترل (CFA) و EAE در روزهای ۱۴ و ۲۱ پس از القا. تعداد سلول های Brdu+ در ناحیه SVZ گروه کنترل بیشتر از گروه EAE است ولی تعداد این سلول ها در OB در گروه های EAE افزایش یافته و با پیشرفت بیماری از روز ۱۴ تا ۲۱ بعد از القا بر تعداد این سلول ها افزوده شد.  $p < 0.001$  \*\*\*= در مقایسه با گروه کنترل (CFA)، (ج) نمونه تصاویر ایمونوهیستوشیمی گروههای مختلف در SVZ و OB نشان داده شده است



**ج**





**شکل ۴-** مقایسه تعداد سلول های  $\text{Brdu}^+/\text{NG2}^+$  در ناحیه زیر بطنی (SVZ) (الف) و پیاز بویایی (OB) (ب) در گروه های کنترل (CFA) و القا شده (EAE) در روز های ۱۴ و ۲۱ پس از القا. تعداد سلول های  $\text{Brdu}^+/\text{NG2}^+$  بعد از القا EAE در SVZ افزایش یافت. با پیشرفت بیماری از روز ۱۴ تا ۲۱ تعداد این سلول ها بطور معنی داری در پیاز بویایی بیشتر شد.  $p < 0.001$  در مقایسه با گروه کنترل،  $+++p < 0.001$  در مقایسه با گروه EAE14.

بیماری در اثر تضعیف سیگنال ردیابی نمی شوند) و ثانیا باعث تحریک مهاجرت سلول های تکثیر شونده از SVZ به OB می شود. نمودار تصاویر مربوط به ایمونوهیستوشیمی بر علیه Brdu در شکل ۳-ج ارائه شده است.

برای مشخص کردن سرنوشت تمایزی سلول های SVZ از مارکر اختصاصی سلول های اجدادی اولیگودندروسیتی ( $\text{NG2}$ ) استفاده شد. ایمونوهیستوشیمی برای Brdu و مارکرهای سلولی خاص نشان داد که بعضی از سلول های SVZ که در مسیر RMS به OB مهاجرت می کنند به عنوان سلول های اجدادی اولیگودندروسیتی،  $\text{NG2}$  بیان می کنند.

گروه EAE ۲۱،  $0.48 \pm 5$  بود. تعداد این سلول ها در OB در گروه کنترل  $7/5 \pm 17/5$ ، در گروه EAE ۱۴،  $17 \pm 33$  و در گروه EAE ۲۱،  $5/6 \pm 41/5$  بود. همانطور که نتایج نشان می دهد تعداد سلول های  $\text{Brdu}^+$  در ناحیه SVZ گروه کنترل بیشتر از گروه EAE است ولی تعداد این سلول ها در OB در گروه های EAE افزایش می یابد و با پیشرفت بیماری از روز ۱۴ تا ۲۱ بعد از القا بر تعداد این سلول ها افزوده می شود (شکل ۳-الف و ب). از این یافته ها می توان نتیجه گرفت که القا EAE اولاً باعث تخلیه سلول های تکثیر شونده نشان دار در SVZ می شود (سلول های جدید تولید شده در اثر القای



تعداد سلول های  $BrdU^+/NG2^+$  در SVZ در گروه کنترل، EAE14، EAE21 به ترتیب  $1/66 \pm 0/66$ ،  $1/66 \pm 0/88$  و  $3/66 \pm 0/66$  و  $4/16 \pm 1/01$  و در OB این گروه ها به ترتیب  $1/33 \pm 0/54$  و  $2/8 \pm 0/37$  بود (شکل ۴).

به نظر می رسد با القا بیماری و افزایش شدت آن تعداد سلول ها در SVZ کاسته شده و در OB افزوده می شود همچنین القا EAE تعداد سلول های اجدادی اولیگودندروسیتی  $BrdU^+/NG2^+$  را بطور بارزی افزایش می دهد.

## بحث

ام اس یکی از شایعترین بیماری های خود ایمنی با زمینه ژنتیکی است که با التهاب و دمیالیناسیون در CNS همراه است [۱۴] و با فراوانی قابل توجهی در اوایل بزرگسالی بروز می کند (زنان دو برابر مردان). مدل EAE یک مدل حیوانی برای بررسی شاخص های التهابی و رفتاری بیماری ام اس است که با وساطت سلول های  $CD4^+$  T ایجاد می شود و با اینفلتراسیون سلولی و دمیالیناسیون همراه است و در نهایت منجر به فلج می شود. در مدل EAE سیتوکین های التهابی  $h1$  مثل  $TNF\alpha$  و  $IFN\gamma$  نقش مهمی در ایجاد بیماری دارند [۲۵]. در مطالعه حاضر 35-55 MOG ایجاد EAE مزمن و پیشرونده نمود بطوریکه علایم بیماری بیشتر شد و پلاک های دمیالینه بیشتری در نخاع ظاهر گردید. در این تحقیق رفتار سلول های SVZ در پاسخ به EAE بررسی شده است.

داده های ما نشان داد که دمیالیناسیون التهابی ایجاد شده در مدل EAE باعث کاهش سلول های نشان دار شده در SVZ می شود، هر چند که ممکن است سلول های ایجاد شده پس از القای بیماری به دلیل تضعیف نشانه  $BrdU$  قابل ردیابی نباشد. بعبارتی کاهش سیگنال جابجایی سلول های از پیش نشاندار از SVZ به OB و نقاط آسیب را نشان میدهد و لزوماً دلیل کاهش سلول های بنیادی درونزاد و به عبارت بهتر سلول های تکثیر شونده در SVZ نیست. نتایج ضد و نقیضی در این ارتباط وجود دارد. گروه Calza اولین بار نشان دادند که در رتی که EAE القا شده به دلیل غلظت بالای NGF تکثیر در SVZ افزایش می یابد [۴]. یافته های مشابه دیگری گزارش کرده اند که EAE می تواند تکثیر و مهاجرت NSCs/NPCs

Neural Stem Cells/Neural Progenitor Cells) را از SVZ تحریک کند [۲۷]. بطور مشابه نتایج دیگر نشان داد که در EAE القا شده با PLP، سلول های T خود ایمنی خاص CNS که فاکتور نوروتروفیک BDNF تولید می کنند با تاثیر روی تکثیر سلول های اجدادی بر نورونز SVZ و DG (Dentate Gyrus) موثر است [۳۲]. به هر حال مطالعات متعدد دیگری نیز گزارش کرده اند که سیتوکین های التهابی تکثیر و نورونز NSCs/NPCs را کاهش می دهند [۹]. Lindvall و همکارانش مشاهده کردند که التهاب مغزی ایجاد شده توسط تزریق لیپوساکارید بطور موثری تکثیر و نورونز NSCs/NPCs را در هیپوکمپ رت مهار می کند [۹]. گروه Palmer گزارش کردند که در *in vivo* و *in vitro*  $TNF\alpha$  و IL-6 سیتوکین-های اصلی برای ایجاد التهاب توسط لیپوساکاریدها هستند و باعث کاهش نورونز هیپوکمپ می شوند. این سیتوکین ها فاکتورهای کلیدی در مهار تکثیر NPC و القا مهاجرت NPC در مدل EAE هستند [۲۳].

در گزارشی دیگر Pluchino و همکارانش بیان ژنی موش C57BL6 با EAE القا شده توسط MOG را آنالیز کردند و تنظیم افزایشی ژن سیتوکین های التهابی مثل  $TNF\alpha$  و  $IFN\gamma$  در ۲۰ و ۳۰ روز بعد از ایمونیزاسیون را مشاهده کردند و همچنین آنها یافتند که تکثیر سلول های بنیادی مغزی در SVZ کاهش می یابد [۲۹].

در سال ۲۰۱۰ گروه Zhuyi نشان دادند که در مدل EAE القا شده با MOG، تکثیر سلول های بنیادی مغزی در SVZ و DG کاهش می یابد که این کاهش سلول ها در هیپوکمپ می تواند دلیلی بر اختلالات شناختی در بیماران ام اس باشد [۱۵].

در این مطالعه ما مشاهده کردیم که در مدل EAE مهاجرت سلول های اجدادی از SVZ به OB افزایش می یابد که با بخشی از یافته های قبلی مطابقت دارد [۲۷]. در مغز بدون آسیب، اجداد عصبی از SVZ از طریق RMS به OB مهاجرت می کنند. RMS از لوله های آستروسیتی (glial tubes) تشکیل شده است و باعث هدایت نوروبلاست-ها به OB می شود و از ورود آنها به بافتهای مجاور مانع می کند. در OB این سلول ها به نورونهای پری گرانولار و

می کنند و منحصرأ به آستروسیت ها و اولیگودندروسیت ها متمایز می شوند. در گروه کنترل سلول های کمی که به کورپوس کالوزوم مهاجرت می کنند به آستروسیت متمایز می شوند، بنابراین می توان گفت که تمایز آستروگلیال در نتیجه التهاب خفیف حاصل می شود، پدیده ای که در بسیاری از آسیب های غیر دمیلینه دیده می شود [۱۷]. بر عکس تولید اجداد اولیگودندروسیتی  $NG_2^+$  و بندرت تولید اولیگودندروسیت بالغ در نتیجه ایجاد مدل EAE دیده می شود. جالب است که سلول های SVZ در پاسخ به مرگ نرون های استریاتال به نرون های دوپامینی متمایز می شوند و در پاسخ به آسیب-های کورتیکال حاد به آستروسیت متمایز می شوند [۱۰]. بنابراین اگرچه انواع آسیب ها باعث مهاجرت سلول های SVZ می شود ولی سرنوشت این سلول ها وابسته به سیگنال هایی است که از محل آسیب برمی خیزند [۲۷].

بطور کلی داه های ما نشان می دهد که احتمالاً سلول های بنیادی عصبی به عنوان منبعی از سلول های اجدادی اولیگودندروسیتی رمیلینه کننده می توانند در ترمیم نقش داشته باشند. اگرچه به نظر می رسد که تمایز سلول های اجدادی اولیگودندروسیتی به اولیگودندروسیت محدود است ولی احتمال القا این توان توسط فاکتورهای رشد [۶]، پیشنهاد می کند که دستکاری سلول های اجدادی عصبی CNS بالغ ممکن است دستاوردهای درمانی جدیدی برای بیماری های دمیلینه مثل ام اس آماده کند.

### سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس و صندوق حمایت از پژوهشگران انجام شده است.

## References

- [1] Battista D, Rutishauser U, Removal of polysialic acid triggers dispersion of subventricularly derived neuroblasts into surrounding CNS tissues. *J Neurosci* 30 (2010) 3995-4003.
- [2] Ben-Hur T, Einstein O, Bulte J, Stem cell therapy for myelin diseases. *Current Drug Target* 6 (2005) 3-19.

گرانولار متمایز می شوند. نشان داده شده که آسیب ایجاد شده یا دمیلیناسیون القا شده باعث به هم خوردن ساختار این مسیر آستروسیتی شده و سبب جدا شدن سلول های اجدادی SVZ از RMS و مهاجرت به ناحیه آسیب می شود [۲۴,۴,۳] و در پاسخ به EAE این سلول ها می توانند به آستروسیت و اولیگودندروسیت هم متمایز شوند [۱۳]. در گزارشی دیگر سلول های اجدادی نورونها به SVZ موش shiverer پیوند شدند و مشاهده شد که سلول ها به OB مهاجرت می کنند (جایی که آنها به آستروسیت و اولیگودندروسیت متمایز می شوند) و نشان دهنده مسیر مهاجرتی این سلول هاست [۳۱].

سلول های بنیادی عصبی می توانند به سلول های اجدادی اولیگودندروسیتی و نرونی متمایز شوند. برای نشاندار کردن سلول های مهاجرتی قبل از القا EAE ۷ بار تزریق Brdu انجام گرفت. سلول های نشاندار در گروه کنترل محدود به SVZ و RMS هستند ولی در مدل EAE این سلول ها در سایر جاها مثل کورپوس کالوزوم، کورتکس، استریاتوم و غیره دیده می شوند [۲۷].

نتیجه مطالعات ما نشان داد که سلول های اجدادی اولیگودندروسیتی  $NG_2^+$  در OB افزایش می یابد. می توان گفت که سیگنال های خاص مثل دمیلیناسیون ایجاد شده در نتیجه EAE باعث متمایز شدن سلول های SVZ به سرنوشت اولیگودندروسیتی می شود تا بتواند در مکانیسم های ترمیم میلین دخالت کند. دمیلیناسیون التهابی القا شده در مدل EAE باعث تحریک تمایز سلول های مهاجرتی نابالغ به فنوتیپ بالغ می شود. در حقیقت سرنوشت سلول های مهاجرتی مطابق با سیگنال های مغزی که به آنها می رسند متفاوت است. مطالعات قبلی هم نشان داده که در مناطقی مثل کورپوس کالوزوم سلول های مهاجرتی سرنوشت گلیال پیدا

- [3] Nait-Oumesmar B, Picard-Riera N, Kerninon C, Decker L, Seilhean D, Hoglinger G, Hirsch E, Reynolds R, and Evercooren A B, Activation of the subventricular zone in multiple sclerosis: Evidence for early glial progenitors. *PNAS* 194 (2007) 4694-4699.
- [4] Calza L, Gardino L, Pozza M, Bettelli C, Micrera A, Proliferation and phenotype regulation in the subventricular zone during allergic encephalomyelitis:

- In vivo evidence of a role of nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (1998) 3209-3214.
- [5] Chandran S, Joannides AJ, Human embryonic stem cells: an experimental and therapeutic resource for neurological disease. *Neurol Sci* 265 (2008) 84-88.
- [6] Criage C, Tropepe V, Morshead C, Reynolds BAS, Evander D, In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J Neurosci* 16 (1996) 2649-2658.
- [7] Cudrici C, Niculescu T, Niculescu F, Oligodendrocyte cell death in pathogenesis of multiple sclerosis: Protection of Oligodendrocytes from apoptosis by complement. *J Rehabil Res Dev* 43 (2006) 123-132.
- [8] Decker L, Durbec P, Rougon G, and Evercooren A. B, Loss of polysialic residues accelerates CNS neural precursor differentiation in pathological conditions. *Mol Cell Neurosci* 19 (2002) 225-238.
- [9] Ekdah CT, Claasen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O, Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (2003) 13632-13637.
- [10] Fallon J, Reid S, Kinyamu R, Opole I, Opole R, Baratta J, Korc M, Endo T, Duong A, Nguyen G, In vivo induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (2000) 14686-14691.
- [11] Franklin R.J.M., Why does remyelination fail in multiple sclerosis? *Nat Rev Neurosci* 3 (2002) 705-714.
- [12] Geisler S, Heilmann H, Veh RW, An optimized method for simultaneous demonstration of neurons and myelinated fiber tracts for delineation of individual trunco- and palliothalamic nuclei in the mammalian brain. *Histochem Cell Biol* 117 (2002) 69-79.
- [13] Goldman S. A. & Luskin, M. B, Strategies utilized by migrating neurons of the postnatal vertebrate forebrain. *Trends Neurosci* 21 (1998) 107-114.
- [14] Gold R, Linington C, Lassmann H, Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 126 (2006) 1953-1971.
- [15] Guo J, Hongzeng Li H, Yu C, Liu F, Meng Y, Gong W, Zhuyi Li, Wang J, Decreased neural stem/progenitor cell proliferation in mice with chronic/nonremitting experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurosignals* 18 (2010) 1-8.
- [16] Hemmer B, Archelos J, Hartung HP, New concepts in the immunopathogenesis of MS. *Nature* 3 (2002) 291-301.
- [17] Holmin S, Almqvist P, Lendahl U & Mathiesen T, Adult nestin-expressing subependymal cells differentiate to astrocytes in response to brain injury. *Eur J Neurosci* 9 (1997) 65-75.
- [18] Imitola J, Snyder EY, Khoury SJ, Genetic programs to responses of neuronal stem /progenitor cells during demyelination: potential insights into repair mechanisms in multiple sclerosis. *Physiol Genomics* 14 (2003) 171-197.
- [19] Kuhn HG, Palmer TD, Adult neurogenesis: a compensatory mechanism for neuronal damage. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 251 (2001) 152-158.
- [20] Lois C, Alvarez-Buylla A, Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264 (1994) 1145-1148.
- [21] McQualter JL, Bernard CC, Multiple sclerosis: a battle between destruction and repair. *J Neurochem* 100 (2007) 295-306.
- [22] Menn B, Garcia-Verdugo JM, Yaschine C, Gonzalez-Perez O, Rowitch D, Alvarez-Buylla A: Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci* 26 (2006) 7907-7918.
- [23] Monje ML, Toda H, Palmer TD: Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 302 (2003) 1760-1765.
- [24] Nait-Oumesmar B, Decker L, Lachapelle F, Bachelin C, Baron-Van Evercooren A, Progenitor cells of adults mouse subventricular zone proliferate, migrate and differentiate into oligodendrocytes after demyelination. *Eur J Neurosci* 11 (1999) 4357-4366.
- [25] Pedotti R, De Voss JJ, Steinman L, Galli SJ, Involvement of both 'allergic' and 'autoimmune' mechanisms in EAE, MS and other autoimmune disease. *Trends Immunol* 24 (2003) 479-484.
- [26] Picard-Riera N, Nait-Oumesmar B, Baron-Van Evercooren A, Endogenous adult neural stem cells: limits and potential to repair the injured central nervous system. *J Neurosci Res* 76 (2004) 223-231.
- [27] Picard-Riera N, Decker L, Delarasse C, Goude K, Nait-

- Oumesmar B, Liblau R, Pham-Dinh D, Baron-Van Evercoorent A, Experimental autoimmune encephalomyelitis mobilizes neural progenitors from the subventricular zone to undergo oligodendrogenesis in adult mice. *PNAS* 99 (2002) 13211–13216.
- [28] Pistorio A, Hendry S, Wang X, A modified technique for high-resolution staining of myelin. *J Neurosci Meth* 153 (2006) 135–146.
- [29] Pluchino S, Muzio L, Imitola J, Deleidi M, Alfaro-Cervello C, Salani G, Porcheri C, Brambilla E, Cavasinni F, Bergamaschi A, Garcia-Verdugo JM, Comi G, Khoury SJ, Martino G, Persistent inflammation alters the function of the endogenous brain stem cell compartment. *Brain* 131(2008) 2564–2578.
- [30] Rolak LA, Multiple sclerosis: it's not the disease you thought it was. *Clin Med Res* 1 (2003) 61-62.
- [31] Zhao C, Fancy SPJ, Magy L, Franklin RJ, Stem cells, progenitors and myelin repair. *J Anatomy* 207 (2005) 251-258.
- [32] Ziv Y, Ron N, Butovsky O, Landa G, Sudai E, Greenberg N, Cohen H, Kipnis J, SchwartzM, Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci* (2006) 268-275.