

## PKC Mediates endogenous inhibition of myelin repair in the context of local demyelination induced in mice optic chiasm

Pourabdolhossein F<sup>1</sup>, Javan M<sup>1\*</sup>, Mirnajafi-Zadeh J<sup>1</sup>, Dehghan S<sup>1</sup>, Sherafat M<sup>1</sup>, Mozafari S<sup>1</sup>, Ahmadiani A<sup>2</sup>

1- Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I. R. Iran.

2- Neuroscience Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran.

Received July 8, 2010; Accepted October 31, 2010

### Abstract:

**Background:** Axon regeneration in adult CNS is limited by the presence of inhibitory proteins associated with myelin. Although blocking PKC activity attenuates the ability of CNS myelin to inhibit neurite outgrowth, the role as well as mechanisms underlying the remyelination inhibition in CNS are still largely unknown. Considering the role of PKC in axonal regeneration and the vulnerability of optic chiasm in multiple sclerosis (MS), we assessed the effect of PKC inhibition on remyelination of lysolecithin induced demyelinated optic chiasm.

**Materials and Methods:** Demyelination was induced by stereotaxic intra-chiasmatic injection of 1 $\mu$ l lysolecithin (%1) in male mice. Intracerebroventricular daily injection of a PKC inhibitor (GO6976) was done for 14 days post-lesion. Demyelination and remyelination patterns in optic chiasm were confirmed through histological verification and electrophysiological study using Luxol fast blue staining and visual evoked potentials (VEP) recording, respectively.

**Results:** In lysolecithin treated animals, demyelination was mostly marked at days 3 and 7 post-lesion and an incomplete remyelination occurred at day 14 post-lesion. VEP recording showed increased P-latency at the days 3 and 7 post-lesion while it partially decreased at day 14. Following the inhibition of PKC, while the extent of demyelination and P-latency slightly decreased at the days 3 and 7 post-lesion, it recovered at day 14. VEP recording data were confirmed by histological verification.

**Conclusion:** Inhibition of PKC activity could represent a potential therapeutic approach for stimulating the remyelination process in the context of multiple sclerosis.

**Keywords:** Demyelination, Myelin, PKC, Optic chiasm, Multiple sclerosis, Mice

\* Corresponding Author.

Email: mjavan@modares.ac.ir

Tel: 0098 21 828 84522

Fax: 0098 21 828 84555

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, Winter, 2011; Vol. 14, No 4, Pages 369- 379

# پروتئین کیناز C مهار بازسازی میلین در دمیلیناسیون موضعی القا شده در کیاسما

## بینایی موش را میانجی‌گری می‌کند

۱ فرشته پورعبدالحسین ، محمد جوان<sup>\*</sup> ، سید جواد میر نجفی زاده ، سمانه دهقان ، محمدامین شرافت ، صباح مظرفی ، ابوالحسن احمدیانی<sup>۵</sup>

### خلاصه

سابقه و هدف: پروتئین‌های مهاری موجود در میلین با فعال کردن PKC، ترمیم آکسونی در مغز بالغین را محدود می‌کنند. اگرچه مهار PKC، توانایی پروتئین‌های میلین را در مهار رشد آکسونی کاهش می‌دهد، ولی نقش و مکانیسم آن در مهار بازسازی میلین تاکنون ناشناخته است. با توجه به درگیر شدن دستگاه بینایی در بیماری MS، هدف از این مطالعه بررسی اثر مهار PKC در بازسازی میلین کیاسما می‌باشد.

مواد و روش‌ها: با تزریق یک میکرولیتر لیزولیستین دمیلیناسیون در کیاسما موش نر القاء شد و تزریق روزانه داخل بطنی مهار کننده پروتئین کیناز C (GÖ6976) تا ۱۴ روز پس از القاء ادامه یافت. الگوی دمیلیناسیون و رمیلیناسیون در کیاسما بینایی با رنگ آمیزی اختصاصی میلین و با استفاده از ثبت پتانسیل برانگیخته بینایی (VEP) انجام شد.

نتایج: در حیوانات دریافت کننده لیزولیستین به تهایی بیشترین دمیلیناسیون در روزهای ۳ و ۷ پس از تزریق مشاهده شد و رمیلیناسیون کمی هم در روز ۱۴ دیده شد، اما در حیواناتی که با مهارگر پروتئین کیناز C نیز تیمار شده بودند، دمیلیناسیون کمی در روز ۳ پس از تزریق مشاهده شد و رمیلیناسیون در روزهای ۷ و ۱۴ افزایش یافت. در داده‌های حاصل از ثبت VEP نیز در گروه آسیب، بیشترین تاخیر موج P در روزهای ۳ و ۷ بود که در روز ۱۴ برگشت به سمت نرمال داشت، ولی در گروه تیمار میزان تاخیر موج P در روزهای ۳ و ۷ به شکل قابل ملاحظه‌ای کاهش داشت.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد فعالیت پروتئین کیناز C در مهار ترمیم درونزاد میلین نقش بارزی داشته و مهار آن به عنوان یک راهکار درمانی جدید برای پیشبرد فرایند رمیلیناسیون در بیماری‌های مثل اس.ا.س. قابل استفاده باشد.

وازگان کلیدی: دمیلیناسیون، میلین، آسیب پروتئین کیناز C، کیاسما بینایی، اس، موش سوری

فصلنامه علمی - پژوهشی فیض، دوره چهاردهم، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۹، صفحات ۳۷۹-۳۶۹

### مقدمه

مبتلا به MS سیستم بینایی درگیر است [۳]. ممکن است به دنبال دمیلیناسیون یک رمیلیناسیون ناقص و خود به خودی داشته باشیم که پاسخ ترمیمی ذاتی به دنبال از دست رفتن میلین بین گره‌های رانویه است و با جایگزین صفحه میلینی جدید بین گره‌ها می‌تواند عملکرد هدایت عصبی از دست رفته را جبران کند [۴]. در واقع گزارش شده است که برخی از آسیب‌های مغزی در بیماری MS توسط اولیگو دوندروسیت‌ها [۵] و شوان سل‌ها [۶] رمیلینه می‌شود؛ اگرچه بیشترین قسمت آسیب‌ها، دمیلیناسیون وسیعی بدون ترمیم میلین را نشان داده‌اند [۷]. علت این ترمیم ناموفق آکسونی در سیستم عصبی مرکزی نه تنها به عدم کفایت ترمیم ذاتی نورون‌های بالغ نسبت داده شده، بلکه مواجهه محیطی این آکسون‌های آسیب دیده با میلین هم می‌تواند دلیل دیگری باشد [۸]. شواهد زیادی ارائه شده است که قسمت عمدۀ فعلیت مهاری در محیط CNS به اجزای پروتئینی موجود در میلین و مولکول‌های اسکار گلایایی در محل آسیب مربوط است [۹]. سه پروتئین مهاری عمدۀ در میلین موجود در سیستم عصبی مرکزی شناسایی شده است که عبارتند از: گلیکوپروتئین وابسته به میلین (MAG) [۱۰]؛ A Nogo [۱۱]، و پروتئین میلین اولیگو دوندروسیتی (OMgp) [۱۲]. مطالعات اخیر

آکسون سلول‌های عصبی در سیستم عصبی مرکزی (CNS) پستانداران بالغ، توانایی ذاتی کمی برای ترمیم پس از آسیب دارند [۱]. مولتیپل اسکلروزیس (MS) یک بیماری مزمن التهابی CNS است که مهمترین شاخص آن دمیلینه شدن اعصاب محیطی و مرکزی، آسیب آکسونی و از دست رفتن آنها می‌باشد و در نتیجه اختلالات عصبی متعددی متناسب با آن ظاهر می‌شود [۲]. فقدان یا نقص بینایی، یکی از علایم اولیه بیماری است که حتی قبل از تشخیص بیماری نیز بروز می‌کند. در پیش از ۷۰ درصد بیماران

<sup>۱</sup> دانشجوی دکترا، گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

<sup>۲</sup> دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

<sup>۳</sup> استاد، گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

<sup>۴</sup> کارشناسی ارشد، گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

<sup>۵</sup> استاد، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهری بدشتی، تهران

\* لشائی نویسنده مسؤول؛

تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه فیزیولوژی

تلفن: ۰۲۱ ۸۲۸۸۴۵۲۲ - ۰۲۱ ۸۲۸۸۴۵۵۵

پست الکترونیک: mjavan@modares.ac.ir

تاریخ پذیرش نهایی: ۸۹/۸/۶ تاریخ دریافت: ۸۹/۴/۱۷

حیوانات با تزریق داخل صفاقی کتابمن ( $70\text{ mg/kg}$ ) و زایلазین ( $10\text{ mg/kg}$ ) که در محلول استریل سالین  $0/9$  درصد رقیق شدند، بیهوش می‌شدند. دمیلیناسیون با تزریق محلول  $1/9$  درصد لیزولسیتین (سیگما، USA) در محلول استریل سالین  $0/9$  درصد با حجم ۱ میکرولیتر در کیاسماهی بینایی القا می‌شد [۱۷]. درصد با حجم ۱ میکرولیتر در کیاسماهی بینایی القا می‌شد [۱۷]. موش‌ها با موقعیت سر کاملاً صاف در دستگاه استریوتاکس Steolting, USA) قرار می‌گرفتند و ۱ میکرولیتر از محلول  $1/9$  درصد لیزولسیتین با سرنگ همیلتون  $1\text{ ml}$  به کیاسماهی بینایی تزریق می‌شد. موقعیت کیاسما با استفاده از اطلس موش:  $3/9\text{ mm}$  جلوی لامدا با موقعیت جانبی صفر نسبت به لامدا و با عمق  $mm 5/75$  از دورا بود [۱۸]. در حیوانات گروه کنترل با همان مشخصات اطلس و حجم یکسان سالین تزریق می‌شد. لیزولسیتین یا سالین با Steolting, USA) تزریق شد. جهت اطمینان از فراهم نمودن زمان لازم برای انتشار لیزولسیتین، سوزن تزریق به مدت ۵ دقیقه در محل تزریق نگه داشته می‌شد. مطالعه با تزریق رنگ کوماسی بلو ۲ درصد در کیاسماهی بینایی، جهت یافتن موقعیت دقیق تزریق مناسب با مشخصات اطلس و همچنین تخمین تقریبی میزان انتشار رنگ در محل تزریق انجام شد (داده‌ها نشان داده نشده‌اند).

#### کانول گذاری داخل بطن مغزی

جهت تزریق داخل بطنی داروی GÖ6976، مهارگر PKC (sigma, USA) لازم بود که حیوانات کانول گذاری شوند. دارو هر روز با دوز  $nmol/animal/day$   $2/5$  با حجم  $5\text{ }\mu\text{l}$  میکرولیتر تزریق می‌شد. برای کانول گذاری ابتدا حیوانات را با روش فوق بیهوش کرده و در دستگاه استریوتاکس قرار می‌گرفتند. جایگاه کانول با توجه به مشخصات اطلس موش [۱۸].  $3/6\text{ mm}$  جلوی لامدا،  $1/1\text{ mm}$  جانبی نسبت به لامدا و با عمق  $2/2\text{ mm}$  نسبت به دورا بود که جمجمه توسط دریل سوراخ شده و کانول مورد نظر با مشخصات فوق با عمق  $1\text{ mm}$  در بطن راست گذاشته شده و توسط سیمان دندان پزشکی ثابت می‌شد. حیوانات با توجه به پروتکل، دارو را از طریق کانول داخل بطنی روزانه دریافت می‌کردند [۱۹]. حلال دارو سالین با درصد بسیار ناچیز ( $0/002$ ) درصد DMSO بود.

#### گروه‌های آزمایشی

مطالعه ۱: بررسی عملکرد میلیناسیون (دمیلیناسیون و رمیلیناسیون) و عوامل مداخله در حیوان زنده با استفاده از ثبت الکتروفژیولوژیک VEP. در این مطالعه  $12\text{ گروه آزمایشی}$  داشتیم (در هر گروه  $n \geq 6$  می‌باشد). ۳ گروه اول (کنترل)، حیواناتی بودند که ۱ میکرولیتر سالین به کیاسما و ۵ میکرولیتر سالین به صورت

نشان داده‌اند که هر سه آنها از طریق یک گیرنده مشترک به نام گیرنده Nogo (NgR) عمل می‌کنند و با فعال نمودن Rho GTPase ها، بهویژه Rho A و همچنین پروتئین کیناز C (PKC) می‌توانند رشد مخروط آکسونی و ترمیم عصبی و میلین را مهار کنند [۱۳، ۱]. غیر فعال کردن مسیر سیگنالینگ Rho A افکتورهای آن می‌توانند رشد نوریت‌هارا افزایش دهد [۱]. رمیلیناسیون در CNS توسط سلول‌های بنیادین چندتوانی و سلول‌های پیش ساز اولیگوکندروسیتی (OPCs) میانجی‌گری می‌شود، اما در بیماری MS به دلایلی که هنوز ناشناخته است، موفق نیست. برخی شواهد نشان می‌دهند که تمایز OPC ها به اولیگوکندروسیت‌های بالغ به علت حضور مهارکننده‌های میلینی در محل آسیب مهار می‌شود و این می‌تواند یکی از دلایل شکست رمیلیناسیون در بیماری‌های نظری MS باشد [۱۳] Baer و همکارانش نشان دادند که مهار وابسته به میلین تمایز OPC ها می‌تواند به علت فعال شدن مسیر سیگنالینگ Rho A-ROCK و کیناز واپسی به آن و یا مسیر سیگنالینگ PKC باشد [۱۳]. لیزولسیتین آنالوگی از لیزوفسفاتیدیل کولین با اثر دترجتی است و به طور ویژه روی سلول‌های میلینی کننده اثر می‌گذارد [۱۴]، باعث حل شدن چربی شده و در ماده سفید CNS موش بالغ دمیلیناسیون را القا می‌کند [۱۵]. در مقایسه با سایر سموم مثل اتیدیوم بروماید، بیشترین اثر آن روی سلول‌های میلینی کننده است و اثر سمی کمتری روی سایر سلول‌ها، نظری آسترودسیت‌ها دارد؛ بنابراین می‌تواند با القای دمیلیناسیون و به دنبال آن ترمیم احتمالی را ایجاد کند و برای القای دمیلیناسیون ماده مناسبی است [۱۶]. در این مطالعه کیاسماهی بینایی به جهت درگیری فراوان آن در بیماری ام.اس. جهت القای دمیلیناسیون موضعی با لیزولسیتین انتخاب شده و الگوی دمیلیناسیون و رمیلیناسیون در کیاسماهی موش بالغ در حضور و عدم حضور مهارگر PKC بررسی گردید.

## مواد و روش‌ها

### حیوانات

در این تحقیق از موش‌های نر نژاد C57/BLJ6 در محدوده وزنی  $25-30\text{ گرم}$  (خریداری شده از موسسه پاستور، کرج) استفاده شد. حیوانات در شرایط تاریکی/روشنایی  $12$  ساعته با دمای کنترل شده ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) و بدون محدودیت دسترسی به آب و غذا نگهداری شدند. کلیه آزمایشات روی حیوانات با رعایت اصول اخلاقی و ثبت شده بین المللی کار با حیوانات آزمایشگاهی که مورد تائید کمیته اخلاق دانشگاه تربیت مدرس بود، انجام شد. القای موضعی دمیلیناسیون

محلول پارافرمالدھید ۴ درصد به مدت یک شب در دمای  $^{\circ}\text{C}$  قرار داده شد، سپس بافت مغز در فرایند پردازش بافتی قرار گرفت. پس از آب گیری با سری الكلهای ۵۰ تا ۱۰۰ درصد هر کدام یک ساعت و شفاف سازی با زایلول (۲ بار ۴۵ دقیقه)، نمونه‌ها بین ۶-۳ ساعت در پارافین با دمای  $^{\circ}\text{C}$  ۶۰ انکوبه شده و در انتها بلوك-های پارافینی از مغز تهیه شده و جهت برش گیری آساده گردید. برش‌های کرونال به صورت سریال و به ضخامت ۶ میکرون از ناحیه کیاسما و اعصاب بینایی تهیه گردیده و روی لامهایی که از قبل با چسب پلی لایزن آغشته شده بود، قرار داده شدند. رنگ آمیزی دوگانه اختصاصی میلین توسط لوگول فست بلو و کرزیل فست ویوله (Cresyl Fast Violet)

بیست و یک برش کرونال تهیه شده از کیاسما هر حیوان جهت رنگ آمیزی انتخاب شد. برای شفاف سازی و حذف پارافین نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه، سه بار در محلول زایلول قرار گرفته و ۹۵ سپس مرحله آب دهی بافتی که شامل عبور از الكل مطلق و ۹۰ درصد به مدت ۵ دقیقه بود و سپس آنها در محلول از قبل آماده شده LFB ۰/۱ درصد (British drug house, UK) حل شده در الكل ۹۵ درصد به مدت ۳ ساعت در حمام بافتی با دمای  $^{\circ}\text{C}$  ۶۰ قرار گرفتند. پس از آن در الكل ۹۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه و ۰/۰ درصد قرار داده و به دنبال آن چند بار در الكل ۷۰ درصد قرار گرفتند [۲۰]. بعد از شستشو با آب مقطر آنها در CFV ۹۵ و بعد از شست و شوی نمونه‌ها با آب مقطر، دوبار در الكل ۹۰ درصد و ۱۰۰ درصد آب گیری کرده و پس از شفاف سازی نهایی بافتی در زایلول دو بار به مدت ۱۰ دقیقه قرار می‌گیرند. در نهایت نمونه‌ها با استفاده از چسب انتالن (Merck, Germany) روی لام ثابت می‌شوند.

#### تهیه تصویر از لام نمونه‌ها و آنالیز تصاویر

تصاویر از ۲۱ نقطه مشخص از برش‌های سریال از کیاسما بینایی (در محدوده تقریبی ۱۲۰ میکرون جلوی برگما تا ۹۸ میکرون پشت برگما) توسط میکروسکوپ نوری Olympus مدل AX70 و دوربین مدل DP50 تهیه و آنالیز شد. وسعت دمیلیناسیون با استفاده از نرم افزار J Image اندازه‌گیری و کمی شد و در هر تصویر نسبت وسعت ناحیه دمیلینه به کل سطح ناحیه مورد نظر (کیاسما) اندازه گیری گردید [۲۱, ۲۰]. داده‌های بدست آمده از هر حیوان میانگینی از کل ۲۱ نقطه به دست آمده بود و در هر گروه آزمایشی حداقل ۳ حیوان تکرار شد ( $n=3$ ).

داخل بطنی دریافت می‌کردند و در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ پس از تزریق ثبت گرفته می‌شد. ۳ گروه بعدی حیواناتی بودند که ۱ میکرولیتر لیزولستین ۱ درصد در کیاسما آنها تزریق می‌شد و در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ پس از تزریق ثبت گرفته می‌شد. ۳ گروه بعد حیواناتی بودند که علاوه بر تزریق لیزولستین در کیاسما، روزانه مهارگر PKC (GO6976) را با دوز ۲/۵ nmol/animal/day با حجم ۵ میکرولیتر دریافت کرده و در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ پس از تزریق ثبت گرفته می‌شد. و در نهایت ۳ گروه شم که در حیوانات این گروه سوزن تزریق را تا کیاسما برد و لی تزریقی صورت نمی‌گرفت و در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ پس از آن ثبت گرفته می‌شد که این گروه برای بررسی اثر آسیب ناشی از سوزن انجام شد.

مطالعه ۲: بررسی میزان دمیلیناسیون (دمیلیناسیون و رمیلیناسیون) با Luxol Fast Blue استفاده از مطالعات بافت شناسی (رنگ آمیزی Luxol Fast Blue) بود که در این مطالعه ۷ گروه آزمایشی داشتیم (در هر گروه  $n=3$  باشد). در ۳ گروه از حیوانات ۱ میکرولیتر لیزولستین ۱ درصد در کیاسما تزریق شد و در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ پس از تزریق، نمونه بافتی جهت رنگ آمیزی میلین خارج گردید. ۳ گروه دیگر حیواناتی بودند که علاوه بر تزریق لیزولستین در کیاسما روزانه مهارگر PKC (GO6976) را با دوز ۲/۵ nmol/animal/day با حجم ۵ میکرولیتر به صورت داخل بطنی دریافت کرده و در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ پس از تزریق، نمونه بافتی جهت رنگ آمیزی میلین خارج شد. برای بررسی اثر تزریق حلال لیزولستین در گروه هفتم (سالین) ۱ میکرولیتر سالین به کیاسما و ۵ میکرولیتر سالین به صورت داخل بطنی تزریق شد و در روز ۷ پس از تزریق (این روز معادل زمان حداکثر دمیلیناسیون در گروه دریافت کننده لیزولستین است)، نمونه بافتی جهت رنگ آمیزی میلین خارج می‌شد. با توجه به عدم بروز دمیلیناسیون در این روز، احتمال دمیلیناسیون ناشی از تزریق سالین در روزهای ۳ و ۱۴ بررسی نشد.

#### پردازش بافت مغزی

موش‌ها در گروههای آزمایشی مختلف در روزهای مورد نظر (۳، ۷ و ۱۴ روز پس از تزریق) با تزریق داخل صفاتی دوزهای بالای کتمین و زایلازین به طور عمقی بیهوش شدند و عمل پرفیوژن از طریق بطن چپ قلب انجام شد. در ابتدا ۲۵ ml بافر فسفات (PBS) ۰/۱ مولار با pH:۷/۴ به بطن چپ حیوان تزریق شده و پس از خارج شدن تمامی خون موجود در عروق از دهلیز راست، میزان ۵۰ ml محلول پارافرمالدھید ۴ درصد در محلول PBS ۰/۰ مولار با pH:۷/۴ به منظور تثیت اولیه بافت از طریق بطن چپ وارد دستگاه گردش خون حیوان می‌شد، سپس مغز حیوان از جمجمه خارج می‌گردید. برای فیکس شدن بهتر، بافت در

ناحیه‌ای به طول  $800\text{--}1200 \mu\text{m}$  متشر شود. همچنین، محل تزریق طبق اطلس مغز موش حدود  $3/9 \text{ mm}$  جلوی لامبدا و با عمق  $5/75 \text{ mm}$  نسبت به دورا بود [۱۸]. بیست و یک مقطع کرونال با فواصل برابر برای آنالیز کمی دمیلیناسیون القا شده با لیزولسیتین و ترمیم حاصل از آن در حضور عدم حضور مهارگر PKC انتخاب شد. وسعت دمیلیناسیون در روزهای  $3, 7$  و  $14$  پس از تزریق LPC بررسی و آنالیز شد (تعداد حیوانات در هر گروه حداقل  $3$  سر بود). دمیلیناسیون در کیاسما و عصب بینایی گروهی که سالین دریافت کرده بودند مشاهده نشد (شکل A-۱). آنالیز مقاطع مغزی برای تعیین وسعت دمیلیناسیون در گروه LPC نشان داد که حداقل وسعت دمیلیناسیون در روز  $7$  پس از تزریق مشاهده می‌شود (شکل B-۱). در روز  $14$  پس از تزریق وسعت دمیلیناسیون به طور قابل توجهی کاهش یافت و این پدیده در شکل شماره  $1$ ، بخش B قابل مشاهده است. در حیواناتی که مهارگر PKC را دریافت کرده بودند، دمیلیناسیون خفیفی در روزهای  $3$  و  $7$  مشاهده شد که به صورت چشمگیری در مقایسه با گروه‌های لیزولسیتین کاهش یافته بود و در روز  $14$  در همین گروه دمیلیناسیون قابل تشخیص نبود (شکل شماره C-۱). آنالیز داده‌ها کاهش قابل توجهی در وسعت آسیب در روزهای  $3, 7$  و  $14$  پس از تزریق در گروه دریافت کننده مهارگر PKC را نشان داد. در مقایسه با روز  $7$  گروه لیزولسیتین، که بیشترین وسعت دمیلیناسیون را داشت، میزان کاهش وسعت آسیب در گروهی که مهارگر PKC را دریافت کرده بود، در روز  $3$  با  $P < 0.05$  و در روزهای  $7$  و  $14$  با  $P < 0.001$  معنی دار بود. تعداد حیوانات در همه گروه‌های آزمایشی حداقل  $3$  بود (شکل شماره D-۱).

ارزیابی دمیلیناسیون القا شده با لیزولسیتین و ترمیم بعد از آن در گروه‌های مختلف با تکنیک VEP

ثبت VEP می‌تواند جهت بررسی عملکرد مسیرهای بینایی شامل: اعصاب و کیاسماهای بینایی و حتی قشر بینایی مورد استفاده قرار گیرد. در این مطالعه برای ارزیابی عملکردی میزان دمیلیناسیون و رمیلیناسیون، VEP ثبت و آنالیز شد. شکل A-۲ نمونه‌ای از موج ثبت شده در حیوانات گروه کنترل همراه با اجزای آن را نشان می‌دهد. اجزای امواج VEP ثبت شده از قشر پس سری موش شامل: P1-N1, P2-N2, P3-N3, P1-N1 می‌باشد، اجزای P1-N1 دارای ثبات بیشتر بوده و برای اندازه‌گیری هدایت موج در سیستم بینایی قابل اعتماد است. در اینجا تاخیر موج P1 به عنوان شاخص هدایت سیستم بینایی در نظر گرفته شد. در مقایسه گروه کنترل با گروه‌های لیزولسیتین، بیشترین افزایش در زمان تاخیر موج P در روز  $7$  پس از تزریق بود ( $P < 0.01$ )، اما در گروه‌های که

ثبت الکتروفیزیولوژیک پتانسیل برانگیخته بینایی (VEP) استفاده از میانگین گیری سیگنال‌های حاصل از فعالیت الکتروانسفالوگرافیک ثبت شده از جمجمه بدست می‌آید. VEP می‌تواند اطلاعات مهم تشخیصی در مورد یکپارچگی عملکرد بینایی تهیه کند. مراحل جراحی و الکترود گذاری مشابه روش‌هایی است که قبل توصیف شده است [۲۲، ۲۳]. به طور خلاصه، حیوان طبق روش بالا بیهوش شده و سر حیوان در دستگاه استریوتاکس ثابت می‌شود. برای تسهیل ثبت VEP یک الکترود تک قطبی از جنس استیل زنگ نزن در ناحیه پس سری جمجمه کاشته می‌شود (A:  $0$ , L:  $\pm 3\text{mm}$ ) در انتهای قدامی جمجمه هم الکترود مرجع گذاشته شده و الکترودها توسط سیمان دندان پزشکی در جمجمه ثابت می‌شوند. برای ثبت ابتدا حیوان بی‌حرکت شده را در یک جعبه تاریک به مدت  $10$  دقیقه قرار داده تا با تاریکی سازش پیدا کند و سپس محرک نوری (فلش) که توسط دستگاه مولد تحریک (SMP-3100, Nihon Kohden)  $300$  بار با فرکانس  $1\text{ Hz}$  تولید می‌شد، با زاویه تابش  $45^\circ$  به هر دو چشم حیوان تابیده می‌شد. شدت نور به طور تقریبی  $40\text{ lx}$  بود. پاسخ‌های ده هزار برابر تقویت شده، با فیلتر بالا و پایین  $30$  و  $100$  هرتز (به ترتیب) با آمپلی فایر بیوفیزیکی تنظیم می‌شد (AVB-10, Nihon Kohden). امواج تقویت شده سپس میانگیری شده (DAT-1100, Nihon Kohden) و توسط نرم افزار Biochart نوری و اولین موج ثبت و یا منفی را اندازه‌گیری می‌کردیم (Latency P-).

### آنالیز آماری

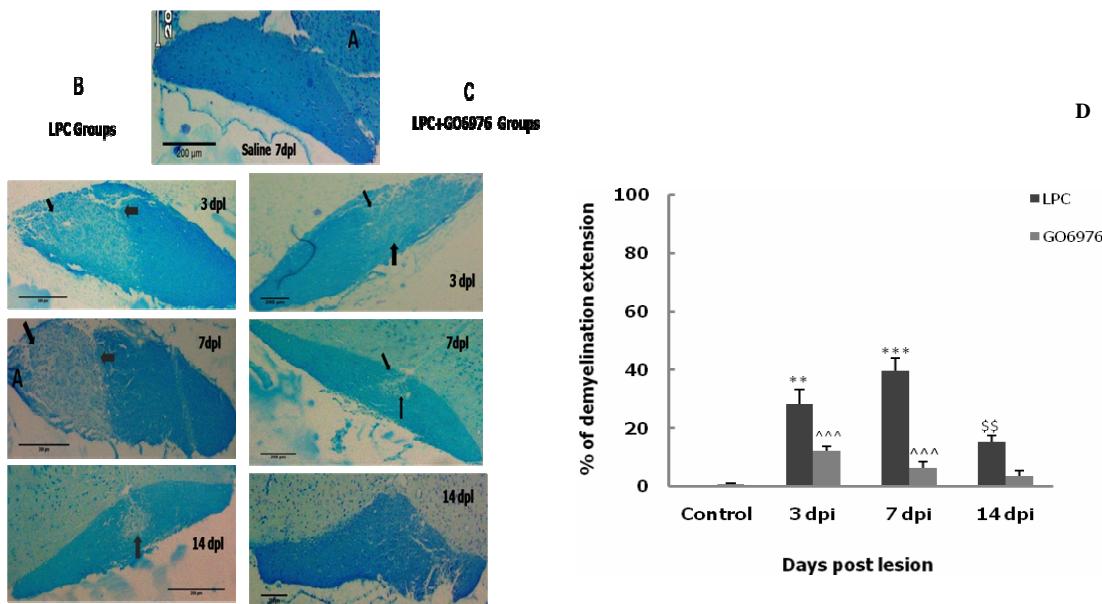
تفاوت میان گروه‌ها در آزمایشات بافت شناسی و ثبت VEP توسط آزمون ANOVA و پس آزمون Tukey با نرم افزار GraphPad prism ۵ مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها در هر نمودار به صورت ستونی که نشان دهنده Mean $\pm$ SEM ارائه شده و  $P < 0.05$  از لحاظ آماری معنی دار تلقی شد.

### نتایج

ارزیابی بافت شناسی از دمیلیناسیون القا شده توسط لیزولسیتین در گروه‌های آزمایشی مختلف

مطالعه با رنگ کوماسی بلو جهت تایید محل تزریق کیاسما نشان داد که، تزریق به کیاسما بدون انتشار به ساختارهای اطراف و مایع مغزی نخاعی دور آن صورت پذیرفته است (داده‌ها نشان داده نشده است). نتایج بدست آمده از رنگ آمیزی میلین مقاطع سریال مغز نشان داده است که لیزولسیتین قادر بوده است در

جراحی بر روی ثبت VEP، ثبت در روزهای مختلف گروه‌های شم و سالم انجام شد که تغییرات معنی داری بین این گروه‌ها مشاهده نشد. داده‌ها در شکل شماره ۴ نمایش داده شده است.

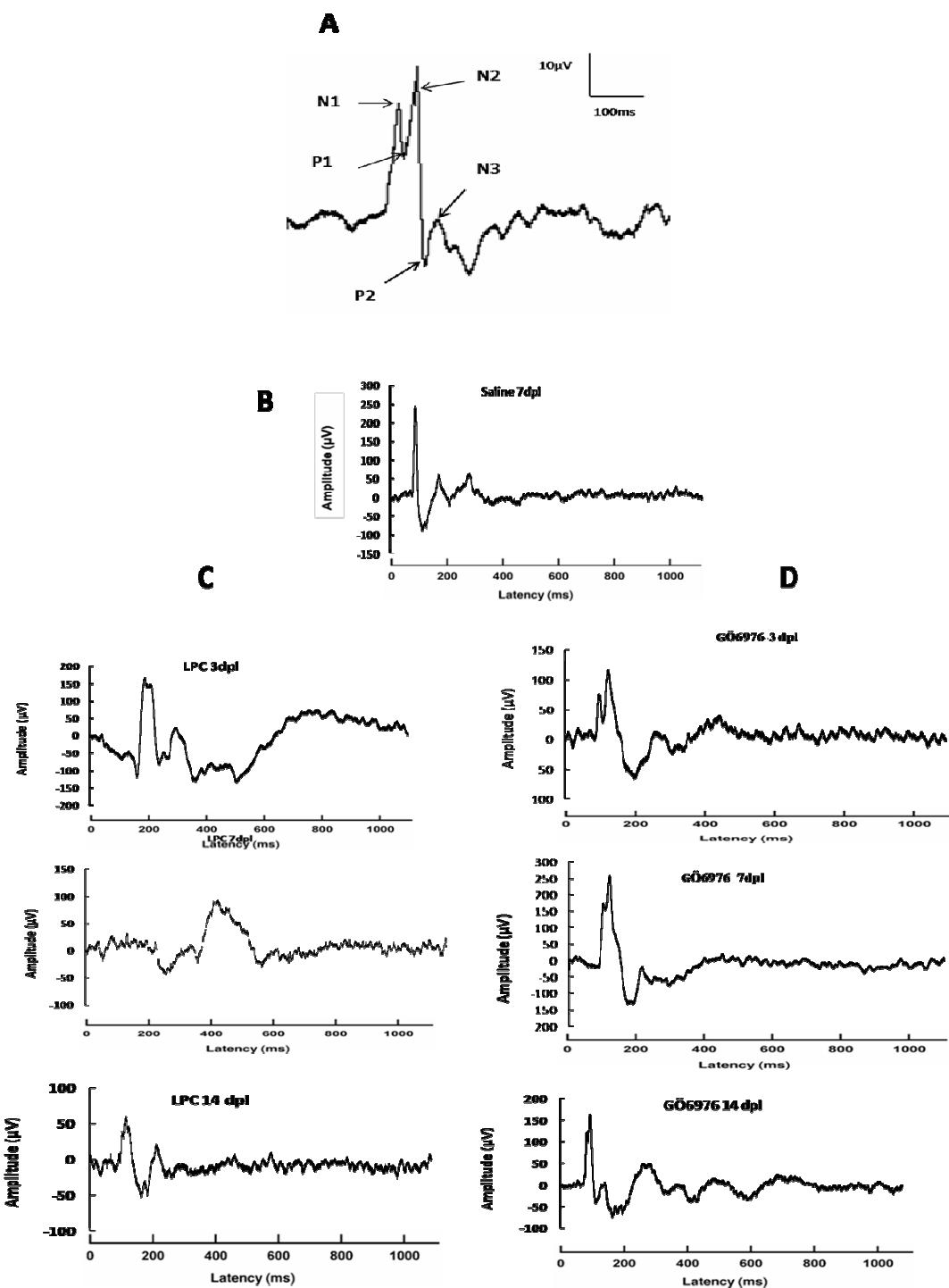


شکل شماره ۱-رنگ آمیزی لوگرول فست بلو (LFB) در مقاطع سریال تهیه شده از مغز حیوانات در گروه‌های و زمان‌های متفاوت. A-مقاطع کیاسما در حیوانی که سالین دریافت کرده است. در این حیوانات دمیلیناسیون نمی‌شود. B-مقاطع کیاسما در گروه‌های لیزوولسیتین در زمان‌های ۳، ۷، ۱۴ روز پس از تزریق. C-مقاطع کیاسما در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ پس از تزریق در گروه‌هایی که مهارگر PKC را همزمان با القای دمیلیناسیون دریافت کرده اند (Scale bar در همه عکس‌ها ۲۰۰ میکرومتر است). D-این گراف مقایسه بین گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد. تعداد حیوانات در هر گروه حداقل ۳ بود. در هر حیوان ۲۱ مقطع سریال انتخاب گردیده و میزان وسعت دمیلیناسیون در آن به صورت میانگین این مقاطع بیان شد که در هر مقطع حاصل: وسعت ناحیه دمیلنه به کل ناحیه کیاسما به صورت درصد بیان شده است. در گروه لیزوولسیتین، میزان دمیلیناسیون در روز ۳ و ۷ به ترتیب ( $P<0.001$ ،  $P<0.01$ ) نسبت به کنترل (حیوانات تزریق نشده) معنی‌دار بود و حداقل دمیلیناسیون در روز ۷ بود. در همین گروه در روز ۱۴ کاهش وسعت دمیلیناسیون نسبت به روز ۷ با  $P<0.01$  ( $P<0.001$ ) معنی‌دار بود. اما گروه‌هایی که مهارگر PKC دریافت کرده بودند در مقایسه با گروه لیزوولسیتین کاهش قابل توجهی در میزان دمیلیناسیون در روزهای ۳ و ۷ نشان دادند (هر دو  $P<0.001$ ). در مقایسه با روز ۷ گروه لیزوولسیتین که بیشترین دمیلیناسیون را داشت، مهار PKC وسعت دمیلیناسیون در روز ۳ و ۷ را کاهش داد ( $P<0.001$ ،  $P<0.001$ ). تمام مقادیر P با آزمون Tukey حاصل شده است شد و هر ستون Mean±SEM را نشان می‌دهد.

و همچنین در گیر بودن این ناحیه در بیماری MS، جهت القای مدل موضعی دمیلیناسیون با لیزوولسیتین انتخاب گردید. VEP یک روش در دسترس و غیر تهاجمی است که برای ارزیابی سیستم بینایی قابل اعتماد است [۲۵]. استفاده کلینیکی از VEP برای تشخیص پاتولوژی‌های بینایی به خوبی پایه گذاری شده است. به علاوه این تکنیک به عنوان یک روش حساس برای تعیین تغییرات اولیه در مسیر بینایی در مدل‌های دمیلیناسیون یا MS تایید شده است و یک روش مناسب برای بررسی بینایی در انسان است [۲۶].

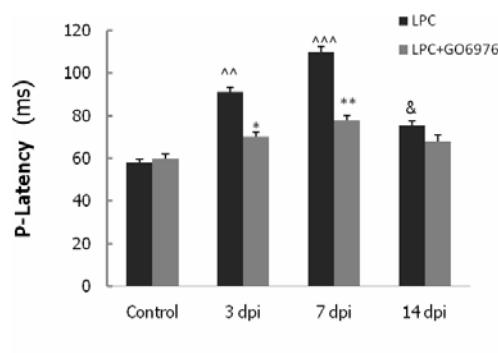
## بحث

امروزه واضح است که آسیب آکسونی سورون‌ها در بیماری MS و مدل‌های حیوانی آن یکی از دلایل ناتوانی‌های کلینیکی ناشی از بیماری است. یافته‌های اخیر نشان می‌دهند که با خشی سازی فعالیت مهارکننده‌های میلینی در محیط، می‌شود از آسیب آکسونی جلوگیری و یا ترمیم آنها را تسريع کرد [۲]. مسیر بینایی موش یک مدل عالی جهت مطالعات عملکردی، بیوشیمیایی و سلولی (گلیوژن‌ز و میلینوژن‌ز) را ایجاد می‌کند [۲۴]. در این مطالعه کیاسماهای بینایی موش بهجهت مهم بودن آن در مسیر بینایی

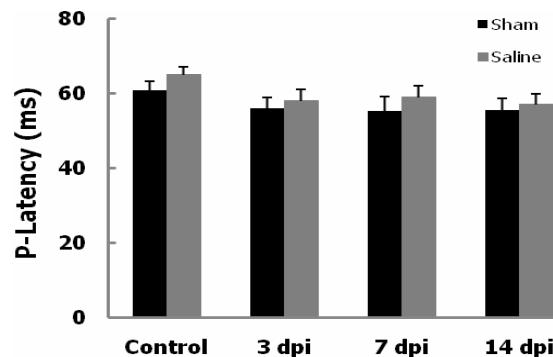


شکل شماره ۲- مقایسه ثبت های VEP در گروه های مختلف آزمایشی. A- یک ثبت نمونه از حیوان سالم با شرح جزئیات، طبق قرارداد اولین موج بالا رو، N1 و اولین موج پایین رو، P1 نامیده می شود و باقی موج ها هم به ترتیب با تغییر اعداد نام گذاری می شوند. در اینجا فاصله بین تحریک و موج P1 به عنوان شاخص هدایت اندازه گیری گردید. B- نمونه یک ثبت در گروه سالین ۷ روز پس از تزریق است که به لحاظ تاخیر موج P با موش سالم تفاوتی ندارد. C- نمونه ثبت های VEP در روزهای مختلف پس از تزریق لیزولسیتین را نشان می دهد، بیشترین تاخیر در روز ۷ نسبت به بقیه واضح است. محور عمودی دامنه با واحد  $\mu\text{V}$  و محور افقی زمان با واحد ms را نشان می دهد. D- نمونه ثبت های VEP در روزهای مختلف پس از تزریق لیزولسیتین به همراه مهارگر PKC (GÖ6976) روزانه با دوز  $2/5$  نانومول به ازای هر حیوان را نشان می دهد. کاهش قابل توجه میزان تاخیر موج P در همه روزها مشهود است.

لیزولسیتین برای القای دمیلیناسیون موضعی انتخاب شد، زیرا به طور اختصاصی باعث مرگ سلول‌های میلینه کننده و آسیب به میلین می‌شود و از مرگ سایر سلول‌ها مثل آستروسیت‌ها و آسیب اکسونی جلوگیری می‌کند [۲۷]. لیزولسیتین در مطالعات گذشته نیز جهت القای دمیلیناسیون موضعی در نواحی مختلف CNS نظر طناب نخاعی [۷]، پایک تحانی مخچه [۲۸]، کورپوس کالوزوم [۱۷] و همچنین عصب بینایی [۲۹] استفاده شده است برای ارزیابی دمیلیناسیون بافتی و به دنبال آن ترمیم احتمالی از رنگ آمیزی اختصاصی میلین Luxol Fast Blue استفاده گردید. اگرچه در بیماری MS دمیلیناسیون به دنبال دمیلیناسیون رخ می‌دهد اما اغلب به دلایلی که هنوز ناشناخته است، شکست می‌خورد. با توجه به این که ترمیم میلین در CNS توسط سلول‌های بینایدین درونزاد و پیش‌سازهای اولیگو دوندروسیتی میانجی‌گری می‌شود، شکست تعایز OPC‌ها به سلول‌های میلینه کننده بالغ یکی از دلایل شکست در دمیلیناسیون است [۱۳]. هم‌چنین نشان داده شده است که پروتئین‌های رها شده از میلین و الیگو دوندروسیت‌ها حین دمیلیناسیون در OPC محل آسیب می‌توانند یک اثر مهار کننده قوی روی تعایز میلین تعایز OPC با سیگنانلینگ A Rho و کیناز مربوط به آن و با پروتئین کیناز C میانجی‌گری می‌شود [۱۳]. و همچنین مهار فارماکولوژیکی PKC می‌تواند فرایند ترمیم عصبی و میلین را افزایش دهد [۱۳.۱]. هدف اصلی این مطالعه بررسی اثر مهاری PKC روی فرایند ترمیم میلین در مدل موضعی دمیلیناسیون القا شده با لیزولسیتین در کیاسمای بینایی بود. همچنین در این مطالعه نتایج حاصل از ثبت VEP توسط مطالعات بافت‌شناسی تایید شدند. نتایج نشان داد که وسعت دمیلیناسیون در گروه لیزولسیتین در روز ۷ پس از تزریق حداقل بود و با گذشت زمان در روز ۱۴ کاهش یافت. در این زمینه Woodruff و همکارانش گزارش کردند که بیشترین دمیلیناسیون در مدل حیوانی موش صحرایی در پایک تحانی مخچه در روز ۱۴ پس از تزریق لیزولسیتین بوده است [۱۶]. در همین گروه در ثبت VEP نیز بیشترین تاخیر موج P در روز ۷ پس از تزریق لیزولسیتین بوده که در طول زمان این تاخیر کاهش یافته است؛ یعنی در روز ۱۴ پس از تزریق میزان تاخیر موج P به طرز معنی‌داری نسبت به روز ۷ کاهش یافته و این می‌تواند تاییدی بر داده‌های بافت‌شناسی باشد. پس همزمان با افزایش دمیلیناسیون از روز ۳ تا ۷ که به حداقل میزان خود می‌رسد میزان تاخیر موج P در تست عملکردی VEP افزایش می‌یابد. با کاهش وسعت دمیلیناسیون در روز ۱۴ در داده‌های بافت‌شناسی، میزان تاخیر موج P نیز کاهش می‌یابد که این موضوع می‌تواند تاییدی بر



شکل شماره ۳- مقایسه گروه‌های مختلف در ثبت VEP. هر ستون میانگین ۳۰۰ ثبت است و تعداد حیوانات در هر گروه ۶ بود. میزان تاخیر موج P به عنوان شاخص هدایت عصبی اندازه گیری شد. در گروه لیزولسیتین، در روزهای مختلف پس از تزریق در مقایسه با ثبت پایه (کنترل)، میزان تاخیر موج P افزایش یافته بود. تاخیر موج P روزهای ۳ و ۷ به ترتیب با  $P<0.01$  و  $P<0.001$  نسبت به کنترل معنی دار بود، اما روز ۱۴، در مقایسه با کنترل تغییر معنی‌داری نشان نداد. این در حالی است که نسبت به روز ۷ که بیشترین تاخیر را داشت، کاهش معنی داری در تاخیر موج P نشان داد ( $P<0.05$ ). اما در گروه‌هایی که مهارگر PKC دریافت کرده بودند، در هیچ روزی تاخیر موج P تغییرات معنی داری با تاخیر کنترل نشان نداد. در مقایسه روز ۳ گروه لیزولسیتین با روز ۳ گروه PKC میزان کاهش تاخیر موج P با  $P<0.05$  معنی دار بود، همچنین در مقایسه روزهای ۷ کاهش معنی دار در گروه PKC مشاهده شد ( $P<0.01$ ). تمام مقادیر P با آزمون Tukey حاصل شده است شد و هر ستون Mean $\pm$ SEM را نشان داده است.



شکل شماره ۴- در این شکل مقایسه گروه‌های شم و سالم در روزهای مختلف نشان داده شده است. برای اطمینان از صحت ثبت و عدم مداخله فرآیند جراحی و تزریق در ثبت، این مقایسه انجام شد که در این مقایسه هیچ اختلاف معنی داری در میزان تاخیر موج P بین گروه‌ها مشاهده نشد. میزان تاخیر کنترل مربوط به ثبت قبل از تزریق است. هر ستون Mean $\pm$ SEM را نشان داده است.

که فرایند ترمیم در گروههایی که مهارگر PKC را دریافت کرده‌اند به طور قابل توجهی افزایش یافته و با توجه به یافته‌های فوق می‌توان نتیجه گرفت، تمایز OPC های حاضر در محل آسیب یا مهاجرت کرده از مخازن اطراف و یا حتی بطن‌های جانی به محل آسیب افزایش یافته و ترمیم میلین را افزایش می‌دهد. البته ما در این مدل آسیب آکسونی نداشتم ولی به هر حال مهار PKC می‌توانند فرایند ترمیم آکسونی را هم افزایش دهد. PKC در مسیر فعال شدن NgR فعال شده و حتی فعال شدن آن برای به راه افتادن مسیر سیگنالینگ NgR ضروری است. با توجه به این که اکثر مهار کننده‌های میلینی از طریق گیرنده NgR عمل می‌کنند، بنابراین منطقی به نظر می‌رسد که با مهار PKC، مهار مهار میلین و اجزای آن را شاهد باشیم [۱۳، ۲، ۱]. یافته‌های دیگر نشان می‌دهند که مهار PKC می‌تواند روی رفتار آستروسیت‌ها در فرایند ترمیم میلین اثر بگذارد، ولی در مورد واقعی مولکولی آن اطلاعات زیادی در دست نیست. شواهدی دال بر فعال شدن میکروگلیاها در مسیر سیگنالینگ Rho وجود دارد و این به نقش مثبت PKC و Rho A در فرایند ترمیم دلالت می‌کند که با فعال کردن میکروگلیاها و آستروسیت‌ها محیط را به نفع رمیلیناسیون تغییر می‌دهد، ولی آثار مهاری آنها بیشتر بوده بنابراین با مهار آنها افزایش فرایند ترمیم را شاهد هستیم [۱۳].

### نتیجه گیری

یافته‌های ما پیشنهاد می‌کنند که مهار PKC می‌تواند حتی به صورت حد به دنبال دمیلیناسیون مفید باشد، زیرا با این ترتیب اثرات مهاری میلین‌های رها شده از عصب که هنوز توسط سیستم گلیایی در محیط تمیز نشده و نقش مهمی در مهار رمیلیناسیون دارد، کاهش می‌یابد. داده‌های اخیر می‌توانند یک راه برای تحقیقات بیشتر در زمینه اثر حذف فارماکولوژیکی PKC در مهاجرت و تکثیر OPC ها و سلول‌های بنیادین مغزی علاوه بر فرایند تمایز آنها در مدل‌های حیوانی و حتی کلینیکی نظری MS باز کند و همچنین می‌تواند هدف خوبی برای طراحی دارو باشد.

### تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت دانشگاه تربیت مدرس و شبکه تحقیقات علوم اعصاب ایران انجام شد. از کمکهای آقای امیر شجاعی در انجام بخش الکتروفیزیولوژی این کار قدردانی به عمل می‌آید.

ترمیم میلین در این بازه زمانی باشد. اما در گروهی از حیوانات که علاوه بر القاء دمیلیناسیون با لیزولسیتین همزمان مهارگر پروتئین کیناز C را نیز دریافت کرده بودند، به ترتیب در روزهای ۳، ۷ و ۱۴ پس از تزریق کاهش قابل ملاحظه‌ای در میزان دمیلیناسیون اتفاق افتاد؛ به طوری که میزان دمیلیناسیون القاء شده در روز ۱۴ بسیار ناچیز بود. به همین ترتیب در داده‌های VEP نیز میزان تاخیر موج P نسبت به گروههای لیزولسیتین کاهش قابل توجهی نشان داد؛ به نحوی که در مقایسه با گروه لیزولسیتین در روز ۷ که بیشترین تاخیر در موج P را داشت، روزهای ۳، ۷ و ۱۴ گروههایی که مهارگر PKC را دریافت کرده بودند، کاهش معنی‌داری در تاخیر موج P نشان داد که این داده‌ها با تأیید بافت شناسی همراه است. همچنین در داده‌های VEP برای حذف اثرات جراحی و الکترود گذاری روی ثبت، گروه حیوانات سالم با شم مقایسه شدند که هیچ گونه تغییرات معنی‌داری بین روزهای ۳، ۷ و ۱۴ پس از جراحی گروه شم و حیوانات سالم در ثبت VEP یافت نشد و این داده‌ها، قابل اعتماد بودن داده‌های VEP را تأیید می‌کند. در تأیید نتایج حاصل از این مطالعه، Sivasankaran و همکاران با مهار فارماکولوژیک PKC در محیط‌های درون و برون تنی گزارش کردند که میزان تمایز عصب آسیب دیده افزایش می‌یابد و همچنین مهار فارماکولوژیک اثر مهاری میلین را کاهش می‌دهد [۱]. از طرفی Baer و همکاران با مهار بیان ژن PKC و همچنین مهار فارماکولوژیک Dاده‌های جالبی را گزارش کردند که می‌تواند تأییدی بر داده‌های ما باشد. این گروه با مهار مسیر سیگنالینگ PKC نشان دادند که تمایز OPC ها به سلول‌های میلین ساز بالغ افزایش می‌یابد. بنابراین PKC می‌تواند یکی از میانجی‌گرهای مهاری کلیدی در میلین سازی باشد، زیرا فعال شدن آن در مسیر مهار کننده‌های میلینی می‌تواند تمایز OPC ها را مهار کند. همچنین آنها با مهار مسیر سیگنالینگ Rho و کیناز مربوط به آن که از افکتورهای گیرنده NGFR (NgR) است، نتایج مشابهی گزارش کردند؛ یعنی میزان تمایز OPC ها افزایش یافت و همچنین رشد نوریت عصبی در حضور مهار کننده‌های میلینی افزایش یافت [۱۳، ۱]. همکاران با مهار سیگنالینگ NOGO، یکی از پروتئین‌های مهاری میلین در مدل‌های MS، گزارش کردند که از آسیب آکسونی پیشگیری کرده و ترمیم آن افزایش می‌یابد [۲]. با توجه به یافته‌های فوق می‌توان نتیجه گیری کرد که در مدل موضعی دمیلیناسیون در کیاسمای بینایی نیز مهار PKC می‌تواند فرایند ترمیم میلین را تسريع کند و یا از ایجاد آسیب بهشتی گروه لیزولسیتین جلوگیری کند. داده‌های ما به صورت بافت شناسی و عملکردی نشان می‌دهند.

## References:

- [1] Sivasankaran R, Pei J, Wang KC, Zhang YP, Shields CB, Xu XM, He Z. PKC mediates inhibitory effects of myelin and chondroitin sulfate proteoglycans on axonal regeneration. *Nat Neurosci* 2004; 7(3):261-8.
- [2] Karnezis T, Mandemarkers W, Mc Qualter JL, Zheng B, Ho PP, Jordan KA, et al. The neurite outgrowth inhibitor Nogo A is involved in autoimmune-mediated demyelination. *Nat Neurosci* 2004; 7(7): 736-44.
- [3] Guazzo EP. A technique for producing demyelination of the rat optic nerves. *J Clin Neurosci* 2005; 12(1): 54-8.
- [4] Smith KJ, Blakemore WF, Mc Donald WI. Central remyelination restores secure conduction. *Nature* 1979; 280(5721): 395-6.
- [5] Prineas JW, Connell F. Remyelination in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1979; 5(1): 22-31.
- [6] Ghatak NR, Hirano A, Doron Y, Zimmerman HM. Remyelination in multiple sclerosis with prepheral type myelin. *Arch Neurol* 1973; 29(4): 262-7.
- [7] Pavelco KD, Van Engelen BG, Rodriguez M. Acceleration in the rate of CNS remyelination in lyssolecithin-induced demyelination. *J Neurosci* 1998; 18(7): 2498-505.
- [8] Spencer T, Domeniconi M, Cao Z, Filbin MT. New roles for old proteins in adult CNS axonal regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 2003; 13: 133-9.
- [9] Yiu G, He Z. Signaling mechanism of the myelin inhibitors of axon regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 2003; 13(5): 545-51.
- [10] Mukhopadhyay G, Doherty P, Walsh FS, Crocker PR, Filbin MT. A novel role for myelin associated glycoprotein as an inhibitor of axonal regeneration. *Neuron* 1994; 13(3): 757-67.
- [11] GrandPre T, Nakamura F, Vartanian T, Strittmatter SM. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a reticulon protein. *Nature* 2000; 403(6768): 439-44.
- [12] Wang KC, Koprivica V, Kim JA, Sivasankaran R, Gao X, Neve RL, et al. Oligodendrocyte myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature* 2002; 417(6892): 941-4.
- [13] Baer AS, Syed YA, Kang SU, Mitteregger D, Vig R, Ferencz-Constant C, et al. Myelin-mediated inhibition of oligodendrocyte precursor differentiation can be overcome by pharmacological modulation of Fyn-Rho A and protein kinase C signaling. *Brain* 2009; 132: 465-81.
- [14] Alt G, Ghabriel MN, Sikri K. Lysophosphatidyl Choline-induced demyelination a freeze-fracture study. *Acta Neuropathol* 1988; 75(5): 456-64.
- [15] Low PA, Schmelz JD, Yao JK, Dyck PJ, Parthasarathy S, Baumann WJ. Structural specificity in demyelination induced by lysophospholipids. *Biochem Biophys Acta* 1983; 754(3): 298-304.
- [16] Woodruff RH, Franklin RJ. Demyelination and remyelination of the caudal cerebellar peduncle of adult rats following stereotaxic injections of lyssolecithin, ethidium bromide and complement/anti-galactocerebrside, a comparative study. *Glia* 1999; 25(3): 216-28.
- [17] Nait-Oumesmar B, Decker L, Lachapelle F, Avellana-Adalid V, Bachelin C, Van Evercooren AB. Progenitor cells of the adult mouse subventricular zone proliferate, migrate and differentiate in to oligodendrocyte after demyelination. *Eur J Neurosci* 1999; 11(12): 4357-66.
- [18] Paxinos G, Franklin KBJ. The mouse brain in stereotaxic coordinates. 2<sup>nd</sup> ed. Sandiego, California, Academic press; 2004.
- [19] Lee JK, Kim JE, Sivila M, Strittmatter SM. Nogo receptor antagonism promotes stroke recovery by enhancing axonal plasticity. *J Neurosci* 2004; 24(27): 6209-17.
- [20] Chitnis T, Imitola J, Wang Y, Elyman W, Chawla P, Sharuk M, et al. Elevated neural expression of CD 200 protects wlds mice from inflammation-mediated neurodegeneration. *Am J Pathol* 2007; 170(5): 1675-712.
- [21] Goudarzvand M, Javan M, Mirnajafi zadeh J, Mozafari S, Taki T. Vitamins E and D3 attenuate demyelination and potentiate remyelination processes of hippocampal formation of rats following local injection of ethidium bromide. *Cell Mol Neurobiol* 2010; 30(2): 289-99.
- [22] Kamei C, Kuroda K, Fujiwara A, Takeda Y. Effects of narcotics, including morphine, on visual evoked potential in rats. *Eur J Pharmacol* 2009; 602(2-3): 294-7.
- [23] Ishikawa T, Fujiwara A, Takechi K, Ago J, Matsumoto N, Rahman MA, et al. Changes of visual evoked potential induced by lateral geniculate nucleuse kindeling in rats. *Epilepsy Res* 2008; 79: 146-50.
- [24] Skof RP, Price DL, Stocks A. Electron microscopic autoradiographic studies of gliogenesis in rat optic nerve. I Cell proliferation. *J Comp Neurol* 1976; 169(3): 291-312.
- [25] Lehman DM, Harrison JM. Flash visual evoked potentials in hypomyelinated mutant mouse shivere. *Doc Ophthalmol* 2002; 104(1): 83-95.
- [26] Hudnell HK, Boyes WK, Otto DA. Rat and human visual evoked potentials recorded under comparable conditions: a preliminary analysis to address the issue of predicting human neurotoxic effects from rat data. *Neurotoxicol Teratol* 1990; 12(4): 391-8.
- [27] Kotter MR, Setzu A, Sim FJ, Van Rooijen N, Franklin RJM. Macrophage depletion impairs oligodendrocyte remyelination following lyssolecithin induced demyelination. *Glia* 2001; 35(3): 204-12.

- [28] Lachapelle F, Bechelin C, Moissonnier P, Nait-Oumesmar B, Fontaine D, Baron-Van Evercooren A. Failure of remyelination in the non human primate optic nerve. *Brain Pathol* 2005; 15(3): 198-207.
- [29] Kotter MR, Li WW, Zhao C, Franklin RJM. Myelin impairs CNS remyelination by inhibiting oligodendrocyte precursor cell differentiation. *J Neurosci* 2006; 26: 328-32.
- [30] Keller JN, Steiner MR, Holtsberg FW, Mattson MP, Steiner SM. Lysophosphatidic acid-induced proliferation-related signals in astrocytes. *J Neurochem* 1997; 69(3): 1073-84.