Jundishapur
Scientific Medical Journal

November & December 2023. Vol 22. No 5

Research Paper

Comparison of the Expression Levels of MBP and GFAP Following the Induction of Neuronal Demyelination with Ethidium Bromide in Male and Female Rats

Aref Nooraei[1,2], Kaveh Khazaeel[3], *Marzieh Darvishi[4], Zohreh Ghotbeddin[5], Zahra Basir[6]

1. Assistant Professor of Anatomy and Comparative Embryology, Department of Histology, Faculty of Paraveterinary Medicine, Ilam University, Ilam, Iran.
2. Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran.
3. Associate Professor of Veterinary Anatomical Sciences, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran.
4. Associate Professor of Medical Anatomical Sciences, Department of Basic Sciences, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran.
5. Associate Professor of Physiology, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz-Ahvaz-Iran.
6. Assistant Professor of Histology, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Nooraei A, Khazaeei K, Darvishi M, Ghotbeddin Z, Basiri Z. [Comparison of the Expression Levels of MBP and GFAP Following the Induction of Neuronal Demyelination with Ethidium Bromide in Male and Female Rats (Persian)]. Jundishapur Scientific Medical Journal. 2023; 22(5):542-554. 10.32592/JSMJ.22.5.542

https://doi.org/10.32592/JSMJ.22.5.542

ABSTRACT

Background and Objectives Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune, inflammatory disease with demyelination and astrogliosis of the central nervous system that affects the brain and spinal cord. The prevalence of this disease is three times higher in women than in men.

Subjects and Methods This study was conducted on 42 male and female rats with an approximate weight of 300-350 g in the Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz. The samples were randomly divided into six groups, namely the male control group, female control group, male sham group (receiving normal saline), female sham group (receiving normal saline), male MS group, and female MS group. To inject ethidium bromide in the MS groups using a microinjector, the rats were anesthetized with ketamine (80 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg), and 0.02% ethidium bromide and 20microliter normal saline were injected using a Hamilton syringe.

Results The results of this study showed that the inflammation and degeneration of nerve cells increased in the MS groups, with males exhibiting a higher level of inflammation and degeneration. The level of myelin basic protein (MBP) expression in the MS group was reduced compared to other groups, which was almost the same in both genders. The level of glial fibrillary acidic protein expression was increased in the MS group, compared to the other groups, which was higher in the female gender when comparing the two genders.

Conclusion MS causes a decrease in the amount of MBP and an elevation in the astrogliosis factor, which leads to the destruction of the myelin sheath and astrocytes and leads to sensory and motor disabilities in people with MS.

Keywords Ethidium bromide, GFAP, MBP, Multiple sclerosis

Received: 01 Dec 2023
Accepted: 02 Jan 2024
Available Online: 19 Feb 2024

Corresponding Author:
Marzieh Darvishi
Address: Department of Basic Sciences, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran.
Tel: 09124025893
E-Mail: marzidarvish@yahoo.com

Jundishapur
Scientific Medical Journal

Extended Abstract

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune, inflammatory, chronic disease with demyelination and astrogliosis of the central nervous system (CNS), which affects various parts of the body, such as the brain, spinal cord, and optic nerve [1]. Destruction of myelin or demyelination is one of the main causes of MS. The general structure of myelin in the peripheral and central nervous systems is similar, although there are differences in their molecular composition. Myelin is a repetitive multilayer of tightly packed lipid bilayers, which are held together by specific myelin proteins, one of which is myelin basic protein (MBP). Myelin proteins are among the longest proteins in the body [2].

Due to MS, the MBP is destroyed and damaged, potentially leading to a severe effect on the expression of this protein. MBP has been studied as a neurodegenerative factor in the pathogenesis of the MS autoimmune disease. MS is characterized by CNS inflammation, demyelination, and axonal loss. Even though it is not fully understood whether MBP directly acts as the main antigen in human MS, it is evident that there is an association between MS and the function of MBP in the formation and ongoing maintenance of myelin. This protein constitutes 30% of the total CNS myelin protein. MBP is a clear example of a seemingly simple molecule, but actually biochemically and structurally complex that is closely related to the normal development of the nervous system and neurological diseases [3].

Following inflammation in the CNS due to MS disease, immune attacks begin on the myelin sheath, This leads to reduced MBP expression, heightened myelin destruction, slowed nerve conduction, and ultimately the development of neurological symptoms [4]. Another symptom of MS is the destruction of astrocytes, which respond to damage and disease in the CNS through a complex and multifaceted process called astrogliosis. Dysfunction of astrocytes and astrogliosis can lead to or contribute to various CNS disorders [5]. Astrocytes play an important role in scar formation in the central nervous system. In addition, astrocytes are potent secretors of various proinflammatory cytokines and cytotoxic factors.

Glial fibrillary acidic protein (GFAP) is a well-established biomarker for astrogliosis. Several studies have described its use for MS and reported its relationship with the severity of the disease and the level of neuroinflammation [6, 7]. GFAP, an acidic protein found in the cytoskeletal protein of certain astrocytes [8], was first isolated from the white matter plaque of MS patients [9]. GFAP is normally expressed in astrocytes and ventricular membrane cells and is considered the signature protein of astrocytes [10]. The activation and proliferation of microglia and astrocytes observed in demyelinating lesions indicate that the contribution of the innate immune response of resident CNS cells may play an important role in oligodendrocyte damage and axonal degeneration [11]. Glial cells and astrocytes, in particular, are highly abnormal early in MS [12].

Studies in experimental autoimmune encephalomyelitis have shown that activation of astrocytes, and loss of their end-feet around small blood vessels represent early events in lesion development, linked to loss of blood-brain barrier function, subsequent CNS inflammation, as well as perivascular edema [13]. Considering the destruction of myelin and osteocytes in MS, this study aimed to investigate the level of MBP and GFAP expression in male and female rats without hormonal intervention.

Methods

This study was conducted on 42 male and female rats with an approximate weight of 300-350 g and an age range of 6 to 7 months at the Shahid Chamran Faculty of Veterinary Medicine in Ahvaz. First, to acclimatize the rats to the environment, they were kept for one week with a light-dark cycle of 12 hours without food and water restrictions. All stages of the test were performed according to the instructions of the Ethics Committee of Laboratory Animals, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz (EE/99.3.02.55591/scu.ac.ir: code of ethics). Afterward, the rats were randomly divided into 6 groups of seven, consisting of a male control group, female control group, male sham group (receiving normal saline), female sham group (receiving normal saline), MS male group, and MS female group. For stereotaxic surgery and ethidium bromide injection in MS groups, using a microinjector, mice were anesthetized with ketamine (80 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg). The hair in the skull area was shaved and in the midline of the head, from the frontal to the occipital side, a sagittal incision was made to determine the injection point according to the coordinates of the Paxinus atlas (anterior-posterior 0.46, medial-external 1, and dorsal-ventral 2.2). In the final stage, 0.02% ethidium bromide and normal saline were injected in the amount of 20 µl using a Hamilton syringe in the designated area in the rats of the injury and normal saline groups, respectively [14]. After induction of multiple sclerosis, the tested groups were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine and xylazine, and after perfusion (with normal saline solution and 4% paraformaldehyde), the animal's head was separated and the brain was removed without damage. Finally, brain samples were prepared and evaluated for histological studies in the usual way [15].

Hematoxylin-eosin staining was used to examine tissue changes in brain components, such as hippocampus and cerebrum, and the findings were expressed as percentages. After tissue staining, the changed area as well as the entire studied area were measured using Image J and Image Tools software packages [16]. To check the expression level of GFAP and MBP, the immunohistochemical method of

Nooraei A, et al. Expression Levels of MBP and GFAP Following the Induction of Neuronal Demyelination with Ethidium Bromide. JSMJ. 2023; 22(5):542-554

paraffin slides was used. To identify, the tissue sections were initially dehydrated and then treated with the primary antibodies for GFAP and MBP (Anti-mouse, Abcam company) at a ratio of 1:500. The samples were left to incubate overnight at room temperature in a humid environment set at 4°C. After washing with phosphate-buffered saline (PBS), the slices were stained with a secondary antibody conjugated to FITC and Alexa red at a ratio of 1:200 (Anti-mouse, Abcam company) and were placed at room temperature for 2 hours. In the next step, the nuclei were stained again by washing with PBS (in the dark) using propidium iodide (Sigma). Then again, the samples underwent the steps of dehydrating, and mounting the slide was done [17, 18].

Results

The results of this study showed that the inflammation and degeneration of nerve cells increased in the MS groups, with males exhibiting particularly heightened levels of both inflammation and degeneration. The level of MBP expression in the MS group was decreased in both genders, compared to other groups. This decrease in expression was almost the same, and the level of GFAP expression in the MS group was increased, in comparison to other groups, which was higher in females than in males.

Conclusion

Multiple sclerosis is an autoimmune disease in which the central nervous system undergoes inflammation, demyelination, and astrogliosis [19]. The results of this study showed that multiple sclerosis can lead to a reduction in neuron density in the hippocampus and an elevation in the quantity of degenerated neurons in the cortical part of the brain. It was also found that the rate of destruction of neurons was higher in males than in females. Dunn et al showed that in males, axons or myelin were more vulnerable to autoimmune attacks, and functional impairment was more severe. Although MS is more common in women, men are more vulnerable. The prevalence of MS in women is partly related to sex hormones; however, the severity of the damage is greater in men, which is in line with the results of the present study [20]. Kipp et al. (2009) reported that in MS, women reach disability milestones at a later age than men, and the male gender is associated with faster progression and worse outcomes [21]. Therefore, although MS is more prevalent in women, cellular-neural destruction and sensory and motor disabilities are more frequent in men. Several studies have shown that MS can cause a decrease in MBP expression [22-25].

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

All steps of this study were carried out according to the guidelines of the ethics committee for working with laboratory animals with ethics code: EE/99.3.02.5591/scu.ac.ir.

Funding

This study has no financial sponsor.

Authors contributions

Aref Nooraei: writing proposals, conducting clinical trials, writing articles.

Kaveh Khazail: edited the article, analyzed the data.

Marzieh Darvishi: proposal design, analysis, article editing.

Zohra Qutbuddin: data analysis and analysis, article editing.

Zahra Basir: analysis of textural images.

Conflicts of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to espress their gratittute to the experts of the Department of Anatomy, Faculty of Paraveterinary Medicine, Ilam University, and Faculty of Veterinary, Shahid Chamran University of Ahvaz.

مقاله پژوهشی

مقایسه‌ی میزان بیان پروتیئن پایه‌ی میلین (MBP) و فاکتور آستروگلیوزیس (GFAP) به دنبال القای دمیلیناسیون عصبی با اتیدیوم برماید در موش‌های صحرایی نر و ماده

عارف نورایی[۱،۲]، کاوه خزائیل[۳]، *مرضیه درویشی[۴]، زهره قطب الدین[۵]، زهرا بصیر[۶]

۱. استادیار آناتومی و جنین‌شناسی مقایسه‌ای، گروه بافت‌شناسی، دانشکده‌ی پیرادام‌پزشکی، دانشگاه ایلام، ایران، ایران.
۲. گروه علوم پایه، دانشکده‌ی دام‌پزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
۳. دانشیار علوم تشریحی دام‌پزشکی، گروه علوم پایه، دانشکده‌ی دام‌پزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
۴. دانشیار علوم تشریحی پزشکی، گروه علوم پایه، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایران، ایران.
۵. دانشیار فیزیولوژی، گروه علوم پایه، دانشکده‌ی دام‌پزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
۶. استادیار بافت‌شناسی، گروه علوم پایه، دانشکده‌ی دام‌پزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

Use your device to scan and read the article online

Citation Nooraei A, Khazaeei K, Darvishi M, Ghotbeddin Z, Basiri Z. [Comparison of the Expression Levels of MBP and GFAP Following the Induction of Neuronal Demyelination with Ethidium Bromide in Male and Female Rats (Persian)]. Jundishapur Scientific Medical Journal. 2023; 22(5):542-554. 10.32592/JSMJ.22.5.542

https://doi.org/10.32592/JSMJ.22.5.542

CC BY NC

چکیده

زمینه و هدف مولتیپل اسکلروزیس نوعی بیماری خودایمنی، التهابی، همراه با دمیلیناسیون و آستروگلیوز سیستم عصبی مرکزی است که مغز و نخاع را درگیر می‌کند و شیوع آن در زنان سه برابر مردان است.

روش بررسی این مطالعه درباره‌ی ۴۲ سر موش صحرایی نر و ماده با وزن تقریبی ۳۰۰ تا ۳۵۰ گرم در دانشکده‌ی دام‌پزشکی شهید چمران اهواز انجام شد. موش‌ها به‌طور تصادفی به ۶ گروه کنترل نر، گروه کنترل ماده، گروه شم نر (دریافت‌کننده‌ی نرماسالین)، گروه شم ماده (دریافت‌کننده‌ی نرمال‌سالین)، گروه MS نر و گروه MS ماده تقسیم شدند. به‌منظور تزریق اتیدیوم بروماید در گروه‌های MS با استفاده از میکروواینجکتور، موش‌ها با کتامین (۸۰mg/kg) و زایلازین (۵mg/kg) بیهوش شدند. تزریق اتیدیوم بروماید ۰/۰۲ درصد و نرمال‌سالین به میزان ۲۰ میکرولیتر با استفاده از سرنگ همیلتون انجام شد.

یافته‌ها نتایج این مطالعه نشان داد که التهاب، دژنراسیون سلول‌های عصبی در گروه‌های MS افزایش یافت که این التهاب و دژنراسیون در جنس نر بیشتر بود. همچنین، میزان بیان MBP در گروه MS نسبت به سایر گروه‌ها کاهش یافت که در مقایسه‌ی دو جنس، این کاهش بیان تقریباً به یک اندازه بود. همچنین، میزان بیان GFAP در گروه MS نسبت به سایر گروه‌ها افزایش داشت که در مقایسه‌ی دو جنس، این افزایش در جنس ماده بیشتر بود.

نتیجه گیری MS سبب کاهش میزان پروتئین پایه‌ی میلین و افزایش فاکتور آستروگلیوزیس می‌شود که تخریب غلاف میلین و تخریب آستروسیت‌ها را در پی دارند و سبب ناتوانی‌های حسی و حرکتی در افراد مبتلا به MS می‌شوند.

کلیدواژه‌ها مولتیپل اسکلروزیس، MBP، GFAP، اتیدیوم برماید

تاریخ دریافت: ۱۰ آذر ۱۴۰۲
تاریخ پذیرش: ۱۲ دی ۱۴۰۲
تاریخ انتشار: ۳۰ دی ۱۴۰۲

نویسنده مسئول:
مرضیه درویشی
نشانی: گروه علوم پایه، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایران، ایران.
تلفن: ۰۹۱۲۴۰۲۵۸۹۳
رایانامه: marzidarvish@yahoo.com

مجله علمی پزشکی
جنـــدی شـــاپور

مقدمه

مولتیپل اسکلروزیس (MS) نوعی بیماری خودایمنی، التهابی، مزمن و همراه با دمیلیناسیون و آستروگلیوزیس سیستم عصبی مرکزی (CNS) است که نواحی مختلفی همچون مغز، نخاع و عصب بینایی را درگیر می‌کند [۱]. تخریب میلین یا دمیلیناسیون از اصلی‌ترین علل ایجاد بیماری MS است. ساختار کلی میلین در سیستم عصبی محیطی و مرکزی مشابه است، هرچند در ترکیب مولکولی آن‌ها تفاوت‌هایی دیده می‌شود. میلین چند لایه‌ی تکراری از دو لایه‌ی لیپیدی فشرده است که توسط پروتئین‌های میلین خاصی که یکی از آن‌ها MBP است در کنار هم قرار می‌گیرند. پروتئین‌های میلین از جمله طولانی‌ترین پروتئین‌ها در بدن هستند [۲]. در اثر بیماری اماس، پروتئین پایه‌ی میلین (MBP) دچار تخریب و آسیب می‌شود و ممکن است بیان این پروتئین شدیداً تحت تأثیر قرا بگیرد. مدت‌ها است که MBP به‌عنوان عاملی نورودژنراتیو در پاتوژنز بیماری خودایمنی MS مطالعه شده است. MS با التهاب CNS، دمیلینه شدن و از دست دادن آکسون مشخص می‌شود، درحالی‌که نقش مستقیم MBP به‌عنوان یک آنتی‌ژن اولیه در MS انسانی نامشخص است، واضح است که MBP و عملکرد آن در تشکیل میلین و نگهداری طولانی‌مدت با MS مرتبط است. این پروتئین ۳۰ درصد از کل پروتئین میلین CNS را تشکیل می‌دهد.

MBP نمونه‌ی بارز یک مولکول به‌ظاهر ساده، اما در واقع از نظر بیوشیمیایی و ساختاری پیچیده است که ارتباط نزدیکی با رشد نرمال سیستم عصبی و بیماری‌های عصبی دارد [۳]. به دنبال التهاب در CNS در اثر بیماری MS، حملات ایمنی به غلاف میلین شروع می‌شوند که در نتیجه‌ی این حملات ایمنی، میزان بیان MBP کمتر و شدت تخریب میلین بیشتر می‌شود و کاهش سرعت هدایت عصبی رخ می‌دهد و نهایتاً علائم عصبی بروز می‌یابند [۴]. از دیگر علائم بیماری MS تخریب آستروسیت‌ها است. آستروسیت‌ها به آسیب و بیماری در سیستم عصبی مرکزی CNS از طریق فرایندی پیچیده و چندوجهی به نام آستروگلیوز پاسخ می‌دهند. اختلال عملکرد آستروسیت‌ها و آستروگلیوزیس می‌تواند به انواع اختلالات CNS منجر شود یا به آن‌ها کمک کند [۵].

آستروسیت‌ها نقش مهمی در تشکیل اسکار در سیستم عصبی مرکزی دارند. علاوه بر این، آستروسیت‌ها ترشح‌کننده‌ی قوی سیتوکین‌های مختلف پیش‌التهابی و فاکتورهای سیتوتوکسیک هستند. پروتئین اسیدی گلیال (GFAP) نشانگر زیستی به‌خوبی تثبیت‌شده‌ای برای آستروگلیوزیس است؛ زیرا مطالعات متعددی استفاده از آن را برای MS توصیف کرده و ارتباط آن را با شدت بیماری و میزان التهاب عصبی نیز گزارش کرده‌اند [۶ ، ۷]. GFAP پروتئینی اسیدی است که در پروتئین اسکلت سلولی آستروسیت‌های خاص یافت می‌شود [۸]. این پروتئین برای اولین بار از پلاک ماده‌ی سفید بیماران مولتیپل اسکلروزیس جدا شد [۹]. GFAP به طور معمول در آستروسیت‌ها، سلول‌های غشای بطنی و... بیان می‌شود و پروتئین نمادین آستروسیت‌ها در نظر گرفته می‌شود [۱۰]. فعال‌سازی و تکثیر میکروگلیا و آستروسیت‌های مشاهده‌شده در ضایعات دمیلینه‌کننده نشان می‌دهد که سهم پاسخ ایمنی ذاتی سلول‌های CNS ساکن ممکن است نقش مهمی در آسیب الیگودندروسیت و دژنراسیون آکسون ایفا کند [۱۱]. در واقع، سلول‌های گلیال و آستروسیت‌ها، به‌ویژه، در اوایل بیماری MS بسیار غیرطبیعی هستند [۱۲]. مطالعات در مورد آنسفالومیلیت خودایمنی تجربی (EAE) نشان داده است که فعال شدن آستروسیت‌ها و از دست دادن انتهای پایانه‌های آن‌ها در اطراف رگ‌های خونی کوچک نشان‌دهنده‌ی رویدادهای اولیه در ایجاد ضایعه است که با از دست دادن عملکرد سد خونی‌مغزی (BBB)، التهاب متعاقب CNS و همچنین، ادم اطراف عروقی مرتبط است [۱۳]. مولتیپل (MS) اصلی‌ترین بیماری دمیلینه‌کننده‌ی سیستم اعصاب مرکزی و همچنین، شایع‌ترین علت غیرتروماتیک ناتوانی نورولوژیکی در افراد جوان و میان‌سال در جهان است و از طرفی، MS می‌تواند هر بخشی از سیستم اعصاب مرکزی، اعصاب بینایی، ساقه‌ی مغز، مخچه و نخاع را درگیر کند و به دنبال این درگیری، تخریب غلاف میلین نورون‌های عصبی رخ می‌دهد و بر سیستم حسی و حرکتی اثر می‌گذارد و به بروز نشانه‌ها و علائم آسیب‌شناختی منجر می‌شود. شروع بیماری MS در اوایل دوران بلوغ، معمولاً بین ۲۰ تا ۴۰سالگی است و در زنان ۲ تا ۳ برابر بیشتر از مردان رخ می‌دهد.

ازاین‌رو، بیشتر قشر جوان جامعه را درگیر می‌کند، به‌صورتی که شایع‌ترین علت ناتوانی نورولوژیک مزمن در دوران جوانی نامیده شده است. همچنین، با توجه به افزایش استرس و فشارهای اجتماعی کنونی و تأثیر مستقیم این عوامل بر نرخ بروز بیماری مولتیپل اسکلروزیس و همچنین، ازآن‌جایی که این بیماری قشر جوان و به‌خصوص جنس مؤنث را بیشتر درگیر می‌کند، امروزه اماس تهدیدی جدی برای سلامت خانواده‌ها و اجتماع است؛ بنابراین، ضروری است به‌منظور افزایش سلامت اجتماع، پژوهش‌های متعددی در زمینه‌ی شناخت بیشتر این بیماری انجام شود. با توجه به تخریب میلین و همچنین، آستروسیت‌ها در بیماری MS، هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی میزان بیان MBP و GFAP در موش‌های صحرایی نر و ماده بدون مداخله‌ی هورمونی است.

روش بررسی

این مطالعه درباره‌ی ۴۲ سر موش صحرایی نر و ماده با وزن تقریبی ۳۰۰ تا ۳۵۰ گرم و محدوده‌ی سنی ۶ تا ۷ ماه در دانشکده‌ی دامپزشکی شهید چمران اهواز انجام شد. ابتدا، به‌منظور سازگاری موش‌ها با محیط، موش‌ها به مدت یک هفته و چرخه‌ی تاریکی و روشنایی ۱۲ ساعت بدون محدودیت آب و غذا نگهداری شدند. تمام مراحل آزمون بر اساس دستورالعمل کمیته‌ی اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز (کد اخلاق: EE/99. 3.02.55591/scu.ac.ir) انجام شد. سپس، موش‌ها به‌طور تصادفی، به ۶ گروه هفت‌تایی متشکل از کنترل نر، کنترل ماده، شم نر (دریافت‌کننده‌ی

نرمال‌سالین)، شم ماده (دریافت‌کننده‌ی نرمال‌سالین)، MS نر و MS ماده تقسیم شدند. به‌منظور جراحی استریوتاکس و تزریق اتیدیوم بروماید در گروه‌های MS، با استفاده از میکروواینجکتور، موش‌ها با کتامین (۸۰mg/kg) و زایلازین (۵mg/kg) بیهوش شدند و موهای ناحیه‌ی جمجمه تراشیده شد و سپس، در خط میانی سر از ناحیه‌ی فرونتال به‌سمت اکسیپیتال برشی ساژیتال برای تعیین نقطه‌ی تزریق طبق مختصات اطلس پاکسینوس (قدامی‌خلفی ۰/۴۶، داخلی‌خارجی ۱ و پشتی‌شکمی ۲/۲) ایجاد شد. در مرحله‌ی نهایی، تزریق اتیدیوم بروماید ۰/۰۲ درصد و نرمال‌سالین به میزان ۲۰ میکرولیتر با استفاده از سرنگ همیلتون در ناحیه‌ی مشخص‌شده در موش‌های گروه آسیب و نرمال‌سالین به‌ترتیب انجام شد [۱۴]. پس از القای مولتیپل اسکلروزیس، گروه‌های مورد آزمایش با تزریق داخل‌صفاقی کتامین و زایلازین بیهوش شدند و پس از پرفیوژن (با محلول نرمال‌سالین و پارافرمالدئید ۴ درصد) سر حیوان جدا شد و مغز بدون آسیب خارج شد. در نهایت، نمونه‌های مغز برای بررسی‌های بافت‌شناسی به روش معمول تهیه و ارزیابی شدند [۱۵].

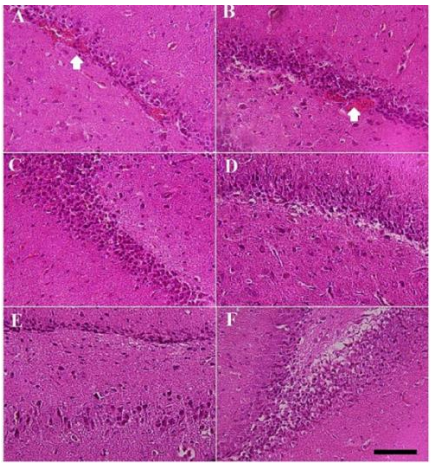
از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین به‌منظور بررسی تغییرات بافتی اجزای مغز مانند هیپوکامپ و مخ استفاده شد و یافته‌ها به‌صورت درصد بیان شد. بعد از رنگ‌آمیزی بافتی، با استفاده از نرم‌افزارهای Image J و Image tools، مساحت ناحیه‌ی تغییریافته و همچنین، کل ناحیه‌ی مورد مطالعه اندازه‌گیری شد [۱۶]. برای بررسی میزان بیان GFAP و MBP از روش ایمنوهیستوشیمی لام‌های پارافینی تهیه شد. برای شناسایی ابتدا مراحل آب‌دهی به برش‌های بافت انجام شد و سپس، نمونه‌ها در معرض آنتی‌بادی اولیه‌ی GFAP و MBP (Anti mouse، شرکت abcam) با نسبت ۱:۵۰۰ قرار گرفتند و به مدت یک شبانه‌روز در دمای ۴ درجه در محیط مرطوب قرار داده شدند. بعد از شست‌وشو با PBS (محلول بافر نمکی)، برش‌ها با آنتی‌بادی ثانویه‌ی کونژوگه به FITC و Alexa red به نسبت ۱:۲۰۰ (Anti mouse، شرکت abcam)، رنگ‌آمیزی شدند و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند. در مرحله‌ی بعد، نمونه‌ها مجدداً با PBS (در تاریکی) شسته شدند و با استفاده از پروپیدیوم یداید (سیگما) هسته‌ها رنگ شد. سپس، مجدداً نمونه‌ها مراحل آبگیری را طی کردند و مانت لام انجام شد [۱۷ ، ۱۸].

داده‌های جمع‌آوری‌شده به‌صورت توصیفی و تحلیلی با نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ بررسی شدند. میانگین داده‌های جمع‌آوری‌شده ± خطای استاندارد ارائه شد. اطلاعات به‌دست‌آمده از آزمون‌ها توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه اندازه‌گیری شد.

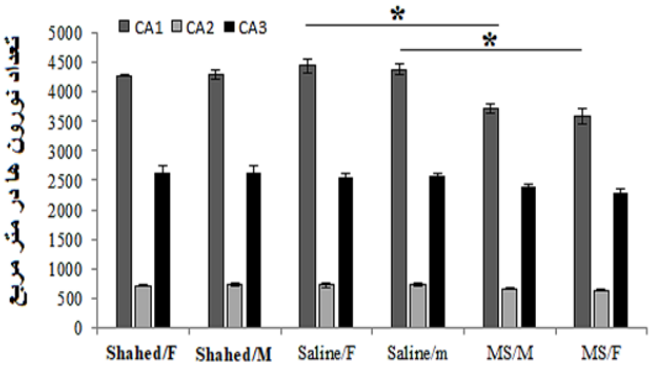
یافته ها

نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین در این مطالعه نشان داد که تراکم نورونی در گروه‌های MS نر و ماده به‌شدت کاهش پیدا کرده است و همچنین، التهاب و خون‌ریزی نیز در این گروه‌ها دیده می‌شود. درحالی‌که در گروه‌های کنترل و شم، تراکم نورونی کاملاً طبیعی بود (تصویر ۴-۱). همچنین، چروکیدگی و دژنره شدن سلول‌های عصبی در قسمت کورتکس مخ در گروه MS نسبت به سایر گروه‌ها افزایش پیدا کرده بود که دژنره شدن سلول‌های عصبی در گروه MS نر بیشتر از MS ماده بود (تصاویر ۴-۲، ۴-۳ و نودار ۴-۱). در بررسی‌های ایمنوهیستوشیمی نشان داده شد که میزان بیان MBP در گروه MS نسبت به سایر گروها به‌شدت کاهش پیدا کرده و تراکم گرین‌پیکسل‌ها نیز کاهش یافته است (تصویر۴-۴) و نیز در رنگ‌آمیزی GFAP نشان داده شد که در گروه MS میزان تراکم آستروسیت‌ها نسبت به سایر گروه‌ها افزایش یافته که نشان‌دهنده‌ی آستروگلیوزیس در گروه‌های MS است (تصویر ۴-۵ و نمودار ۴-۲).

نتایج



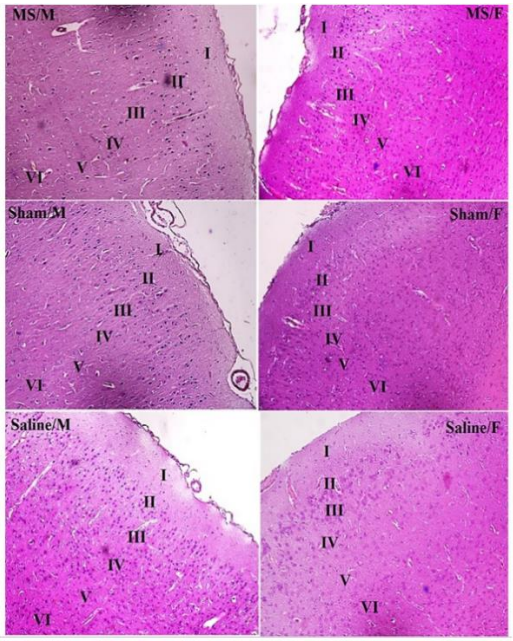
تصویر ۴-۱. رنگ‌آمیزی هماتوکسین ائوزین (برش‌های هیپوکمپ) در گروه آسیب نر (A) و ماده (B) تغییرات بافتی را نشان می‌دهد که این تغییرات در جنس نر بیشتر است (این تغیرات بین دو گروه آسیب معنی‌دار نیست). تراکم نورونی در این گروه‌ها به‌شدت کاهش یافته است، درحالی‌که در گروه سالین نر (C) و سالین ماده (D) و گروه‌های شاهد نر (E) و شاهد ماده (F) تراکم نورون‌ها مشاهده می‌شود. لنز ۱۰، بزرگ‌نمایی ۲۰۰.



نمودار۴-۱. شمارش سلول‌های نواحی CA1، CA2 و CA3 هیپوکمپ

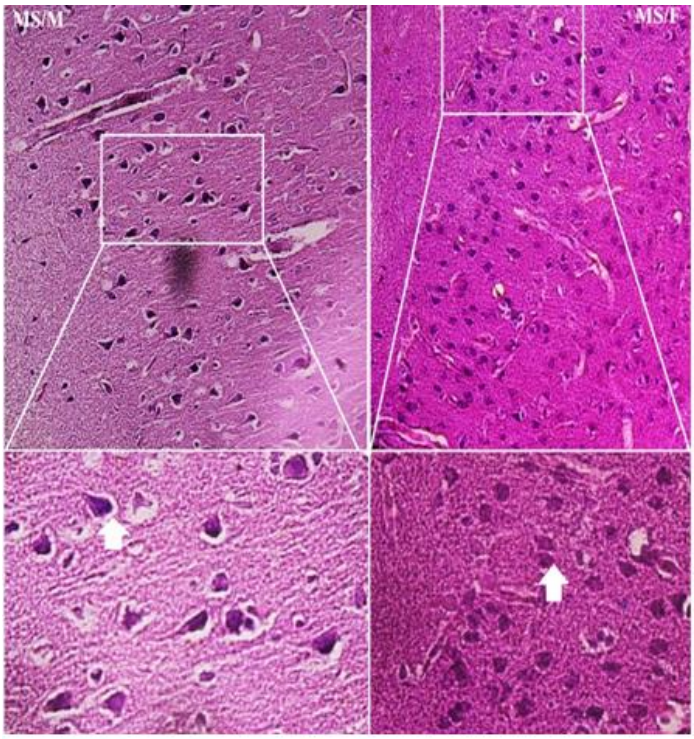
جدول ۴-۱. تعداد نورون‌ها در گروهای مختلف رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین

	تعداد نورون در هر مترمربع		
گروه‌بندی	ناحیه‌ی CA1	ناحیه‌ی CA2	ناحیه‌ی CA3
Shahed/F	۴۳۷۶	۶۱۰	۲۵۹۰
Shahed/M	۴۴۰۵	۶۴۱	۲۵۸۷
Salin/F	۴۴۷۲	۶۴۷	۲۵۳۱
Salin/M	۴۴۱۷	۶۴۵	۲۵۳۸
MS/F	۳۵۳۰	۵۵۲	۲۲۳۷
MS/M	۳۴۹۳	۵۳۰	۲۲۲۹

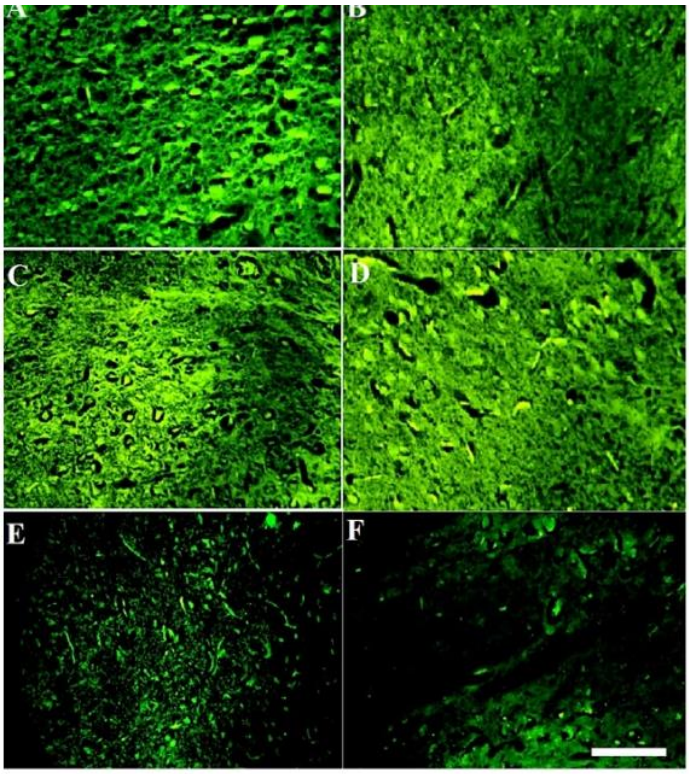


تصویر ۴-۲. ناحیه‌ی کورتکس و ۶ لایه‌ی آن؛ تفاوت خاصی در لایه‌های کورتکس در گروه‌های کنترل و شم مورد آزمایش رخ نداده است. اما چروکیدگی و دژنره شدن سلول‌ها در لایه‌های مختلف در گروه‌های MS دیده می‌شود.

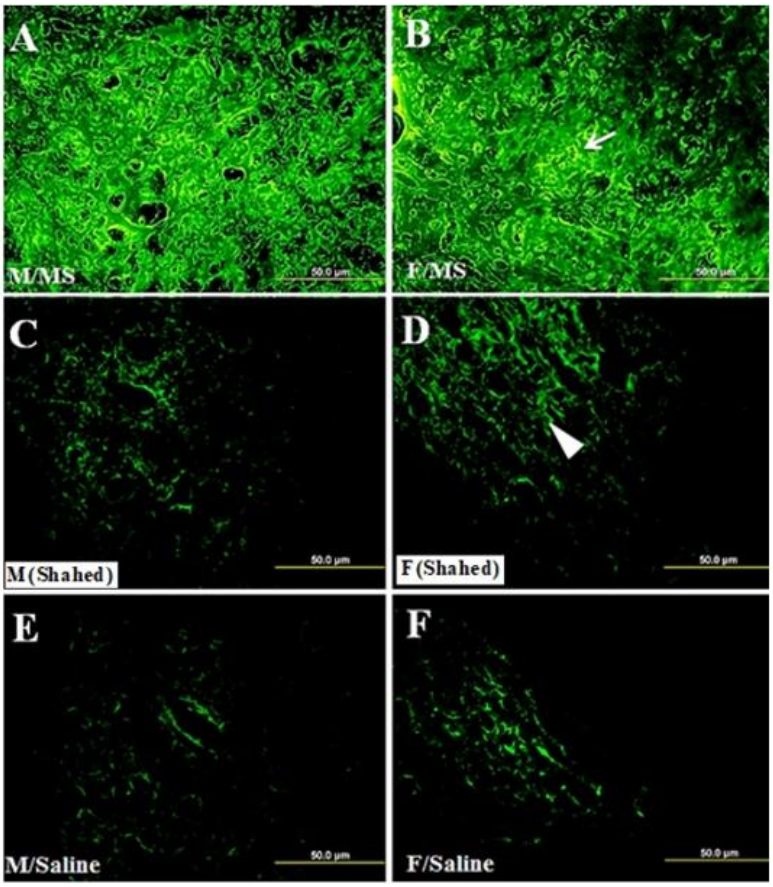
لایه‌ی ملکولی Molecular Layer، لایه‌ی دانه‌دار خارجی External Granular Layer، لایه‌ی هرمی خارجی External Pyramidal Layer، لایه‌ی دانه‌دار داخلی Internal Granular Layer، لایه‌ی هرمی داخلی Internal Pyramidal Layer، لایه‌ی چندشکلی Multiform Layer



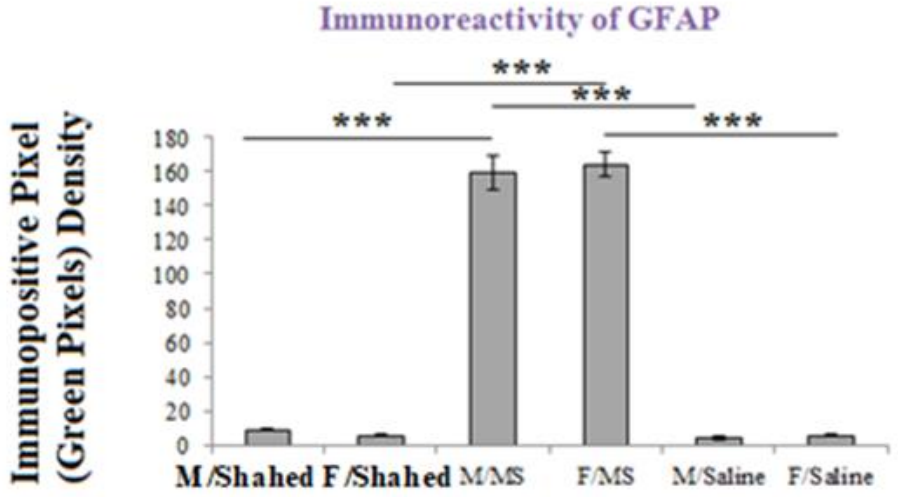
تصویر۴-۳. ساختار بافت‌شناسی کورتکس در دو گروه دمیلینه‌ی نر و ماده. پیکان سفید نشان‌دهنده‌ی سلول‌های چروکیده و دژنره است. شدت تخریب در جنس نر بیشتر از جنس ماده است.



تصویر۴-۴. رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی برای بررسی بیان MBP در گروه شاهد نر (A) و ماده (B) و همچنین، گروه سالین نر (C) و ماده (D). در گروه شاهد نر (A) و ماده (B) و همچنین، گروه سالین نر (C) و ماده (D) میزان بیان MBP بالا است و در گروه‌های آسیب نر (E) و ماده (F)، تراکم گرین‌پیکسل کاهش یافته است.



تصویر ۴-۵. تصویر میکروسکوپ فلورسنت از رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی برای بررسی بیان GFAP (گلیوزیس) است. رنگ سبز نشان‌دهنده‌ی سیتوپلاسم رنگ-آمیزی‌شده با آنتی‌بادی GFAP است. پیکان سفید تراکم بالای سلول‌های آستروسیت و مثلث سفید مورفولوژی ستاره‌ای‌شکل سلول را نمایش می‌دهد.



نمودار ۴-۲. نمودار هیستوگرام از درصد بیان مارکر GFAP در گروه‌های آزمون (بررسی کمی با نرم‌افزار Image J انجام شده است). مقادیر نشان‌دهنده‌ی means± SEM (۰/۰۰۱ ≥P***) است.

جدول ۴-۲. تعداد گرین‌پیکسل‌ها در رنگ‌آمیزی GFAP

گروه‌های مختلف	تعداد گرین‌پیکسل
Shahed/F	۹
Shahed/M	۸
Salin/F	۵
Salin/M	۶
MS/F	۱۶۴
MS/M	۱۵۳

بحث

مولتیپل اسکلروزیس نوعی بیماری خودایمنی است که در آن، سیستم عصبی مرکزی دچار التهاب، دمیلیناسیون و آستروگلیوز می‌شود [۱۹]. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که مولتیپل اسکلروزیس می‌تواند سبب کاهش تراکم نورونی در هیپوکامپ و همچنین، افزایش نورون‌های دژنره در قسمت قشری مخ شود. همچنین، نتایج این مطالعه نشان داد که میزان تخریب نورون‌ها در جنس نر نسبت به جنس ماده بیشتر است، Dunn, S و همکاران نشان دادند که در جنس نر آکسون یا میلین در برابر حملات خودایمنی آسیب‌پذیرتر است و همچنین، اختلال عملکردی در مردان شدیدتر است. اگرچه MS در زنان شایع‌تر است، مردان آسیب‌پذیرتر هستند. شیوع MS در زنان تا حدی به هورمون‌های جنسی مربوط می‌شود؛ اما شدت آسیب در مردان بیشتر است که همسو با نتایج مطالعه‌ی حاضر است [۲۰]. Kipp, M و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که در بیماری MS، زنان در سنین بالاتر نسبت به مردان به نقاط عطف ناتوانی می‌رسند و جنسیت مرد با پیشرفت سریع‌تر و پیامد بدتری همراه است [۲۱]؛ بنابراین، هرچند MS در زنان شیوع بیشتری دارد، تخریب سلولی‌عصبی و ناتوانی‌های حسی و حرکتی در مردان بیشتر است. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که بیماری مولتیپل اسکلروزیس می‌تواند سبب کاهش بیان پروتئین پایه‌ی میلین شود [۲۵-۲۲].

مکانسیم تخریب و کاهش بیان MBP به‌خوبی شناخته نشده است؛ اما تخریب و ناپدید شدن این پروتئین بر نقش آنزیم پروتئولیتیک دلالت دارد. تجزیه‌ی میلین و همچنین، تخریب MBP توسط پروتئینازها می‌تواند سبب ایجاد پپتیدهای انسفالیتوژن شود و مشخص شده است که این امر سبب تغییر در ساختار غلاف میلین می‌شود که خود نشان می‌دهد که تخریب MBP اولین گام در تجزیه‌ی میلین در بیماری‌های دمیلینه‌کننده است. یک پروتئیناز خنثی فعال شده با کلسیم (کالپین) که MBP را تجزیه می‌کند، در بافت مغزی مبتلایان به MS و مایع مغزی‌نخاعی CSF افزایش می‌یابد و حضور آن در میلین نشان می‌دهد که میلین ممکن است در بیماری دمیلینه‌کننده‌ی خود هضم شود؛ بنابراین، در مبتلایان به این بیماری، میزان بیان MBP کاهش و میزان تخریب آن افزایش می‌یابد که نتایج این مطالعه نیز این را نشان می‌دهد [۲۶]. در مدل‌های حیوانی نشان داده شده است که یکی از مهم‌ترین علل تخریب MBP تجزیه‌ی این پروتئین به قطعات بسیار ریز و پپتیدهای کوچک‌تر است که این تکه‌تکه شدن پروتئین سبب عرضه‌ی بهتر به سلول‌های T و در نتیجه، آسیب شدیدتر و تخریب بیشتر پروتئین پایه‌ی میلین می‌شود [۲۸،۲۷]. به دنبال چنین تغییراتی، دمیلیناسیون نیز ممکن است در نتیجه‌ی فاگوسیتوز MBP باشد [۲۹] که نتایج این مطالعه هم نشان داد که MS سبب تخریب و کاهش میزان بیان MBP می‌شود که شدت دمیلینه شدن در هر دو گروه نر و ماده تقریباً با هم برابر بود. علاوه بر التهاب و تخریب میلین، در مبتلایان به MS تخریب آستروسیت‌ها نیز رخ می‌دهد [۳۰]. آستروسیت‌ها فراوان‌ترین و ناهمگن‌ترین نوع سلول گلیال هستند [۳۱]، در رشد آستروسیت‌ها عوامل اپی‌ژنتیک بسیار مهم و مؤثر هستند. تعدادی از ژن‌های آستروسیت در اوایل توسعه متیله می‌شوند. از جمله GFAP پروتئینی است که بعنوان سرکوب رونویسی از ژن آستروسیت عمل میکند. بیان این پروتئین ((GFAPدر CNSبه عنوان شناساگر اولیه آستروسیت ها می باشد. مطالعات متعددی نشان می دهد که این پروتئین را به عنوان نشانگر زیستی است، که آستروگلیال ها را در بیماری MSفعال می‌کند. Norkute و همکاران در سال ۲۰۰۹ مطالعه‌ای درباره‌ی آستروسیتوزیس هیپوکامپ موش‌ها انجام دادند و مشاهده کردند که بعد از القای مولتیپل اسکلروزیس، بیان GFAP در طول آزمایش نسبت به گروه شاهد افزایش چشمگیری داشته است که هم‌راستا با مطالعه‌ی حاضر است [۳۶]. می‌توان گفت GFAP ممکن است نقش آسیب‌رسان به CNS را داشته باشد. پس از آسیب‌های دژنره‌کننده‌ی سیستم عصبی مرکزی، آستروسیت‌ها با تولید GFAP بیشتر به‌سرعت واکنش نشان می‌دهند که به آستروگلیوز شدید منجر می‌شود [۳۷] و مطالعه‌ی حاضر نیز این را نشان می‌دهد. درک مکانیسم‌هایی که بیان GFAP را در آستروسیت‌ها تنظیم می‌کنند، حوزه‌ای مهم برای بررسی است؛ زیرا ممکن است ابزاری برای کنترل فرایندهای فیزیولوژیکی و پاتوفیزیولوژیکی در CNS فراهم کند. نشان داده شده است که هورمون‌های زنانه، از جمله استرادیول‌ها، سبب افزایش میزان بیان GAFP و به دنبال آن، تخریب آستروسیت‌ها می‌شود و با برداشتن تخمدان و کاهش سطح استرادیول، میزان بیان GAFP و تخریب آستروسیت‌ها کاهش می‌یابد [۳۸]. مطالعه‌ی ما نیز هم‌راستا با مطالعه‌ی Rozovsky و همکاران، نشان داد که هورومون‌های زنانه می‌تواند میزان بیان GAFP را افزایش دهد.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که بیماری MS می‌تواند سبب کاهش تراکم نورنی در نواحی سه‌گانه‌ی هیپوکامپ شود و نیز می‌تواند سبب التهاب و خون‌ریزی در نواحی هیپوکامپ و مخ شود. این بیماری می‌تواند سبب دژنره و چروکیده شدن سلول‌های عصبی در ۶ لایه‌ی کورتکس مخ شود و همچنین، MS می‌تواند سبب کاهش میزان پروتئین پایه‌ی میلین و افزایش فاکتور آستروگلیوزیس شود که هر دو این تغیرات در مغز به‌ترتیب سبب تخریب غلاف میلین و تخریب آستروسیت‌ها می‌شوند که به دنبال

آن، ناتوانی‌های حسی و حرکتی در افراد مبتلا به MS بروز می‌کند.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

کلیه مراحل انجام این مطالعه بر اساس دستوالعمل کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی با کد اخلاق :EE/99.3.02.5591/scu.ac.ir انجام شد.

حامی مالی

این مطالعه فاقد حامی مالی می باشد.

مشارکت نویسندگان

عارف نورایی نوشتن پروپوزال، انجام آزمایشات بالینی، نوشتن مقاله.

کاوه خزاییل ویرایش مقاله، تجزیه و تحلیل داده ها.

مرضیه درویشی طراحی پروپوزال، تجزیه وتحلیل داده ها، ویرایش مقاله.

زهره قطب الدین تجزیه و تحلیل داده ها،ویرایش مقاله.

زهرا بصیر تجزیه و تحلیل تصاویربافتی.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام میدارند که هیچگونه تعارض منافعی وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از کارشناسان بخش آناتومی دانشکده پیرادامپزشکی دانشگاه ایلام و دانشکده دامپزشکی شهید چـمران اهـواز کمال تشکر و قدردانی را دارم.

References

[1] Höftberger R, Lassmann H. Inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system. Handb Clin Neurol. 2017;145:263-83. [DOI: 10.1016/B978-0-12-802395-2.00019-5] [PMID] [PMCID]

[2] Fornasiero EF, Mandad S, Wildhagen H, Alevra M, Rammner B, Keihani S, et al. Precisely measured protein lifetimes in the mouse brain reveal differences across tissues and subcellular fractions. Nature communications. 2018;9(1):4230. [DOI: 10.1038/s41467-018-06519-0]

[3] Martinsen V, Kursula P. Multiple sclerosis and myelin basic protein: Insights into protein disorder and disease. Amino Acids. 2022;54(1):99-109. [DOI: 10.1007/s00726-021-03111-7] [PMID] [PMCID]

[4] Neumann B, Segel M, Chalut KJ, Franklin RJ. Remyelination and ageing: reversing the ravages of time. Mult Scler. 2019; 25(14):1835-41. [DOI: 10.1177/1352458519884006] [PMID] [PMCID]

[5] Sofroniew MV. Astrogliosis. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014;7(2):a020420. [DOI: 10.1101/cshperspect.a020420] [PMID]

[6] Mañé-Martínez MA, Olsson B, Bau L, Matas E, Cobo-Calvo Á, Andreasson U, et al. Glial and neuronal markers in cerebrospinal fluid in different types of multiple sclerosis. Mult Scler. 2015;21(5):550-61. [DOI: 10.1177/1352458514549397] [PMID] [PMCID]

[7] Kassubek R, Gorges M, Schocke M, Hagenston VA, Huss A, Ludolph AC, et al. GFAP in early multiple sclerosis: A biomarker for inflammation. Neurosci Lett. 2017;657:166-70. [DOI: 10.1016/j.neulet.2017.07.050] [PMID]

[8] De Armond SJ, Eng LF, Rubinstein LJ. The Application of filial Fibrillary Acidic (GFA) Protein Immunohistochemistry in Neurooncology: A Progress Report. Pathol Res Pract. 1980;168(4):374-94. [DOI: 10.1016/s0344-0338(80)80273-1] [PMID]

[9] Raghavan R, Steart PV, Weller RO. Cell proliferation patterns in the diagnosis of astrocytomas, anaplastic astrocytomas and glioblastoma multiforme: a Ki-67 study. Neuropathol Appl Neurobiol. 1990;16(2):123-33. [DOI: 10.1111/j.1365-2990.1990.tb00941.x] [PMID]

[10] Zhang N, Shang Z, Wang Z, Meng X, Li Z, Tian H, et al. Molecular pathological expression in malignant gliomas resected by fluorescein sodium-guiding under the YELLOW 560 nm surgical microscope filter. World J Surg Oncol. 2018;16(1):195. [DOI: 10.1186/s12957-018-1495-2] [PMID] [PMCID]

[11] Bø L. The histopathology of grey matter demyelination in multiple sclerosis. Acta Neurol Scand Suppl. 2009;(189):51-7. [DOI: 10.1111/j.1600-0404.2009.01216.x] [PMID]

[12] Ponath G, Park C, Pitt D. The role of astrocytes in multiple sclerosis. Front Immunol. 2018;9:217. [DOI: 10.3389/fimmu.2018.00217] [PMID] [PMCID]

[13] Brosnan CF, Raine CS. The astrocyte in multiple sclerosis revisited. Glia. 2013;61(4):453-65. [DOI: 10.1002/glia.22443] [PMID]

[14] Levine JM, Reynolds R. Activation and proliferation of endogenous oligodendrocyte precursor cells during ethidium bromide-induced demyelination. Exp Neurol. 1999;160(2):333-47. [DOI: 10.1006/exnr.1999.7224] [PMID]

[15] Barone FC, Hillegass LM, Price WJ, White RF, Lee EV, Feuerstein GZ, et al. Polymorphonuclear leukocyte infiltration into cerebral focal ischemic tissue: myeloperoxidase activity assay and histologic verification. J Neurosci Res. 1991;29(3):336-45. [DOI: 10.1002/jnr.490290309] [PMID]

[16] Shirazi A, Golab F, Sanadgol N, Barati M, Mohammad Salehi R, Vahabzadeh G, et al. [Evaluation of the neurotrophic factors in animal model of myelin destruction induced by cuprizone in c57bl/6 mice (Persian)]. Shefaye Khatam. 2016;4(2):47-54. [DOI: 10.18869/acadpub.shefa.4.2.47]

[17] Halliday GM, Cullen KM, Kril JJ, Harding AJ, Harasty J. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunohistochemistry in human cortex: a quantitative study using different antisera. Neurosci Lett. 1996;209(1):29-32. [DOI: 10.1016/0304-3940(96)12592-1] [PMID]

[18] Hamano K, Iwasaki N, Takeya T, Takita H. A quantitative analysis of rat central nervous system myelination using the immunohistochemical method for MBP. Brain Res Dev Brain Res. 1996;93(1-2):18-22. [DOI: 10.1016/0165-3806(96)00025-9] [PMID]

[19] Yi W, Schlueter D, Wang X. Astrocytes in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis: Star-shaped cells illuminating the darkness of CNS autoimmunity. Brain Behav Immun. 2019;80:10-24. [DOI: 10.1016/j.bbi.2019.05.029] [PMID]

[20] Dunn SE, Gunde E, Lee H. Sex-based differences in multiple sclerosis (MS): part II: rising incidence of multiple sclerosis in women and the vulnerability of men to progression of this disease. Curr Top Behav Neurosci. 2015;26:57-86. [DOI: 10.1007/7854_2015_370] [PMID]

[21] Kipp M, Beyer C. Impact of sex steroids on neuroinflammatory processes and experimental multiple sclerosis. Front Neuroendocrinol. 2009;30(2):188-200. [DOI: 10.1016/j.yfrne.2009.04.004] [PMID]

[22] Harp CT, Ireland S, Davis LS, Remington G, Cassidy B, Cravens PD, et al. Memory B cells from a subset of treatment-naïve relapsing-remitting multiple sclerosis patients elicit CD4+ T-cell proliferation and IFN-γ production in response to myelin basic protein and myelin oligodendrocyte glycoprotein. Eur J Immunol. 2010;40(10):2942-56. [DOI: 10.1002/eji.201040516] [PMID]

[23] Jana M, Pahan K. Down-regulation of myelin gene expression in human oligodendrocytes by nitric oxide: implications for demyelination in multiple sclerosis. J Clin Cell Immunol. 2013;4:10.4172/2155-9899.1000157. [DOI: 10.4172/2155-9899.1000157] [PMID]

[24] Boullerne, A. I., & Benjamins, J. A. (2006). Nitric oxide synthase expression and nitric oxide toxicity in oligodendrocytes. Antioxidants & redox signaling, 2006,8(5-6), 967-980. [DOI: 10.1089/ars.2006.8.96]

[25] Calderon TM, Eugenin EA, Lopez L, Kumar SS, Hesselgesser J, Raine CS, et al. A role for CXCL12 (SDF-1α) in the pathogenesis of multiple sclerosis: regulation of CXCL12 expression in astrocytes by soluble myelin basic protein. J Neuroimmunol. 2006;177(1-2):27-39. [DOI: 10.1016/j.jneuroim.2006.05.003] [PMID]

[26] Banik NL. Pathogenesis of myelin breakdown in demyelinating diseases: role of proteolytic enzymes. Crit Rev Neurobiol.

1992;6(4):257-71. [PMID]

[27] D'Souza CA, Moscarello MA. Differences in susceptibility of MBP charge isomers to digestion by stromelysin-1 (MMP-3) and release of an immunodominant epitope. Neurochemical research. 2006;31:1045-54. [DOI: 10.1007/s11064-006-9116-9]

[28] Mastronardi FG, Moscarello MA. Molecules affecting myelin stability: a novel hypothesis regarding the pathogenesis of multiple sclerosis. J Neurosci Res. 2005;80(3):301-8. [DOI: 10.1002/jnr.20420] [PMID]

[29] Sajad M, Zargan J, Chawla R, Umar S, Khan HA. Upregulation of CSPG3 accompanies neuronal progenitor proliferation and migration in EAE. J Mol Neurosci. 2011;43(3):531-40. [DOI: 10.1007/s12031-010-9476-0] [PMID]

[30] Ludwin SK, Rao VT, Moore CS, Antel JP. Astrocytes in multiple sclerosis. Mult Scler. 2016;22(9):1114-24. [DOI: 10.1177/1352458516643396] [PMID]

[31] He F, Sun YE. Glial cells more than support cells? Int J Biochem Cell Biol. 2007;39(4):661-5. [DOI: 10.1016/j.biocel.2006.10.022] [PMID]

[32] Hatada I, Namihira M, Morita S, Kimura M, Horii T, Nakashima K. Astrocyte-specific genes are generally demethylated in neural precursor cells prior to astrocytic differentiation. PLoS One. 2008;3(9):e3189. [DOI: 10.1371/journal.pone.0003189] [PMID]

[33] Sun D, Jakobs TC. Structural remodeling of astrocytes in the injured CNS. Neuroscientist. 2012;18(6):567-88. [DOI: 10.1177/1073858411423441] [PMID] [PMCID]

[34] [34] Abdelhak A, Hottenrott T, Morenas-Rodríguez E, Suárez-Calvet M, Zettl UK, Haass C, et al. Glial activation markers in CSF and serum from patients with primary progressive multiple sclerosis: potential of serum GFAP as disease severity marker? Front Neurol. 2019;10:280. [DOI: 10.3389/fneur.2019.00280] [PMID] [PMCID]

[35] Abdelhak, A., Huss, A., Kassubek, J., Tumani, H., & Otto, M. Serum GFAP as a biomarker for disease severity in multiple sclerosis. Scientific reports,2018, 8(1), 14798. [DOI:10.1038/s41598-018-33158-8].

[36] Norkute A, Hieble A, Braun A, Johann S, Clarner T, Baumgartner W, et al. Cuprizone treatment induces demyelination and astrocytosis in the mouse hippocampus. J Neurosci Res. 2009;87(6):1343-55. [DOI: 10.1002/jnr.21946] [PMID]

[37] Sriram K, Benkovic SA, Hebert MA, Miller DB, O'Callaghan JP. Induction of gp130-related cytokines and activation of JAK2/STAT3 pathway in astrocytes precedes up-regulation of glial fibrillary acidic protein in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of neurodegeneration: key signaling pathway for astrogliosis in vivo? J Biol Chem. 2004;279(19):19936-47. [DOI: 10.1074/jbc.M309304200] [PMID]

[38] Rozovsky I, Wei M, Stone DJ, Zanjani H, Anderson CP, Morgan TE, et al. Estradiol (E2) enhances neurite outgrowth by repressing glial fibrillary acidic protein expression and reorganizing laminin. Endocrinology. 2002;143(2):636-46. [DOI: 10.1210/endo.143.2.8615] [PMID]