



اثر دمیالیناسیون عصبی بر تغییرات رفتاری، مورفومتریک و هیستولوژیک فورنیکس و هیپوکامپ موش صحرایی نر مدل موتیل اسکلروزیس

عارف نورایی: دانشجوی دکتری، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهیدچمران اهواز، اهواز، ایران
کاوه خزانیل: دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران (* نویسنده مسئول) K.khazaeil@scu.ac.ir
مرضیه درویشی: دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران
زهره قطب الدین: دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
زهرا بصیر: دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

چکیده

کلیدواژه‌ها

موتیل اسکلروزیس،
اختلال حافظه،
مورفومتري،
مورفولوژی

زمینه و هدف: موتیل اسکلروزیس، یک بیماری التهابی مزمن سیستم عصبی مرکزی است که یکی از عوارض ناشی از بیماری اختلالات شناختی است. از این رو هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر دمیالیناسیون عصبی بر تغییرات رفتاری، مورفومتریک و هیستولوژیک فورنیکس و هیپوکامپ موش صحرایی می باشد.

روش کار: در این مطالعه تجربی ۲۱ موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با وزن ۳۵۰-۳۰۰ گرم و محدوده سنی ۶ تا ۷ ماه استفاده شد. حیوانات به ۳ گروه، سالم، سالی و اتیدیوم بروماید تقسیم شدند. دمیالیناسیون با تزریق اتیدیوم بروماید در بطن‌های مغزی انجام و بررسی‌های رفتاری، مورفومتریک و هیستولوژیک انجام گرفت. اطلاعات به دست آمده از آزمون‌های فیزیولوژیک و وزن بدن توسط آنالیز وار یانس یک طرفه با اندازه گیری تکراری ارزیابی گردید. سایر به وسیله آنالیز وار یانس دوطرفه و آزمون‌های تکمیلی T-
test و TUKEY مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: آزمون تعادل، اختلال عملکردی و حرکتی در گروه آسیب دیده را نسبت به سایر گروه‌ها را نشان داد که از نظر آماری معنی دار بود ($P < 0.05$). نتایج حاصل از ماز آبی موریس نشان می‌دهد که گروه‌های سالم و سالی نسبت به گروه دمیالیناسیون در زمان کمتری سکو را یافتند ($P < 0.05$). رنگ آمیزی لوکسال فست بلو آ سیب میلیه شدید را در گروه اتیدیوم بروماید نشان داد و همچنین در رنگ آمیزی کرزیل ویوله افزایش (dark cell) در گروه دمیالیناسیون تایید شد ($P < 0.05$).

نتیجه گیری: دمیالیناسیون منجر به کاهش حجم هیپوکامپ و فورنیکس در مغز می‌گردد. همچنین باعث افزایش سلول‌های آسیب دیده در مغز می‌گردد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: حامی مالی ندارد.

شیوه استناد به این مقاله:

Nooraei A, Khazaeel K, Darvishi M, Ghotbeddin Z, Basir Z. The Effect of Neuronal Demyelination on Behavioral, Morphometric and Histological Changes of the fornix and Hippocampus of Male Multiple Sclerosis Rats. Razi J Med Sci. 2024(1 Jan);30.157.

Copyright: ©2024 The Author(s); Published by Iran University of Medical Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 4.0 صورت گرفته است.



Original Article

The Effect of Neuronal Demyelination on Behavioral, Morphometric and Histological Changes of the fornix and Hippocampus of Male Multiple Sclerosis Rats

Aref Nooraei: PhD Student , Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

Kaveh Khazaeel: Associate Professor , Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran (* Corresponding Author) K.khazaeil@scu.ac.ir

Marzieh Darvishi: Associate Professor ,Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

Zohreh Ghotbeddin: Associate , Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

Zahra Basir: Associate Professor , Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

Abstract

Background & Aims: Brain morphology using quantitative data is one of the most important research topics in neuroscience. There is little documentation about the anatomical changes in the demyelinated mouse brain. On the other hand, the differences between the changes applied due to demyelination in both genders have not been studied. Therefore, the present study was conducted with the aim of investigating the morphometric aspects of the brain of demyelinated male rats along with evaluating the changes in their behavioral patterns. Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune disease of the central nervous system (CNS) that affects different areas such as the brain, spinal cord, and optic nerve. The disease is characterized by active plaques containing cytokine-secreting T lymphocytes (1, 2). Nerve demyelination following acute CNS inflammation leads to neurological disability characterized by temporary remission and recurrence or a chronic advanced stage. One of the complications of the disease is cognitive disorders that have been reported in 40-60% of cases and occur in the early or even late stages of the disease (3, 4). MS-related cognitive impairment is often characterized by a relative decrease in neurophysiological function in assessing short-term memory processing speed, attention, spatial visual abilities, and executive function (5, 6). These disorders affect the course of life of individuals and are diagnosed in clinical evaluation to some extent imperceptibly but have not been studied morphometrically. So far, MRI findings have been used to examine the association between structural damage and cognitive impairment. Studies have shown that atrophy of various structures in the gray matter of the brain, such as the cerebral cortex, causes neurological disability (6, 7). Specifically, atrophy of some areas of the cortex, especially the hippocampus, is associated with dysfunction of the cognitive process in the early stages of the disease, while changes in white matter volume did not play a role in the development of these cognitive disorders (8, 9). In one study, imaging findings from patients with Parkinson's showed that the hippocampus and amygdala were atrophied, and this atrophy was concentrated in the cephalic areas of the hippocampus. This dementia has not been observed (10). Also, in patients with Alzheimer's disease, a decrease in the total volume of the fornix and mammals is directly related to cognitive disorders (11). On the other hand, in another study, the findings of people with brain trauma indicated that a reduction in the volume of the hippocampus, fornix and corpus callosum is also seen in the lesion-free group (12). The corpus callosum is the main structure of white matter in the brain that connects the right and left hemispheres. This structure is damaged in MS and its damage causes complex and cognitive disorders. Alon Kalron's findings also show that MS reduces the volume of the hippocampus, amygdala and thalamus. Findings of scientists such as Audoin, Wadhwa and Benear also show the role of hippocampus and fornix in memory and learning (13-15). Given that none of the studies has so far examined the relationship between the

Keywords

Multiple sclerosis,
Memory disorder,
Morphometry,
Morphology

Received: 05/08/2023

Published: 01/01/2024

histological and anatomical structure of the brain and its function, this study attempts to macroscopically, microscopically and horny areas of the hippocampus and fornix. Study a function in the male rat demelinase model.

Methods: This study was performed on 21 male rats weighing approximately 300-350 g in ShahidChamran Veterinary School of Ahvaz. First, in order to adapt the rats to the environment, they were kept at $23 \pm 23^\circ \text{C}$ for one week, and the dark-light cycle was maintained for 12 hours without water and food restrictions. All stages of the test were performed according to the instructions of the Committee on Ethics of Working with Laboratory Animals, Faculty of Veterinary Medicine, ShahidChamran University of Ahvaz (EE / 99.3.02.55591 / scu.ac.ir: Code of Ethics). The mice were then randomly divided into three groups of seven consisting of the first group: healthy, the second group: normal saline recipient and the third group: ethidium bromide recipient. For stereotaxic surgery and injection of ethidium bromide using a microinjector, mice were anesthetized with ketamine (80mg / kg) and xylazine (5mg / kg) and the hair on the skull was shaved and then in the midline of the head from the frontal to the oxy. The sagittal shear palate was created to determine the injection site according to the coordinates of the Paxinos atlas (anterior-posterior 0.46, internal-external 1 and dorsal-abdominal 2.2). In the final stage, injection of ethidium bromide 0.02% and normal saline at the rate of $20 \mu\text{l}$ was performed using a Hamilton syringe in the specified area in mice in the injury group and normal saline, respectively (16). Modified Neurological Severity Scores (MNSS) method was used to check balance. This test consists of several parts that are measured in the balance test of several parameters. Also, in order to investigate the type and manner of animal movement in ethidium bromide, normal saline and healthy rats, footprint test was used. Morris water maze test was used to check the level of spatial learning of the animal. At the end of the twelfth week, 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. After brain extraction, their length and width were measured using a digital caliper and their weight was measured using a digital scale. Then, the weight and volume of the hippocampus region were measured, and the demyelination and nerve cell survival indices in the brain tissue were measured using Siloxal Fast Blue and Cresyl Violet staining in the hippocampus and fornix.

Results: The results obtained from the balance test showed balance and motor dysfunction in the affected group, which was statistically significant ($P < 0.05$). The results of the Morris water maze test in 5 days (4 days of learning and one day of testing) show that the healthy and saline groups found the platform in less time than the demyelination group. On the other hand, the mean brain indices, The hippocampus and fornix were less in the injury group compared to the healthy and saline groups ($P < 0.05$). Fast blue lux staining also showed severe myelin damage in the ethidium bromide group and also increased the number of damaged nerve cells (dark cell) in curzil violet staining ($P < 0.05$).

Conclusion: Cerebral demyelination reduces the volume of the hippocampus and fornix in the brain of male rats and also increases the number of damaged cells in direct relation to memory loss and balance. These people can also develop cognitive and behavioral disorders that will negatively affect their daily lives.

Conflicts of interest: None

Funding: None

Cite this article as:

Nooraei A, Khzaeel K, Darvishi M, Ghotbeddin Z, Basir Z. The Effect of Neuronal Demyelination on Behavioral, Morphometric and Histological Changes of the fornix and Hippocampus of Male Multiple Sclerosis Rats. Razi J Med Sci. 2024(1 Jan);30.157.

Copyright: ©2024 The Author(s); Published by Iran University of Medical Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

***This work is published under CC BY-NC-SA 4.0 licence.**

مقدمه

مولتیپل اسکلروزیس (*Multiple Sclerosis-MS*)، یک بیماری خود ایمن مزمن سیستم عصبی مرکزی (CNS) است که نواحی مختلفی همچون مغز، نخاع و عصب بینایی را درگیر می کند. این بیماری با پلاک های فعال که حاوی لنفوسیت T ترشح کننده سیتوکین می باشد، شناسایی می گردد (۱ و ۲). دمیلینه شدن اعصاب به دنبال التهاب حاد CNS، منجر به بروز ناتوانی نورولوژیک می شود که با مراحل فروکشی موقت و عود یا یک مرحله پیشرفته مزمن مشخص می گردد. یکی از عوارض ناشی از بیماری، اختلالات شناختی است که در ۴۰-۶۰ موارد گزارش شده است و در مراحل ابتدایی و یا حتی انتهای بیماری بروز می کند (۳ و ۴). اختلال شناختی مرتبط با MS اغلب با کاهش نسبی عملکرد نوروفیزیولوژیک در ارزیابی سرعت پردازش حافظه کوتاه مدت، توجه، توانایی های بینایی فضایی و عملکرد اجرایی مشخص می شود (۵ و ۶). این اختلالات بر روند زندگی افراد موثر بوده و در ارزیابی بالینی تا حدودی به صورت نامحسوس تشخیص داده می شوند، ولی این بیماری تاکنون از لحاظ مورفومتریک مورد مطالعه چندانی قرار نگرفته اند. تاکنون از مطالعه یافته های MRI برای بررسی ارتباط بین آسیب ساختاری و اختلال شناختی استفاده شده است. مطالعات نشان داده که آتروفی ساختارهای مختلف ماده خاکستری مغز، همچون قشر مخ، باعث ناتوانی و نقص عصبی می شود (۶ و ۷). به طور اختصاصی آتروفی برخی از مناطق قشر مغز، به ویژه هیپوکامپ، با اختلال عملکرد روند شناختی در مراحل اولیه بیماری همراه است، این در حالی که تغییرات حجم ماده سفید نقشی در بروز این اختلالات شناختی نداشته است (۸ و ۹). در مطالعه ای که توسط بوچارد و همکاران در سال ۲۰۰۸ انجام شد، یافته های تصویربرداری بیماران مبتلا به پارکینسون نشان داد که نواحی هیپوکامپ و آمیگدال دچار آتروفی شده و این آتروفی در نواحی سفالیک هیپوکامپ متمرکز می باشد و مقایسه این داده ها با یافته های بالینی بیماران ارتباط آن بازوال مغزی را تایید کرد، ولی در آمیگدال این زوال عقلی مشاهده نشده است (۱۰). همچنین در بیماران مبتلا به آلزایمر کاهش حجم کلی فورنیکس و اجسام پستانی در ارتباط مستقیم با

اختلالات شناختی می باشد (۱۱). از طرفی در پژوهشی دیگر یافته های افراد مبتلا به ترومای مغزی حاکی از آن بود که کاهش حجم هیپوکامپ، فورنیکس و کارپوس کالوزوم در گروه بدون ضایعه هم دیده می شود (۱۲). کورپوس کالوزوم، ساختار اصلی ماده سفید در مغز می باشد که نیمکره های راست و چپ را به هم متصل می کند. این ساختار در بیماری MS آسیب دیده و آسیب آن باعث اختلالات کارهای پیچیده و شناختی می گردد (۱۳).

یافته های دانشمندانی چون آوودین و همکاران در سال ۲۰۰۷، وادهاو و همکاران در سال ۲۰۱۷ و همچنین سیندهوجا و همکاران در سال ۲۰۲۱ نیز نقش هیپوکامپ و فورنیکس را در حافظه و یادگیری نشان می دهد (۱۴-۱۶). بیماری MS اصلی ترین بیماری دمیلینه CNS، همچنین شایع ترین علت غیر تروماتیک ناتوانی نورولوژیک در افراد جوان و میان سال در جهان است. MS می تواند هر بخشی از CNS، اعصاب بینایی، ساقه مغز، مخچه و نخاع را درگیر کند. تخریب غلاف میلین نورون های عصبی، نه تنها بر کارکرد سیستم حسی و حرکتی اثر می گذارد، بلکه منجر به بروز نشانه ها و علائم آسیب شناختی نیز می شود. اختلال در دید، خستگی، اختلال عملکرد مثانه، اختلالات شناختی، تغییرات هیجانی، افسردگی، اضطراب و خنده و گریه پاتولوژی برخی از تظاهرات بالینی این بیماری به شمار می رود. MS یک بیماری هتروژن است بنابراین پاسخ به درمان در این افراد بسیار متفاوت است. فاکتورهای دخیل در این هتروژنیسیته کاملاً شناخته نشده اند، اما احتمالاً یک کمپلکس ژنتیکی که منجر به غیر نرمال بودن سیستم ایمنی می شود یا باعث افزایش حساسیت CNS به واسطه های التهابی شده و یا توانایی ترمیم آسیب ها را کاهش می دهد در این امر نقش دارد. با توجه به افزایش استرس و فشارهای اجتماعی کنونی و تاثیر مستقیم این عوامل بر بروز بیماری MS و همچنین از آنجایی که این بیماری قشر جوان و علل مخصوص جنس مونث را بیشتر درگیر می کند، امروزه MS تهدید جدی برای سلامت خانواده ها و اجتماع می باشد، بنابراین ضروری است به منظور افزایش سلامت اجتماع پژوهش های متعددی در زمینه شناخت بیشتر این بیماری انجام شود.

روش کار

حیوانات و گروه‌های آزمایش: این مطالعه تجربی

بر روی ۲۱ سر موش صحرایی نر با وزن تقریبی ۳۵۰-۳۰۰ گرم و محدوده سنی ۶ تا ۷ ماه در دانشکده دامپزشکی شهید چمران اهواز انجام شد. ابتدا به منظور سازگاری موش‌ها با محیط به مدت یک هفته در دمای 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد و چرخه تاریکی-روشنایی ۱۲ ساعت بدون محدودیت آب و غذا نگهداری شدند. تمام مراحل آزمون بر اساس دستورالعمل کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز (IR.ILAM.REC.1402.019) کد اخلاق انجام شد. سپس موش‌ها به طور تصادفی به ۳ گروه هفت تایی متشکل از گروه اول: سالم، گروه دوم: دریافت کننده نرمال سالین و گروه سوم: دریافت کننده اتیدیوم برو ما ید تقسیم گردید. به منظور جراحی استریوتاکس و تزریق اتیدیوم برو ما ید با استفاده از میکرواینجکتور، موش‌ها با کتامین (۸۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۵ گرم/کیلوگرم) بیهوش شدند و موهای ناحیه مجمه تراشیده شد و سپس در خط میانی سر از ناحیه فرونتال به سمت اکسیپیتال برشی ساژیتال جهت تعیین نقطه تزریق بر طبق مختصات اطلس پاکسینوس (قدامی- خلفی ۰/۴۶، داخلی خارجی ۱ و پشتی- شکمی ۲/۲) ایجاد گردید. در مرحله نهایی تزریق اتیدیوم برو ما ید ۰/۰۲٪ و نرمال سالین به میزان ۲۰ میکرولیتر با استفاده از سرنگ همیلتون در ناحیه مشخص شده در موش‌های گروه آسیب و نرمال سالین به ترتیب انجام شد (۱۷).

به منظور بررسی تعادل از روش Modified Neurological Severity Scores (MNSS) استفاده شد. این آزمون شامل چند قسمت می‌باشد که در آزمون تعادل چند پارامتر سنجیده می‌شود: امتیاز ۰: تعادل با حفظ موقعیت، امتیاز ۱: گرفتن لبه‌های Beam با چنگ، امتیاز ۲: آویزان شدن، امتیاز ۳: افتادن یک اندام، امتیاز ۴: آویزان شدن و افتادن دو اندام از Beam بیشتر از ۴۰ ثانیه، امتیاز ۵: آویزان شدن و افتادن دو اندام از Beam بیشتر از ۲۰ ثانیه و امتیاز ۶: عدم تعادل. این آزمون قبل از جراحی و در هفته‌های دوم، چهارم،

ششم، هشتم، دهم و دوازدهم مورد بررسی قرار گرفت (۱۸). همچنین به منظور بررسی نوع و شیوه حرکت حیوان در

موش‌های گروه اتیدیوم برو ما ید، نرمال سالین و سالم از آزمون ردپا استفاده شد. روش کار به این صورت می‌باشد که اندام‌های جلو و عقب (fore and hind paws) موش‌های صحرایی با رنگ‌های غیر سمی قهوه‌ای و سبز به ترتیب آغشته شد. سپس، حیوانات در طول مسیری که ۱۰۰ سانتی‌متر امتداد دارد و دارای ۲۰ سانتی‌متر عرض و ارتفاع است، راه رفتند. امتیاز آزمون footprint با تعیین ۴ پارامتر و اندازه‌گیری آن ثبت شد. این ۴ پارامتر شامل موارد زیر می‌باشد: Stride length (ST): میانگین فاصله بین هر قدم، Hind-base width (HBW): میانگین فاصله بین اندام عقب چپ و راست، Front-base width (FBW): میانگین فاصله بین اندام جلو چپ و راست و Overlap of front and hind footprint (OV): همپوشانی ردپای اندام عقب و جلو (۱۹).

جهت بررسی میزان یادگیری فضایی حیوان از آزمون مازآبی موریس استفاده شد. ماز آبی یک مخزن فلزی حلقوی بادیواره سبیه رنگ به قطر ۱۵۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۶۰ سانتی‌متر می‌باشد که با آب ۲۲ درجه سانتی‌گراد پر می‌شود. یک سکوی فلزی تیره قابل تغییر با قطر تقریبی ۱۰ سانتی‌متر در فاصله ۵ سانتی‌متری زیر سطح آب در مرکز یکی از چهار ربع دایره (شمال شرقی، جنوب شرقی، شمال غربی یا جنوب غربی) قرار داده می‌شود. آزمون در اتاق تاریک انجام می‌شود. حرکت و رفتار حیوان به وسیله یک دوربین تلویزیونی مادون قرمز که در بالای مخزن قرار گرفته ردیابی و کنترل می‌شود و حرکات حیوان ذخیره و آنالیز می‌گردد. در این حالت چند پارامتر سنجیده می‌شود: مدتی که طول می‌کشد تا حیوان سکو را پیدا کند، طول مسافت کل مسیرش، موش در هر بار آموزش، درصد زمانی که حیوان در هر ربع مخزن می‌گذراند و سرعت حرکت موش.

کل آزمون در پنج روز انجام شد که شامل چهار روز آموزش و یک روز آزمون بود. در روزهای آموزش، حیوان چهار بار در ماز آبی رها شد (که رهاسازی حیوان هر بار

از یک نقطه به صورت تصادفی انجام شد و در مورد آن این امر رعایت گردید که از هر ۴ نقطه A، B، C و D برای رهاسازی حیوان در هر روز استفاده گردد. در ابتدای آموزش حیوان به مدت ۱۵ ثانیه روز سکو قرار داده شد. سپس حیوان از استخر خارج شد و پس از یک دقیقه به صورت تصادفی و به انتخاب نرم افزار موش از یکی از چهار ربع به استخر منتقل گردید. حداکثر زمانی که حیوان جهت پیدا کردن سکو در اختیار دارد ۹۰ ثانیه می باشد. در صورتی که حیوان نتواند در طول این مدت سکو را پیدا کند حیوان به سمت سکو راهنمایی می گردد و اگر پیدا کند به او اجازه داده می شود که ۱۰ ثانیه روی سکو بماند. در پایان آموزش ها در هر روز حیوان خشک شد و به قفس منتقل می گردد. در روز پنجم سکو از داخل محفظه برداشته شد و حیوانات به استخر رها شدند و حرکات حیوان و مدت زمان سپری شده برای یافتن سکو ثبت گردید. این آزمایش با فرض اینکه حیوان محل سکو را به خاطر سپرده است طراحی شده و بر اساس آن باید بیشترین زمان و مسافت را در ربع محل قرارگیری سکو طی کند. به همین دلیل بعد از ۹۰ ثانیه حرکت حیوان زمان و مسافت طی شده در ربع محل قرارگیری سکو معیار و میزان سنجش حافظه خواهد بود (۱۸).

در انتهای هفته دوازدهم، گروه‌های مورد آزمایش با تزریق داخل صفاقی کتامین و زایلازین بیهوش شدند و پس از پرفیوژن (با محلول نرمال سالین و پارافرمالدهید ۴ درصد) سر حیوان جدا گردید و مغز بدون آسیب خارج شد. پس از استخراج مغز، طول و عرض آن‌ها با استفاده از کولیس دیجیتال و وزنشان با استفاده از ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد. سپس وزن و حجم ناحیه هیپوکامپ اندازه‌گیری و شاخص‌های دمیلیناسیون و بقای سلول عصبی در بافت مغز با استفاده از رنگ آمیزیلوکسال فسف بلو و کرزیل ویوله در هیپوکامپ و فورنیکس سنجیده شد (۲۰). برای تهیه محلول کرزیل ویوله ۹۹۰ میلی لیتر آب مقطر به دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد رسانده شد و سپس یک گرم پودر محلول کرزیل ویوله در آب مقطر حل شد. سپس اسید استیک ۱۰ درصد به آرامی به محلول به دست آمده اضافه شد.

به منظور ارزیابی اندازه ناحیه دمیلینه در گروه‌های مختلف مورد آزمون و مقایسه گروه‌ها با هم با استفاده از نرم افزار Image J نسخه ۱/۴۳ اندازه ناحیه صورتی رنگ (ناحیه دمیلینا سیون) ایجاد شده و اندازه کل برش مغز ثبت گردید و بر اساس فرمول زیر درصد Volume fraction تعیین گردید.

$$\text{Volume fraction} = 100 \times \frac{\text{damage tissue}}{\text{total tissue of brain}}$$

داده‌های جمع آوری شده به صورت توصیفی و تحلیلی با نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ مورد بررسی قرار گرفت. میانگین داده‌های جمع آوری شده \pm خطای استاندارد ارائه گردید. اطلاعات به دست آمده از آزمون‌های فیزیولوژیک و وزن بدن توسط آنالیز واریانس یک طرفه با اندازه‌گیری تکراری ارزیابی گردید. پارامترهای ماکروسکوپی و میکروسکوپی به وسیله آنالیز واریانس دوطرفه و آزمون‌های تکمیلی T-test و TUKEY مورد ارزیابی قرار گرفت. مقدار $P \leq 0.05$ به عنوان اختلاف معنی دار در نظر گرفته شد.

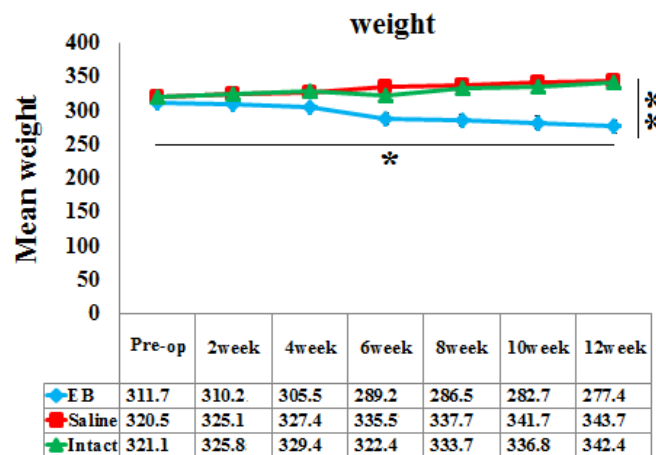
یافته‌ها

ندیده بودند، امتیاز Balance beam test نزدیک خط پایه می‌باشد و هیچ اختلال تعادلی و حرکتی در اندام این حیوانات مشاهده نشد. در صورتی که در گروه دریافت کننده اتیدیوم بروماید تا هفته دوازدهم افزایش پیشرونده امتیاز وجود دارد و این افزایش در مقایسه با هفته اول نیز معنی دار می‌باشد، بنابراین بین گروه‌های سالم و سالی‌ن با گروه دمیلیناسیون اختلاف معنی داری وجود دارد ($P < 0.001$) (شکل ۲).

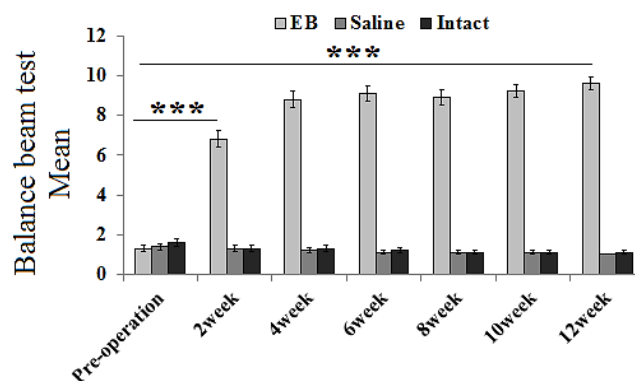
شکل ۳ داده‌های مربوط به آزمون ردپا را نشان می‌دهد و شاخص ST در گروه سالم و سالی‌ن از نظر آماری اختلاف معنی داری با هم ندارند و از لحاظ بررسی فیزیولوژیک دارای قدم‌های مستقیم، منظم و اندام عقب در تعادل با ردپای اندام جلو می‌باشد ($P > 0.05$). این وضعیت از هفته اول تا دوازدهم گزارش شده است و

میانگین وزن موش‌های صحرایی در گروه‌های مختلف آزمون در شکل ۱ آمده است. داده‌ها نشان می‌دهد در گروه سالم، وزن حیوان با افزایش سن افزایش می‌یابد و این افزایش در هفته دوازدهم نسبت به هفته اول معنی دار است ($P < 0.05$). در گروه دریافت کننده سالی‌ن نیز افزایش وزن از هفته اول تا آخر مشاهده گردید، ولی تفاوت معنی داری با گروه سالم دیده نشد. در گروه دریافت کننده اتیدیوم بروماید تا هفته ۴ تغییر وزنی مشاهده نشد، ولی در هفته هشتم و دوازدهم کاهش وزن دیده شد که این تفاوت از نظر آماری معنی دار می‌باشد ($P < 0.01$).

نتایج حاصل از Balance beam test نشان می‌دهد که در گروه سالم و گروه دریافت کننده سالی‌ن که آسیبی

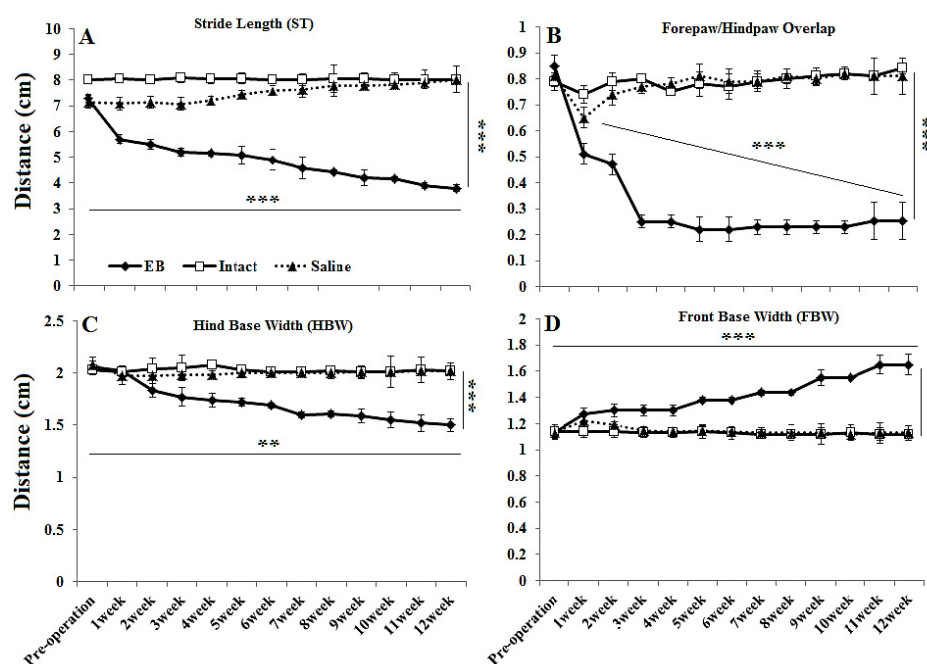


شکل ۱- نمودار خطی میانگین وزن گروه‌های مورد آزمون (EB: اتیدیوم بروماید، Saline: نرمالین سالی‌ن و intact: سالم). * نشان دهنده ($P < 0.05$) و ** ($P < 0.01$) است.



شکل ۲- آزمون تعادل (Balance beam test).

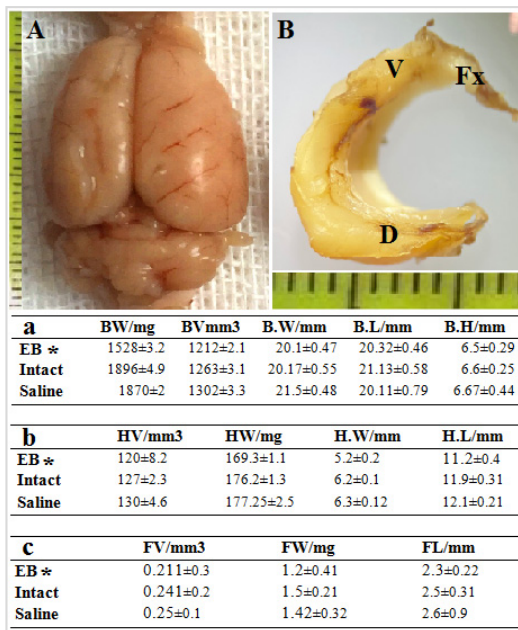
نمودار هیستوگرام از روند تغییرات تعادل در گروه‌های مورد آزمون (EB: اتیدیوم بروماید، Saline: نرمالین سالی‌ن و intact: سالم). *** ($P < 0.001$) است.



شکل ۳- آنالیز کمی الگوی footprint در گروه های مورد آزمون بر اساس محاسبه stride length (ST), Overlap (OV), front base width (FBW) و hind base width (HBW). مقادیر نشان دهنده $\text{means} \pm \text{SEM}$ می باشد. (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

آمده نشان داد که از هفته دوم تا هفته دوازدهم شاخص FBW افزایش داشته است و این افزایش از هفته اول تا دوازدهم در هر دو گروه از لحاظ آماری معنی دار می باشد ($P \leq 0.01$). (شکل D۳). شکل C۳ نشان دهنده شاخص HBW در گروه های آزمون می باشد. در هفته دوازدهم یافته های به دست آمده از میانگین HBW نشان داد که در توافق با سایر شاخص های الگوی حرکتی، گروه های سالم و سالیین از نظر آماری اختلاف معنی داری با هم ندارند ($P > 0.05$). این در حالی است که در گروه آسیب کاهش شاخص HBW وجود دارد ($P \leq 0.05$). در شکل ۴ با توجه به آنالیز داده های زمان، میانگین زمان سپری شده برای رسیدن به سکو در آزمون ماز آبی موریس، در گروه های سالم و سالیین از روز دوم تا روز ششم کاهش معنی داری را نشان می دهد. در گروه های آسیب دیده نیز از روز دوم تا ششم این کاهش مشاهده شد و این اختلاف از نظر آماری معنی دار می باشد ($P \leq 0.01$).

نمودار به دست آمده از مقادیر ST به صورت صاف می باشد (شکل A۳). در گروه آسیب دیده داده های به دست آمده نشان داد که اختلاف معنی داری بین این گروه و گروه سالم وجود دارد ($P \leq 0.01$) و نمودار به دست آمده کاهش ST را در هفته های سوم تا دوازدهم بیان می کند. بررسی فیزیولوژیک موش ها قدم های نامنظم، کوتاه، با لرزش و عدم قرار گیری در خط مستقیم را نشان می دهد. در بررسی پارامتر تفاوت معنی دار بین ۲ گروه سالم و سالیین می باشد ($P < 0.03$). این در حالی است که در گروه آسیب افزایش معنی دار OV نسبت به دو گروه دیگر مشاهده شد ($P \leq 0.05$). علاوه بر آن این روند افزایشی در گروه های آسیب نسبت به گروه سالم ادامه دارد که به صورت معنی دار می باشد ($P < 0.01$). (شکل B۳). در مورد شاخص FBW نیز یافته ها نشان داد که گروه سالم و سالیین از نظر آماری اختلاف معنی داری با هم ندارند ($P > 0.05$). در گروه های آسیب دیده داده های به دست

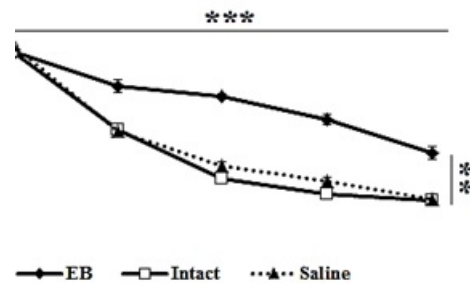


شکل ۶- داده‌های حاصل از اندازه‌گیری ماکرو سکوی مغز، هیپوکامپ و فورنیکس.

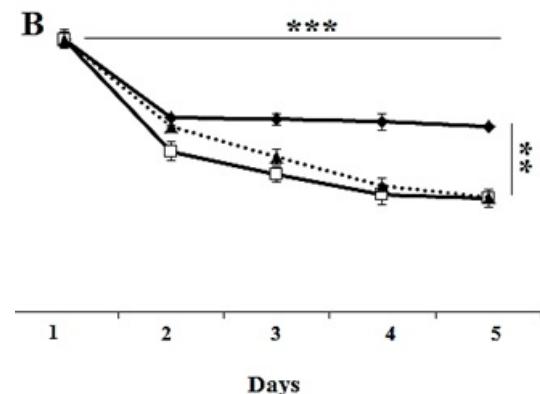
* تغییرات عددی را نسبت به دو گروه سالم و سالیین نشان می‌دهد. V: وترال هیپوکامپ، D: دورسال هیپوکامپ و Fx: فورنیکس می‌باشد.

(Brain weight-BW، length-BL و Brain height-BH) در سه گروه مورد آزمون می‌باشد. علاوه بر آن حجم، وزن و طول هیپوکامپ (به ترتیب HV hippocampus، volume-hippocampus، weight-HW، hippocampus length-HL) ثبت شده است که داده‌ها حاکی از کاهش تمامی شاخص‌های مغزی در گروه آسیب را دارد که این کاهش از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد و در انتها حجم، وزن و طول فورنیکس (به ترتیب Fornix weight-FW، Fornix volume-FV و length-FL) تعیین گردید.

شکل ۷ تصویر برش‌های بافتی رنگ آمیزی شده با لوکسال فسف بلو و کرزیل ویوله را نشان می‌دهد. همان‌طور که در تصویر مشخص است در گره آسیب نواحی دمیلیناسیون به رنگ قرمز قابل مشاهده می‌باشد و در رنگ آمیزی کرزیل ویوله سلول‌های پیکنوز و dark cell به تعداد زیاد در ناحیه هیپوکامپ قابل مشاهده می‌باشد، ولی در دو گروه سالم سالیین تفاوت معنی‌داری دیده نشد.



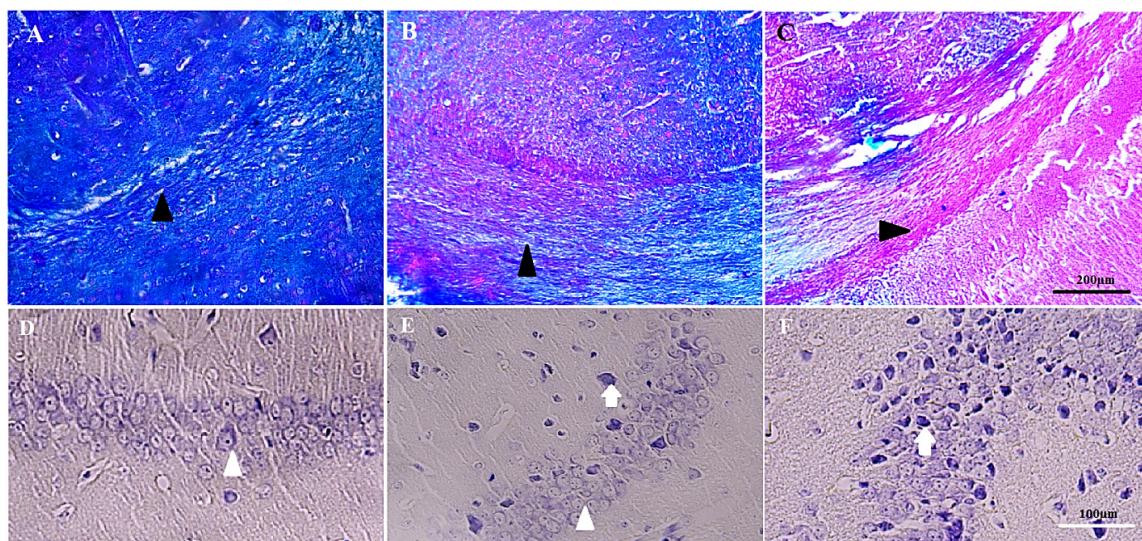
شکل ۴- نتایج آزمون ماز آبی موریس در طی ۶ روز آموزش بین گروه‌های سالیین و MS را نشان می‌دهد (مقادیر نشان دهنده Means± SEM، $P \leq 0.01$ ، $P \leq 0.001$). آزمون آماری ANOVA Repeated measure



شکل ۵- نتایج آزمون ماز آبی موریس در طی ۵ روز آموزش و آزمون بین گروه‌های سالم، سالیین و آسیب دیده نشان می‌دهد. مقادیر نشان دهنده means± SEM ($P < 0.01$ ، $P < 0.001$)

در شکل ۵، با توجه به آنالیز داده‌های مسافت، میانگین مسافت سپری شده برای رسیدن به سکو در گروه‌های MS از روز اول تا روز ششم افزایش معنی‌داری را با گروه‌های سالیین و ماده نشان داد که این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود ($P \leq 0.01$). در مقایسه بین گروه‌های MS بررسی بین دو جنس تفاوت معنی‌داری را نشان نداد.

شکل ۶ یافته‌های حاصل از اندازه‌گیری حجم مغز (Brain volume-BV)، وزن مغز (Brain weight-BW)، همچنین طول، عرض و ارتفاع مغز (به ترتیب Brain



شکل ۷- برش‌های رنگ آمیزی شده کورپوس کالازوم با لوکسال فست بلو در گروه‌های مورد آزمون (مثلث سیاه نشان دهنده آکسون‌ها می‌باشد که در تصاویر A و B میلین به رنگ آبی قابل مشاهده است و در C از بین رفتن غلاف میلین و به رنگ قرمز دیده می‌شود. تصاویر E, D و F نیز رنگ آمیزی کرزبل و بوله را نشان می‌دهد که مثلث سفید نورون‌ها را نشان می‌دهد و پیکان سفید dark cell را نشان می‌دهد).

بحث

اختلالات حافظه و رفتاری می‌شود (۲۱، ۲۲). مطالعه حاضر نشان داد که آسیب به سیستم لیمبیک حافظه و یادگیری را دچار اختلال می‌کند. در آزمون ماز آبی موریس نیز القا MS سبب افزایش زمان سپری شده برای رسیدن به سکو شد. در مطالعه بودبرگ و همکاران در سال ۲۰۰۴ که با ایجاد آنسفالومیلیت خود ایمنی تجربی (Experimental Autoimmune -EAE Encephalomyelitis) به بررسی طیف وسیعی از آزمون‌های رفتاری پرداختند، در آزمون ردپا نشان داده شد در موش‌های مبتلا عملکرد اصلی حرکتی اندام عقبی و جنبه‌های خاص‌تر به مانند حرکات دقیق تعادل و رانش تحت تاثیر قرار می‌گیرد. در موش‌های مبتلا به MS به دلیل عدم تعادل ناشی از آسیب مغزی و به دنبال آن آسیب به هیپوکامپ و فورنیکس موش‌ها جهت حفظ تعادل در هنگام راه رفتن پاهای عقب را به هم نزدیک می‌کردند که به همین علت اندام حرکتی عقبی دچار اختلال حرکتی شد، (۲۳). در مطالعه مدیحا و همکاران در سال ۲۰۱۷ در بررسی ردپا نشان داده شد در موش‌های صحرائی تزریق شده با رتنون، الگوی راه رفتن در مقایسه با گروه شاهد کاملاً مختل شده که با کوتاه شدن طول قدم‌ها این اختلال کاملاً مشهود بود.

اختلالات شناختی در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس بسیار شایع است و در حدود ۶۰٪ تخمین زده شده است که می‌تواند بر روی زندگی افراد مبتلا تاثیرات منفی بگذارد (۲۰). جهت القا MS در این تحقیق از اتیدیوم بروماید استفاده شد. این مطالعه در ۳ بخش رفتاری، بررسی‌های مورفومتریک و هیستولوژیک انجام شد. در مطالعه حاضر نشان داده شد که ایجاد مولتیپل اسکلروزیس در موش‌ها منجر به ضایعات التهابی مشخص و نقص در عملکرد می‌شود. در بین گروه‌های موجود گروه دمیلینه از لحاظ رفتاری نسبت به گروه سالم و گروه سالین دارای تغییرات حافظه، عدم تعادل، اختلالات حرکتی و عدم تطابق گام‌های جلو و عقب بود. القا مولتیپل اسکلروزیس در این تحقیق باعث مختل شدن راه رفتن و عدم تعادل گروه مبتلا به MS در آزمون ردپا شد. نقایص شناختی یکی از مهم‌ترین تعیین‌کننده‌های کیفیت زندگی مبتلایان به MS محسوب می‌شود (۲۰). توافق گسترده‌ای وجود دارد که حافظه و رفتار به سلامت هیپوکامپ بستگی دارد؛ به طوری که مطالعات متعددی نشان داده است که آسیب به هیپوکامپ منجر به

های گلیال، نورون ها و آکسون ها به دلیل دمیلیناسیون التهابی و تخریب عصبی) و یا تغییر در اجزای غیر بافتی رخ دهد (۲۹). در افراد مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس به دلیل آتروفی مغزی، بار پلاک و همچنین تراکم آکسونی (از دست دادن آکسون) می توان کاهش وزن در مغز را مشاهده کرد (۳۰).

در پژوهشی دیگر مشخص شد که در ترومای مغزی بدون ضایعات نورورادیولوژیک کاهش حجم در کارپوس کالوزوم، هیپوکامپ و فورنیکس رخ می دهد که به دنبال این کاهش اختلالات عصبی و عملکردی حافظه نیز دیده شد (۲۰). در بررسی موش های تراریخته مبتلا به آلزایمر نشان داده شد طول کارپوس کالوزوم و فورنیکس و همچنین حجم هیپوکامپ کاهش پیدا کرد که نشان دهنده قطع ارتباط نیمکره های مغزی و هیپوکامپ است که ممکن است سبب ناهنجاری های رفتاری شود (۳۱). علی حیدری و همکاران نشان دادند میانگین وزن مغز در جنین های ۱۵ و ۲۰ روزه و زاده های ۳۰ روزه گروه هیپوکسی به طور معنی داری

پایین تر از گروه شاهد بود که نتایج ارزیابی حافظه، بیانگر کاهش معنی دار حافظه احترازی در گروه هیپوکسی در مقایسه با گروه شاهد بود (۳۲). در مطالعه حاضر در رابطه با شاخص های هیستولوژی رنگ آمیزی لوکسال فست بلو و کریزل ویوله نشان داد دمیلینه شدن در کارپوس کالوزوم افزایش یافته است که هم راستا با این مطالعه است و نشان داده شده است که مولتیپل اسکلروزیس ایجاد شده با کوپریزون در موش صحرایی باعث افزایش تخریب میلین و کاهش الیگودندروسیت ها در کارپوس کالوزوم شده است (۳۳). در مطالعه شیرازی و همکاران تحت عنوان "بررسی فاکتورهای نوروتروفیک در مدل حیوانی تخریب میلین القاء شده با کوپریزون در موش" نشان داده شد در رنگ آمیزی لوکسال فست بلو، جسم پینه ای در موش های MS القا شده با کوپریزون ادم و پلاک های دمیلینه مشاهده شد که در گروه شاهد هیچ گونه دمیلینه شدن دیده نشد (۳۴). در مطالعات پیشین نشان داده شده کارپوس کالوزوم به عنوان رابط دونیمکره مغز عمل می کند و می تواند به نقل و انتقال اطلاعات به بیرون

همچنین از طرفی اختلال در راه رفتن با افزایش قابل ملاحظه عرضی پای عقب و افزایش همپوشانی راست کاملاً مشخص شد (۲۴) که نتایج مطالعات فوق هم راستا با نتایج مطالعه حاضر بودند. حافظه و یادگیری، اساس پردازش اطلاعات است و از آنجایی که پردازش اطلاعات پایه روند تصمیم گیری، شناسایی محرک و برنامه ریزی پاسخ که مقدمه ای برای آغاز حرکت است، محسوب می شود. عوامل مؤثر بر آن و در پی آن عملکرد حرکتی ناشی از آن نیز حائز اهمیت اند. هیپوکامپ نقش بسیار مهمی در پردازش و به خاطر آوردن اطلاعات حافظه و جهت یابی ایفا می کند (۲۵). در مطالعه ای دیگر که کورکوسکا و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام دادند در بررسی آزمون ماز آبی موریس در بین دو گروه کنترل و (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis) نتایج نشان داد که هر دو گروه در پیدان کردن بستر پنهان در طول آزمایش تفاوت چندانی نداشتند و همه حیوانات الگوی یادگیری معمولی را نشان دادند که مخالف با نتایج مطالعه حاضر است (۲۶). در سال ۲۰۱۷، وانگ و همکاران با مطالعه بر روی چهار گروه موش شامل گروه شم، ایسکمی، گروه ایسکمی دریافت کننده ۲۵ میلی گرم برگیلوگرم لوودوپا و گروه ایسکمی و دریافت کننده ۵۰ میلی گرم بر کیلو گرم لوودوپا نشان دادند که در آزمون رفتاری ماز آبی موریس هرچند لوودوپا می تواند سبب بهبود مسیر حرکت شنا شود، ولی فقط در گروه شم مسیر شنا به صورت منظم بود ولی در سایر گروه ها مسیر شنا بی نظمیهایی همراه بود (۲۷). بررسی های مورفومتریک نشان داد که که آسیب به مغز باعث کاهش حجم، وزن، طول و سایر پارامترهای آناتومیکی در مغز می شود. در یک مطالعه تحت عنوان بررسی رابطه شدت اختلالات حرکتی با اندازه های پونز و کورپوسکالوزوم در ام.آر.ای کودکان مبتلا به لکومالاسی اطراف بطنی نشان داده شد طول کارپوس کالوزوم در گروه لکومالاسی به طور معنی داری بسیار کمتر از گروه کنترل بود (۲۸). در بیماری MS کاهش حجم مغز مشاهده می شود که این کاهش حجم می تواند به دلیل از دست دادن بافت (از دست دادن میلین، سلول

Gabriely G, Bien CG, et al. The compartmentalized inflammatory response in the multiple sclerosis brain is composed of tissue-resident CD8+ T lymphocytes and B cells. *Brain*. 2018 Jul; 141(7): 2066–2082.

2. Höftberger R, Lassmann H. Inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system. *Handb Clin Neurol*. 2018; 145: 263–283.

3. Sugijono SE, Mulyadi R, Firdausia S, Prihartono J, Estiasari R. Corpus callosum index correlates with brain volumetry and disability in multiple sclerosis patients. *Neurosciences (Riyadh)*. 2020 Jul;25(3):193–199.

4. Cañellas A, Rovira, Gols AR, Izquierdo JR, Subirana MT, Gairin XM. Idiopathic inflammatory-demyelinating diseases of the central nervous system. *Neuroradiology*. 2007;49:393-409.

5. Buonvicino D, Ranieri G, Pratesi S, Gerace E, Muzzi M, Guasti D, et al. Neuroprotection induced by dexpropamipexole delays disease progression in a mouse model of progressive multiple sclerosis. *Br J Pharmacol*. 2020 Jul;177(14):3342–3356.

6. Marciniwicz E, Pokryszko-Dragan A, Podgórski P, Małyszczak K, Zimny A, Kołtowska A, et al. Quantitative magnetic resonance assessment of brain atrophy related to selected aspects of disability in patients with multiple sclerosis: preliminary results. *Pol J Radiol*. 2019;84:e171–e178.

7. Chu R, Kim G, Tauhid S, Khalid F, Healy BC, et al. Whole brain and deep gray matter atrophy detection over 5 years with 3T MRI in multiple sclerosis. using a variety of automated segmentation pipelines. *PLoS One*. 2018; 13(11): e0206939.

8. Pitteri M, Boscolo Galazzo I, Brusini L, Cruciani F, Dapor C, et al. Microstructural MRI Correlates of Cognitive Impairment in Multiple Sclerosis: The Role of Deep Gray Matter. *Diagnostics (Basel)*. 2021 Jun; 11(6): 1103.

9. Kiljan S, Preziosa P, Jonkman LE, van de Berg WDJ, Twisk J, et al. Cortical axonal loss is associated with both gray matter demyelination and white matter tract pathology in progressive multiple sclerosis: Evidence from a combined MRI-histopathology study. *Mult Scler*. 2021 Mar;27(3):380–390.

10. Bouchard TP, Malykhin N, Martin WW, Hanstock CC, Emery DJ, et al. Age and dementia-associated atrophy predominates in the hippocampal head and amygdala in Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2008;29(7):1027-1039.

11. Copenhaver BR, Rabin LA, Saykin AJ, Roth RM, Wishart HA, Flashman LA, et al. The fornix and mammillary bodies in older adults with Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, and cognitive complaints: a volumetric MRI study. *Psychiatry Research: Neuroimaging*. 2006;147(2-3), 93-103.

12. Lakaye B, Foidart A, Grisar T, Balthazart J.

کمک کند و از طرفی می تواند در فرایند شناختی دخیل باشد. بنابراین تخریب این ناحیه می تواند سبب اختلالات شناختی و رفتاری شود (۲۹). در مطالعه ویگ و بیلکی در سال ۱۹۹۵ نشان داده شد که ضایعات فیمبریا-فورنیکس به تنهایی باعث ایجاد اختلال حافظه متوسط می شود که با عملکرد در کار NeuroMuscular Stabilization اندازه گیری می شود (۳۵).

نتایج مطالعه مورفومتریک و آنالیز رفتاری اثر دمیالیناسیون بر ساختارهای مغزی در مدل مولتیپل اسکلروزیس القا شده با اتیدیوم بروماید موش صحرایی نر نشان داد که القای MS سبب تغییرات بافتی مغز در نواحی هیپوکامپ و کورپوس کالوزوم می گردد. این تغییرات همراه با مرگ سلولی، تخریب آکسون و میلین، القاء گلیوزیس و به دنبال آن کاهش حجم و وزن مغز و هیپوکامپ می باشد. یافته های رفتاری نشان می دهد که اختلالات بافتی و مورفومتریک منجر به آسیب های شناختی و حافظه و همچنین اختلالات حرکتی و تعادل می گردد. این تغییرات ساختاری در آناتومی مغز موش صحرایی که مبین تغییرات بافت شناسی و هم راستا با عملکرد رفتاری آن می باشد، می تواند مسیر جدیدی جهت تشخیص سریع تر و پیشگیری از بروز علائم ناتوان کننده داشته باشد.

نتیجه گیری

دمیالیناسیون مغزی منجر به کاهش حجم هیپوکامپ و فورنیکس در مغز موش صحرایی نر و همچنین باعث افزایش سلول های آسیب دیده در ارتباط مستقیم با کاهش حافظه و تعادل می گردد. در بیماران مبتلا به MS چون نواحی هیپوکامپ و فورنیکس دچار آسیب می شوند، بنابراین این افراد می توانند به اختلالات شناختی و رفتاری نیز دچار شوند که تاثیر منفی بر زندگی روزمره آنها خواهد گذاشت.

References

1. Etsuji Saji S, Tröscher AR, Paunovic M, Liblau R,

Partial cloning and distribution of estrogen receptor beta in the avian brain. *Neuroreport*. 1998;9:2743-48.

13. Chen Q, Hattori T, Tomisato H, Ohara M, Hirata K, Yokota T. Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative.. Turning and multitask gait unmask gait disturbance in mild-to-moderate multiple sclerosis: Underlying specific cortical thinning and connecting fibers damage. *Hum Brain Map*. 2023;44(3):1193-1208.

14. Wadhwa M, Prabhakar A, Ray K, Roy K, Kumari P, Jha PK, et al . Inhibiting the microglia activation improves the spatial memory and adult neurogenesis in rat hippocampus during 48 h of sleep deprivation. *J Neuroinflamm*. 2017;14(1):1-18.

15. Audoin B, Guye M, Reuter F, AuDuong MV, Confort-Gouny S, Malikova I, et al. Structure of WM bundles constituting the working memory system in early multiple sclerosis: a quantitative DTI tractography study. *Neuroimage*. 2007;36(4):1324-30

16. Govindarajan ST, Pan R, Krupp L, Charvet L, Duong TQ. Gray Matter Morphometry Correlates with Attentional Efficiency in Young-Adult Multiple Sclerosis. *Brain Sci*. 2021;11(1):80.

17. Levine JM, Reynolds R. Activation and proliferation of endogenous oligodendrocyte precursor cells during ethidium bromide-induced demyelination. *Experim Neurol*. 1999;160(2):333-347.

18. Sohaili S, Moayeri A, Darvishi M, Abbasi. N Repair Effects of Depakene on Neuropathological Changes in Cuprizone Model of Demyelination. *eIJPPR*. 2021;2010(10):5.

19. Vorhees C, Williams M. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc*. 2006;1:848–858.

20. Ziehn MO, Avedisian AA, Dervin SM, Umeda EA, O'Dell TJ, et al. Therapeutic testosterone administration preserves excitatory synaptic transmission in the hippocampus during autoimmune demyelinating disease. *J Neurosci*. 2012;32(36):12312-12324.

21. He J, Yamada K, Nakajima A, Kamei H, Nabeshima T. Learning and memory in two different reward tasks in a radial arm maze in rats. *Behav Brain Res*. 2002;134(1-2):139-148.

22. Macías Islas MÁ, Ciampi E. Assessment and impact of cognitive impairment in multiple sclerosis: an overview. *Biomedicines*. 2019;7(1):22.

23. DeTure MA, Dickson DW. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2019;14(1):1-18

24. Moosavi M, Naghdi N, Maghsoudi N, Asl SZ. The effect of intrahippocampal insulin microinjection on spatial learning and memory. *Hormones Behav*. 2006;50(5):748-752.

25. Kurkowska-Jastrzębska I, Świątkiewicz M,

Zaremba M, Cudna A, Piechal A, Pyrzanowska J, et al . Neurodegeneration and inflammation in hippocampus in experimental autoimmune encephalomyelitis induced in rats by one-time administration of encephalitogenic T cells. *Neuroscience*. 2013;248:690-698.

26. Wang W, Liu L, Jiang P, Chen C, Zhang T. Levodopa improves learning and memory ability on global cerebral ischemia-reperfusion injured rats in the Morris water maze test. *Neuroscience Lett*. 2017;636:233-240.

27. Shevil E, Finlayson M. Pilot study of a cognitive intervention program for persons with multiple sclerosis. *Health Educ Res*. 2010;25(1):41-53.

28. De Stefano N, Stromillo ML, Giorgio A, Bartolozzi ML, Battaglini M, Baldini M, et al. Establishing pathological cut-offs of brain atrophy rates in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016;87(1):93-99.

29. DeLuca GC, Williams K, Evangelou N, Ebers GC, et al The contribution of demyelination to axonal loss in multiple sclerosis. *Brain*. 2006;129(6):1507-1516.

30. Buddeberg BS, Kerschensteiner M, Merkler D, Stadelmann C, Schwab ME. Behavioral testing strategies in a localized animal model of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2004;153(1-2):158-170

31. Aliheydari M, Ghotbeddin Z, Khazaeil K, Tabandeh MR. Effect of fish oil treatment during chronic hypoxia in pregnancy on memory impairment, brain morphometry changes and oxidative stress in adult male rat offspring. *Feyz*. 2020;24(2):170-80.

32. Shevil E, Finlayson M. Pilot study of a cognitive intervention program for persons with multiple sclerosis. *Health Educ Res*. 2010;25(1):41-53.

33. 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. *ShefayeKhatam*. 2016;4(2):47-54

34. Wiig KA, Bilkey D K. Lesions of rat perirhinal cortex exacerbate the memory deficit observed following damage to the fimbria-fornix. *Behav Neurosci*. 1995;109(4):620–630