

بررسی تجویز توام ویتامین‌های E و D3 بر یادگیری و حافظه فضایی در تشکیلات هیپوکمپ موش صحرائی به دنبال دمی‌لیناسیون ناشی از اتیدیوم بروماید

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۵/۴؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۶/۱۹

چکیده

مهدی گودرزوند^{۱*}، سمیرا چوپانی^۲
ناصر نقدی^۲، زهره خدایی^۲

^۱ دکترای تخصصی فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، ایران
^۲ کارشناسی ارشد فیزیولوژی و فارماکولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
^۳ دکترای تخصصی فیزیولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
^۴ دکترای تخصصی تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی البرز، ایران

* نویسنده مسئول: دکترای تخصصی فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، ایران

۰۲۶-۳۴۳۳۶۰۰۷

E-mail: ml18medical@yahoo.com

زمینه و هدف: هیپوکمپ به عنوان بخشی از سیستم لیمبیک دارای نقش اساسی در شکل‌گیری چندین نوع حافظه از جمله حافظه فضایی می‌باشد. گزارش‌های متعددی از اختلالات شناختی و حافظه در بیماران مولتیپل اسکلروزیس (ام‌اس) و نقش‌های آنتی‌اکسیدانی و بازسازی عصبی ویتامین‌های E و D3 منتشر شده است. هدف این مطالعه بررسی تأثیر تجویز توام ویتامین‌های E و D3 بر یادگیری و حافظه فضایی در تشکیلات هیپوکمپ موش صحرائی به دنبال دمی‌لیناسیون ناشی از اتیدیوم بروماید می‌باشد.

مواد و روش‌ها: موش‌های نر نژاد ویستار با تزریق داخل صفاقی کلرات هیدرات بی‌هوش شدند. سر حیوان در دستگاه استریوتاکسی ثابت گردید و ۳ میکرولیتر اتیدیوم بروماید در داخل ژيروس دنداندار هیپوکمپ تزریق شد. آزمایش‌های رفتاری پس از تجویز توام داخل صفاقی ویتامین‌های E (۱۰۰ mg/kg) و D3 (۵ μg/kg) برای ۷ روز انجام شد. و از دستورالعمل ۵ روزه ماز آبی موریس استفاده شد. بدین صورت که ۴ روز با سکوی پنهان برای ارزیابی یادگیری و حافظه فضایی و روز پنجم با سکوی آشکار برای ارزیابی هماهنگی حسی حرکتی.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز توام ویتامین‌های E و D3 موجب کاهش معنادار مسافت طی شده برای رسیدن حیوان به سکو نسبت به گروه ضایعه شد در صورتی که شاخص‌های تاخیر زمانی برای یافتن سکو و سرعت شنای حیوان نسبت به گروه ضایعه اختلاف معناداری را نشان نداد.

نتیجه‌گیری: بنابراین تجویز ویتامین‌ها احتمالاً از طریق حفاظت عصبی موجب افزایش اندکی در یادگیری و حافظه فضایی می‌گردد.

کلمات کلیدی: مولتیپل اسکلروزیس، یادگیری، ویتامین E، ویتامین D3، حافظه فضایی

مقدمه

بیماری MS یکی از شایع‌ترین بیماری‌های عصبی در انسان است که با فراوانی قابل توجهی در اوایل بزرگسالی بروز می‌کند (در زنان دو تا سه برابر مردان) و مهم‌ترین علائم آن عبارتند از: فلج، فقدان حس، خستگی، نقایص شناختی و اختلالات بینایی. این بیماری دمی‌لینه کننده و التهابی مزمن، در اثر فعالیت سیستم ایمنی باعث التهاب بافتی و مرگ سلول‌های عصبی می‌گردد. یکی از عوارض بیماری MS دمی‌لیناسیون است که پس از بروز آن، مقداری رمی‌لیناسیون خودبخودی نیز مشاهده می‌شود.^۱

دمی‌لیناسیون ناشی از مواد شیمیایی مدل مناسبی جهت بررسی تغییرات سلولی است که در بیماری‌های دمی‌لینه کننده مانند MS اتفاق می‌افتد. تزریق مستقیم اتیدیوم بروماید مدل ساده و قابل تکراری است که با آن می‌توان فرآیندهای دمی‌لیناسیون، رمی‌لیناسیون و ترمیم عصبی را بررسی کرد.^۲ آسیب الیگودندروسیتی ناشی از اتیدیوم بروماید موجب یک دمی‌لیناسیون اولیه در محل تزریق می‌گردد،^۳ در واقع اتیدیوم بروماید موجب مرگ سلولی می‌گردد.^۴ هیپوکمپ مرکز اصلی یادگیری و حافظه در CNS می‌باشد. این محل به بیماری‌های نورولوژیک و ایسکمی بسیار حساس و

محورهای دستگاه استریوتاکسی در سه جهت فضایی تنظیم و حیوان در دستگاه استریوتاکسی قرار گرفت. موهای پشت سر حیوان با یک قیچی، کوتاه و پوست ناحیه توسط پنبه آغشته به الکل ۷۰٪ تمیز و سپس یک برش طولی ۱/۵ سانتیمتری در پوست جمجمه (از حد فاصل دو چشم تا برآمدگی استخوان پس سری) با استفاده از تیغ بیستوری ایجاد گردید. عضلات و بافت های روی جمجمه کاملاً برداشته و سطح استخوان تمیز و خشک تا محل درزها (برگما، لامبدا و ساجیتال) نمایان گردید. مختصات ژيروس دنداندار بر اساس نقشه توپوگرافی اطلس پاکسینوس و واتسون نسبت به برگما تعیین و علامت گذاری شد. سپس سوراخی به قطر ۱/۵mm توسط مته دندانپزشکی در آن نقطه ایجاد گردید، پرده سخت شامه با نوک سوزن برداشته و یک نوبت تزریق اتیدیوم بروماید با استفاده از سرنگ همپلتون در ژيروس دنداندار صورت گرفت. پس از جراحی هر موش بطور انفرادی در قفس نگهداری شد. آزمایش های رفتاری پس از تجویز داخل صفاقی ویتامین های E (۱۰۰ mg/kg) و D3 (۵µg/kg) و حلال دارو به صورت توام برای ۷ روز انجام شد. از دستور العمل ۵ روزه ی ماز آبی مورس استفاده شد. بدین صورت که ۴ روز با سکوی پنهان برای ارزیابی یادگیری و حافظه ی فضایی و روز پنجم با سکوی آشکار برای ارزیابی هماهنگی حسی حرکتی.

بررسی یادگیری و حافظه فضایی در ماز آبی مورس

ماز آبی مورس حوضچه ای گرد و سیاه با قطر ۱۳۶ cm و ارتفاع ۶۰ cm بود که تا ارتفاع ۲۵ cm با آب $20 \pm 1^\circ\text{C}$ پر می شود. ماز در اتاقی قرار دارد که در اطراف آن علائم و نشانه های خارج مازی (مثل ساعت، پنجره، پوستر، قفسه و چراغ) وجود دارد و از نظر جغرافیایی بطور فرضی به چهار ربع دایره با فواصل برابر از هم تقسیم می شود. یک سکوی گرد از جنس پلکسی گلاس به قطر ۱۰ cm در مرکز یکی از ربع ها دایره و یک سانتیمتر زیر سطح آب قرار می گیرد. یک دیود ساطع کننده نور مادون قرمز که توسط یک نوار کشی به پشت حیوان وصل می شود و یک دوربین ویدیویی که در بالای حوضچه نصب شده نور مادون قرمز را ردیابی می کند. در نهایت، سیگنال ها به کامپیوتر منتقل و توسط سیستم نرم افزاری تحلیل می گردد.

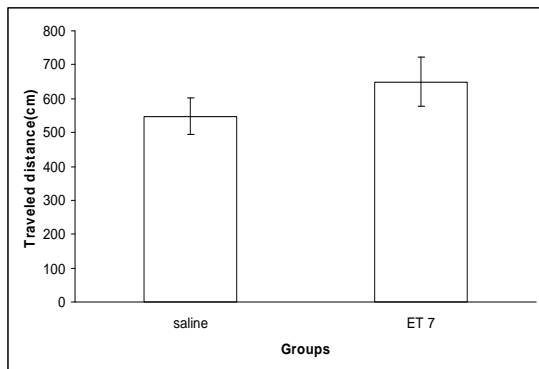
آسیب پذیر می باشد.^۸ همچنین جایگاهی برای صدمات اکسیداتیو محسوب می شود.^۹ گزارش ها حاکی از بروز ۲۵-۶۰ درصد اختلال شناختی در بیماران MS می باشد.^{۱۰} ژيروس دنداندار هیپوکمپ به دلیل داشتن سلول های بنیادی عصبی (NSCs) توانایی تکثیر و تمایز را در سرتاسر عمر جوندگان و حتی انسان حفظ می کند.^{۱۱} بنابراین هیپوکمپ به دلیل آسیب پذیری و همچنین قابلیت بازسازی ناحیه مناسبی جهت مطالعه مکانیسم های دخیل در فرایندهای یادگیری، حافظه و ترمیم عصبی خواهد بود. یادگیری به صورت تغییر رفتار در نتیجه کسب تجربیات جدید تعریف می شود و حافظه توانایی بازخوانی تجربیات آموخته شده است. حافظه به عنوان توانایی بازخوانی اطلاعات یک جزء ضروری یادگیری محسوب می شود.^{۱۲} ویتامین E به عنوان جمع آوری کننده گونه های فعال اکسیژن تحت شرایط *in vivo* و *in vitro* عمل می کند. فعالیت آنتی اکسیدانی ویتامین E از طریق جلوگیری از آسیب اکسیداتیو بافتی ناشی از رادیکال های آزاد صورت می گیرد و از این طریق اثر حفاظتی خود را بر جای می گذارد.^{۱۳} نقش ویتامین D در بیماری MS در مطالعات ژنتیکی و اپیدمیولوژیک مشخص شده است.^{۱۴، ۱۵} ویتامین D3 موجب کاهش علائم مدل حیوانی بیماری MS می شود.^{۱۶، ۱۷} اگرچه ویتامین D در کنترل علائم بیماری MS استفاده می شود، اما مکانیسم عمل دقیق آنها به خوبی مشخص نیست. بنابراین بر آن شدیم تا در این مطالعه اثر تجویز توام ویتامین های E و D3 بر یادگیری و حافظه فضایی در تشکیلات هیپوکمپ موش صحرایی به دنبال دمیلتاسیون ناشی از اتیدیوم بروماید را بررسی نماییم.

مواد و روش ها

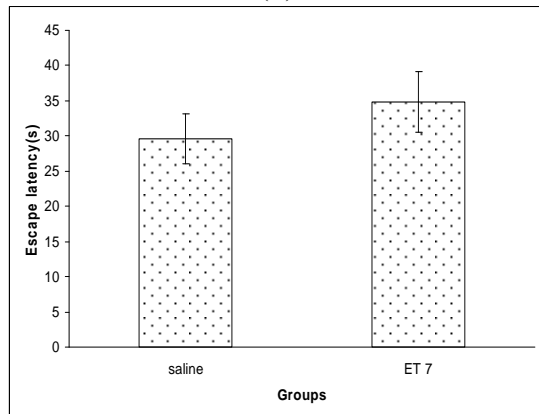
موش های صحرایی نژاد ویستاردر محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم، مورد استفاده در آزمایش ها، از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. پیش از جراحی استریوتاکسی هر پنج موش در یک قفس، ولی پس از آن بطور انفرادی نگهداری شدند. حیوانات در طی آزمایشات بطور آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند. طول دوره نوری ۱۲ ساعت (۷ بامداد تا ۷ شب)، رطوبت و دمای اتاق ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) ثابت بود. موش ها پس از وزن کشی با تزریق داخل صفاقی (Intraperitoneal) کلرال هیدرات 80 mg/Kg بیهوش شدند. سپس

آموزش حیوانات

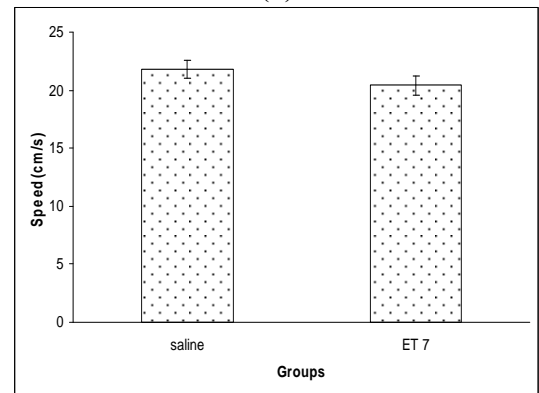
در آزمایشات سکوی پنهان (Hidden Platform) هر موش به مدت چهار روز و در هر روز یک بلوک و در هر بلوک چهار بار تحت آموزش قرار می‌گیرد. در هر بلوک حیوان چهار بار و فقط یک بار، از هریک از جهات (شمال، جنوب، شرق و غرب) که به‌طور تصادفی توسط کامپیوتر تعیین می‌گردد، رها می‌شود. در هر بار ۹۰ ثانیه به موش فرصت داده می‌شود تا محل سکوی را پیدا کند، در غیراین‌صورت به روی سکوی راهنمایی می‌گردد و در هر صورت ۳۰ ثانیه به حیوان فرصت داده می‌شود تا بر روی سکوی بماند و محیط اطراف را بررسی نماید.



(A)



(B)



(C)

شکل ۱. A. بررسی اثر توکسین اتیدیوم بروماید بر میزان مسافت طی شده حیوان، به عنوان شاخصی از یادگیری و حافظه فضایی، ۷ روز پس از تزریق توکسین. B. بررسی اثر توکسین اتیدیوم بروماید بر تأخیر زمانی برای یافتن سکوی توسط حیوان، به عنوان شاخصی از یادگیری و حافظه فضایی، ۷ روز پس از تزریق توکسین. C. بررسی اثر توکسین اتیدیوم بروماید بر میزان سرعت شنای حیوان، به عنوان شاخصی از سلامتی حسی - حرکتی حیوان، ۷ روز پس از تزریق توکسین.

$$p \leq 0.05^*$$

بررسی سلامت سیستم حسی - حرکتی

در روز پنجم آزمایش سکوی با کاغذ آلومینیومی پوشانده و تقریباً یک سانتیمتر بالاتر از سطح آب قرار می‌گیرد تا کاملاً قابل رؤیت باشد. بوسیله این آزمایش، که سکوی آشکار (Visible Platform) نامیده می‌شود، اگر حیوان قادر به یافتن سکوی باشد سلامت سیستم بینایی - حرکتی حیوان تأیید می‌گردد. هر روز پس از اتمام آزمایشات، حیوانات خشک و به قفس منتقل می‌شوند.

پارامترهای مسافت طی شده توسط حیوان برای رسیدن به سکوی و تأخیر زمانی در رسیدن به سکوی شاخص‌هایی از یادگیری و حافظه فضایی محسوب می‌شوند. همچنین سرعت شنای حیوان نیز شاخصی از سلامتی سیستم حسی - حرکتی حیوان می‌باشد. بنابراین با توجه به ارزیابی شاخص‌های فوق یافته‌های زیر به‌دست آمد.

نتایج

الف - اثر آسیب دمیله‌کننده ناشی از اتیدیوم بروماید (به عنوانی مدلی از دمیله‌ناسیون بیماری MS) بر مسافت طی شده، تأخیر زمانی برای یافتن سکوی و سرعت شنای حیوان، ۷ روز پس از ایجاد ضایعه در هیپوکمپ موش صحرایی. تزریق اتیدیوم بروماید موجب افزایش معنادار مسافت طی شده ($p < 0.05$) توسط حیوان در مقایسه با گروه کنترل می‌شود اما اختلاف معناداری در تأخیر زمانی برای یافتن سکوی و سرعت شنای حیوان ۷ روز پس از ایجاد ضایعه مشاهده نشد (شکل ۱ A, B, C).

ب- اثر ۷ روز تجویز توام ویتامین های E و D3 بر مسافت طی شده، تأخیر زمانی برای یافتن سکو و سرعت شنای حیوان: تجویز توام ویتامین های E و D3 برای ۷ روز موجب کاهش معنادار مسافت طی شده ($p < 0.05$) توسط حیوان برای یافتن سکو در مقایسه با گروه ضایعه شد اما موجب کاهش معنادار تأخیر زمانی برای یافتن سکو نشد. سرعت شنای حیوان نیز افزایش معناداری را نشان نداد (شکل A, B, C).

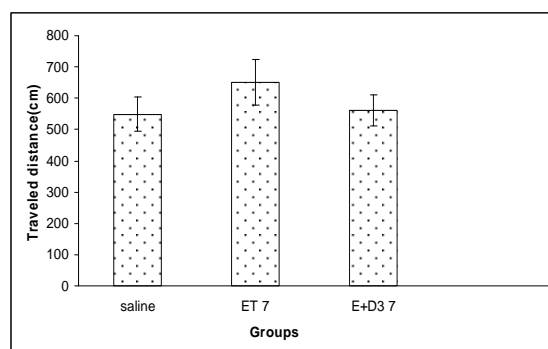
همچنین اثر تجویز مجزای ویتامین E و D3 برای ۷ روز نیز در مطالعه قبلی مان مورد بررسی قرار گرفت و اختلاف معناداری در هیچ کدام از شاخص ها مشاهده نشد (یافته ها نشان داده نشده است).

بحث

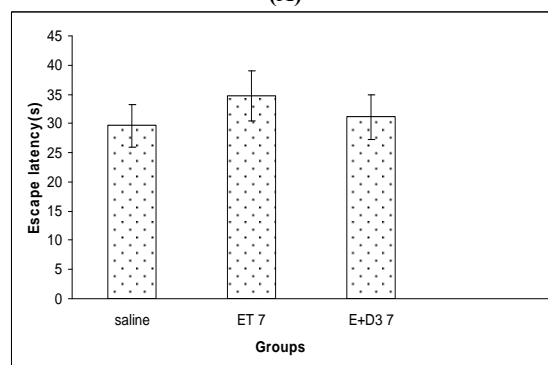
تزریق EB به داخل هیپوکمپ موجب دمیلیناسیون موضعی می شود. فرآیند دمیلیناسیون و رمیلیناسیون به دنبال تزریق EB ابزار مناسبی جهت مطالعه بررسی اثرات داروهای گوناگون بر بیماری های دمیلینه کننده مانند ام اس است.^{۱۸} تعدادی از مطالعات دمیلیناسیون بافت خاکستری هیپوکمپ را در بیماران MS مشخص کرده است.^{۱۹} همچنین اختلال حافظه در ۲۵ تا ۶۰ درصد این بیماران گزارش شده است.^{۱۰} در مطالعه های قبلی مولکولی، میکروسکوپ الکترونی و بافت شناسی که در آزمایشگاه مان انجام گرفت نقش اتیدیوم بروماید در ایجاد دمیلیناسیون و فعال شدن مسیر آپوپتوز در هیپوکمپ و همچنین نقش آنتی آپوپتوتیک تجویز توام ۷ روز ویتامین های E و D3 مشخص شد (۲۰). بنابراین در راستای طرح های پژوهشی قبلی در مطالعه رفتاری حاضر اثر تجویز توام ویتامین های E و D3 برای ۷ روز بر یادگیری و حافظه فضایی در تشکیلات هیپوکمپ موش صحرائی به دنبال دمیلیناسیون ناشی از اتیدیوم بروماید مورد بررسی قرار گرفت.

در این مطالعه میزان های مسافت طی شده و تأخیر زمانی جهت یافتن سکو به عنوان شاخص یادگیری و حافظه فضایی بررسی شد. همچنین میزان سرعت حرکت حیوان به عنوان شاخصی از وضعیت سلامتی حسی - حرکتی در نظر گرفته شد.

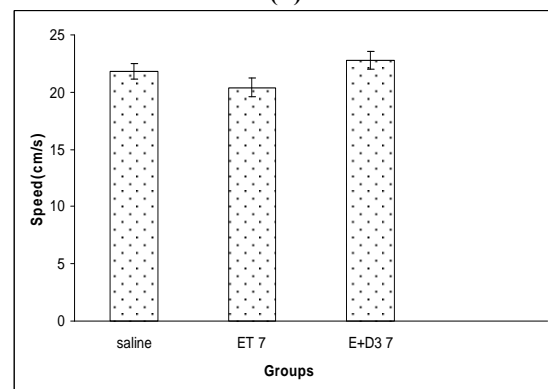
۷ روز پس از تزریق EB میزان مسافت طی شده توسط حیوان در مقایسه با گروه کنترل (سالین) افزایش یافت اما میزان های تأخیر زمانی و سرعت حرکت حیوان تغییر معناداری را نشان نداد. با توجه



(A)



(B)



(C)

شکل ۲. A. بررسی ۷ روز تجویز توام ویتامین های E و D3 بر میزان مسافت طی شده توسط حیوان، به عنوان شاخصی از یادگیری و حافظه فضایی. B. بررسی ۷ روز تجویز توام ویتامین های E و D3 بر میزان تأخیر زمانی برای یافتن سکو توسط حیوان، به عنوان شاخصی از یادگیری و حافظه فضایی. C. بررسی ۷ روز تجویز توام ویتامین های E و D3 بر میزان سرعت شنای حیوان، به عنوان شاخصی از وضعیت سلامتی حسی - حرکتی حیوان. تجویز توام ویتامین های E و D3 برای ۷ روز موجب کاهش معنادار مسافت طی شده توسط حیوان برای یافتن سکو در مقایسه با گروه ضایعه شد اما موجب کاهش معنادار تأخیر زمانی برای یافتن سکو نشد. * $p \leq 0.05$.

آنتی‌اکسیدانی یا نقش مستقیم آن می‌باشد. نقش غیرمستقیم یا غیرآنتی‌اکسیدانی برای ویتامین E نیز مطرح است که از طریق فعال کردن تعدادی از مسیرهای سیگنالینگ درون سلولی و یا افزایش بیان یکسری از پروتئین‌های دخیل در روند رشد و تمایز سلول عصبی، صورت می‌پذیرد. مطالعات متعددی اثرات ضد آپوپتوزی و ضد التهابی ویتامین E را نشان داده‌اند.^{۲۵-۲۳}

ویتامین D3 یکی از ویتامین‌های محلول در چربی است که علاوه بر حفظ هموستاز کلسیم پلاسمایی در تنظیم سیستم ایمنی خصوصاً ایمنی با واسطه سلول‌های T نقش دارد. این ویتامین به سهولت از سد خونی- مغزی عبور می‌کند، مغز محلی برای فعال کردن ویتامین D3 غیر فعال به فعال می‌باشد. ویتامین D3 با گیرنده داخل هسته ای خود که در الیگودندروسیت‌ها، نورون‌ها، آستروسیت‌ها و ماکروفاژها بیان می‌شود تشکیل کمپلکس فعال نسخه برداری را می‌دهد که بیان یکسری از ژن‌های مرتبط با التهاب را تضعیف می‌کند.^{۲۶، ۲۷} مطالعه‌های اپیدمیولوژیک، ژنتیک و مدل‌های حیوانی نقش ویتامین D را در MS نشان می‌دهند.^{۱۶، ۱۷} با توجه به موارد فوق می‌توان احتمال اثر این ویتامین‌ها را در روند بازسازی عصبی و نهایتاً بهبود حافظه فضایی پیش‌بینی نمود.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این مطالعه رفتاری تا اندازه‌ای با یافته‌های قبلی مولکولی و هیستولوژیک منطبق بود. ویتامین‌های E و D3 از طریق افزایش بازسازی عصبی در هیپوکمپ موجب افزایش یادگیری و حافظه فضایی می‌شود.

تقدیر و تشکر

هزینه این پژوهش از بودجه پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی البرز تأمین گردید. از این رو همکاران این طرح کمال تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی البرز و گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی انستیتو پاستور ایران دارند.

به یافته‌های قبلی محتمل‌ترین دلیل برای این نتیجه آغاز روند آپوپتوز و ایجاد آسیب در هیپوکمپ می‌باشد که موجب افزایش تدریجی مسافت طی شده می‌گردد (شکل ۱). با توجه به اینکه تزریق اتیدیوم بروماید به صورت محدود در هیپوکمپ صورت گرفت انتظار اختلال حرکتی را نداشتیم، از این رو در این مطالعه اختلاف معناداری در سرعت حرکت حیوان مشاهده نشد و در صورت مشاهده اختلال حرکتی، حیوان مورد نظر از مطالعه کنار گذاشته می‌شد.

تجویز توأم ویتامین‌های E و D برای ۷ روز موجب کاهش معنی میزان مسافت طی شده توسط حیوان در مقایسه با گروه کنترل (سالین) افزایش یافت اما میزان‌های تاخیر زمانی و سرعت حرکت حیوان تغییر معناداری را نشان نداد (شکل ۲). در صورتی که تجویز ۷ روز ویتامین‌های E و D3 به تنهایی موجب کاهش مسافت طی شده، تاخیر زمانی و سرعت حرکت در مقایسه با گروه ضایعه (تزریق EB) نشد (یافته‌ها نشان داده نشده است).

این نتایج ممکن است به دلیل اثر حفاظتی و ضد التهابی ویتامین‌های E و D3 در برابر آسیب عصبی باشد. این یافته با یافته‌های متعدد محققین دیگر که اثر ضد التهابی و حفاظت عصبی ویتامین‌های E و D3 را در مدل‌های حیوانی MS و بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی نشان داده‌اند، مطابقت دارد. همچنین مطالعات متعددی نقش حفاظت عصبی ویتامین E را در برابر استرس اکسیداتیو در بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی نشان می‌دهد.^{۱۳} ویتامین D3 در مدل موش صحرایی، موجب کاهش علائم EAE می‌شود.^{۱۴، ۱۵}

ویتامین E ماده مغذی ضروری در انسان می‌باشد که نقش آنتی‌اکسیدانی آن در اعمال طناب نخاعی، اعصاب مغزی، عملکرد شبکه به ویژه لکه زرد، تثبیت غشای نورونی و مهار سمیت گلوتاماتی مشخص شده است.^{۲۱، ۲۲} ویتامین E اولین سد دفاعی در برابر پراکسیداسیون اسیدهای چرب اشباع نشده موجود در فسفولیپیدهای غشای سلولی و داخل سلولی می‌باشد که ناشی از اثر

References

- Brecknell JE, Fawcett JW. Axonal regeneration. *Biol Rev* 1996; 71: 227-255.
- Blakemore WF. Ethidium bromide induced demyelination in the spinal cord of the cat. *Neuropathol App Neurobiol* 1982; 8:365-375.

3. Levine JM, Reynolds R. Activation and proliferation of endogenous oligodendrocyte precursor cells during ethidium bromide-induced demyelination. *Exp Neurol* 1999; 160: 333-347.
4. Bondan EF, Lallo MA, Sinhorini IL. The effect of cyclophosphamide on brainstem remyelination following local ethidium bromide injection in Wistar rats. *J Submicr Cytol Pathol* 2000; 32: 603-612.
5. Bondan EF, Lallo MA, Trigueiro AH, et al. Delayed Schwann cell and oligodendrocyte remyelination after ethidium bromide injection in the brainstem of Wistar rats submitted to streptozotocin diabetogenic. *Bio Res* 2006; 39: 637-646.
6. Blakemore WF, Crang AJ, Evans RJ. The effect of chemical injury on Oligodendrocytes In: Mimms CC, Cuzneks MC, Kelly W. *Viruses and demyelinating diseases*. London: Acad Press 1983; 167-190.
7. Guazzo EP. A technique for producing demyelination of the rat optic nerves. *J Clin Neurosci* 2005; 12: 54-58.
8. Nakafuku M, Nakatomi H, Kuriu T, et al. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 2002; 110: 429-441.
9. Cha CI, Shin CM, Chung YH, Kim MJ, Lee EY, Kim E-G. Age-related changes in the distribution of nitrotyrosine. *Brain Res* 2002; 931: 194-199.
10. Rao SM, Leo GL, Bernardin L, et al. Cognitive dysfunction in multiple sclerosis. Frequency, patterns, and prediction. *Neurology* 1991; 41: 685-691.
11. Represa A, Becq H, Jorquera I, et al. Differential properties of dentate gyrus and CA1 neural precursors. *J Neurobiol* 2005; 62: 243-261.
12. Choopani S, Moosavi M, Naghdi N. Involvement of nitric oxide in insulin induced memory improvement. *Peptides* 2008; 29: 898-903
13. Rose RC, Bode AM. Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate. *FASEB J* 1993; 7: 1135-1142.
14. Goldberg P. Multiple sclerosis: vitamin D and calcium as environmental determinants of prevalence. 1. Sunlight, dietary factors and epidemiology. *Int J Environ Stud* 1974; 6: 19-27.
15. Goldberg P. Multiple sclerosis: vitamin D and calcium as environmental determinants of prevalence. 2. Biochemical and genetic factors. *Int J Environ Stud* 1974; 6: 121-200.
16. Garcion E, Sindji L, Nataf S, et al. Treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis in rat by 1,25-dihydroxyvitamin D3 leads to early effects within the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2003; 105 : 438-448.
17. Mosayebi G, Ghazavi A, Payani MA. The effect of vitamin D3 on the inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *J Iran Univ Med Sci* 2006; 13: 184-196.
18. Smith KJ, Blakemore WF, McDonald WI. Central remyelination restores secure conduction. *Nat* 1979; 280: 395-6.
19. Sailer M, Fischl B, Salat D, Tempelmann C, Schonfeld MA, Busa E, et al. Focal thinning of the cerebral cortex in multiple sclerosis. *Brain* 2003; 126: 1734-44.
20. Goudarzvand M, Javan M, Mirnajafi-Zadeh J, et al. 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: 289-299.
21. Reiter E, Jiang Q, Christen S. Anti-inflammatory properties of α - and γ -tocopherol. *Mol Aspect Med* 2007; 28: 668-91.
22. Schubert D, Kimura H, Maker P. Growth factors and vitamin E modify neuronal glutamate toxicity. *Proc Nat Acad Sci* 1992; 89: 8264.
23. Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 1993; 300: 535-43.
24. Jeong YW, Park SW, Hossein MS. Antiapoptotic and embryotrophic effects of α -tocopherol and L-ascorbic acid on porcine embryos derived from in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Theriogenol* 2006; 66: 2104-12.
25. Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med* 2007; 43: 4-15.
26. Garcion E, Sindji L, Nataf S. Treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis in rat by 1,25-dihydroxyvitamin D3 leads to early effects within the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2003; 105: 438-48.
27. Spach KM, Pedersen LB, Nashold FE. Gene expression analysis suggests that 1,25-dihydroxyvitamin D3 reverses experimental autoimmune encephalomyelitis by stimulating inflammatory cell apoptosis. *Physiol Genomic* 2004; 18: 141-51.