

بررسی اثرات آل-ترانس رتینوئیک اسید بر روی علائم، میزان نیتریک اکسید و ظرفیت تام آنتی اکسیدانی سرم در مدل موشی مولتیپل اسکلروز

اصغر مروریدی: دانش آموخته کارشناسی ارشد ایمنی شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. amorvaridi@yahoo.com

دکتر نوروز دلیرژ: استادیار ایمنی شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. n.delirezh@urmia.ac.ir

دکتر رحیم حب نقی: دانشیار آسیب شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. r.hobbenaghi@urmia.ac.ir

*دکتر سید میثم ابطحی فروشانی: استادیار ایمنی شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (*نویسنده مسئول). meysamabtahi@hotmail.com

دکتر حسن ملکی نژاد: دانشیار فارماکولوژی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. hassanmalekinejad@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۳۰

تاریخ دریافت: ۹۱/۵/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: در سال‌های اخیر مدارک فراوانی از دخالت آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد در بیماری زایی اسکلروز متعدد و آنسفالومیلیت تجربی خود ایمن (EAE= Experimental Autoimmune Encephalomyelitis)، مدل جانوری اسکلروز متعدد، به دست آمده است. بنابراین آل-ترانس رتینوئیک اسید (ATRA= All-Trans Retinoic Acid) به عنوان یک ترکیب آنتی اکسیدان ممکن است که در کاهش شدت بیماری موثر باشد.

روش کار: تحقیق حاضر از نوع مداخله‌ای-تجربی می‌باشد. بیماری EAE از طریق ایمن سازی با پپتید 35-55 MOG و ادجوانت کامل فروند Freund's (adjuvant)، در موش‌های ماده C57BL/6 القاء شد. سپس موش‌های مبتلا در دو گروه ۷ رأسی قرار گرفتند. همچنین ۷ رأس موش نیز به عنوان گروه سالم در نظر گرفته شدند. درمان با ATRA (۲۵mg/kg) یک روز در میان) از زمان بروز علائم درمانگاهی در گروه درمانی (روز ۱۲) آغاز گشت. هم‌زمان، گروه کنترل تنها حلال دارو را دریافت نمودند. علائم تا زمان کشتار موش‌ها (روز ۳۳) روزانه ثبت گردید. سپس میزان تولید نیتریک اکسید در محیط کشت سلول‌های طحالی و ظرفیت تام آنتی اکسیدانی در سرم موش‌ها سنجیده شد.

یافته‌ها: تجویز ATRA پس از بروز علائم بیماری به طور معنی‌داری موجب تخفیف بیماری گردید. به دنبال تحریک مجدد پادگنی (antigen-specific re-stimulation) در سلول‌های جدا شده از طحال، تولید نیتریک اکسید در گروه تحت درمان با ATRA به طور معنی‌داری کاهش یافت و به محدوده سطح آن در موش‌های سالم رسید. همچنین درمان با ATRA از کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی سرم در موش‌های مبتلا ممانعت به عمل آورد.

نتیجه‌گیری: لااقل بخشی از اثرات مفید ATRA در درمان EAE به دلیل کاهش سطح نیتریک اکسید و بهبود قابلیت دفاع آنتی اکسیدانی صورت می‌گیرد.

کلیدواژه‌ها: اسکلروز متعدد، آنسفالومیلیت تجربی خود ایمن، آل-ترانس رتینوئیک اسید، نیتریک اکسید، ظرفیت آنتی اکسیدانی.

مقدمه

عنوان مدل جانوری بیماری اسکلروز متعدد فرصت مناسبی را جهت ارزیابی اولیه فراورده‌های دارویی جدید فراهم نموده است (۳).

هر دو بیماری MS و EAE دارای یک ماهیت خود التهابی می‌باشند (۴ و ۵). غلظت گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن و یا نیتروژن (سوپراکسید، نیتریک اکسید و پراکسی نیتريت) در شرایطی از قبیل التهاب می‌تواند به حدی افزایش یابد که بر سازوکارهای ذاتی آنتی اکسیدانی موجود غلبه نماید. چنین استرس‌های اکسیداتیو و یا نیتراتیو موجب تخریب اجزای حیاتی سلول از قبیل لپیدها، پروتئین‌ها و DNA و بالاخص DNA

با وجود پیشرفت‌هایی که در سال‌های اخیر در امر درمان بیماری اسکلروز متعدد (Multiple Sclerosis) حاصل شده است، بسیاری از بیماران به طور بهینه به درمان‌های یاد شده پاسخ نمی‌دهند، به طوری که مقوله درمان و جلوگیری از پیشرفت بیماری همچنان به عنوان یک چالش پیش رو مطرح می‌باشد. بنابراین دست‌یابی به روش‌های درمانی کم‌خطر و ارزان قیمت جهت افزودن به رژیم درمانی مبتلایان به اسکلروز متعدد لازم به نظر می‌رسد (۱ و ۲). در این بین آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی (EAE) به

بود. این موش‌ها در حیوان خانه پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه در شرایط استاندارد آب، غذا، دما و نور کافی نگهداری شدند. کلیه مراحل این تحقیق در کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه ارومیه مورد تایید قرار گرفته است.

القاء EAE: مقدار $200 \mu\text{g}$ پپتید MOG33-55 با توالی (M-E-V-G-W-Y-R-S-P-F-S-R-V-V-H-L-Y-R-NG-K) و درجه خلوص ۹۵٪ (شرکت ANASPEC-آمریکا) در $100 \mu\text{L}$ بافر فسفات سالین (Phosphate Buffered Saline) و $100 \mu\text{L}$ ادجوانت فروند کامل (شرکت Sigma-آمریکا) مخلوط و به صورت زیر جلدی در ناحیه پشت هر موش تزریق گردید. مقدار 400 ng سم سیاه سرفه (شرکت Sigma-آمریکا) نیز در حجم $300 \mu\text{L}$ PBS در روز تزریق پپتید و ۴۸ ساعت بعد به صورت داخل صفاقی تزریق گردید (۱۷). روند بیماری و تغییرات وزن موش‌ها روزانه مورد ارزیابی قرار گرفت. از مقیاس زیر جهت ارزیابی شدت بیماری استفاده گردید: صفر: عدم بروز بیماری، یک: اختلال در حرکت دم، دو: فلج شدن دم، سه: اختلال در راه رفتن، چهار: فلجی یک پا، پنج: فلجی دو پا، شش: فلجی چهار دست و پا، هفت: مرگ (۱۷).

درمان موش‌های مبتلا به EAE با آل ترانس رتینوئیک اسید: ۱۴ رأس موش پس از القاء بیماری به دو گروه ۷ رأسی با شرایط سنی و وزنی یکسان تقسیم شده، تا ۲۱ روز پس از بروز علائم درمانگاهی به شرح زیر تحت درمان قرار گرفتند: گروه تحت درمان: استوک ATRA (شرکت Sigma-آمریکا) به میزان 0.4 mg/ml در PBS حاوی ۲٪ DMSO (Dimethyl Sulfoxide) حل گردید. پس از تقسیم دارو در لوله‌های کرایو به میزان مورد نیاز جهت تزریق در هر نوبت، اقدام به فریز کردن دارو در -20°C درجه سلسیوس تا زمان مورد نظر گردید.

به منظور ارزیابی اثرات درمانی دارو، بر روی بیماری در حال جریان، اقدام به تجویز یک روز در میان داروی ATRA ($500 \mu\text{g}$ به ازای هر رأس) پس از بروز اولین علائم درمانگاهی (۱۲ روز پس از القاء بیماری) در همه موش‌های گروه مطالعه به

میتوکندری می‌گردد (۶). امروزه شواهد فراوانی مبنی بر دخالت رادیکال‌های آزاد در ایجاد هر دو بیماری EAE و MS در دسترس می‌باشد (۶-۸). بنابراین این احتمال مطرح می‌گردد که استفاده از ترکیبات آنتی اکسیدان در امر درمان بیماری ارزنده و مفید می‌باشد.

مدت‌ها است که نقش ویتامین آ به عنوان یک ترکیب آنتی اکسیدانت با قابلیت شکست واکنش‌های زنجیره‌ای شناخته شده است (۹). آل - ترانس رتینوئیک اسید (تریتینوئین، ATRA)، یک متابولیت فعال ویتامین آ می‌باشد که دارای اثرات ضد سرطانی، تعدیل کننده ایمنی و همچنین آنتی اکسیدانی می‌باشد. ATRA نسبت به سایر ایزومرهای طبیعی ویتامین آ پایدارتر بوده و قابلیت نفوذ بیشتری را به سلول‌های بدن دارد (۱۰). این ترکیب به منظور درمان آکنه، پسوریازیس و لوسمی پرومیلوسیتی به کار رفته است (۱۰). در گذشته نشان داده شده است که ترکیبات ویتامین آ بر روی برخی از مدل‌های جانوری بیماری‌های خود ایمن از قبیل آرتریت، کولیت، دیابت، میوزیت، نفریت و آنسفالومیلیت آلرژیک خود ایمن موثرند (۱۱-۱۶). در بیشتر این مطالعات بیشتر به اثرات تعدیل کننده ایمنی این ترکیبات پرداخته شده و کمتر به فوائد احتمالی این ترکیب به عنوان یک آنتی اکسیدان پرداخته شده است.

در این مطالعه، ضمن بررسی اثرات درمانی تجویز ATRA بعد از شروع علائم درمانگاهی EAE، اثرات آن بر روی تولید نیتریک اکسید ($\text{NO}=\text{Nitric Oxide}$) در مایع رویی کشت سلول‌های طحالی و همچنین ظرفیت تام آنتی اکسیدانی سرم نیز مورد ارزیابی قرار گرفته است.

روش کار

در این مطالعه تجربی که به صورت موردی/شاهدی انجام شده است. جامعه مورد مطالعه، شامل موش‌های ماده خالص (inbred) نژاد C57BL/6 با محدوده سنی ۶ تا ۸ هفته می‌باشد که از انستیتو پاستور ایران خریداری شده

اندازه‌گیری نیتریک اکسید: میزان تولید نیتریک اکسید توسط روش رنگ سنجی گریس (Griess) و استفاده از منحنی استاندارد نیتريت سدیم تعیین گردید. به طور خلاصه، $100 \mu\text{L}$ از مایع رویی کشت سلول‌های طحال به صورت دوتایی به داخل چاهک‌های پلت ۹۶ خانه‌ای ته تخت ریخته شد. سپس $100 \mu\text{L}$ از محلول ۱ درصد سولفانیل‌آمید (شرکت Sigma-آمریکا) به چاهک‌ها اضافه شد. پلیت به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی و درجه حرارت اتاق نگاه داری شد. آنگاه به تمام حفره‌ها $100 \mu\text{L}$ از محلول ۱ درصد N-۱- نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدرو کلراید (شرکت Sigma-آمریکا) اضافه شد و بار دیگر به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی و درجه حرارت اتاق نگاه داری شد. در نهایت جذب نوری نمونه در طول موج 530 نانومتر توسط دستگاه الیزانگار قرائت گردید. هم زمان با استفاده از غلظت‌های مختلف نیتريت سدیم منحنی استاندارد ترسیم شده و از طریق رگرسیون و معادله خطی، غلظت نیتريت موجود در نمونه‌ها تعیین گردید.

اندازه‌گیری ظرفیت آنتی اکسیدان تام سرم: قبل از خارج نمودن طحال موش‌ها، اقدام به خون گیری از قلب و جداسازی سرم آن‌ها گردید. برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی از شیوه FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) استفاده شد. در ابتدا با استفاده از اسیدکلریدریک 40 mM ، محلول 10 mM تری پریدیل-تریازین (TPTZ)، (شرکت Sigma-آمریکا) تهیه شد. سپس با مخلوط کردن بافر استات، محلول کلریدریک آهن و محلول TPTZ، معرف FRAP تهیه شد. $1/5 \text{ ml}$ از معرف به $50 \mu\text{L}$ از نمونه‌ها افزوده شد. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در 37°C درجه سلسیوس نگاه داری شدند و سپس جذب نوری آن‌ها در 593 نانومتر قرائت گردید. جهت ترسیم منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف سولفات آهن استفاده شد و بر اساس آن ظرفیت آنتی اکسیدان تام سرم در نمونه‌ها تعیین گردید. آنالیز آماری: جهت مقایسه داده‌های ناپارامتری (Nonparametric) مرتبط با شدت علائم درمانگاهی از آزمون Mann-Whitney-U استفاده

صورت داخل صفاقی گردید. انتخاب دوز تزریقی بر مبنای مطالعات گذشته بر روی سایر مدل‌های بیماری خود ایمن صورت گرفته است (۱۱، ۱۸ و ۱۹).

گروه شاهد: موش‌های مبتلا به EAE بودند که در حجم مشابه با گروه قبلی پس از بروز علائم در تمام موش‌های گروه (روز ۱۲ پس از القاء) تحت درمان با PBS حاوی ۲٪ DMSO (دارونما) قرار گرفتند. در ضمن ۷ رأس موش C57BL/6 که از نظر سن، جنس و وزن مشابه با دو گروه قبلی بودند، به عنوان گروه سالم غیر بیمار در نظر گرفته شدند. این موش‌ها فرایند ایجاد بیماری را بدون دریافت پپتید MOG33-55 طی کرده و هم‌زمان با آن‌ها تحت درمان با دارونما قرار گرفتند.

تهیه کشت سلولی طحال و سنجش سایتوکاین‌های موجود در مایع رویی آن: ۳ هفته بعد از آغاز درمان (روز ۳۱ پس از القاء) اقدام به نخاعی کردن موش‌ها شد. بدین ترتیب که طحال موش‌ها تحت شرایط استریل خارج و بعد از قطعه قطعه شدن در 5 ml محیط کشت RPMI-1640 (شرکت Sigma-آمریکا) حاوی ۱۰٪ FBS (Fetal Bovine Serum) (شرکت Gibco-آلمان) له گردید. بافت حاصل جهت تهیه سوسپانسیون سلولی از توری سیمی به قطر 0.2 میلی متر عبور داده شد. پس از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در 200 g ، به منظور حذف RBC‌ها، بر روی رسوب سلولی به دست آمده 5 ml بافر لیز کننده (کلرید آمونیوم: 0.15 M ، بی کربنات پتاسیم: 10 mM و EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid): 1 mM ؛ pH: 7.2) افزوده شد. بعد از ۵ دقیقه ضمن افزودن 10 ml محیط کشت بار دیگر به مدت ده دقیقه در 200 g سانتریفیوژ شد. سپس رسوب سلولی در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰٪ FBS به حالت سوسپانسیون در آورده شد. پس از شمارش، سوسپانسیون سلولی به تعداد $10^6 \times 2$ از آن تهیه شد. این سلول‌ها در پلت‌های کشت ۲۴ خانه در حضور پپتید MOG33-55 با غلظت $50 \mu\text{g/ml}$ به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور حاوی ۵٪ CO_2 کشت داده شدند. پس از طی این مدت مایع رویی آن‌ها جمع آوری شد.

در گروه شاهد تفاوت معنی داری را با گروه سالم نشان نمی‌دهد (نمودار ۲ و جدول ۱). در موش‌های گروه شاهد نسبت به موش‌های گروه سالم یک کاهش ۵۹ درصدی در میزان ظرفیت تام آنتی اکسیدانی سرم مشاهده می‌گردد. درمان با ATRA پس از بروز علائم درمانگاهی از روز ۱۲ موجب بهبود و برگشت ظرفیت تام آنتی اکسیدانی در طی سه هفته بعد از آغاز درمان می‌شود (نمودار ۳ و جدول ۱).

بحث و نتیجه گیری

درمان بیماری‌های خود ایمن به طور معمول پس از بروز علائم درمانگاهی صورت می‌پذیرد (۲۰). در این مطالعه نیز به منظور ارزیابی توان درمانی ترکیبات مد نظر، تجویز دارو پس از بروز علائم ناتوانی نورولوژیک در تمامی موش‌های گروه درمانی صورت گرفته است (روز ۱۲ پس از القای EAE). نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که در این شرایط، تجویز ATRA موجب بهبود در سیمای بالینی موش‌های مبتلا نسبت به گروه کنترل می‌گردد. این بهبودی نسبی هم‌زمان با کاهش سطح نیتریک اکسید تولیدی توسط سلول‌های طحال و بهبود قابلیت دفاع آنتی اکسیدانی سرم صورت می‌گیرد.

در بیماران مبتلا به اسکروز متعدد میزان رادیکال‌های آزاد و نیتریک اکسید و به تبع آن میزان پراکسیداسیون چربی‌ها افزایش می‌یابد (۷). بر خلاف سایر بیماری‌ها که عمده‌تاً استرس‌های اکسیداتیو یک نقش ثانویه و یا جانبی را در بیماری زایی بیماری ایفا می‌نمایند، شواهدی دال

شد. جهت مقایسه سایر داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و Tukey's test به کار گرفته شد. در تمام بررسی‌ها $p < 0.05$ به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد. کلیه بررسی‌های آماری در محیط نرم افزاری SPSS ویراست ۱۷ انجام شد و برای ترسیم نمودارها از نرم افزار Microsoft Excel (۲۰۰۷) استفاده شد. کلیه داده‌ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ گزارش گردید.

یافته‌ها

بر اساس نتایج به دست آمده میانگین شدت ناتوانی نورولوژیک در طول دوره درمان در موش‌های تحت درمان با ATRA ($3/2 \pm 0/15$) نسبت به گروه شاهد ($4/14 \pm 0/11$) کمتر می‌باشد ($p < 0/001$). میانگین حداکثر شدت بیماری نیز در گروه موش‌های شاهد ($5/8 \pm 0/18$) در مقایسه با موش‌های تحت درمان ($4/68 \pm 0/19$) کمتر بود ($p < 0/05$). ارزیابی شاخص تجمع بیماری (Cumulative Disease Score; CDI) نیز که نشان دهنده مجموعه بار و فشار بیماری در طی مدت مطالعه بین گروه‌های مختلف می‌باشد، نتایج مشابهی را نشان می‌دهد (نمودار ۱). بر این اساس شاخص مزبور در موش‌های مبتلا و تحت درمان با ATRA به ترتیب به میزان ۲۷٪ نسبت به همین شاخص در گروه شاهد کاهش نشان می‌دهد.

به دنبال تحریک مجدد لنفوسیت‌های طحالی با پپتید MOG در محیط کشت میزان تولید NO به طور معنی داری در گروه تحت درمان نسبت به گروه شاهد کاهش یافت. به طوری که میزان O

جدول ۱- نتایج حاصل از تحلیل واریانس در مورد سطح نیتریک اکساید مایع رویی کشت سلول‌های طحال و ظرفیت تام آنتی اکسیدان سرم.

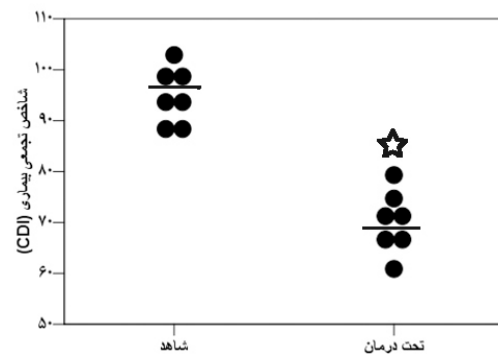
گروه	سطح نیتریک اکساید مایع رویی کشت طحال			ظرفیت تام آنتی اکسیدان سرم		
	اختلاف از	خطای	P. value	اختلاف از	خطای	p. value
	میانگین	استاندارد		میانگین	استاندارد	
سالم	۱۳/۳۸	۴/۶۰	۰/۰۳	۴۹/۰۴	۸۹/۰۵۱	<۰/۰۰۱
شاهد						
تحت	-۰/۳۲	۴/۴۱	۰/۹۹۷	۱۱/۴	۸۹/۰۵۱	۰/۹۹۱
درمان	۱۳/۰۶	۴/۴۱	۰/۰۲	-۴۳۰	۸۹/۰۵۱	<۰/۰۰۱
شاهد						

سیستم‌های پاک‌سازی کننده و یا کاهش سطح عوامل آنتی اکسیدان باشد (۲۱).

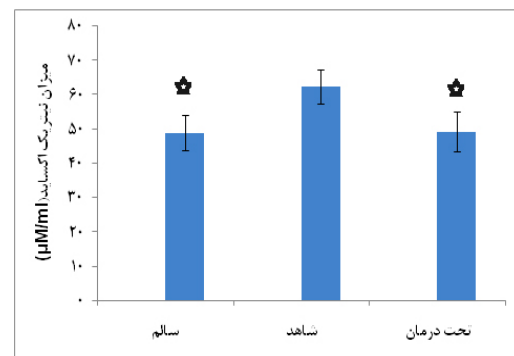
بر اساس بررسی‌های انجام شده متناسب با پیشرفت بیماری فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان از قبیل سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز در گویچه‌های سرخ بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروز و موش‌های مبتلا به EAE کاهش می‌یابد (۸ و ۲۲). کاهش فعالیت کاتالاز در گویچه‌های سرخ، کاهش میزان گلوتاتیون بافتی و ظرفیت تام آنتی اکسیدانی سرم یک واقعه اولیه در شروع EAE می‌باشد (۸).

نشان داده شده است که الیگودندروسیت‌ها نسبت به آستروسیت‌ها و میکروگلیال‌ها به استرس‌های اکسیداتیو و یا نیتراتیوی به علت کمتر بودن ظرفیت دفاع آنتی اکسیدانی در *in vitro* حساسیت بیشتری را نشان می‌دهند. استرس‌های اکسیداتیو و یا نیتراتیو ممکن است به مرگ انتخابی و حذف الیگودندروسیت و در نتیجه دمیالیناسیون در شرایط *in vivo* منتهی گردد (۶). گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن و یا نیتروژن، همچنین ممکن است که منجر به آسیب غلاف میلین شده و زمینه پیشبرد حمله توسط سلول‌های ماکروفاژ/میکروگلیال را فراهم دارند (۶).

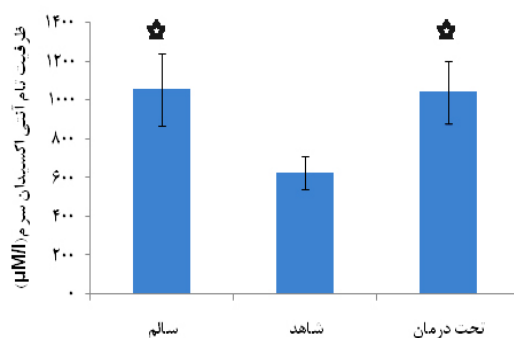
نیتریک اکسید به سرعت موجب مهار سیتوکروم c اکسیداز شده و بدین ترتیب در زنجیره تنفسی اختلال ایجاد می‌نماید. نیتریک اکسید و رادیکال‌های سوپراکسید با یکدیگر ترکیب شده و پراکسی نیتريت را می‌دهند که رادیکال یادشده هم پس از شکست به رادیکال‌های شدیداً واکنش پذیر هیدروکسیل و دی اکسید نیتروژن تبدیل می‌گردند (۲۳). پراکسی نیتريت و سایر گونه‌های واکنش پذیر NO دارای اثرات سمی بر روی نرون‌ها، آکسون‌ها و سلول‌های گلیال بوده و موجب القای آپوپتوز (Apoptosis) در آنها می‌گردند (۲۴). NO به صورت غیر مستقیم و از طریق القای آزاد شدن گلوتامات به وسیله میکروگلیال‌ها و ماکروفاژها منجر به ایجاد آسیب می‌گردد (۲۴). نقش NO در ایجاد بیماری MS با مشاهده واحدهای نیتروکسین در سلول‌های پلاک‌های مغزی بیماران MS ثابت شده است



نمودار ۱- میانگین شاخص تجمع بیماری بین موش‌های مبتلا به EAE و مبتلا به EAE و تحت درمان با ATRA*. نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($p < 0.01$) نسبت به گروه شاهد می‌باشد. (هر دایره نمودار یک موش می‌باشد. هر خط تیره نیز میانگین شاخص مزبور را در آن گروه مشخص می‌نماید).



نمودار ۲- میانگین تولید نیتریک اکسید در مایع رویی کشت سلول‌های طحال. * نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($p < 0.05$) نسبت به گروه شاهد می‌باشد.



نمودار ۳- میانگین ظرفیت تام آنتی اکسیدان سرم. * نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($p < 0.01$) نسبت به گروه شاهد می‌باشد.

بر دخالت مستقیم و اولیه استرس‌های اکسیداتیو در اختلالات التهابی و استحال‌ای بافت عصبی از قبیل اسکلروز متعدد وجود دارد (۷ و ۶). این احتمال نیز مطرح است که افزایش رادیکال‌های آزاد در این بیماران ناشی از اختلال در

(۱۰ و ۳۰). اینترفرون گاما عامل اصلی القای تولید نیتریک اکسید توسط سلول‌های ماکروفاژ/میکروگلیال می‌باشد. مطالعات گذشته موید نقش ATRA در کاهش تولید اینترفرون گاما بوده است (۱۱ و ۳۱).

به طور جالب توجهی نشان داده شده است که در شرایط آزمایشگاهی RA موجب تشدید فعالیت $INF\beta-1b$ در مهار فعالیت سلول‌های $CD8+$ اختصاصی پادگن‌های میلینی شده است (۳۲).

در مطالعه‌ای که اخیراً انجام شده است، نقش درمان با ATRA در کاهش تولید سایتوکاین‌های التهابی IL-17 (عامل شکست BBB از طریق ایجاد رادیکال‌های آزاد) و $IFN-\gamma$ (عامل اصلی القای تولید NO و فعال سازی سلول‌های ماکروفاژ/میکروگلیال) در موش‌های مبتلا به EAE نشان داده شده است (۳۱). در این پژوهش نیز ما اثرات مفید درمان با ATRA پس از بروز علائم بیماری در کاهش تولید NO و بهبود ظرفیت آنتی اکسیدانی را مشخص نمودیم. بنابراین ممکن است که افزودن ترکیب آنتی اکسیدان و تعدیل کننده ایمنی ATRA به رژیم درمانی مبتلایان به MS دارای اثرات سودمند و ارزنده‌ای باشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله بخشی از پایان نامه آقای اصغر مروایندی در مقطع کارشناسی ارشد ایمنی‌شناسی به راهنمایی آقای دکتر نوروز دلیرز در سال ۱۳۹۱ و کد ۵۱۰-۲-ک می باشد که با حمایت دانشگاه ارومیه اجرا شده است.

نگارندگان از زحمات مجموعه کارکنان پژوهشکده زیست فناوری و دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه کمال تقدیر و تشکر را دارند.

منابع

1. Goldenberg MM. Multiple sclerosis review. P T. 2012 Mar; 37(3):175-84.
2. Vosoughi R, Freedman MS. Therapy of MS. Clin Neurol Neurosurg. 2010 Jun; 112(5): 365-85.
3. Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune

(۲۵). ذکر این نکته لازم به نظر می رسد که پروفایل سایتوکاینی تولید شده توسط سلول‌های طحالی به خوبی نمایانگر تولید همین پروفایل در بافت عصبی می‌باشد (۵).

فعالیت آنتی اکسیدانی مشتقات ویتامین آ به وسیله زنجیره آب گریز پلی ان موجود در ساختار آن‌ها اعمال می‌گردد. این زنجیره قابلیت جمع آوری اکسیژن نوزاد، خنثی سازی رادیکال‌های $Thyil$ ، و تثبیت رادیکال‌های پیروکسیل را در فشار معمول اکسیژن در بافت‌ها دارا می‌باشد (۹). گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن موجب افزایش نفوذپذیری سد خونی مغزی شده و موجب پیشبرد نفوذ سلول‌ها به بافت عصبی می‌گردند. عامل اصلی در شکست سد خونی مغزی سایتوکاین IL-17 می‌باشد. ساز و کار IL-17 در پیشبرد شکست سد خونی مغزی، ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن در سلول‌های اندوتلیال مغزی می‌باشد (۲۶). بنابراین این احتمال مطرح می‌گردد که حضور عوامل آنتی اکسیدان از قبیل ATRA از این طریق در ممانعت از شکست سد خونی مغزی نیز موثر واقع شوند. القای بیان مولکول‌هایی از قبیل سوپر اکسید دیسموتاز (و گلووتاتیون که به دنبال تیمار سلول‌ها با مشتقات اسید رتینوئیک گزارش شده است، ممکن است که توجه کننده بخش از اثرات آنتی اکسیدانی منتسب به رتینوئیدها باشد (۲۷ و ۲۸). از طرف دیگر مشتقات اسید رتینوئیک از طریق کاهش تولید نیتریک اکسید و پاسخ‌های التهابی نیز ممکن است که در کاهش آسیب‌های اکسیداتیو موثر واقع شوند (۲۹). گزارش شده است که ATRA از طریق ممانعت از تخلیه ذخایر گلووتاتیون موجب حفاظت نرون‌های جنینی در برابر آسیب‌های اکسیداتیو و آپوپتوز ناشی از آن می‌گردد (۲۸). اسید رتینوئیک در کشت اولیه سلول‌های هیپوکامپ از طریق ممانعت از کاهش سطوح سوپر اکسید دیسموتاز حاوی مس و روی ($SOD-1$) و سوپر اکسید دیسموتاز حاوی منگنز ($MnSOD2$) موجب حفاظت آن‌ها در برابر آسیب‌های اکسیداتیو گردیده است (۱۰). بر اساس برخی از تحقیقات اسید رتینوئیک ممکن است که در بیماری آلزایمر نیز دارای اثرات سودمندی باشد

production correlates with improved disease course. *J Immunol.* 1995 Jan 1; 154(1):450-8.

17. Mosayebi G, Ghazavi A, Salehi H, Payani MA, Khazae MR. Effect of sesame oil on the inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Pak J Biol Sci.* 2007 Jun 1;10(11):1790-6.

18. Kinoshita K, Yoo BS, Nozaki Y, Sugiyama M, Ikoma S, Ohno M, et al. Retinoic acid reduces autoimmune renal injury and increases survival in NZB/W F1 mice. *J Immunol.* 2003 Jun 1;170(11):5703-8.

19. Van YH, Lee WH, Ortiz S, Lee MH, Qin HJ, Liu CP. All-trans retinoic acid inhibits type 1 diabetes by T regulatory (Treg)-dependent suppression of interferon-gamma-producing T-cells without affecting Th17 cells. *Diabetes.* 2009 Jan; 58(1):146-5.

20. Stuve O, Youssef S, Weber MS, Nessler S, von Budingen HC, Hemmer B, et al. Immunomodulatory synergy by combination of atorvastatin and glatiramer acetate in treatment of CNS autoimmunity. *J Clin Invest.* 2006 Apr;116(4):1037-44.

21. Neuhaus O, Hartung HP. Evaluation of atorvastatin and simvastatin for treatment of multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother.* 2007 May; 7(5):547-56.

22. Koch M, Ramsaransing GS, Arutjunyan AV, Stepanov M, Teelken A, Heersema DJ, et al. Oxidative stress in serum and peripheral blood leukocytes in patients with different disease courses of multiple sclerosis. *J Neurol.* 2006 Apr;253(4):483-7.

23. Sasaoka T. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: friend and foe. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2012 Jul; 39(7):597-8.

24. Herz J, Zipp F, Siffrin V. Neurodegeneration in autoimmune CNS inflammation. *Exp Neurol.* 2010 Sep; 225(1):9-17.

25. Xiao BG, Ma CG, Xu LY, Link H, Lu CZ. IL-12/IFN-gamma/NO axis plays critical role in development of Th1-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol Immunol.* 2008 Feb; 45(4):1191-6.

26. Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. *Scand J Immunol.* 2011 Jul;74(1):1-13.

27. Kiningham KK, Cardozo ZA, Cook C, Cole MP, Stewart JC, Tassone M, et al. All-trans-retinoic acid induces manganese superoxide dismutase in human neuroblastoma through NF-kappaB. *Free Radic Biol Med.* 2008 Apr 15; 44(8):1610-6.

28. Crockett S, Clarke M, Reeves S, Sims B. Cystine glutamate exchanger upregulation by retinoic acid induces neuroprotection in neural stem cells. *Neuroreport.* 2011 Aug 24; 22(12):598-602.

29. Oseto S, Moriyama T, Kawada N, Nagatoya K,

encephalomyelitis research. *Brain.* 2006 Aug; 129 (Pt 8):1953-71.

4. Comabella M, Khoury SJ. Immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Clin Immunol.* 2012 Jan; 142(1): 2-8.

5. Kuerten S, Lehmann PV. The immune pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis: lessons learned for multiple sclerosis? *J Interferon Cytokine Res.* 2011 Dec; 31(12):907-16.

6. Mao P, Reddy PH. Is multiple sclerosis a mitochondrial disease? *Biochim Biophys Acta.* 2010 Jan; 1802(1): 66-79.

7. Sayre LM, Perry G, Smith MA. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol.* 2008 Jan; 21(1):172-88.

8. Zargari M, Allameh A, Sanati MH, Tiraihi T, Lavasani S, Emadyan O. Relationship between the clinical scoring and demyelination in central nervous system with total antioxidant capacity of plasma during experimental autoimmune encephalomyelitis development in mice. *Neurosci Lett.* 2007 Jan 22; 412(1): 24-8.

9. Palace VP, Khaper N, Qin Q, Singal PK. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radic Biol Med.* 1999 Mar; 26(5-6):746-61.

10. Lee HP, Casadesus G, Zhu X, Lee HG, Perry G, Smith MA, et al. All-trans retinoic acid as a novel therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother.* 2009 Nov; 9(11):1615-21.

11. Nozaki Y, Yamagata T, Sugiyama M, Ikoma S, Kinoshita K, Funauchi M. Anti-inflammatory effect of all-trans-retinoic acid in inflammatory arthritis. *Clin Immunol.* 2006 Jun; 119(3): 272-9.

12. Osanai M, Nishikiori N, Murata M, Chiba H, Kojima T, Sawada N. Cellular retinoic acid bioavailability determines epithelial integrity: Role of retinoic acid receptor alpha agonists in colitis. *Mol Pharmacol.* 2007 Jan; 71(1):250-8.

13. Zunino SJ, Storms DH, Stephensen CB. Diets rich in polyphenols and vitamin A inhibit the development of type I autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Nutr.* 2007 May; 137(5):1216-21.

14. Ohyanagi N, Ishido M, Suzuki F, Kaneko K, Kubota T, Miyasaka N, et al. Retinoid ameliorates experimental autoimmune myositis, with modulation of Th cell differentiation and antibody production in vivo. *Arthritis Rheum.* 2009 Oct; 60(10):3118-27.

15. Escribese MM, Conde E, Martin A, Saenz-Morales D, Sancho D, Perez de Lema G, et al. Therapeutic effect of all-trans-retinoic acid (at-RA) on an autoimmune nephritis experimental model: role of the VLA-4 integrin. *BMC Nephrol.* 2007; (8):3.

16. Racke MK, Burnett D, Pak SH, Albert PS, Cannella B, Raine CS, et al. Retinoid treatment of experimental allergic encephalomyelitis. IL-4

Takeji M, Ando A, et al. Therapeutic effect of all-trans retinoic acid on rats with anti-GBM antibody glomerulonephritis. *Kidney Int.* 2003 Oct; 64(4):1241-52.

30. Zhu X, Perry G, Moreira PI, Aliev G, Cash AD, Hirai K, et al. Mitochondrial abnormalities and oxidative imbalance in Alzheimer disease. *J Alzheimers Dis.* 2006 Jul; 9(2):147-53.

31. Abtahi F. SM, delirez N, Hobbenaghi R, Mosayebi G. Therapeutic effects of all-trans retinoic acid on experimental autoimmune encephalomyelitis and its role in T-helper lymphocyte responses. *Tehran University Medical Journal.* 2011; 69(11):710-7 [persian].

32. Pino-Lagos K, Benson MJ, Noelle RJ. Retinoic acid in the immune system. *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Nov; 1143:170-87.

The effects of All-Trans Retinoic Acid on clinical symptoms, nitric oxide levels and total antioxidant capacity of plasma in mouse model of multiple sclerosis

Asghar Morvaridi, MSc, Immunology, Department of Microbiology, Veterinary Faculty, Urmia University, Urmia, Iran. amorvaridi@yahoo.com

Norouz Delirez, PhD, Assistant Professor of Immunology, Department of Microbiology, Veterinary Faculty, Urmia University, Urmia, Iran. n.delirez@urmia.ac.ir

Rahim Hobbenaghi, PhD, Associate Professor of Pathobiology, Department of Pathobiology, Veterinary Faculty, Urmia University, Urmia, Iran. r.hobbenaghi@urmia.ac.ir

***Seyyed Meysam Abtahi Froushani**, PhD, Assistant Professor of Immunology, Department of Microbiology, Veterinary Faculty, Urmia University, Urmia, Iran. (*Corresponding Author). meysamabtahi@hotmail.com

Hassan Malekinejad, PhD, Associate Professor of Pharmacology, Department of Basic science, Veterinary Faculty, Urmia University, Urmia, Iran. hassanmalekinejad@yahoo.com

Abstract

Background: In recent years, increasing evidence suggest that free radicals plays an important role in the pathogenesis of multiple sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE), an animal model of multiple sclerosis. Therefore, All-Trans Retinoic Acid (ATRA) as an antioxidant may be effective in ameliorating disease severity.

Methods: The present research is an experimental-interventional study. EAE was induced by immunization of female C57BL/6 mice with MOG35-55 peptide and complete Freund's adjuvant. EAE mice were placed in two therapeutic groups (n=7 per group). Also, 7 mice served as normal (non-EAE) controls. Treatment with ATRA (25mg/Kg-every other day) was initiated in treatment group at day 12 when the treatment group developed a disability score. EAE control received vehicle alone with same schedule. Signs of disease were recorded daily until the day 33 when mice were sacrificed. Then, the levels of nitric oxide in spleen cell culture supernatant and total antioxidant capacity of plasma in mice were evaluated.

Results: ATRA significantly alleviated the clinical signs of established EAE. Upon antigen-specific re-stimulation of splenocytes, nitric oxide production was significantly reduced in TRA-treated group and reached in the range of normal mice. In addition, reduction in antioxidant capacity of serum in ATRA-treated EAE mice was prevented.

Conclusions: At least part of the beneficial effects of ATRA in the treatment of EAE may be done by suppressing nitric oxide levels and improving antioxidant defense potential.

Keywords: Multiple sclerosis, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, All-Trans Retinoic Acid, Antioxidant capacity, Nitric oxide.