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

اصغر مرواریدی: 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 دریافت: ۹۱/۵/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۳۰

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 MOG35-55 و ادجوانت کامل فروند Freund's (adjuvant)، در موش های ماده C57BL/6 القاء شد. سپس موش های 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

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 درمان های یاد شده پاسخ نمی‌دهند، به طوری که مقوله درمان و جلوگیری از پیشرفت بیماری همچنان به عنوان یک چالش پیش رو مطرح می‌باشد. بنابراین دست یابی به روش های درمانی کم خطر و ارزان قیمت جهت افزودن به رژیم درمانی مبتلایان به اسکلروز متعدد لازم به نظر می رسد (۱و۲). در این بین آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی (EAE) به عنوان مدل جانوری بیماری اسکلروز متعدد فرصت مناسبی را جهت ارزیابی اولیه فراورده های دارویی جدید فراهم نموده است (۳).

هردو بیماری MS و EAE داری یک ماهیت خود التهابی می‌باشند (۴و ۵). غلظت گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن و یا نیتروژن (سوپراکسید، نیتریک اکسید و پراکسی نیتریت) در شرایطی از قبیل التهاب می تواند به حدی افزایش یابد که بر سازوکارهای ذاتی آنتی اکسیدانی موجود غلبه نماید. چنین استرس های اکسیداتیو و یا نیتراتیوی موجب تخریب اجزای حیاتی سلول از قبیل لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA و بالاخص DNA

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-07]

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 علایم درمانگاهی EAE، اثرات آن بر روی تولید نیتریک اکسید (NO=Nitric Oxide) در مایع رویی کشت سلول‌های طحالی و همچنین ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی 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 می باشد که از انستیتو پاستور ایران خریداری شده 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 ۲۰۰ µg 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 ۱۰۰µL بافر فسفات سالین (Phosphate Buffered Saline) و ۱۰۰µL ادجوانت فروند کامل (شرکت Sigma-آمریکا) مخلوط و به صورت زیر جلدی در ناحیه پشت هر موش تزریق گردید. مقدار ۴۰۰ng سم سیاه سرفه (شرکت Sigma-آمریکا) نیز در حجم۳۰۰µl PBS در روز تزریق پپتید و ۴۸ ساعت بعد به صورت داخل صفاقی تزریق گردید (۱۷). روند بیماری و تغییرات وزن موش ها 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 موش های مبتلا به EAE با آل ترانس رتینوئیک اسید: ۱۴ رأس موش پس از القاء بیماری به دو گروه ۷رأسی با شرایط سنی و وزنی یکسان تقسیم شده، تا ۲۱ روز پس از بروز علایم درمانگاهی به شرح زیر تحت درمان قرار گرفتند:

گروه تحت درمان: استوک ATRA (شرکت Sigma-آمریکا) به میزان ۰/۴ mg/ml در PBS حاوی ۲٪ DMSO (Dimethyl Sulfoxide) حل گردید. پس از تقسیم دارو در لوله های کرایو به میزان مورد نیاز جهت تزریق در هر نوبت، اقدام به فریز کردن دارو در ۲۰- 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 (۵۰۰ µg به ازای هر رأس) پس از بروز اولین علایم درمانگاهی (۱۲روز پس از القاء بیماری) در همه موش‌های گروه مطالعه به

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-07]

صورت داخل صفاقی گردید. انتخاب دوز تزریقی بر مبنای مطالعات گذشته بر روی سایر مدل های بیماری خود ایمن صورت گرفته است (۱۱, ۱۸و 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 موش ها تحت شرایط استریل خارج و بعد از قطعه قطعه شدن در ۵ml محیط کشت RPMI-1640 (شرکت Sigma-آمریکا) حاوی ۱۰٪ FBS (Fetal Bovine Serum) (شرکتGibco -آلمان) له گردید. بافت حاصل جهت تهیه سوسپانسیون سلولی از توری سیمی به قطر ۰/۲ میلی متر عبور داده شد. پس از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰g، به منظور حذف RBC ها، بر روی رسوب سلولی به دست آمده ۵ ml بافر لیز کننده (کلرید آمونیوم: ۰/۱۵M، بی‌کربنات پتاسیم: ۱۰mM و EDTA (EthylenediaminetetraaceticAcid): ۰/۱ mM؛ pH: ۷/۲) افزوده شد. بعد از ۵ دقیقه ضمن افزودن ۱۰ml محیط کشت بار دیگر به مدت ده دقیقه در ۲۰۰g 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 cell/ml ۱۰۶ ×۲ از آن تهیه شد. این سلول‌ها در پلت های کشت ۲۴ خانه در حضور پپتید MOG33-55 با غلظت ۵۰ µg/ml به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور حاوی ۵٪ CO2 کشت داده شدند. پس از طی این مدت مایع رویی آن‌ها جمع آوری شد.

اندازه‌گیری نیتریک اکسید: میزان تولید نیتریک اکسید توسط روش رنگ سنجی گریس (Griess) و استفاده از منحنی استاندارد نیتریت سدیم تعیین گردید. به طور خلاصه، ۱۰۰µL از مایع رویی کشت سلول‌های طحال به صورت دوتایی به داخل چاهک‌های پلت ۹۶ خانه‌ای ته تخت ریخته شد. سپس ۱۰۰ µL 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 ۱۰۰µL از محلول ۱ درصد N-۱-۱نفتیل 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 ۵۳۰ نانومتر توسط دستگاه الایزانگار قرائت گردید. هم‌زمان با استفاده از غلظت های مختلف نیتریت سدیم منحنی استاندارد ترسیم شده و از طریق رگرسیون و معادله خطی، غلظت نیتریت موجود در نمونه‌ها تعیین گردید.

اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدان تام سرم: قبل از خارج نمودن طحال موش‌ها، اقدام به خون گیری از قلب و جداسازی سرم آن ها گردید. برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی از شیوه FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) استفاده شد. در ابتدا با استفاده از اسیدکلریدریک ۴۰mM، محلول ۱۰mM 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. ۱/۵ml از معرف به ۵۰µL از نمونه ها افزوده شد. نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس نگاه داری شدند و سپس جذب نوری آن ها در ۵۹۳ نانومتر قرائت گردید. جهت ترسیم منحنی استاندارد از غلظت های 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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-07]

شد. جهت مقایسه سایر داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و Tukey's test به کار گرفته شد. در تمام بررسی‌ها $p<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد. کلیه بررسی های 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 Mean±SD گزارش گردید.

یافته‌ها

بر اساس نتایج به دست آمده میانگین شدت ناتوانی نورولوژیک در طول دوره درمان در موش های تحت درمان با ATRA (۰/۱۵± ۳/۲) نسبت به گروه شاهد (۰/۱۱± ۴/۱۴) کمتر می باشد ($p<۰/۰۰۱$). میانگین حداکثر شدت بیماری نیز در گروه موش‌های شاهد (۰/۱۸± ۵/۸) در مقایسه با موش های تحت درمان (۰/۱۹± ۴/۶۸) کمتر بود ($p<۰/۰۵$). ارزیابی شاخص تجمعی 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 می دهد (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 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

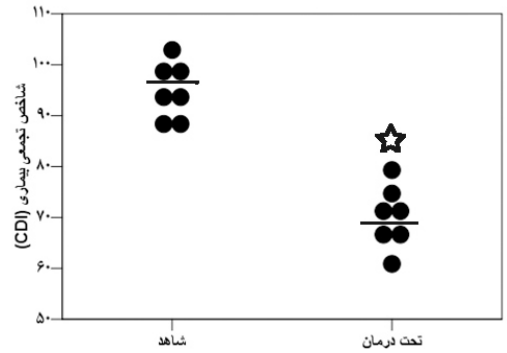
درمان بیماری‌های خود ایمن به طور معمول پس از بروز علایم درمانگاهی صورت می‌پذیرد (۲۰). در این مطالعه نیز به منظور ارزیابی توان درمانی ترکیبات مد نظر، تجویز دارو پس از بروز علائم ناتوانی نورولوژیک در تمامی موش‌های گروه درمانی صورت گرفته است (روز ۱۲ پس از القای EAE). نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که در 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 اسکلروز متعدد میزان رادیکال‌های آزاد و نیتریک اکسید و به تبع آن میزان پراکسیداسیون چربی‌ها افزایش می‌یابد (۷). بر خلاف سایر بیماری‌ها که عمدتاً استرس‌های اکسیداتیو یک نقش ثانویه و یا جانبی را در بیماری زایی بیماری ایفا می‌نمایند، شواهدی دال

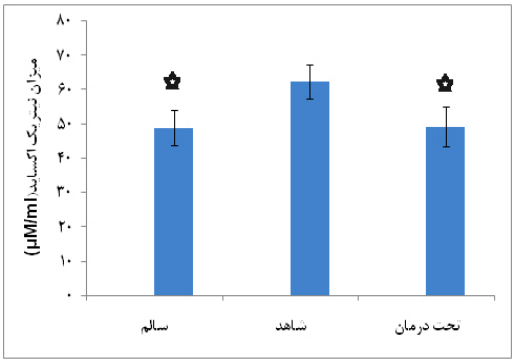
جدول ۱- نتایج حاصل از تحلیل واریانس در مورد سطح نیتریک اکساید مایع رویی کشت سلول‌های طحال و ظرفیت تام آنتی اکسیدان سرم.

		سطح نیتریک اکساید مایع رویی کشت طحال			ظرفیت تام آنتی اکسیدان سرم		
گروه		اختلاف از میانگین	خطای استاندارد	P. value	اختلاف از میانگین	خطای استاندارد	p. value
سالم	شاهد	-۱۳/۳۸	۴/۶۰	۰/۰۳	۴۹۰/۴	۸۹/۰۵۱	<۰/۰۰۱
	تحت	-۰/۳۲	۴/۴۱	۰/۹۹۷	۱۱/۴	۸۹/۰۵۱	۰/۹۹۱
شاهد	درمان	۱۳/۰۶	۴/۴۱	۰/۰۲	-۴۳۰	۸۹/۰۵۱	<۰/۰۰۱

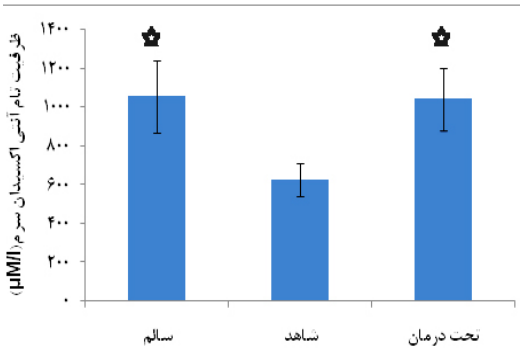
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-07]



نمودار ۱- میانگین شاخص تجمعی بیماری بین موش‌های مبتلا به EAE و مبتلا به EAE و تحت درمان با ATRA.*نشان دهنده اختلاف معنی‌دار (p<0/۰۰۱) 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 معنی دار (p<۰/۰۵) نسبت به گروه شاهد می‌باشد.



نمودار ۳- میانگین ظرفیت تام آنتی اکسیدان سرم. *نشان دهنده اختلاف معنی دار (p<۰/۰۰۱) نسبت به گروه شاهد می‌باشد.

بر دخالت مستقیم و اولیه استرس‌های اکسیداتیو در اختلالات التهابی و استحاله‌ای بافت عصبی از قبیل اسکلروز متعدد وجود دارد (۶و۷). این احتمال نیز مطرح است که افزایش رادیکال‌های آزاد در این بیماران ناشی از اختلال در 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 گویچه های سرخ بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروز و موش‌های مبتلا به EAE کاهش می‌یابد (۸و ۲۲). کاهش فعالیت کاتالاز در گویچه های 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 دمیلیناسیون 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 اخلال ایجاد می‌نماید. نیتریک اکسید و رادیکال‌های سوپراکسید با یکدیگر ترکیب شده و پراکسی نیتریت را می‌دهند که رادیکال یادشده هم پس از شکست به رادیکال‌های شدیداً واکنش پذیر هیدروکسیل و دی اکسید نیتروژن تبدیل می‌گردند (۲۳). پراکسی نیتریت 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 نیتروتیروزین در سلول‌های پلاک‌های مغزی بیماران MS ثابت شده است

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-07]

(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 گلوتاتیون که به دنبال تیمار سلول‌ها با مشتقات اسید رتینوئیک گزارش شده است، ممکن است که توجیه کننده بخش از اثرات آنتی اکسیدانی منتسب به رتینوئیدها باشد (۲۷و۲۸). 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 گلوتاتیون 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 (۱۰و 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 (۱۱و۳۱).

به طور جالب توجهی نشان داده شده است که در شرایط آزمایشگاهی RA موجب تشدید فعالیت INFβ-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-γ(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 مرواریدی در مقطع کارشناسی ارشد ایمنی‌شناسی به راهنمایی آقای دکتر نوروز دلیرژ در سال ۱۳۹۱ و کد ۵۱۰-۲-ک می باشد که باحمایت 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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-07]

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. Antioxidantpotentials 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 experimentalallergic encephalomyelitis. IL-4 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):146-5.٥

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,

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-07]

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, delirezh 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.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-07]

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 Delirezh, PhD, Assistant Professor of Immunology, Department of Microbiology, Veterinary Faculty, Urmia University, Urmia, Iran. n.delirezh@urmia.ac.ir
Rahim Hobbenaghi, PhD, Associate Professor of Pathology, 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.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-07]