Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی سلول و بافت
جلد ۱، شماره ۲، زمستان ۱۳۸۹، ۴۵-۳۷

تاثیر ترکیب زهر زنبور عسل و ویتامین B_{12} روی فرایند گلیوزیس در ساقه مغز رت های مبتلا به انسفالومیلیت آلرژیک تجربی- مدل حیوانی مالتی پل اسکلروزیس

اکبر کریمی دانشجوی Ph.D.[1*]، کاظم پریور Ph.D.[1]، محمد نبیونی Ph.D.[2]،
سعید حقیقی Ph.D.[3]، سهراب ایمانی Ph.D.[4]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران
۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت معلم تهران
۳- دانشکده داروسازی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی
۴- گروه سم شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: Karimiakbar38@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۲/۷ /۱۳۸۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱/۲۱

چکیده

هدف: با توجه به نقش ویتامین B_{12} در تنظیم واکنشهای ایمنی در این مطالعه به عنوان یک عامل کمکی همراه با زهر زنبور عسل برای کاهش التهاب استفاده شد. این مطالعه برای بررسی اثر زهر زنبور عسل و ویتامین B_{12} روی التهاب و گلیوزیز در رتهای همراه با انسفالومیلیت آلرژیک انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: ترکیب هموژنه نخاع خوکچه هندی به همراه ادجوانت کامل فروند برای القاء انسفالومیلیت در رت‌های لویس جهت ایجاد یک مدل از بیماری مالتی پل اسکلروزیز استفاده شد. بیماری در ۴۰ رت القاء شد و آنها به طور تصادفی در ۴ گروه قرار گرفتند و با زهر زنبورعسل و ویتامین B_{12} درمان شدند. درمان از روز بعد از القاء بیماری به وسیله GPSCH آغاز وبه مدت ۱۰ روز طول کشید. روش ایمنو هیستوشیمی برای بررسی پروتئین اسیدی رشته‌ای گلیالی و از روش الایزا برای بررسی میزان تومور نکروزیز فاکتور- آلفا در سرم رت‌ها استفاده شد.

نتایج : درمان با زهر زنبور عسل و ویتامین B_{12}، نشانه‌های بد کلینیکی، سطح سرمی تومور نکروزیز فاکتور - آلفا و فرایند گلیوزیس در رتهای لویس القاء شده با ترکیب نخاع تازه خوکچه هندی را کاهش داد.

نتیجه گیری: ترکیب زهر زنبور عسل و ویتامین B_{12} به خاطر ممانعت از فعالیت‌های سلول‌های T خود واکنشگر، دارای خاصیت ضد التهابی بوده و آسیب به سیستم عصب مرکزی و گلیوزیز را کاهش می‌دهد.

کلمات کلیدی: زهر زنبور عسل، انسفالومیلیت آلرژیک تجربی، گلیوزیس، مالتی پل اسکلروزیس، ویتامین B_{12}

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

مالتی پل اسکلروزیس(MS) یک بیماری التهابی مزمن می‌باشد که در آن ماده سفید سیستم عصبی مرکزی توسط سلولهای التهابی وT فعال شده مورد هدف قرار می‌گیرد و با نشانه‌هائی شامل: التهاب، میلین زدایی و از بین رفتن اعمال نورولوژیک و افزایش فعالیت آستروسیت ها (گلیوزیس) مشخص می‌شود (۱). انسفالومیلیت آلرژیک تجربی (EAE) بعنوان یک مدل حیوانی با ارزش برای بیماری MS در نظر گرفته می‌شود و دانشمندان از آن جهت ارزیابی روند بیماری و فرایند درمانی استفاده می‌کنند (۲). EAE در حیوانات توسط تزریق بافت سیستم عصب مرکزی و یا برخی از پروتئین‌های ویژه میلین گونه جانوری دیگر مثل، Myelin Basic Protein (MBP) و یا Myelin oligodendrocyte Glycoprotein (MOG) همراه با ادجوانت ایجاد می‌شود. در EAE نشانه‌هایی شامل فلج، التهاب، نواحی میلین زدایی شده در ماده سفید سیستم عصبی مرکزی، آسیب به سد خونی– مغزی، نفوذ سلولهای T (CD4+) و ماکروفاژها به سیستم عصبی مرکزی وگلیوزیس دیده می‌شود (۳). میکروگلیاها و آستروسیتها نقش خود را در ایجاد بیماری با ترشح کردن ملکولهایی به عنوان واسطه‌های تخریب کننده بافتی انجام می‌دهند (۴).

در بررسی بیماری MS و مدل حیوانی آن یعنی EAE بیومارکرهایی را در نظر می‌گیرند. یکی از این بیومارکرها پروتئین اسیدی رشته‌ای گلیالی(GFAP) می‌باشد که به عنوان مارکر آستروسیتها بوده و برای ارزیابی یکی از وقایع بیماری که همانا روند گلیوزیس می‌باشد استفاده می‌شود (۵). آستروسیتها و میکروگلیاها در سیستم عصب مرکزی بعد از EAE و MS فعال شده و گلیوزیس بوجود می‌آید و فرایند التهاب در این زمینه نقش بسیار مهمی ایفا می‌کند(۶).

زهر زنبور عسل (*Apis melifera*) شامل انواع متفاوتی از پپتیدها با وزن ملکولی سبک و سنگین و پروتئینهایی شامل آپامین، آدولاپین، فسفو لیپاز A2 می‌باشد. بعلاوه اینکه شامل آمین‌های فعال بیولوژی (هیستامین، اپی نفرین) و چندین نوع ترکیب غیر پپتیدی مشتمل بر لیپیدها، کربوهیدراتها و اسیدهای آمینه آزاد می‌باشد(۷). ملیتین و فسفولیپاز A2 دو ترکیب عمده زهر زنبور عسل می‌باشند که عمدتا نقش مهمی در القاء و شروع واکنشهای آلرژیک مرتبط با نیش زنبور ایفا می‌کنند (۸). زهر زنبور درمانی به طور گسترده‌ای در درمان بیماریهای ضد التهابی مزمن موثر است(۹). همچنین ویژگیهای ضد التهابی کل زهر زنبور عسل در مدل رت دارای آرتریت القاء شده، گزارش شده است و در آن دیده شده است که تزریق زهر زنبور عسل موجب سرکوب لوکوسیت‌ها و کاهش غلظت تومور نکروزیز فاکتور-آلفا (TNF-a) می‌شود(۷).

التهاب مزمن اغلب با استرس‌های اکسیداتیو همراه بوده و زمینه ساز بسیاری از بیماریهای وابسته به سن شامل سرطان، آترواسکلروزیس، بیماریهای همراه با تخریب سیستم عصبی و آرتریت می‌باشد مشاهدات جدید پیشنهاد می‌کند که کوبالامین‌ها (مشتقات ویتامین B_{12}) ممکن است پاسخ‌های استرس اکسیداتیو را مدوله کند. بیماریهای التهابی با افزایش سطوح ترانس کوبالامین‌ها همراه هستند. غلظت کوبالامین‌ها سطوح TNF-a را در مایع مغزی نخاعی مدوله می‌کند. TNF-a در پاسخ‌های التهابی مهم می‌باشند و پیشنهاد شده که افزایش کوبالامین می‌تواند به عنوان مکمل در پاسخ‌های سلولی به التهاب، مورد استفاده قرار گیرد(۱۰). فعالیتهای میلین زدایی و التهابی در بیماران MS با احیای مجدد میلین همراه است و به مصرف ویتامین B_{12} می‌انجامد(۱۱).

از آنجایی که در طی EAE و ادامه روند التهاب، فعالیت آستروسیت‌ها و نهایتا گلیوزیس افزایش پیدا می‌کند ما در این مطالعه از خاصیت ضد التهابی زهر زنبور عسل و ویتامین B_{12} استفاده کرده و اثرات آن را روی فعالیت آستروسیت‌ها و روند گلیوزیس بررسی نمودیم تا ببینیم که این ترکیب درمانی تا چه اندازه می‌تواند جلوی یکی از مهمترین وقایع بیماری زایی EAE را بگیرد تا در آینده از آن به عنوان ترکیب درمانی جهت درمان MS استفاده شود.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی جهت ایجاد مدل EAE ازروش Schnider وهمکارانش(۱۲) استفاده شد. برای این منظور پس از تهیه ترکیب هموژنه نخاع خوکچه هندی (GPSCH) آن را به نسبت ۱به ۱ با ادجوانت کامل فروند (CFA) مخلوط کرده تا امولوسیونی از نخاع خوکچه هندی و ادجوانت کامل فروند (GPSCH-CFA) تهیه شد. با تزریق آن به رت‌های لوئیس EAE در آنها القا گردید.

رت‌های لوئیس استفاده شده خالص بوده و در مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی شرکت کارخانجات دارو پخش

www.SID.ir

Archive of SID

تهران نگهداری می‌شدند. حیوانات دسترسی آزادانه به آب و غذا داشته و کلیه شرایط نگهداری آنها استاندارد و مطابق با کتاب راهنمای نگهداری و مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انتشار یافته توسط (National Academy Press Washington , D.C , 1996) بود.

دارو درمانی: EAE در ۴۰ رت القاء شد و سپس به صورت تصادفی در ۴ گروه ۱۰ تایی به شرح ذیل تقسیم شدند:

گروه ۱: تحت عنوان گروه E-S نامگذاری شدند و روزانه نرمال سالین را به صورت داخل صفاقی دریافت می‌کردند.

گروه ۲: تحت عنوان E-B_{12} نامگذاری شدند و یک روز در میان ویتامین B_{12} را به میزان mg/kg ۱۵دریافت می‌کردند(۱۳) .

گروه ۳: تحت عنوان E-BV نام گرفتند و روزانه زهر زنبور عسل را به میزان mg/kg ۲ از طریق داخل صفاق دریافت می‌کردند (۱۴).

گروه ۴: با نام E-BB بودند که هر روز زهر زنبور عسل را به میزان mg/kg ۲و ویتامین B_{12} را یک روز در میان به میزان mg ۱۵ / kg از طریق داخل صفاقی دریافت می‌کردند.

درمان‌ها از روز اول بعد از تزریق GPSH –CFA آغاز شد و تا روز دهم به طول انجامید.

ارزیابی‌های کلینیکی EAE: روز تزریق ترکیب GPSH –CFA به عنوان روز صفر بعد از تزریق (0dpi) در نظر گرفته شد. رت‌ها به طور روزانه جهت بررسی علائم و نشانه‌های کلینیکی و تغییرات وزن بدن مورد ارزیابی قرار گرفتند. ارزیابی‌ها تا 19dpi به طول انجامید و در هر روز بر اساس درجه‌بندی ذیل امتیاز بندی شدند:

صفر: نرمال و بدون نشانه‌های کلینیکی، یک: دم فاقد کشیدگی طبیعی باشد، دو: فلج دم، سه: فلج جزئی در اندام حرکتی عقبی، چهار: فلج کامل در اندام حرکتی عقبی، پنج: فلج کامل اندام حرکتی عقبی و فلج جزئی در اندام حرکتی فوقانی، شش: مرگ و میر.

اندازه گیری پارامترهای سرمی: درروز (۱۴dpi) نمونه خون از آنها گرفته شد. سپس سرم آنها را جدا کرده و میزان TNF-α در سرم رت‌ها از طریق روش الایزا و با استفاده ازکیت مخصوص تعیین TNF-a در سرم رت ساخت شرکت (Abcam) اندازه گیری شد.

بررسی‌های ایمنو هیستوشیمیایی برای ارزیابی فعالیت آستروسیت‌ها: در dpi ۱۹ پس از بیهوش کردن رت‌ها مغز آنها خارج کرده و به دقت ساقه مغز جدا شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در محلول فیکساتیو نگهداری شدند. با استفاده از میکرتوم برشهای ۵ میکرومتری از بافت تهیه شد و فرایندهای پارافین زدایی و به آبدهی در مورد آنها اجرا شد. برای باز آرایی آنتی ژنی، برش‌ها داخل بافر Tris-EDTA قرار داده و به مایکروویو 850 W منتقل شدند. سپس برشها با آب سرد جاری شستشو داده و در ادامه با محلول TBS شستشو شدند. برای متوقف کردن فعالیت Endogenous peroxidase از محلول بلاکر شامل 1 H_2O_2 درصد در متانل استفاده شد. در ادامه برش‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با Rabbit anti –Rat GFAP ساخت شرکت (Abcam) به عنوان آنتی بادی اولیه، انکوبه شدند. سپس لام ا باTBS شستشو و سپس با HRP anti-rabbits IgG (Abcam) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. برای pvisualization از تکنیک استاندارد(DAB) Diaminobenzidine استفاده شد. برای نمونه‌های کنترل هم تمامی روش فوق بدون کاربرد آنتی بادی اولیه اجرا شد. از هرگروه ۵ برش به طور تصادفی انتخاب و تعداد سلولهای GFAP مثبت در هر برش به صورت تصادفی در زمینه‌هایی با بزرگ نمایی بالا (400×) توسط فردی که اطلاعی از گروهای درمانی نداشت، مورد شمارش قرار گرفت(۱۵).

روشهای آماری: تمام تستها با استفاده از نرم افزار SPSS و با روش Mann Whitney U-test به لحاظ آماری مورد بررسی قرار گرفت. $P<0.05$ به عنوان سطح معنی‌دار بودن داده‌ها در نظر گرفته شد.

نتایج

تاثیر ترکیب زهر زنبور عسل و ویتامین B_{12} روی تحرک و شرایط کلینیکی رت‌های EAE:

بعد از تزریق امولوسیون GPSCH-CFA به رت‌ها، برخی از آنها در گروه‌های مختلف، از 9dpi نشانه‌هایی مثل کاهش فعالیت‌های جستجویی، کاهش رفتارهای تغذیه‌ای و کاهش وزن بدن را بروز

www.SID.ir

Archive of SID

دادند. در روز 11dpi علائمی همانند از دست دادن کشیدگی دم، فلج جزئی در ناحیه دم در گروههای E-S و E-B_{12} دیده شد و این در حالی بود که این نشانه‌ها در گروه E-BV از 12dpi و در گروه E-BB از روز 13dpi مشاهده شد. نشانه‌های یاد شده به تدریج بیشتر و بیشتر شده و در نهایت به بروز فلج کامل در اندام تحتانی منجر گردید. این نشانه‌ها در گروه E-S باشدت بیشتر دیده شد. (نمودار۱).

با توجه به این نمودار دیده می‌شود که میانگین شدت بیماری در گروه‌های تحت درمان نسبت به گروه E-S کاهش پیدا کرده است. میانگین شدت بیماری در گروه‌های E-BB و E-BV نسبت به گروه E-S به صورت معنی‌داری کاهش یافته بود($p<0.05$). نتایج نشان می‌دهند که ترکیب زهر زنبور عسل و ویتامین B_{12} به صورت معنی‌داری می‌توانند نشانه‌های سخت کلینیکی را در رت‌های EAE کاهش دهند.

تاثیر ترکیب درمانی روی سطح سرمی TNF-a:

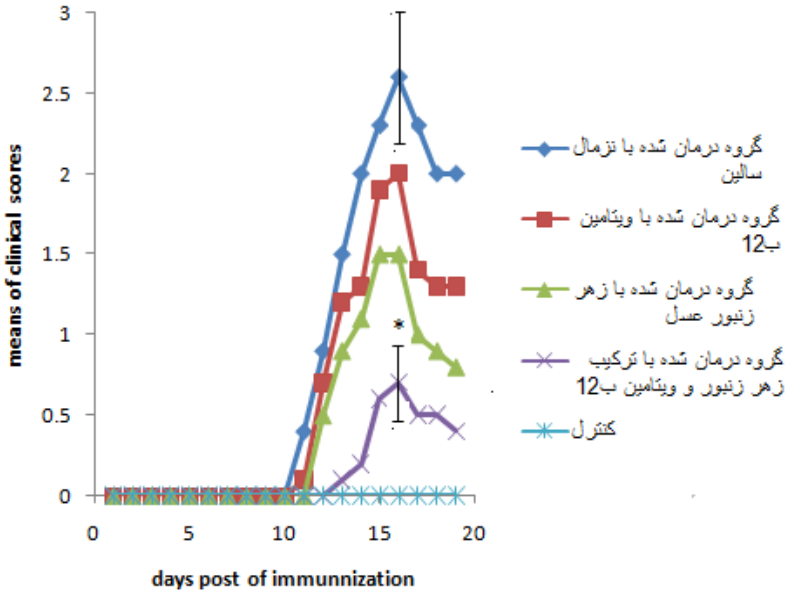
میزان TNF-a در سرم رت‌ها در گروه‌های مختلف با روش الیزا اندازه گیری شد. نتایج آن به صورت خلاصه در شکل (۱) نشان داده شده است. میزان TNF-a در گروه‌هایی که تحت درمان قرار گرفته بودند نسبت به گروه E-S کاهش پیدا کرده بود و این روند کاهشی در گروه‌های E-BB و E-BV به صورت معنی‌داری ($p<0.05$) مشهود بود.

این نتایج نشان می‌دهد که ترکیب زهر زنبور عسل و ویتامین B_{12} توانسته است به صورت معنی‌داری($p<0.05$) میزان TNF-a را در سرم رت‌های EAE کاهش دهد.

تاثیر ترکیب زهر زنبور عسل و ویتامین B_{12} روی فعالیت آستروسیت‌ها:

تاثیر ترکیب درمانی روی فعالیت آستروسیت‌ها با روش ایمینو هیستوشیمی روی برش‌های بافت مغزی با هدف قرار دادن مارکر GFAP (بعنوان شاخص عملکرد آستروسیت‌ها) انجام گرفت. سلولهای GFAP مثبت و تفاوت در تعداد آنها در گروه‌های مختلف در شکل(۲) نشان داده شده است. نتایج حاصل از شمارش سلولهای GFAP مثبت در برش‌های ساقه مغزی به صورت خلاصه در شکل (۳) آمده است. تعداد سلولهای GFAP مثبت در گروه E-S به صورت قابل توجهی افزایش یافته بود. کاهش تعداد سلولهای GFAP مثبت در گروه E-BB نسبت به گروه E-S در ناحیه ساقه مغزی به صورت معنی‌داری کاهش یافته بود ($p<0.05$) این روند کاهشی در گروه E-B_{12} دیده شد ولی معنی‌دار نبود.

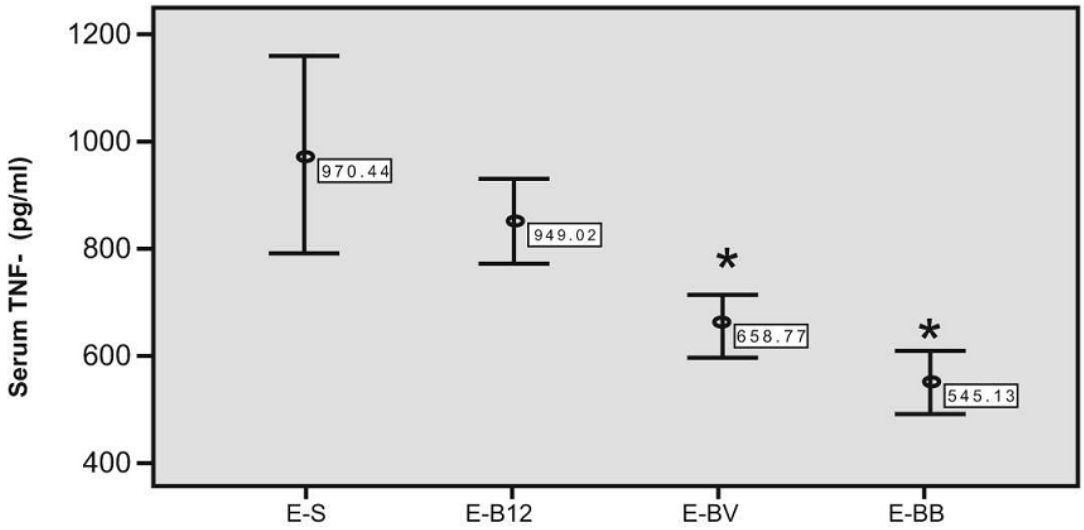
نتایج نشان می‌دهد که ترکیب درمانی زهر زنبور عسل و ویتامین B_{12} موجب کاهش تعداد سلولهای GFAP و در نهایت موجب کاهش فعالیت آستروسیتها وگلیوزیس در رت‌های EAE می‌شود.



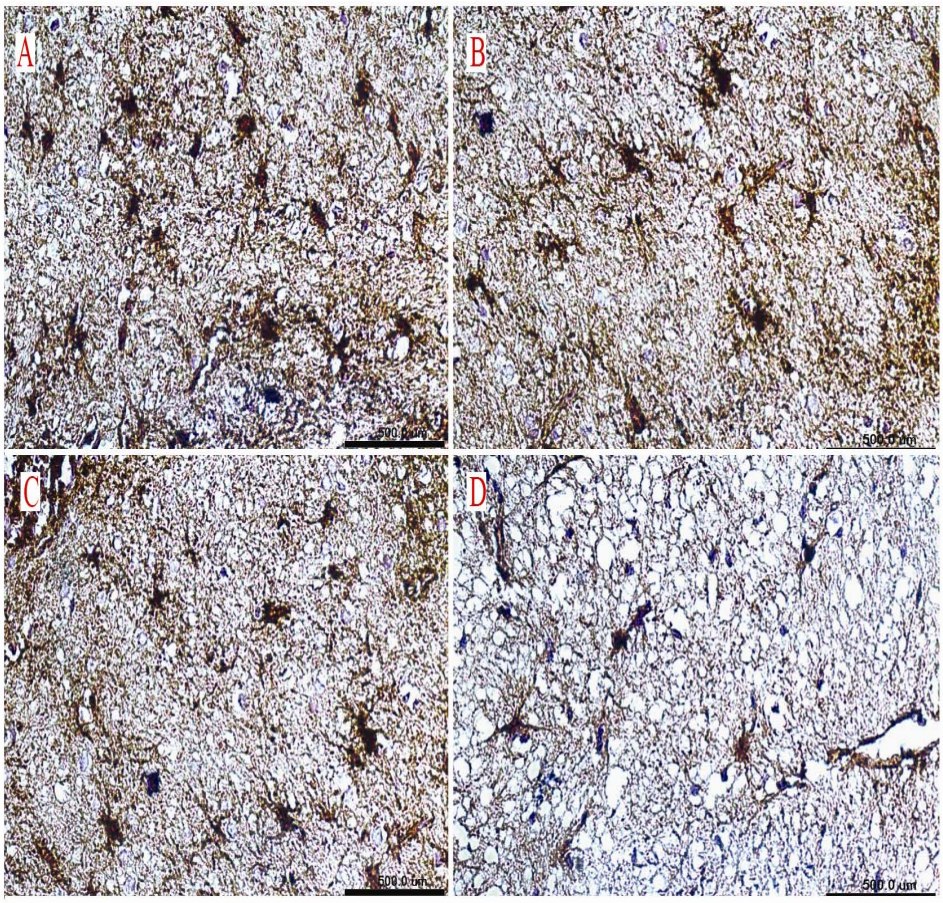
نمودار۱: نمودار تغییرات شدت بیماری در روزهای مختلف بعد از واکسینه کردن با نخاع خوکچه هندی در گروههای تحت درمان. همانطور که در شکل دیده می شود در گروهی که هر دوی زهر زنبور و ویتامین B_{12} را دریافت کرده اند شدت علائم کلینیکی یافته است، هرچند که این کاهش علائم کلینیکی در سایر گروههای تحت درمان هم دیده می شود ولی روند آن در گروه E-BB معنی دار تر ($p< 0.05$) است.

www.SID.ir

Archive of SID



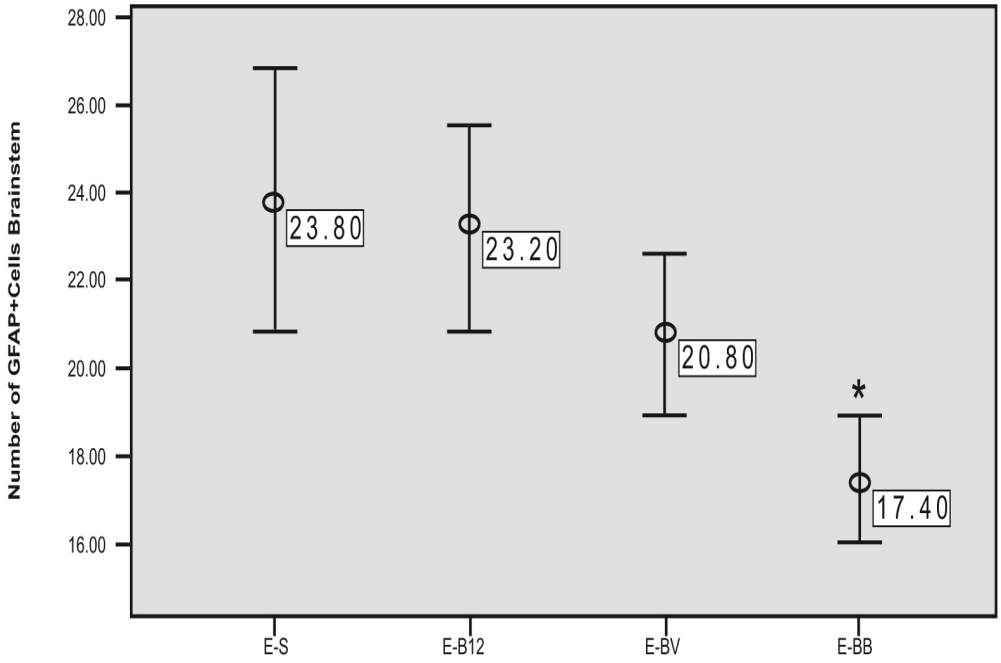
شکل ۱: سطوح TNF- در سرم رت ها در گروههای مختلف بیشترین مقدار TNF-α و نیترات در سرم مربوط به گروه E-S وکمترین آنها مربوط به گروه E-BB می باشد (P<0.05). کاهش سطوح یاد شده در مقایسه با گروه E-S را نشان می دهد.*



شکل ۲: سلولهای GFAP مثبت در ساقه مغز در گروههای مختلف
برشهایی از ساقه مغز که با روش ایمنوهیستوشیمی با هدف تعیین آستروسیت ها و مارکر GFAP رنگ آمیزی شده است
A-گروه E-S (گروهی که مبتلا به EAE بوده وفقط نرمال سالین به عنوان درمان دریافت می کردند) روند گلیوزیس در این گروه از سایرین بیشتر است.
B- گروه $E\text{-}B_{12}$ (گروهی که مبتلا به EAE بوده و ویتامین B_{12} رادریافت کرده اند). C- گروه E-BV (گروهی که مبتلا به EAE بوده و زهر زنبور رادریافت کرده اند). D- گروه E-BB (گروهی که مبتلا به EAE بوده و زهر زنبور و ویتامین B_{12} را دریافت کرده اند.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳: تعداد سلولهای GFAP مثبت در ساقه مغز رتها در گروههای مختلف نحوه شما رش سلولهای GFAP مثبت درقسمت مواد و روشها آمده است(P<0.05). کاهش سلولهای GFAP مثبت را در مقایسه با گروه E-S نشان می‌دهد.*

بحث

کاربرد پزشکی محصولات زنبور عسل از زمان‌های قدیم مورد استفاده قرار گرفته است و امروزه زهر زنبور عسل به طور گسترده‌ای در درمان آرتریت و دیگر بیماریهای التهابی، خود ایمنی و تخریب کننده مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۶) . زهر زنبور عسل اثرات ضد التهابی و ضد دردی روی واکنش‌های التهابی دارد. زهر زنبور عسل شامل انواعی از پپتیدها، آنزیم‌ها و آمین‌های فعال و ترکیبات دیگر است که به عنوان عوامل کمکی در بهبودی MS می‌تواند موثر باشد. برای مثال ملیتین سوبسترای اصلی زهر زنبور عسل، یکی از قوی‌ترین عوامل شناخته شده ضد التهابی می‌باشد و همچنین آدولاپین یک سوبسترای ضد التهابی قوی دیگر است که فعالیت سیکلو اکسیژنازی را مهار می‌کند (۱۴) .گزارش شده است که زهر زنبور عسل از تولید اینترلوکین 1ß (IL-1ß) و TNF-α از ماکروفاژها در رت‌ها در پاسخ به تحریک داخلی با لیپو پلی ساکارید باکتریایی ممانعت بعمل می‌آورد (۱۷). ترکیبات آلرژیکی اولیه زهر زنبور عسل مثل هیستامین و فسفولیپاز A2 ، تولید اینترلوکین -۱۰(IL-10) را به وسیله سلولهای Th2 القاء کرده و تکثیر سلولهای T را سرکوب می‌کند و می‌تواند در کاهش التهاب و نهایتا کاهش میلین زدایی نقش داشته باشد(۱۸). با توجه به مطالعات انجام گرفته درمورد تاثیرات زهر زنبور عسل روی بیماریهای التهابی و خود ایمنی و خواص و ترکیبات ضد التهابی و تعدیل کنندگی ایمنی آنها، انتظار آن می‌رفت که در مطالعه خود این اثرات را مشاهده نماییم. با توجه به نتایج بدست آمده در زمینه‌های علائم کلینیکی، سطح سرمی TNF-a، انتظارات ما برآورده شد و مشاهده نمودیم که ترکیب زهر زنبور عسل و ویتامین B_{12}، این علائم را کاهش داده است(۷و۱۴). علاوه بر تأثیرات ضد التهابی واکنش اکسیدانی زهر زنبور عسل که در مطالعات مختلف دیده شده و در بالا نیز به آنها اشاره شده است می‌توان از نقش کمکی ویتامین B_{12} هم یاد کرد خواص آنتی اکسیدانی و ضد التهابی ویتامین B_{12}، احتمالاً نتیجه‌ای از یک ترکیب اثرات مستقیم و غیر مستقیم است این تأثیرات شامل تحریک فعالیت میتونین سنتتاز، واکنش مستقیم با اکسیژن reactive، گونه‌های نیتروژن، تأثیر در ذخیره جزئی گلوتاتیون و تعدیل کردن ملکولهای پیام رسان می‌باشد. می‌توان گفت که کوبالامینها دارای فعالیتهای آنتی اکسیدانی شاخص در جایگاههای فارماکولوژی بوده و موجب حفاظتهای سلولی مهم علیه استرسهای اکسیداتیو و التهاب می‌شوند(۱۰). TNF-α و اینترفرون گاما از جمله سیتوکین‌های پس التهابی هستند که عمدتا به توسط سلولهای T خود ایمنی ترشح شده و مستقیما سد خونی– مغزی را تخریب کرده و آپوپتوزیس اولیگودندروسیت‌ها را القاء می‌کند و عاملی در جهت میلین

www.SID.ir

Archive of SID

زدایی محسوب می‌شود(۱۹). در رت‌های مدل EAE سطح سرمی TNF-α در شروع بیماری، تنظیم افزایشی پیدا نمود، که بیانگر آن است که TNF-α نقش مهمی در شروع وگسترش بیماری دارد (۱۲). با توجه به نقش TNF-α در گسترش بیماری و حالات EAE و هدف درمانی آن، در این مطالعه نیز به اندازه گیری آن در سرم رتهای مدل EAE واقع در گروههای مختلف پرداخته شد و که مشاهده شد که میزان آن در گروهی که درمانی را دریافت نکرده بودند افزایش یافت. این نتایج Shnider و همکارانش (۱۲) و Pollak و همکارانش (۲۰) مطابقت دارد. سطوح پلاسمایی TNF-α با شدت و سختی EAE و بیماری MS ارتباط داشته و بیانگر حالات ایمنی است.

در مطالعه حاضر سطح سرمی TNF-a در گروهی که هر دو ترکیب زهر زنبور عسل و ویتامین B_{12} را در یافت کرده بودند کاهش یافت که موافق با نتایج کار Nam و همکارانش(۲۱) می‌باشد. این تحقیق اعلام نمود که زهر زنبور عسل می‌تواند از تولید سیتوکین‌های پس التهابی مانند TNF-α ممانعت بعمل آورد. مطالعات از اهمیت اثرات ایمنی ویتامین B_{12} حمایت می‌کند این اثرات شامل مدوله کردن فعالیت سیتو کین TNF-α می‌باشد(۱۱) .

ما در مطالعه خود مشاهده نمودیم که رت‌های مبتلا به EAE دارای افزایش میزان GFAP در ساقه مغز خود بودند و این نتایج موافق با مطالعه Nylen و همکارانش(۲۲) اشد، چرا که افزایش بیان GFAP ممکن است در ارتباط با صدمه مغزی و گلیوزیس باشد و GFAP مارکری است که با وسعت آسیب مغزی مرتبط است.

GFAP عضوی از خانواده اسکلت سلولی محسوب می‌شود و در فرایندهای حرکتی آستروسیتی و شکلی آن، با ایجاد ساختارهای تثبیتی شرکت می‌کند. در سیستم اعصاب مرکزی مهره داران عالی در پی جراحت و صدمات ناشی از تروما، بیماریها، اختلالات ژنتیکی و تاثیرات شیمیایی، آستروسیت ها باز فعال شده و حالت آستروگلیوزیس را بوجود می‌آورند. در آستروگلیوزیس سنتز سریع GFAP را شاهد هستیم (۲۳).

مطالعه حاضر نشان داد که ترکیب زهر زنبور عسل و ویتامین B_{12} منجر به کاهش بیان GFAP (به عنوان مارکر آستروسیتها) شده است که این نتایج درمانی با نتایج کار Wang و همکارانش (۱۵) مخالف است. وی در بررسی خود اعلام کرده بود که ماده Idazoxan باعث کاهش GFAP در رت‌های مبتلا به EAE می‌شود این پدیده را می‌توان این گونه توجیه کرد که اعمال بیولوژیکی آستروسیتها هم در فرایندهای محافظتی و هم در فرایندهای تخریبی می‌تواند نمود داشته باشد.

نقش GFAP در توسعه حالات EAE و درمان آن پیچیده است به خاطر آنکه آستروسیت‌ها در فعالیتهای چند گانه‌ای شامل تنظیم جریان گلوتامات، فعالیت سیکلو اکسیژناز -۲ (COX-2) و فعالیت سنتز و تولید نیتریک اکساید (NO) و همینطور تولید سیتوکین‌های ضد التهابی و پس التهابی و فاکتورهای ترو فیک دخالت دارد(۱۵). در موشهایی که فاقد بیان GFAPهستند گزارش شده است که بیشتر مستعد گسترش بیماری EAE هستند و با علائم شامل نفوذ بیشتر سلولهای التهابی به سیستم عصب مرکزی مشخص می‌شوند(۲۴). نتایج حاصل از کار ما با نتایج حاصل از کار Mastronardi و همکارانش (۱۳) موافق است. وی در مطالعه‌اش نشان داد که ترکیب اینتر فرون بتا و ویتامین B_{12} منجر به کاهش بیان GFAP در مدلهای EAE می‌شود. یک مکانیزم ممکن برای این قضیه شاید متیلاسیون نواحی پروموتر ژنها باشد که به سبب آن اثر شان غیر فعال می‌شود. برای مثال ژن GFAP توسط متیلاسیون کاستهای CPG در پروموترهایش تنظیم شده است.

نتیجه گیری

ترکیب زهر زنبور عسل و ویتامیین B_{12} باعث کاهش شرایط سخت کلینیکی، سطح سرمی TNF-a و گلیوزیس در رت‌های مبتلا به EAE می‌شود و این تاثیرات در راستای خواص ضد التهابی زهر زنبور عسل و در کنار آن ویتامین B_{12} می‌باشد که با تعدیل کردن سیستم ایمنی وجلوگیری از تکثیر سلولهای T خود واکنشگر باعث تخریب کمتر بافت سیستم عصب مرکزی شده و در نهایت فرآیند گلیوزیس که یکی از مهمترین نتایج تخریب است، با شدت کمتری بروز می‌کند.

تشکر و قدردانی

از مدیر عامل محترم شرکت کارخانجات دارو پخش، جناب آقای دکتر ناصر نقدی و جناب آقای دکتر سعید حقیقی معاونت محترم کنترل کیفیت به دلیل فراهم نمودن شرایط کار و همکاری با انجام این مطالعه در شرکت کارخانجات داروپخش صمیمانه قدردانی می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1. Blakemore WF. Regeneration review repair in MS: the view of experimental pathology. J Neurological Sci. 2007; 125:1-4.

2. Hedreul MT, Gillett A, Olsson T, Jagodic M, et al. Characterization of multiple sclerosis candidate gene expression kinetics in rat experimental autoimmune encephalomyelitis. J of Neuroimmunol. 2009; 210, 30-39.

3. Ferguson C, Sarlieve LI, Vincendon G. Multiple sclerosis: review of Main experimental data and pathogenic hypotheses. Rev. Med. Intern. 1990; 11, 201 – 208.

4. Miller A, Shapiro S, Gershtein R, Kinarty A, et al. Treatment of multiple sclerosis with copolymer-1 (copaxone): implicating mechanisms of Th1 to Th2/Th3 immun- deviation. J Neuroimmunol. 1998; 92: 113-21.

5. Bielekova B, Martin R. Development of biomarkers in multiple sclerosis, Brain. 2004; 127, 1463-1478

6. Wu J, Ohlsson M, WarnerE A, Loo KK, et al., Glial reaction and degeneration of myelinated processes in spinal cord gray matter in chronic experimental aoutoimmune encephalomyelitis. Neuroscience. 2008; 156, 586-596

7. Mirshafiey A. Venom therapy in multiple Sclerosis. Neuropharmacol. 2007; 53, 353 – 361.

8. Kim HW, Kwon YB, Ham TW, Roh DH, et al. Acupoint Stimulation using bee venom attenuates formalin- induced pain behavior and spinal cord fos expression in rats. J. Vet. Med. Sci. 2003; 65, 349 – 355.

9. Han SM, Lee KG, Yeo JH, Kweon HY, et al. Effect of honey bee Venom on Microglial cells nitric oxide and tumor necrosis factor –α production stimulated by LPS. J. of Enthno- pharmacol. 2007; 111, 176 – 181.

10. Birch CS, Brasch NE, McCaddon A, Williams JHH. A novel role for vitamin B_{12}; Cobalamins are intracellular antioxidant in vitro, Free Radical Biology and Medicine. 2009; 47; 184-188.

11. Miller JW. Vitamin B_{12} deficiency, tumor necrosis factor-alpha, and epidermal growth factor: a novel function for vitamin B_{12} ? Nutr Rev. 2002; 60, 142-4.

12. Schnider C, Shuetz G, Zollner TM. Acute neuroinflammation in Lewis rats – A model for acute multiple sclerosis relapses. J.of Neuroimmunol. 2009; 213, 84-90.

13. Mastronardi FG, Min W, Wang H, Winer S, et al. Attenuation of experimental autoimmune encephalomyelitis and nonimmune demyelination by IFN-beta plus vitamin B12: treatment to modify notch-1/sonic hedgehog balance. J Immunol. 2004; 172: 6418-26.

14. Son DJ, Lee JW, Lee YH, Song HS, et al. Therapeutic application of anti-arthritis, pain – releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. Pharmacol. & Therap. 2007; 115, 246-270.

15. Wang XS, Chen YY, Shang XF, Zhu ZG, et al. Idazoxan attenuates spinal cord injury by enhanced astrocytic activation and reduced microglial activation in rat experimental autoimmune encephalomyelitis. Brain Res. 2009; 1253: 198–209.

16. Kang SS, Pak SC, Choi SH. The effect of whole bee venom on arthritis. Am. J. Clin. Med. 2002; 30, 73-80.

17. Kwon YB, Lee HJ, Han HJ, Mar WC, et al. The water – soluble Fraction of bee venom produces antinociceptive and anti – inflammatory effects on rheumatoid arthritis in rats. Life Sci. 2002; 71, 191 – 204.

18. Jutel M, Akdis M, Blaser K. Are regulatory T cells the target at venom immunotherapy?. Curr opin Allergy Clin Immunol. 2005; 5, 365 – 369.

19. Akassoglu K, Bauer G, Kassiatis. Oligodendrocyte apoptosis and primary demyelination induced by local TNF/P55TNF receptor signaling in the central nervous system of transgenic mice: models for multiple sclerosis with primary oligodenrogliopathy. Am. J. Path. 1998; 153, 801-813.

20. Pollak Y, Ovadia H, Orion E, Weidenfeld J, et al. The EAE-associated behavioral syndrome: I Temporal correlation with inflammatory mediators. J. of Neuroimmunol. 2003; 137, 94-99.

21. Nam KW, Je KH, Lee JH, Han HJ, et al. Inhibition of cox-2 activity and proinflammatory cytokines (TNF-alpha and IL-1beta) production by water – soluble sub – fractionated parts fron bee (Apis Mellifera) venom. Arch. Pharm. Res. 2003; 26, 383 – 388.

22. Nylen K, Csajbok LZ, Ost M, Rashid A, et al. Serum glial fibrillary acidic protein is related to focal brain injury and outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. 2007; Stroke 38, 1489–1494.

23. Eng LF, Chirnikar RS, Lee YL, Glial Fibrillary acidic protein: GFAP–Thirty–one Years. Neurochem.Res. 2000; 25: 1439–1451.

24. Liedtke W, Edelmann W, Chiu FC, Kucherlapati R,et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking glial fibrillary acidic protein is characterized by a more severe clinical course and an infiltrative central nervous system lesion. Am. J. Pathol. 1998; 152, 251–259.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Winter 2011; 1(2): 37-45

Research Article

Effect of honey bee venom and vitamin B_{12} on gliosis of brain stem in rats with experimental allergic encephalomyelitis-animal model for multiple sclerosis

Karimi A, Ph.D. Student[1*], Parivar K, Ph.D.[1], Nabiuni M, Ph.D.[2], Haghighi S, Ph.D.[3], Imani S, Ph.D.[4]

1- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Department of Biology, Divison of Cell and Developmental Biology, Faculty of Sciences, University of Tarbiat Moalem, Tehran, Iran

3- Faculty of Pharmacy, Islamic Azad University, Tehran , Iran

4- Department of Toxicology, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

* Email corresponding author: Karimiakbar38@yahoo.com

Received: 26 Feb. 2011 Accepted: 10 Apr. 2011

Abstract

Aim: Regarding the role of vitamin B12 in regulating the immune reactions, this compouned is used in the present study as an accessory agent with the honey bee venom for reduction of inflammation. This study has been down for checking effects of bee venom and B_{12} on inflammation and gliosis in experimental allergic encephalomyelitis rats.

Material and Methods: The guinea pig spinal cord homogenate (GPSCH) along with the Complete Freund's Adjuvant (CFA), was used for induction EAE in Lewis rats for creating a model of MS.EAE was induced in 40 rats, randomly divided to four groups and treated with honey bee venom and vitamin B_{12}. The treatment started from the first day post immunization by GPSCH-CFA and continued for ten days. Immunohistochemical method used for study glial fibrillary acidic protein (GFAP) and ELISA was used for assessment serum TNF-α.

Results:. Our data showed that treatment with the honey bee venom and vitamin B_{12} decreased the disorders of clinical scores, serum TNF-α and level gliosis in Lewis rats induced by GPSCH-CFA.

Conclusion: Combination of honey bee venom and B_{12} has anti-inflammatory activity by inhibiting generation of autoreactive T cells and decreases CNS and gliosis damages.

Keywords: Bee venom, Experimental allergic encephalomyelitis, Gliosis, Multiple sclerosis , Vitamin B_{12}

www.SID.ir