

مطالعه اثرات پیشگیرانه و درمانی کاروتنوئید آستاگزانتین بر روی بیماری Multiple Sclerosis در

موش‌های مدل C57BL/6

سایه بیداران ^۱Ph.D.، پریچهره یغمایی ^{۱*}Ph.D.، علیرضا احمدی ^۲Ph.D.، آزاده ابراهیم حبیبی ^۳Ph.D.، محمد حسین صنعتی ^۴Ph.D.

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، تهران، ایران

۲- دانشگاه الزهراء، پژوهشکده زنان، گروه بیومدیكال، تهران، ایران

۳- دانشگاه علوم پزشکی تهران، مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم، گروه مدل سازی مولکولی، تهران، ایران

۴- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه ژنتیک پزشکی، تهران، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: yaghmaei_p@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۲۴

چکیده

هدف: در مطالعه حاضر به بررسی امکان مفید بودن آستاگزانتین در مدل موشی بیماری MS، آنسفالومیلیت تجربی خود ایمن (EAE) پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها: بیماری EAE با استفاده از پپتید MOG35-55 و ادجوانت کامل فروند (CFU) در موش‌های ماده C57BL/6 القا شد. موش‌ها در گروه کنترل نرمال، گروه بیمار، گروه پیشگیری دریافت کننده آستاگزانتین ۲۱ روز قبل از القا بیماری و گروه درمانی که پس از ایمونیزاسیون و با شروع علائم بیماری، آستاگزانتین را دریافت کردند، قرار گرفتند. هر گروه شامل ۸ راس موش بود. مصرف آستاگزانتین تا ۳۵ روز پس از ایمونیزاسیون ادامه یافت و هر روز به مقدار ۰/۴ درصد وزن پلت مورد مصرف (حدود ۴۰۰ میلی‌گرم) آستاگزانتین مصرف می‌شد. سپس میزان تکثیر سلولی به وسیله آزمون MTT، میزان تولید اینترلوکین ۶ و اینترلوکین یک بتا سرم خونی به وسیله ELISA سنجیده شد. علاوه بر این بافت‌های نخاع نیز به منظور ارزیابی‌های ایمونوهیستوپاتولوژی مطالعه شدند.

نتایج: بر اساس نتایج به دست آمده مصرف آستاگزانتین منجر به بروز پیامدهای بالینی و آسیب شناختی مناسبی شده به طوری که منجر به کاهش تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی IL6، IL1 β شد ($p < 0/001$) مطالعات ایمونوهیستوپاتولوژی نیز کاهش ارتشاح لکوسیت‌ها را در بافت نخاع گروه‌های تجربی نشان دادند.

نتیجه‌گیری: در مجموع ممکن است که این رهیافت دارویی به‌عنوان یک استراتژی سودمند در پیشگیری و درمان بیماری مالتیپل اسکلروز مطرح شد.

واژگان کلیدی: آستاگزانتین، آنسفالومیلیت تجربی خود ایمن، سایتوکاین التهابی، مالتیپل اسکلروزیس

مقدمه

و در تنظیم بیان ژن، القا ارتباطات سلول - سلول و سلامت سلول نقش دارند (۶). آستاگزانتین به میزان بیشتری نسبت به سایر ترکیبات کاروتنوئیدی آزاد شدن فاکتورهای ایمنی مانند IL-10 و TNF- α و تولید آنتی‌بادی‌های Igm را افزایش می‌دهد. دلیل اهمیت مطالعه درباره اثرات سودمند آستاگزانتین این است که این کاروتنوئید حتی در شرایط التهابی خفیف قادر است پاسخ ایمنی قابل توجهی ایجاد نماید (۷). مطالعات پیشین نشان داد تنش‌های اکسایشی آسیب زنده به سیستم عصبی، بیماری‌های عصبی را ایجاد می‌نماید و در مقابل تغذیه با آنتی‌اکسیدانت‌ها احتمال خطر این بیماری‌ها را کاهش می‌دهد اثرات محافظتی آستاگزانتین مرتبط با ساختار منحصر به فرد آستاگزانتین و نحوه قرارگیری آن و تاثیر بر ساختار غشا سلول و عملکرد آن است، از طرفی دیگر خواص آنتی‌اکسیداتیو و ضدالتهابی آن سبب شده است کاندیدای مناسبی برای کاهش آسیبهای مزمن و حاد تخریب نورونی و درمان بیماری‌های عصبی و محافظت از سلول‌های عصبی محسوب شود. به-خصوص که بطور گسترده و با صرف هزینه پائین از جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس، مخمر فافیا رودوزیما و ... می‌توان آن را استخراج کرد (۸-۱۰).

گزارش‌ها نشان می‌دهد در پاسخ به آسیب وارده به سیستم عصبی مرکزی، اینترلوکین ۱ بتا (IL-1 β) و اینترلوکین ۶ (IL-6) افزایش می‌آید. در مطالعه بر روی موش‌های ماده تحت درمان با آستاگزانتین کاهش سطح سرمی IL-1 β مشاهده شده است (۱۱).

مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثر آنتی‌اکسیدانتی آستاگزانتین در تعدیل پاسخ التهابی لنفوسیت‌های T خود واکنشگر و بررسی اثرات پیشگیرانه و درمانی آستاگزانتین در مدل حیوانی بیماری MS (EAE) شکل گرفته است. در مطالعه پیش‌رو القا دمی‌لیناسیون به روش EAE و تاثیرگذاری آستاگزانتین به صورت پیش درمان و درمان بر میزان سطوح سایتوکاین‌های پیش التهابی IL-6 و IL-1 β در سرم خون مورد بررسی قرار گرفت این تحقیق در آزمایشگاه تحقیقاتی بیومدی‌کال دانشگاه الزهرا و آزمایشگاه

انسفالومیلیت تجربی خودایمن (EAE) به عنوان مدل حیوانی بیماری MS (Multiple Sclerosis) در تحقیقات مورد استفاده قرار می‌گیرد. در بیماری MS و مدل تجربی آن (EAE)، پاسخ التهابی سلول‌های TCD4+ خود واکنشگر اختصاصی به آنتی ژن‌های میلین خودی عامل دمی‌لیناسیون سیستم اعصاب مرکزی و سبب ایجاد ناتوانی‌های نورولوژیک در افراد محسوب می‌شود (۱ و ۲).

نتایج مطالعات بر روی مدل حیوانی EAE نشان داده است با انتقال سلول‌های Th1 فعال شده اختصاصی میلین به موش‌های سالم، سبب ابتلا به EAE می‌شود و سلول‌های TCD4+ نفوذ یافته در سیستم عصبی مرکزی سبب افزایش تولید سایتوکاین‌های سلول‌های Th1 میشوند (۳). سایتوکاین‌های سلول‌های Th1 نیز سبب فعال شدن ماکروفاژها، در نتیجه تخریب میلین و آسیب به الیگودندروسیت‌ها می‌شود. ماکروفاژها و سلول‌های میکروگلیا فعال شده انواعی از سایتوکاین‌ها از قبیل IL-6 و IL-1 را ترشح می‌کنند که مقادیر بالای این سایتوکاین‌ها ممکن است باعث آسیب رساندن به سایر الیگودندروسیت‌ها و نورونها شود (۴).

درمان‌های رایج این بیماری عمدتاً شامل یکسری داروهای سرکوب یا تعدیل کننده سیستم ایمنی می‌باشد که علاوه بر عوارض جانبی ناخواسته در دراز مدت با پیشرفت بیماری، کارایی درمانی خود را تا حدود زیادی از دست می‌دهند. از میان استراتژی‌های درمانی که تا به حال برای بیماری MS معرفی شده‌اند درمان‌های غیرتهاجمی مانند استفاده از داروهای آنتی‌اکسیدانت قدرتمند، جایگاه بزرگی را به خود اختصاص داده است. آستاگزانتین به عنوان یک ترکیب محلول در چربی می‌تواند به طور موثر از سد خونی مغزی عبور کند. همچنین یک ماده مغذی سالم بدون اثر سمیت می‌باشد (۵). آستاگزانتین به علت خاصیت آنتی‌اکسیدانتی قوی در حفاظت ترکیبات سلولی در مقابل آسیب اکسایشی

تحقیقاتی مجتمع زکریا رازی دانشگاه علوم تحقیقات تهران انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر به روش تجربی و جامعه مورد بررسی شامل ۳۲ سر موش ماده C57BL/6 در محدوده سنی ۶ الی ۸ هفته‌ای از انستیتو پاستور تهران با میانگین وزنی (mean±SD) $17/62 \pm 0/46$ گرم تهیه شد و در شرایط نور و رطوبت و دمای اپتیموم و مناسب در حیوانخانه دانشگاه علوم تحقیقات تهران نگهداری شدند. پروتکل این تحقیق براساس قوانین بین المللی در مورد حیوانات آزمایشگاهی انجام شد. جهت القا بیماری EAE ۲۰۰ میکروگرم پپتید MOG₃₅₋₅₅ (شرکت Peptron, South Korea) حل شده در ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سدیم (PBS) و ۱۰۰ میکرولیتر ادجوانت فروند کامل (شرکت Sigma، آمریکا) به صورت زیر جلدی در ناحیه پشتی - کمری به هر موش تزریق شد. سپس ۴۰۰ نانوگرم پرتوسیس توکسین به منظور افزایش نفوذپذیری سد خونی-مغزی (شرکت Sigma، آمریکا) در حجم ۳۰۰ میکرولیتر (PBS) حل شده و در روزهای صفر و ۴۸ ساعت بعد از ایمونیزاسیون به صورت داخل صفاقی تجویز

شد (۱۲). آستاگزانتین مصرف شده توسط بخش بیومدیkal دانشگاه الزهرا از جلبک *Haematococcus pluvialis* استخراج شده بود. به طور متوسط موش‌های C57BL/6 روزانه حدود ۰/۴ درصد خوراک مصرفی (پلت) (حدود ۴۰۰ mg/kg) آستاگزانتین دریافت میکردند و پلت‌ها در این مقدار آستاگزانتین غلظانیده می‌شد (۱۳ و ۱۴).

مصرف آستاگزانتین مطابق با گروه‌بندی زیر صورت پذیرفت و کلیه درمانها تا ۳۵ روز (۵ هفته) پس از القا بیماری ادامه یافت: گروه کنترل سالم: گروهی که بیمار نشدند و آب و غذای معمولی دریافت کردند و هیچ دارویی دریافت نکردند، گروه بیمار (EAE): گروهی که بیمار شدند ولی دارو (آستاگزانتین) دریافت نکردند، گروه تجربی پیشگیری: ۲۱ روز (سه هفته) قبل از القا بیماری و ایمونیزاسیون آستاگزانتین دریافت کردند و گروه تجربی درمانی: موش‌ها بعد از القا بیماری و با ارائه اولین علائم بیماری، آستاگزانتین را همراه با پلت مصرفی روزانه دریافت کردند.

بررسی روند تغییرات وزن و شدت علائم کلینیکی به صورت روزانه صورت گرفت. جهت ارزیابی شدت بیماری از سیستم نمره‌دهی هفتگانه مطابق جدول ۱ استفاده شد.

جدول ۱: علائم کلینیکی و درجه شدت بیماری در موش مدل MS (EAE)

درجه شدت بیماری	علائم و بی‌آمدها
صفر	عدم بروز بیماری
یک	شلی 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

خون گرفته شد. نمونه‌های خونی گرفته شده در دستگاه سانتریفوژ یخچال‌دار ۱۰ دقیقه در ۲۰۰ g قرار داده شد تا سرم آن برای تکنیک الیزا جدا شود. به منظور تعیین سطح سایتوکاین اینترلوکین ۱ بتا (IL-1β) و IL-6 در

پنج هفته بعد از القا بیماری (روز سی و پنجم پس از ایمونیزاسیون با پپتید MOG₃₅₋₅₅) موش‌ها تحت بیهوشی عمیق قرار گرفتند (کتامین ۱۰۰ mg/Kg و زایلازین ۱۰ mg/Kg داخل صفاقی ip). و از قلب آنها

فورمازون شد که با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به صورت محلول درآمد. شدت رنگ در طول موج ۴۹۰ نانومتر تعیین و شاخص تحریک به صورت زیر محاسبه شد.

$$\text{شاخص تحریک} = \frac{\text{OD بلانک} - \text{OD در حضور پپتید}}{\text{OD در عدم حضور پپتید}}$$

جهت مطالعات نوروپاتولوژیک با رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی نیز پس از بیهوشی موشها به صورت داخل صفاقی ip با کتامین و زایلازین به نسبت ۳:۱ اقدام به برداشتن نخاع کرده، نخاع را وارد فالكونهای مناسب حجمی حاوی فرمالین ۱۰ درصد نموده و سپس جهت آبگیری و قالبگیری با پارافین و برشگیری آماده نموده، سپس به منظور پارافینزدایی و آبگیری در گزین و بعد الکل قرار داده می شود، لامها به مدت ۱۵ دقیقه در بافر سیترات و ماکروویو قرار گرفتند، سپس جهت بلاک فعالیت پراکسیداز اندوژنز از محلول H₂O₂ در متانول استفاده می شود (سوبسترای اختصاصی). آنتی بادی CD4 کنژوگه به عنوان Ab اولیه (Primary Ab) به اسلایدهای درون هر جار اضافه می شود. سپس لامها آبگیری و در الکل ۹۵ و ۱۰۰ درصد قرار گرفته و با گزین تمیز و لامل بر روی لام چسبانده می شود. جهت بررسی ارتشاح التهابی، تعداد CD4های ارتشاح یافته رنگ آمیزی شده با آنتی بادی CD4 در نخاع، در سه مقطع برای هر نمونه شمرده و میانگین هر یک محاسبه شد. تصاویر با میکروسکوپ Olympus BX51 و دوربین Olympus DP70 و نرم افزار Olysia Bioreport software version 3.2 مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت.

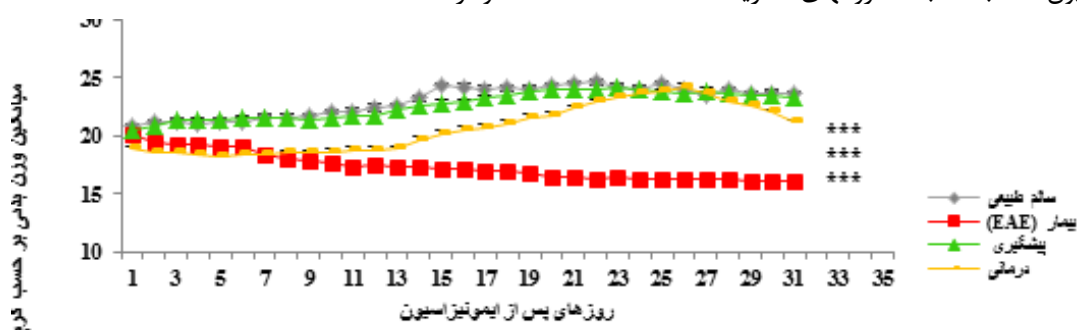
آنالیز آماری

بررسی های آماری در محیط نرم افزاری SPSS ویراست ۲۱ انجام شد، برای ترسیم نمودارها از نرم افزار Microsoft Excel نسخه ۲۰۱۰ استفاده شد. داده ها به صورت Mean±SEM گزارش شد. جهت مقایسه میانگین شدت بیماری از روش غیر پارامتریک Mann

سرم به ترتیب از کیت الایزا (Abcam، آمریکا) و (eBioscience, Inc., USA). مطابق با پروتکل شرکت سازنده استفاده شد. برای هر نمونه دو خانه (کنترل سالم، گروه بیمار و گروه های تجربی) در نظر گرفته شد و یک جفت خانه به عنوان شاهد Blank و هفت جفت خانه نیز برای نمونه استاندارد در نظر گرفته شد. نتایج در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط ELISA Reader خوانده شد. داده ها بعد از تهیه نمودار استاندارد، برای تعیین غلظت سایتوکاین مورد ارزیابی قرار گرفت.

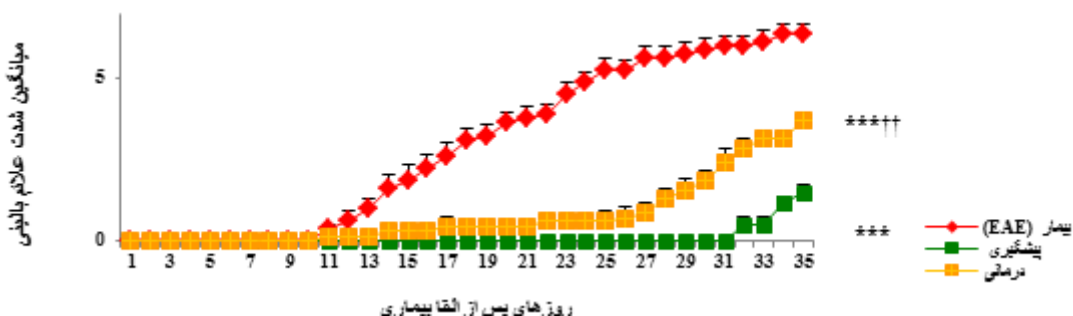
میزان تکثیر سلولهای ایمنی با متد MTT ارزیابی شد. به همین منظور پنج هفته بعد از القا بیماری موشها و پس از بیهوشی عمیق بدون اتلاف وقت طحال موشها تحت شرایط استریل خارج و بعد از قطعه شدن در ۲ml محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد FBS له شده و جهت تهیه سوسپانسیون سلولی از توری سیمی به قطر ۰/۲ میلی متر عبور داده شدند. به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰ سوسپانسیون سلولی سانتریفیوژ شد. به منظور حذف گویچه های سرخ، به رسوب سلولی ۵ میلی لیتر بافر لیز کننده افزوده شد. بعد از ۵ دقیقه ضمن افزودن ۱۰ میلی لیتر محیط کشت نمونه ها بار دیگر سانتریفیوژ تکرار شد. رسوب سلولی در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد FBS به صورت سوسپانسیون در آورده شد. پس از فرآیند شمارش سلولها به وسیله روش رنگ آمیزی با تریپان بلو، سوسپانسیونی حاوی ۱×۱۰^۶ cell/ml تهیه شد و ۱۰۰ μl از آن در هر یک از چاهکهای پلیت ۹۶ خانه ای ته تخت ریخته شد. برای هر نمونه سه تکرار بدون حضور پادگن و سه تکرار در حضور ۵۰ μg/ml از پپتید MOG₃₅₋₅₅ در نظر گرفته شد. به عنوان بلانک نیز در سه چاهک از محیط کشت RPMI-1640 استفاده شد. بعد از ۷۲ ساعت گرم خانه گذاری در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO₂ به هر چاهک ۲۵ μl محلول MTT (۵ mg/ml) در PBS افزوده شده، به مدت ۴ ساعت دیگر گرم خانه گذاری شد. در این مدت احیا ماده MTT توسط سلولهای زنده و در حال تکثیر سبب تشکیل کریستالهای

آستاگزانتین کاهش چشمگیری داشته است. در گروه درمانی دریافت کننده آستاگزانتین پس از ایمونیزاسیون اندکی کاهش وزن مشاهده می‌شود ولی پس از مدت کوتاهی افزایش وزن در موش‌های گروه دریافت کننده آستاگزانتین مشاهده می‌شود. این افزایش وزن در تمامی گروه‌های دریافت کننده آستاگزانتین (هم پیشگیری و هم درمانی) مانند گروه سالم طبیعی نسبت به تغییرات میانگین وزن بدن در موش‌های گروه EAE بدون درمان اختلاف معنی‌داری در سطح $p < 0.0001$ را نشان می‌دهد (نمودار ۱).



نمودار ۱: تغییرات میانگین وزنی بدن: میانگین وزن بدن در گروه کنترل طبیعی و گروه‌های تجربی دریافت کننده آستاگزانتین (پیشگیری و درمان) افزایش معنی‌داری نسبت به گروه بیمار EAE نشان می‌دهند ($P < 0.0001$, $n=8$) (***)

میانگین شدت بیماری در گروه پیشگیری که سه هفته قبل از ایمونیزاسیون آستاگزانتین مصرف کرده بودند نسبت به گروه درمانی در سطح $p < 0.001$ کاهش یافته بود (نمودار ۲).



نمودار ۲: تغییرات میانگین شدت علائم بیماری پس از القا EAE: میانگین شدت بیماری در تمامی گروه‌های تجربی (پیشگیری و درمان) نسبت به گروه موش‌های بیمار (EAE) کاهش معنی‌داری یافته است ($p < 0.0001$) (***) . همچنین میانگین شدت علائم بیماری در گروه درمانی در مقایسه با گروه پیشگیری افزایش معنی‌داری یافته است ($p < 0.001$) (†) (* ارائه دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه EAE و † نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه پیشگیری)

شروع شد. در گروه پیشگیری که از ۳ هفته قبل از ایمونیزاسیون آستاگزانتین دریافت کرده بودند اولین علائم

Whitney-U و جهت مقایسه میانگین وزن، میزان تکثیر لنفوسیتها، سطح سایتوکاین‌ها و تعداد سلولهای لکوسیتی ارتشاح یافته در بافت نخاع از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و Tukey's test استفاده شد. در تمام بررسی‌ها $p < 0.05$ به‌عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

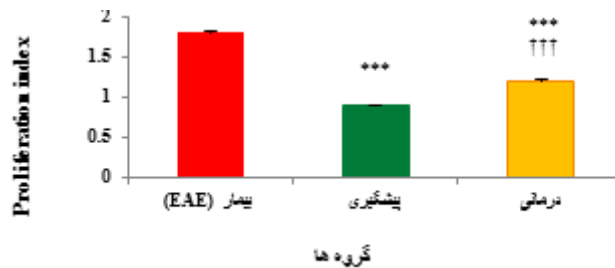
نتایج

بررسی تغییرات میانگین وزن در بین گروه‌های تحت مطالعه نشان داد که میانگین وزن گروه EAE پس از ایمونیزاسیون نسبت به گروه‌های دریافت کننده

نتایج میانگین شدت بیماری نشان می‌دهد شدت علائم بالینی در طول مدت مطالعه در گروه‌های دریافت کننده آستاگزانتین (پیشگیری و درمان) نسبت به گروه بیمار EAE کاهش معنی‌داری داشته است ($p < 0.0001$)

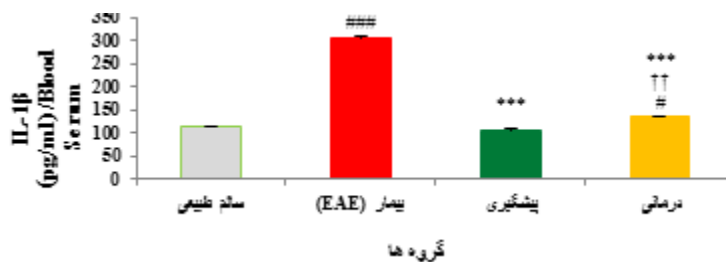
میزان بروز و شیوع بیماری در گروه بیمار بدون درمان EAE و گروه درمانی از روز یازدهم پس از ایمونیزاسیون

معنی‌دار در تمامی گروه‌های تجربی پیشگیری و درمانی نسبت به گروه EAE در سطح $p < 0.0001$ مشاهده شد. همچنین کاهش معنی‌دار تکثیر لنفوسیتی در گروه پیشگیری در مقایسه با گروه درمانی در سطح $p < 0.0001$ دیده شد. مقادیر تکثیر لنفوسیت‌ها بوسیله شاخص تحریکی ارائه شده است (نمودار ۳).



نمودار ۳: بررسی میزان تکثیر لنفوسیت‌ها با روش MTT ۳۵ روز پس از القا EAE. میزان تکثیر لنفوسیت‌ها که بوسیله Proliferation index ارائه می‌شود در تمامی گروه‌های تجربی دریافت‌کننده آستاگزانتین (پیشگیری و درمان) نسبت به گروه موش‌های بیمار (EAE) کاهش معنی‌داری در سطح $p < 0.0001$ نشان دادند، همچنین این شاخص در گروه درمانی نسبت به گروه پیشگیری افزایش معنی‌داری ارائه داد ($p < 0.0001$) (*). ارائه دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه EAE و † نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه پیشگیری).

معنی‌داری یافته ($p < 0.05$)، همچنین سطح سرمی سایتوکاین IL-1 β در گروه درمانی نیز نسبت به گروه پیشگیری در سطح $p < 0.001$ افزایش یافته است. و سطح سرمی IL-1 β در گروه EAE نیز نسبت به گروه کنترل سالم افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد ($p < 0.0001$) (نمودار ۴).



نمودار ۴: بررسی مقایسه‌ای سطح سرمی سایتوکاین پیش التهابی IL-1 β در موش‌های C57BL/6، ۳۵ روز پس از القا EAE. سطح IL-1 β در تمامی گروه‌های تجربی دریافت‌کننده آستاگزانتین (پیشگیری و درمان) در مقایسه با سطح IL-1 β در گروه EAE کاهش معنی‌داری را در سطح $p < 0.0001$ ارائه می‌دهد. سطح IL-1 β در گروه درمانی نیز نسبت به گروه پیشگیری افزایش معنی‌داری یافته است ($p < 0.001$) †† همچنین سطح سرمی سایتوکاین پیش التهابی IL-1 β در گروه بیمار EAE و گروه درمانی نسبت به گروه کنترل طبیعی افزایش معنی‌داری در سطح $p < 0.05$ نشان داد. ### $p < 0.0001$ # نشان می‌دهد (*). ارائه دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه EAE و # نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل طبیعی، † نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه پیشگیری، $n = 8$).

نسبت به گروه EAE نشان می‌دهد ($p < 0.0001$). در صورتی که سطح سایتوکاین IL-6 در

بالینی خفیف و از روز ۳۲ ام پس از القای بیماری قابل مشاهده بود.

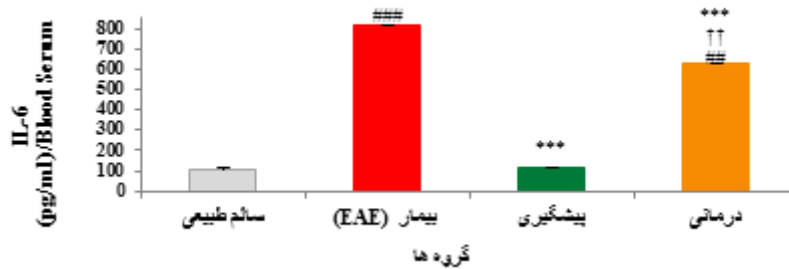
نتایج تست MTT حاکی از کاهش معنی‌دار تکثیر لنفوسیتی در گروه‌های پیشگیری و درمانی موش‌های دریافت‌کننده آستاگزانتین در مقایسه با گروه EAE بدون درمان، در پی تحریک مجدد لنفوسیت‌های طحال با پپتید MOG در محیط کشت می‌باشد. این اختلاف

سطوح سرمی سایتوکاین IL-1 β در گروه‌های پیشگیری و تحت درمان که آستاگزانتین دریافت کرده بودند در قیاس با سطح سرمی IL-1 β در گروه EAE کاهش معنی‌داری یافته است ($p < 0.0001$). سطح سرمی سایتوکاین IL-1 β در گروه درمانی در قیاس با گروه کنترل سالم افزایش

سطوح سرمی سایتوکاین IL-6 در گروه‌های پیشگیری و درمانی دریافت‌کننده آستاگزانتین کاهش معنی‌داری

سالم افزایش معنی داری را نشان می دهد ($p < 0/0001$). از سوی دیگر سطح سرمی IL-6 در گروه پیشگیری در مقایسه با گروه درمانی نیز اختلاف معنی داری در سطح $p < 0/001$ ارائه می دهد (نمودار ۵).

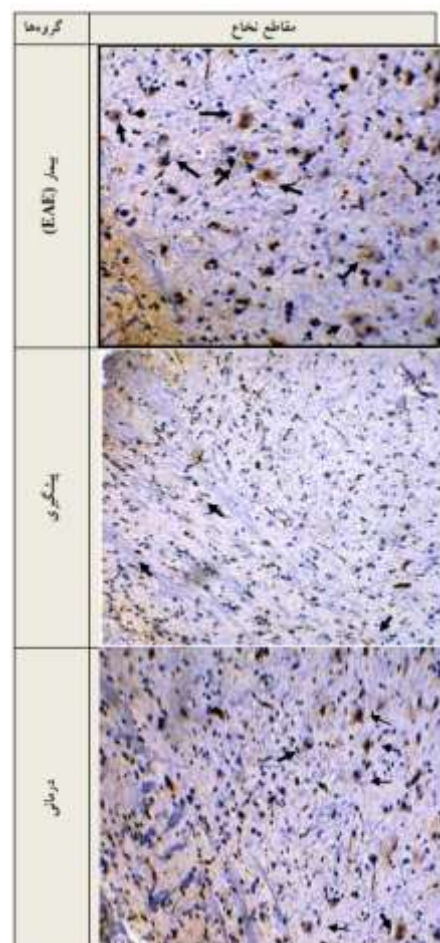
مقایسه با گروه کنترل سالم و همچنین سطوح IL-6 در گروه درمانی نسبت به گروه موش های کنترل سالم افزایش معنی داری یافته است ($p < 0/001$) و سطح سرمی IL-6 در گروه EAE نیز نسبت به گروه کنترل



نمودار ۵ : بررسی مقایسه ای سطح سرمی اینترلوکین پیش التهابی IL-6: در موش های C57BL/6، ۳۵ روز پس از القا EAE: سطح اینترلوکین IL-6 در موش های گروه پیشگیری و درمانی نسبت به گروه بیمار EAE کاهش معنی دار یافته است ($p < 0.0001$) سطح IL-6 در گروه درمانی نیز نسبت به گروه پیشگیری افزایش معنی داری یافته است ($p < 0.001$). سطح سایتوکاین IL-6 در گروه بیمار EAE و گروه درمانی نسبت به گروه موش های سالم افزایش معنی داری یافته اند ($p < 0.0001$, $p < 0.001$) (# نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه بیمار EAE و # نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل سالم طبیعی، † نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه پیشگیری، n=8).

قیاس با گروه بیمار EAE کاهش چشمگیری یافته است (شکل ۱) ($p < 0.0001$).

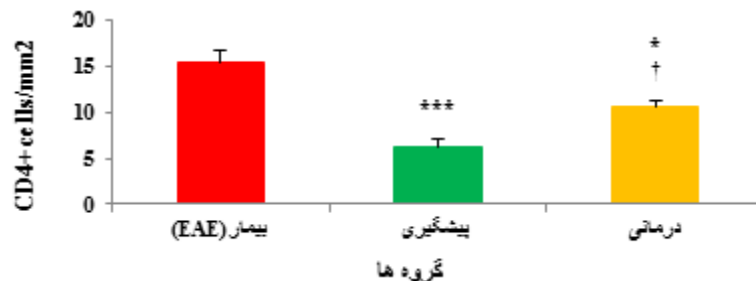
میزان ارتشاح CD4 در مقاطع نخاع گروه پیشگیری در



شکل ۱: مطالعات ایمونوهیستوشیمی اثرات پیشگیرانه و درمانی آستاگزانتین بر بافت نخاعی موش ماده C57BL/6 مدل EAE: تصاویر بالا رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی بافت نخاع با آنتی بادی CD4 بر علیه مولکول های سطحی سلول CD4 را ارائه می دهد. رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی نشان داد که زیرمجموعه های لنفوسیتی به داخل نخاع موش القا شده EAE نفوذ کرده اند، ولی مصرف آستاگزانتین در گروه های تجربی باعث کاهش دانسیته CD4 در نخاع موش های گروه پیشگیری و درمانی (به خصوص موش های گروه پیشگیری) در مقایسه با موش های بیمار EAE شده است. پیکان ها سلول های احتمالی CD4 رنگ آمیزی شده با آنتی بادی CD4 را نشان می دهند اطراف این سلولها هاله قهوه ای رنگ مشاهده می شود (بزرگنمایی ۱۰۰×)

CD4⁺ در مقاطع بافت نخاع گروه پیشگیری نسبت به گروه درمانی در سطح $p < 0.05$ مشاهده می‌شود (نمودار ۶).

نفوذ CD4⁺ در مقاطع بافت نخاعی گروه درمانی نیز در سطح $p < 0.05$ نسبت به گروه EAE کاهش یافته و بین دو گروه پیشگیری و درمانی نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده می‌شود به طوری که اختلاف در مقادیر ارتشاح



نمودار ۶. تعداد CD4⁺ ارتشاح یافته در بافت نخاع موش‌های گروه بیمار (EAE) و گروه‌های تجربی دریافت کننده آستاگزانتین: در تمامی گروه‌های تجربی دریافت کننده آستاگزانتین (پیشگیری و درمان) ارتشاح CD4⁺ کاهش چشمگیری نسبت به گروه EAE نشان می‌دهند ($p < 0.05$, $***p < 0.0001$) و تعداد CD4⁺ در بافت نخاعی موش‌های گروه پیشگیری نیز نسبت به گروه درمانی کاهش معنی‌داری در سطح $P < 0.05$ ارائه داد (* ارائه دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه EAE و † ارائه دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه پیشگیری، $n=8$).

مدولاتوری سیستم ایمنی این مولکول را توجیه کرد. آستاگزانتین می‌تواند از سد خونی-مغزی عبور کرده و سبب استحکام غشا سلولی شود (۱۷). مولکول آستاگزانتین دارای گروه کتونی و هیدروکسیلی بوده که

در دو انتهای مولکول آستاگزانتین قرار دارد و به زنجیره پلی‌ان (پیوند دوگانه) در مرکز مولکول مزدوج شده است. گروه‌های هیدروکسیلی در بخش لیپیدی غشا دو لایه‌ای نفوذ کرده و در ناحیه مجاور به بخش لیپیدی در فاز مایع قرار می‌گیرند، در نتیجه منجر به کاهش سیالیت غشا شده و یکپارچگی و تمامیت غشا و متعاقب آن، ساختار و عملکرد غشا حفظ می‌شود. حضور آستاگزانتین و نفوذ آن در BBB به‌خصوص پیش از القا بیماری EAE، این استحکام و حفظ یکپارچگی و تمامیت غشا را تشدید نموده، در نتیجه نفوذ سلول‌های ایمنی به داخل CNS کاهش می‌یابد (۱۸ و ۵).

در این مطالعه ما اثرات پیشگیرانه و درمانی آستاگزانتین را بر روی علائم نورولوژیکی و شدت بیماری و نقش حفاظتی آن در سطح مولکولی و ایمونوهیستوشیمی را بررسی شد. گروه‌های تجربی دریافت کننده آستاگزانتین (پیشگیری و درمانی) نسبت به گروه بیمار کاهش وزن

بحث

تاکنون مطالعات بالینی درک توسعه یافته‌ای از پاتوفیزیولوژی MS ارائه داده است. پاسخ‌ها و واکنش‌های التهابی متفاوتی در پاتوژنز این بیماری گزارش شده است، واکنش آنتی بادی‌ها، دمی‌لینه شدن آکسون‌ها و اثرات سلول‌های CD4⁺ در خود ایمنی سیستم عصبی مرکزی مشاهده شده‌اند. با استفاده از مدل‌های تجربی ثابت شد سلول‌های CD4⁺ موجب آسیب در سیستم عصبی مرکزی می‌شود و نقش سایتوکاین‌های التهابی قابل مشاهده می‌باشد (۱۵).

در مطالعه پیش رو آستاگزانتین به‌عنوان یک آنتیاکسیدانت قدرتمند در نظر گرفته شده است که از گسترش بیماری EAE به‌عنوان مدل مورد مطالعه MS جلوگیری کرده است. طبق گزارشات ثبت شده کاروتنوئید آستاگزانتین دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانتی بسیار قوی می‌باشد (۱۶) و بر روی سلامتی انسان تاثیر به‌سزایی داشته و از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، چراکه بر خلاف دیگر آنتی‌اکسیدانت‌ها، آستاگزانتین مواد اکسیدانتی مضر برای بدن تولید نمی‌کند (۵). با مطالعه ساختار آستاگزانتین می‌توان فعالیت آنتی‌اکسیدانتی، ضدالتهابی و

نقش $IL-1\beta$ به عنوان سایتوکاین پیش التهابی که توسط مونوسیت و ماکروفاژها و سلول های B و T و در سیستم عصبی مرکزی در طول القا EAE، تنظیم می شود ثابت شده است و همچنین سبب آپوپتوزیس سلول های عصبی میشود (۲۱). آستاگزانتین همچنین به وسیله اثر تنظیم کنندگی و کاهندگی بر سایتوکاین های التهابی سبب حفظ یکپارچگی و تمامیت سد خونی مغزی می شود و مانع نفوذ سلول های ایمنی به سیستم عصبی مرکزی می شود. از طرفی سایتوکاین ها به مانند سایر پروتئین های سیگنالی، نقش مهمی در تنظیم پاسخ ایمنی در مدل EAE بر عهده دارند (۲۲). مشخص شده است سایتوکاین های $Th1$ در پیشرفت بیماری نقش داشته است (۲۳). نتایج مطالعه ای در شرایط *in vitro* نشان می دهد که آستاگزانتین پاسخ سلول های ایمنی لنفوسیتی و تولید سایتوکاین های $Th1$ را تنظیم و تعدیل می کند (۲۴).

گزارش های دیگری حاکی از افزایش تولید $IL-6$ در مرحله پیشرفت و گسترش بیماری MS بوده است (۲۵) که به وسیله اثر تخریبی بر BBB، باعث دمیلینه شدن و التهاب عصبی می شود (۲۶). مطالعات Ying و همکاران (۱۰) نشان می دهد که آستاگزانتین به سهولت از سد خونی مغزی عبور کرده و این امر سبب می شود این کاروتنوئید بتواند سیستم اعصاب مرکزی را در برابر آسیب های مزمن و حاد تخریب نورونی محافظت کند. به نظر می رسد فعالیت های آنتی اکسیدانتی و ضد التهابی و سایر اثرات بیولوژیک بالقوه آستاگزانتین در محافظت نورونی نقش داشته باشند. در واکنش به آسیب های وارد بر سیستم عصبی، سطح برخی از سایتوکاین های التهابی در خون افزایش می یابد و چندین واکنش دفاعی مانند فعال شدن محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال رخ می دهد. Balietti و همکاران (۲۷) اثر آستاگزانتین را در روند پیری وابسته به جنسیت بررسی کردند و گزارش کردند پس از مصرف آستاگزانتین، سایتوکاین های ضد

اندکی را بعد از القا بیماری ارائه دادند. همچنین شدت بیماری در هر دو گروه تجربی دریافت کننده آستاگزانتین (پیشگیری و درمانی) نسبت به گروه EAE کاهش معنی داری یافته بود. از طرفی مصرف آستاگزانتین در گروه های تجربی (پیشگیری و درمانی) سبب کاهش سطوح سایتوکاین های پیش التهابی اینترلوکین یک بتا ($IL-1\beta$) و اینترلوکین ۶ ($IL-6$) در سرم خون موش های القا شده EAE شده است. شدت بیماری و سطوح سایتوکاین های پیش التهابی $IL-1\beta$ و $IL-6$ در سرم خون موش های گروه پیشگیری نسبت به گروه درمانی کاهش معنی داری یافته بود. میزان تکثیر لنفوسیت ها که به وسیله Proliferation index ارائه میشود نیز در گروه های تجربی دریافت کننده آستاگزانتین (پیشگیری و درمانی) در قیاس با گروه بیمار EAE کاهش یافته بود و مقادیر تکثیر لنفوسیت ها در گروه پیشگیری نیز اختلاف معنی داری نسبت به گروه درمانی نشان داد. مطالعات ایمونوهیستوشیمی بافت نخاع نیز کاهش نفوذ سلول های ایمنی و ارتشاح لنفوسیت $TCD4^+$ را در هر دو گروه تجربی پیشگیری و درمانی نسبت به گروه EAE به نمایش گذاشت و این کاهش نفوذ $CD4^+$ در بافت نخاعی گروه پیشگیری نسبت به گروه درمانی چشمگیر بوده است، در صورتی که توقع می رفت در طی روند التهاب، نفوذ پذیری سد خونی-مغزی افزایش یافته باشد.

در واکنش های التهابی سطح سایتوکاین های التهابی در سرم خون افزایش می یابد مطالعات پیشین نقش $IL-1\beta$ و $IL-6$ را در تشدید علائم و بروز ضایعات در بیماری MS به اثبات رسانیده اند (۱۹۲۰). طی تحقیقاتی که بر روی موش مدل MS انجام شد، به نقش موثر $IL-6$ اشاره شد، به طوری که آنتی بادی های مخصوص $IL-6$ در کاهش اثرات EAE در موش موثر بوده و انتقال سیگنال از طریق باند شدن با گیرنده $IL6$ در غشا سلول امکان پذیر میباشد (۱۹).

سایتوکاين‌های التهابی می‌شود (۳۰). مکانیسم مهم دیگر، نفوذ آستاگزانتین در سد خونی-مغزی و ایجاد استحکام و حفظ یکپارچگی و تمامیت غشا می‌باشد در نتیجه منجر به کاهش نفوذ سلول‌های ایمنی به‌داخل سیستم اعصاب مرکزی می‌شود (۵۱۸ و ۵).

آستاگزانتین به سهولت از سد خونی-مغزی عبور کرده و سیستم اعصاب مرکزی را در برابر آسیب‌های مزمن و حاد تخریب سلول‌های عصبی محافظت می‌کند. همه این مکانیسم‌ها و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانسی و ضدالتهابی آستاگزانتین در محافظت نورونی نقش به‌سزایی خواهد داشت (۱۰).

در مطالعه کنونی نیز کاهش سطح IL-1 β ، IL-6 در گروه‌های تجربی دریافت‌کننده آستاگزانتین (گروه‌های پیشگیری و درمانی) در مقایسه با گروه موش‌های EAE بدون درمان منعکس‌کننده اثرات آستاگزانتین بر حفظ یکپارچگی سد خونی-مغزی است که مانع پیشرفت التهاب و کاهش آن می‌شود. تکثیر سلول‌های لنفوسیتی که به-وسیله شاخص تحریکی ارائه شده است در تمامی گروه‌های تجربی دریافت‌کننده آستاگزانتین (گروه‌های پیشگیری و درمانی) در قیاس با گروه موش‌های EAE بدون درمان کاهش یافته است.

اگرچه تاکنون مکانیسم عملکرد گیرنده‌های مداخله‌کننده در این زمینه به اثبات نرسیده است اما نقش تحریک سلول‌های ایمنی لنفوسیتی در این زمینه کاملاً مبرهن و واضح می‌باشد. در واقع توانایی آستاگزانتین در تنظیم کاهشی، تکثیر لنفوسیت‌های T تحریک شده با پروتئین MOG35-55 که یک فاکتور مهم در پاتوژنز بیماری است را کاهش می‌دهد (۲۴).

در مطالعه مشابه دیگری ارزیابی و مقایسه سایتوکاين‌های التهابی و ضدالتهابی به‌دست آمده از کشت سلول‌های طحال موش‌های مدل MS پیش درمان شده با آستاگزانتین نشان داد که روند التهاب کاهش یافته است (۳۱).

التهابی باعث توقف عملکرد عوامل التهابی می‌شود. این عوامل نقش مهمی در بروز پاسخ‌های التهابی و ایمنی دارد به‌طوریکه در موش‌های دریافت‌کننده آستاگزانتین میزان IL-1 β در هر دو ناحیه مغزی و مخچه‌ای کاهش معنی-داری یافته است.

گزارش‌های فوق‌الذکر با یافته‌های به‌دست آمده از این مطالعه مطابقت داشته به‌طوریکه سطوح سایتوکاين‌های التهابی IL-1 β و IL-6 در گروه EAE افزایش یافته و در گروه‌های دریافت‌کننده آستاگزانتین میزان سطح این سایتوکاين‌های التهابی کاهش یافت. مشاهدات Zhou و همکاران (۲۸)، تاثیر آستاگزانتین بر افسردگی ناشی از دیابت را در موش‌های مدل دیابت ارائه و گزارش کردند آستاگزانتین بیان IL-1 β و IL-6 در هیپوکامپ را کاهش داده است. مکانیسم عمل آستاگزانتین بر روی مهار التهاب بوده و از این طریق می‌توانند نورون‌های هیپوکامپ و آمیگدال و هیپوتالاموس را در برابر آسیب هایپرگلاسیسمیک محافظت نماید.

در مطالعات ایمونوهیستوشیمی تحقیق پیشرو در گروه‌های تجربی دریافت‌کننده آستاگزانتین میزان ارتشاح سلول‌های التهابی CD4⁺ به بافت نخاعی نسبت به گروه بیمار کاهش چشمگیری یافت. این امر به‌خصوص در گروه پیشگیری نمود واضحی داشت.

یکی از مکانیسم‌های پیشنهادی جهت تاثیر آستاگزانتین بر روی رشد و تمایز سلول‌های عصبی و نوروزن اشاره بر تنظیم سیگنال ERK می‌باشد. سیگنال ERK (Mitogen-activated protein kinase) MAPKs (پروتئین کیناز فعال شده با میتوزن) تاثیر گذاشته و از آنجاکه MAPKs در واکنش‌های سلولی نسبت به سایتوکاين‌های التهابی مداخله کرده در نهایت منجر به تنظیم عملکرد سلولی، بیان ژن، تکثیر، تمایز و بقا سلولی و آپوپتوزیس می‌شود (۲۹). آستاگزانتین همچنین با سرکوب گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)، القاکننده بیان هسته‌ای NF- κ B، سبب کاهش تولید

سیستم عصبی مرکزی مطالعه کلینیکی بیشتری را می-طلبد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله بدین وسیله از جناب آقای دکتر توانگر پاتوبیولوژیست و عضو هیات علمی علوم پزشکی تهران که در مطالعات بخش هیستوپاتولوژی و ایمنوهایستوپاتولوژی صمیمانه راهنمایی و همراهی فرمودند و همچنین از بخش بیومدیکال دانشگاه الزهرا و مجتمع زکریای رازی دانشگاه علوم تحقیقات تهران قدردانی و سپاسگزاری می‌نمایند.

منابع

1. Lennart TM, Philippe Saikali; Roland S. Liblau, Nathalie Arbour Contribution of CD8+ Lymphocytes to the immune-pathogenesis of multiple sclerosis and its animal models. 2011; 1812: 151-161.
2. Garson JA, Huggett JF, Bustin SA, Pfaffl MW, Benes V, Vandesompele J, Shipley GL. Unreliable real-time PCR analysis of human endogenous retrovirus-W (HERV-W) RNA expression and DNA copy number in multiple sclerosis. AIDS Res Hum Retroviruses. 2009; 25: 377-378.
3. Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. Cytokine, 2015; 74(1): 5-17.
4. Yadav SK, Mindur JE, Ito K, Dhib-Jalbut S. Advances in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. Curr Opin Neurol. 2015; 28(3): 206-19.
5. Ranga Rao A, Phang SM, Ravi S, Aswathanarayana RG. Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications—A review. Mar. Drugs. 2014; 12(1): 128–152.

با توجه به مطالب فوق می‌توان اثرات کاهش شدت التهاب ناشی از تجویز آستاگزانتین را در موش‌های مدل EAE، در گروه‌های پیشگیری و درمانی، به نحوه عملکرد آستاگزانتین به‌منظور حفظ تمامیت و یکپارچگی غشا در سد خونی مغزی سیستم عصبی مرکزی و اثرات آنتی‌اکسیدانتی و ضدالتهابی آن نسبت داد. تاثیر آستاگزانتین در ایجاد کاهش سیالیت غشا و حفظ یکپارچگی و تمامیت غشا و حفظ ساختار و عملکرد صحیح غشا و حضور آستاگزانتین و نفوذ آن در سد خونی-مغزی به‌خصوص پیش از القا بیماری EAE، سبب شده است علائم و شدت بیماری در گروه پیشگیری تخفیف یافته، در نتیجه نفوذ سلول‌های التهابی به‌داخل سیستم اعصاب مرکزی در این گروه نسبت به گروه درمانی کاهش یافته و اثرات بهبود دهنده به‌وضوح مشاهده می‌شود.

با توجه به داده‌های به‌دست آمده و مدارک می‌توان امیدوار بود آستاگزانتین به‌عنوان یک مکمل خوراکی نقش موثری در پیشگیری، التیام و کاهش التهاب و تخریب نورونی ناشی از ابتلا به بیماری مالتیپل اسکلروزیس داشته باشد.

نتیجه‌گیری

آستاگزانتین به‌عنوان یک فاکتور آنتی‌اکسیدانتی، ضدالتهابی قوی، بدون اثر سمی و به‌عنوان یک ترکیب محلول در چربی قادر است به‌طور موثر از سد خونی مغزی عبور کند. سایتوکاین‌ها مانند بعضی پروتئین‌های سیگنالی، نقش مهمی در تنظیم و تعدیل پاسخ ایمنی در مدل MS (EAE) بر عهده دارند. آستاگزانتین با تاثیر تنظیم‌کنندگی و کاهش سطح سایتوکاین‌های التهابی سبب حفظ یکپارچگی و تمامیت سد خونی مغزی شده و مانع نفوذ سلول‌های ایمنی به سیستم عصبی مرکزی می‌گردد علی‌رغم مشاهده کاهش سطح سایتوکاین‌های التهابی و کاهش ارتشاح CD4⁺ در بافت نخاع موش‌های دریافت‌کننده آستاگزانتین بخصوص در گروه پیشگیری، مصرف مکملی یا دارویی آستاگزانتین جهت پیشگیری و درمان بیماری مالتیپل اسکلروزیس و کاهش اثرات التهابی و تخریبی بر

6. Kistler A. Metabolism and CYP-inducer properties of astaxanthin in man and primary human hepatocytes, Arch. Toxicol. 2002; 75(11-12): 665-675.
7. Bennedsen M, Wang X, Willen R, Wadstrom T, Andersen LP. Treatment of H. pylori infected mice with antioxidant astaxanthin reduces gastric inflammation, bacterial load and modulates cytokine release by splenocytes. Immunol. Lett. 1999; 70(3): 185-189.
8. Tso MOM, Lam TT. Method of Retarding and Ameliorating Central Nervous System and Eye Damage. U.S. Patent. 1996; 5: 527-533.
9. Boussiba S, Bing W, Yuan J-P, Zarka A, et al. Changes in pigments profile in the green alga Haematococcus pluvialis exposed to environmental stresses. Biotechnol Lett. 1999; 21(7): 601-4.
10. Ying Cj, Zhang F, Zhou Xy, Hu Xt, et al. Anti-inflammatory Effect of Astaxanthin on the Sickness Behavior Induced by Diabetes Mellitus. Cell Mol Neurobiol. 2015; 35(7).
11. Baliotti M, Giannubilo SR, Giorgetti B, Solazzi M, Turi A, et al. The effect of astaxanthin on the aging rat brain: gender-related differences in modulating inflammation. J Sci Food Agric. 2016; 96(2): 615-8.
12. Mosayebi G, Moazzeni S M, Sanati M H. Effect of sex on susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis induced with MOG35-55 peptide in C57BL/6 Mice. Medical Journal of Tabriz Univ of Med Sci 2006; 27(4): 95-100[Persian].
13. Chew BP, Park JS. Carotenoid action on the immune response. J. Nutr. 2004; 134: 257S-261S.
14. Yuri T, Yoshizawa K, Emoto Y, Kinoshita Y, et al. Effects of Dietary Xanthophylls, Canthaxanthin and Astaxanthin on N-Methyl-N-nitrosourea-induced Rat Mammary Carcinogenesis. In Vivo. 2016; 11-12; 30(6): 795-800.
15. Stromnes IM, Goverman JM. Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. Nat Protoc. 2006; 1(4): 1952-60.
16. Guerin M, Mark E. Huntley and Miguel Olaizola, Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. Trends Biotechnol. 2003; 21(5): 210-216.
17. Sarada R, Vidhyavathi R, Usha D, Ravishankar GA. An Efficient Method for Extraction of Astaxanthin from Green Alga Haematococcus pluvialis. J. Agric. Food Chem. 2006; 54(20): 7585-7588.
18. Barros MP, Pinto E, Colepicolo P, Pedersen M. Astaxanthin and peridinin inhibit oxidative damage in Fe²⁺-loaded liposomes: scavenging oxyradicals or changing membrane permeability? Biochem Biophys Res Comm. 2001; 288(1): 225-32.
19. 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 encephalomyelitis research. Brain. 2006; 129(Pt 8): 1953-71.
20. Narender N, Musfiquidin K, Manjeet K. Paintlia, Md Nasrul Hoda, and Shailendra Giri. Metformin Attenuated the Autoimmune Disease of the Central Nervous System in Animal Models of Multiple Sclerosis. The Journal of Immunology. 2009; 182(12): 8005-8014.
21. Stoll G, Jander S, Schroeter M. Cytokines in CNS disorders: neurotoxicity versus neuroprotection J Neural Transm Suppl. 2000; 59: 81-9.
22. Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, et al. Complementary DNA for a

- novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*. 1986; 324(6092):73-6.
23. Miller SD, Karpus WJ. The immunopathogenesis and regulation of Tcell-mediated demyelinating diseases. *Immunology Today*. 1994; 15(8): 356-361.
24. Kuan-Hung L, Kao-Chang L, Wan-Jung L, Philip-Aloysius T, et al. Astaxanthin, a Carotenoid, Stimulates Immune Responses by Enhancing IFN- and IL-2 Secretion in Primary Cultured Lymphocytes in Vitro and ex Vivo. *Int. J. Mol. Sci*. 2016; 17(1): 44;1-10.
25. Graber JJ, Dhib-Jalbut S. Protective autoimmunity in the nervous system. *Pharmacol Ther*. 2009; 121(2): 147-59.
26. Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. *Scand J Immunol*. 2011; 74(1): 1-13.
27. Baliotti M, Giannubilo SR, Giorgetti B, Solazzi M, et al. The effect of astaxanthin on the aging rat brain: gender-related differences in modulating inflammation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2016; 96(2): 615-618.
28. Zhou Xy, Zhang F, Hu Xt, Chen J, et al. Depression can be prevented by Astaxanthin through inhibition of hippocampal inflammation in diabetic mice. *Brain Res*. 2017; 1657: 262-8.
29. Kim YH, Koh HK, Kim DS. Down-regulation of IL-6 production by astaxanthin via ERK-, MSK-, and NFkappaB- mediated signals in activated microglia. *Int Immunopharmacol*. 2010b; 10(12): 1560-1572.
30. Speranza L, Pesce M, Patruno A, Franceschelli S, et al. Astaxanthin treatment reduced oxidative induced pro-inflammatory cytokines secretion in U937: SHP-1 as a novel biological target. *Mar. Drugs*. 2012; 10(4): 890-899.
31. Bidaran S, Ahmadi AR, Yaghmaei P, Sanati MH, et al. Astaxanthin effectiveness in preventing multiple sclerosis in animal model, Bratisl Med J. 2018; 119 (3);160 – 166.

Study of the preventive and therapeutic effects of astaxanthin carotinoids on Multiple Sclerosis (MS) Disease in C57BL/6 Mice

Bidaran S, Ph.D.¹, yaghmaie P, Ph.D.^{1*}, Ahmadi A, Ph.D.², Ebrahim Habibi A, Ph.D.³, Sanati MH, Ph.D.⁴

1. Islamic Azad University, Science and Research Branch of Tehran, Faculty of Basic Sciences, Department of Biology, Tehran, Iran.
2. Al-Zahra University, Women's Research Center, Biomedical Group, Tehran, Iran.
3. Tehran University of Medical Sciences, Endocrine Research Center, Department of Molecular Modeling, Tehran, Iran.
4. National Institute of Genetics and Biotechnology, Department of Medical Genetics, Tehran, Iran

* Email corresponding author: yaghmaei_p@yahoo.com

Received: 16 Oct. 2018

Accepted: 23 Dec. 2018

Abstract

Aim: In the present study, we examined the possibility of astaxanthin usage in the MS model of mice, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).

Material and methods: EAE disease was induced using MOG35-55 peptide and complete Freund adjuvant (CFU) in female C57BL/6 mice. Mice were divided into control, patient group (MS model, EAE), and prevention group, the group received astaxanthin for 21 days before immunization, and astaxanthin treatment was initiated when mice showed the first symptoms of EAE. Each group consisted of 8 mice. The consumption of Astaxanthin was continued for 35 days, and each mouse received astaxanthin about 0.4% of the weight of used pellet (about 400 mg). Cell proliferation was measured by MTT, IL1 β , but IL6 levels (proinflammatory cytokines) were measured by ELISA. In addition, the spinal cord tissues were also taken for immunohistopathological evaluations.

Results: Based on the results, the use of astaxanthin produced appropriate clinical and pathological outcomes, lead to decrement of IL1 β , and IL6 proinflammatory cytokines ($P < 0.0001$) production. Immunohistopathologic studies also showed a decrease in leukocyte infiltration in the spinal cord of experimental groups.

Conclusion: Overall, this drug approach can be considered as a useful strategy in the prevention and treatment of multiple sclerosis.

Keywords: Astaxanthin, experimental encephalomyelitis autoimmune, proinflammatory cytokine, multiple sclerosis