

## بررسی اثر محافظتی ویتامین B12 بر روی میزان ابتلا رت های لویس

### آنسفالومیلیت آلرژیک تجربی در بیماری MS

مریم موسوی<sup>۱</sup>، اکبر کریمی<sup>۲</sup>، مجید گورویی<sup>۳</sup>

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، گروه بیوشیمی، تهران، ایران.

۲- استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران. [karimiakbar38@yahoo.com](mailto:karimiakbar38@yahoo.com)

۳- گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۱۵

#### چکیده

مقدمه و هدف: مالتیپل اسکلروزیز بیماری پیشرفته خود ایمنی سیستم عصب مرکزی است و آنسفالومیلیت آلرژیک تجربی (EAE) به- عنوان یک مدل حیوانی با ارزش برای این بیماری در نظر گرفته می شود. از آنجایی که ویتامین B12 در تعدیل کردن پاسخ های التهابی و در تشکیل صفحات میلین و تعدیل پاسخ های استرس اکسیداتیو شرکت دارد، هدف از این مطالعه بررسی تاثیرات آن بر روی رت های مبتلا به EAE است.

روش کار: با استفاده از ترکیب هموزنه نخاع کوچک هندی، EAE در رت های لویس القاء شد. از روز بعد از القاء بیماری، درمان ها با استفاده از ویتامین B12 شروع و به مدت ۱۰ روز به طول انجامید. از روش الیزا برای بررسی میزان سطح سرمی  $\alpha$ -TNF استفاده شد. تمام تست ها با استفاده از نرم افزار SPSS و با روش Mann Whitney U- test مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: در این مطالعه مشاهده شد که میزان شرایط کلینیکی بد و میزان  $\alpha$ -TNF در رت های مبتلا به EAE با افزایش میزان B12 کاهش پیدا نموده است.

نتیجه گیری: ویتامین B12 دارای اثر حفاظتی در کاهش شرایط ناشی از EAE بوده و می توان از آن در درمان مکمل بیماری MS استفاده نمود.

واژه های کلیدی: ویتامین B12، آنسفالومیلیت آلرژیک تجربی، بیماری MS

#### مقدمه

عصب مرکزی و یا برخی از پروتئین های ویژه میلین گونه جانوری دیگر مثل Myelin Basic Protein (MBP) یا اولیگو دنروسیت گلیکو پروتئین (Myelin Oligo Denrocyte Glycol Protein) (MOG) همراه با ادجوانت ایجاد می شود. در EAE نشانه هایی مثل فلج، التهاب، نواحی میلین زادیی شده در ماده سفید سیستم عصب مرکزی، آسیب به سد خونی - مغزی، نفوذ سلول های T و ماکروفاژها به سیستم عصب مرکزی دیده می شود (۷).

ویتامین B12 که به کوبالامین معروف است یک ترکیب ارگانیک فلزی است که اتم کبالت در آن درون یک حلقه کورین قرار گرفته و ساختاری شبیه به پورفرین هم (Heme) از آن شکل می گیرد را به وجود می آورد.

بیماری MS یکی از بیماری های التهابی است که عامل ایجاد آن حمله سلول های فعال شده به سیستم عصب مرکزی و از بین رفتن اعمال نورولوژیک می باشد (۴). درمان بیماری MS به دلیل پیچیدگی نا شناخته باقی مانده است و با وجود تلاش های گسترده تحقیقاتی، درمان های خاص و موثر هنوز ابداع نشده است (۹). برای درمان بیماری از داروهای ایتترفرون بتا و گلاتیرامراستات استفاده می گردد، با این حال تاثیرات این داروها در پیشرفت بیماری رضایت بخش نمی باشد (۱۷، ۱۳، ۱۰). آنسفالومیلیت آلرژیک تجربی (EAE) مدل حیوانی با ارزش در کارهای تحقیقاتی بر روی بیماری MS می باشد (۸). EAE در حیوانات توسط تزریق بافت سیستم

یک عامل محافظتی در جهت کاهش اثرات ناشی از بیماری زایی آنسفالومیلیت می باشد.

### مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی جهت مدل آنسفالومیلیت آلرژیک تجربی از روش Schnider و همکارانش استفاده شد (۱۸). برای این منظور پس از بیهوش کردن خوکچه های هندی نخاع آنها خارج شد. سپس با استفاده از یک میلی لیتر نرمال سالین و یک گرم نخاع تازه ترکیب هموژنه به دست آمد (۱۸). ترکیب هموژنه نخاع خوکچه هندی به نسبت یک به یک با ادجوانت کامل فرونت مخلوط شد تا یک ترکیب امولوسیون ایجاد شد. در نهایت ۲۵۰ میکرولیتر امولوسیون به دست آمده را به رت های لوئیس (۱۸۰-۲۰۰ گرم) به صورت زیرجلدی تزریق گردید. رت های لوئیس استفاده شده خالص بوده و در مرکز حیوان خانه دانشگاه پیام نور مرکز اصفهان نگه داری می شدند. این حیوانات نژادی از رت ها می باشند که در آزمایش های خودایمنی کاربرد فراوانی دارند. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی قرار داده شدند. آنها دسترسی آزادانه به آب و غذا داشتند و کلیه شرایط نگه داری استاندارد برای آنها اعمال شد.

### دارو درمانی

در ۴۰ رت بیماری القاء و به صورت تصادفی در چهار گروه قرار داده شدند:

گروه یک: یک روز درمیان نرمال سالین دریافت می کردند.

گروه دو: گروهی که به صورت یک روز درمیان mg/kg ۵، ویتامین B12 را دریافت می کردند.

گروه سوم: گروهی که به صورت یک روز درمیان mg/kg ۱۰، ویتامین B12 را دریافت می کردند.

گروه چهارم: گروهی که به صورت یک روز درمیان mg/kg ۱۵، ویتامین B12 را دریافت می کردند (۱۰).

### ارزیابی کلینیکی

کوبالامین بر خلاف هم نمی تواند در بدن انسان تولید شده و از رژیم غذایی تهیه می گردد (۱). کوبالامین برای دو آنزیم در سلول های انسانی به عنوان کوفاکتور نقش اساسی دارد:

۱- متیونین سنتاز که هموسیستئین را به متیونین تبدیل می کند.

۲- متیل مالونیل کوانزیم A سنتاز که باعث تبدیل متیل مالونیل کوانزیم A به سوکسینیل کوانزیم A می شود (۱).

اولین گزارشات درباره نقش ویتامین B12 در پاتوژنز بیماری MS بیش از سه دهه قبل صورت گرفته است ولی بیشتر این تحقیقات به دلیل مشکلات روش شناسی ضعیف باقی مانده است (۱۲). Misra و همکارانش در سال ۲۰۰۳ ضمن بررسی های صورت گرفته با MRI بر روی بیماران با کاهش ویتامین B12 و بیماران MS اعلام کردند که نواحی فاقد میلین در سیستم عصبی مرکزی هر دو گروه دارای تشابهات زیادی می باشند (۱۱). اختلالات عصبی ناشی از کمبود ویتامین B12 دارای نشانه هایی مثل میلین زدایی و مرگ اکسونی می باشد (۲۰). التهاب مزمن در بیشتر موارد با استرس های اکسیداتیو همراه بوده و این امر زمینه ساز بسیاری از بیماری های وابسته به سن مثل سرطان، آترواسکلروزیس، بیماری های همراه با تخریب سیستم عصب مرکزی و آرتریت می باشد (۳). Birch و همکارانش در سال ۲۰۰۹ گزارش کردند که مشتقات ویتامین B12 پاسخ های استرس اکسیداتیو را تعدیل نموده و بیماری های التهابی با افزایش سطح ترانس کوبال آمین ها همراه می باشد. آنها پیشنهاد کردند که مشتقات ویتامین B12 می تواند به عنوان مکمل در پاسخ های سلولی به التهاب مورد استفاده قرار گیرد (۳). با توجه به نقش های احتمالی B12 در تعدیل فرآیند های التهابی - استرس اکسیداتیو و نقش آن در احیای میلین هدف از این مطالعه بررسی اثر استفاده از ویتامین B12 به عنوان

صورت روزانه مورد بررسی قرار می گرفتند و مطابق جدول یک به آن‌ها امتیاز دهی شد (۱۸).

زمان تیمار ساعت ۱۰ صبح و به صورت یک روز در میان بود. روز تزریق ترکیب امولوسیون به عنوان روز صفر بعد از تزریق (odpi) در نظر گرفته شد. حیوانات به

جدول ۱- امتیازات مربوط به شرایط کلینیکی رت‌ها

| امتیاز | علائم و نشانه‌ها                |
|--------|---------------------------------|
| ۰      | بدون نشانه و علامت              |
| ۱      | دم فاقد کشیدگی طبیعی            |
| ۲      | فلج دم                          |
| ۳      | فلج جزئی در اندام حرکتی عقبی    |
| ۴      | فلج کامل پاها و فلج جزئی دست‌ها |
| ۵      | فلج کامل پاها و فلج کامل دست‌ها |
| ۶      | مرگ و میر                       |

۱۵ mg از روز ۱۳ بود. افزایش بروز نشان‌ها به تدریج بیشتر گردیده و بروز کامل فلج پاها در روز ۱۵ در گروه نرمال سالین مشهود بود و میانگین شدت بیماری در گروه‌های تحت درمان نسبت به گروه نرمال سالین به طور معنی داری کاهش پیدا کرده به طوری که این کاهش در گروه ۴ با دوز ۱۵mg/kg ویتامین B۱۲ کاملاً معنی دار می‌باشد (نمودار ۱).

#### نتایج مربوط به بررسی سطوح سرمی TNF- $\alpha$

میزان TNF- $\alpha$  در سرم خون رت‌ها در گروه‌های مختلف با روش الایزا اندازه‌گیری و نتایج به دست آمده مشخص نمود که تیمار B۱۲ موجب کاهش معنی دار میزان TNF- $\alpha$  در گروه‌های تحت درمان می‌شود. این کاهش در دوزهای ۱۰mg/kg و ۱۵ mg/kg ویتامین B۱۲ معنی دار ترمی‌باشد ( $P \leq 0/05$ ) (نمودار ۲).

#### اندازه‌گیری میزان TNF- $\alpha$

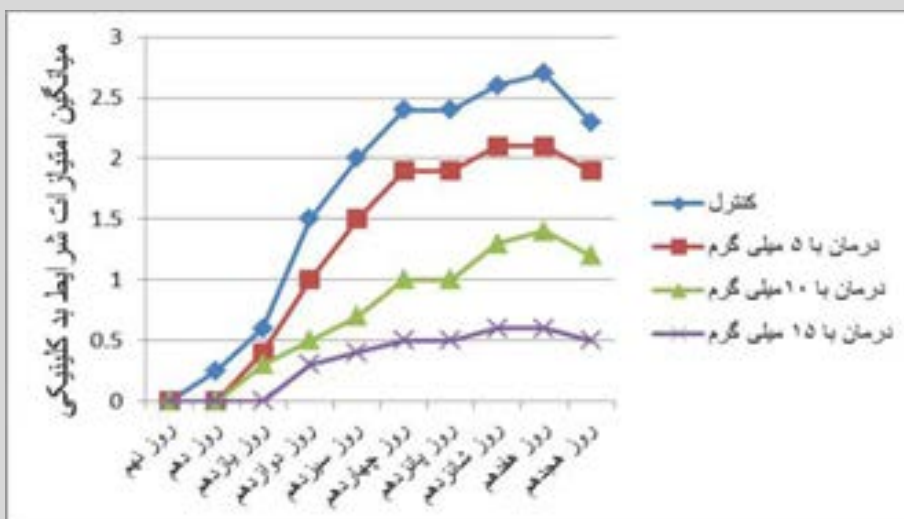
در روز ۱۴ بعد از تزریق امولوسیون، از حیوانات نمونه خون گرفته و پس از جدا سازی سرم‌ها میزان TNF- $\alpha$  آن‌ها با روش الایزا و با استفاده از کیت مخصوص تعیین TNF- $\alpha$  ساخت شرکت (Abcam) و مطابق با دستورالعمل کیت به شماره ab46070 اندازه‌گیری شد.

#### روش‌های آماری

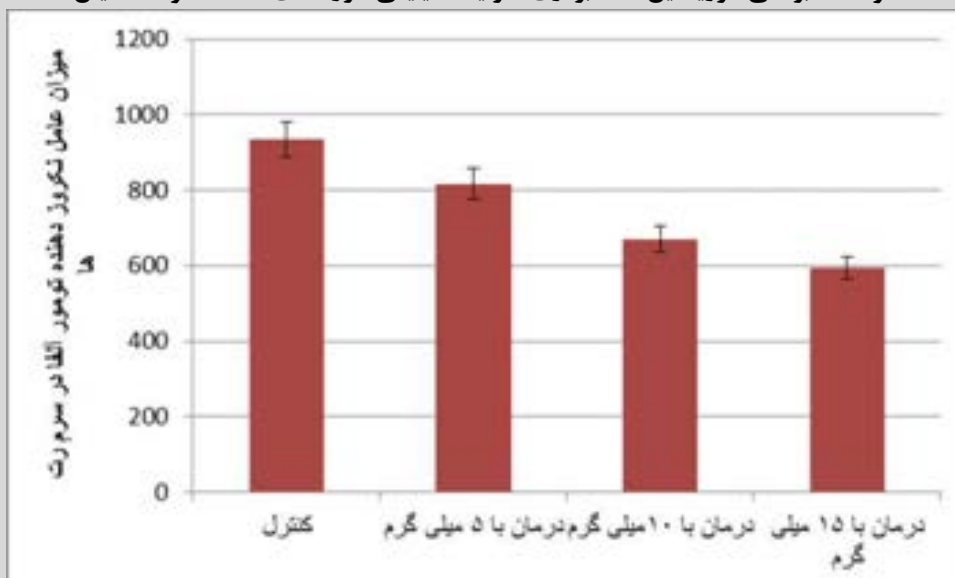
تمام تست‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و با روش Mann Whitney U- test به لحاظ آماری مورد بررسی قرار گرفت.  $P \leq 0/05$  به عنوان سطح معنی دار بودن داده‌ها در نظر گرفته شده است.

#### نتایج

**تاثیر ویتامین B۱۲ روی شرایط کلینیکی رت‌های القا شده**  
بعد از تزریق امولوسیون مورد نظر به رت‌ها در گروه‌های مختلف نشانه‌هایی مثل کاهش رفتارهای تغذیه‌ای و کاهش وزن بدن مشاهده گردید. از روز ۱۱ به بعد علائمی مثل فلج دم، فلج جزئی دست و پاها در گروه نرمال سالین دیده شد، درحالی‌که این نشانه‌ها در گروه با دوز



نمودار ۱- بررسی اثر ویتامین B۱۲ بر روی شرایط کلینیکی گروه های مختلف مورد آزمایش



نمودار ۲- بررسی اثر B۱۲ بر میانگین و انحراف از معیار میزان TNF-α در سرم گروه های مختلف

### بحث و نتیجه گیری

بیماری MS یک بیماری خود ایمنی سیستم عصب مرکزی است که نشانه های پاتولوژی آن شامل نفوذ ماکروفاژها و لنفوسیت ها به سیستم عصب مرکزی، میلین زدایی، آسیب اکسونی می باشد (۵). در MS و EAE دیده شده است که میکروگلیاها و استروسیت ها در پاتوژنز بیماری دخالت دارند و تاثیرات خود را با ترشح مولکول هایی به عنوان واسطه های تخریب کننده بافتی نشان می دهند (۱۹). با توجه به شباهت و نزدیکی بین MS و EAE، همین طور کاربردهای فراوان EAE در

زمینه تحقیقات بر روی MS در این تحقیق ما جهت ارزیابی تاثیر حفاظتی B۱۲ روی MS از مدل EAE استفاده گردید. یکی از موارد مهمی که در تحقیقات بر روی مدل های حیوانی MS مورد ارزیابی قرار می گیرد، مشاهده شرایط کلینیکی می باشد. هرچه شدت بیماری بیشتر شود، میزان بروز اختلالات حرکتی از جمله فلج کامل پاها و فلج کامل دست ها هم در حیوانات تحت آزمایش، نمود بیشتری پیدا می کند. در این مطالعه هم افزایش شرایط بد کلینیکی در گروه نرمال سالین و کاهش شرایط یاد شده در گروه دریافت کننده ویتامین

همراه می‌باشد (۱۲). تأثیرات تنظیم کنندگی ایمنی ویتامین B۱۲ بر تعدیل فعالیت سیتوکین های TNF- $\alpha$  گزارش شده است. ناکارآیی کوبالامین در موازات این مکانیزم ها، می تواند بیماری MS را با بدتر کردن فرآیندهای التهابی، میلین زدایی، کند کردن دوباره روند میلین سازی و ترمیم آن، تشدید کند. از سوی دیگر فعال سازی و گسترش نابه‌جای سلول‌های ایمنی رقیب که تقاضای فراینده ای از ویتامین B۱۲ دارند و فرآیندهای میلین زدایی و التهابی مداوم یا تکراری، تلاش برای دوباره میلین سازی و احیای مجدد آن مصرف ویتامین B۱۲ را افزایش می دهد و ممکن است به ناکارآیی ویتامین B ۱۲ منجر شود (۱۷، ۸). در این مطالعه مشاهده گردید که در طی افزایش سطح B۱۲ شرایط نامساعد کلینیکی در رت های EAE کاهش می یابد و خود نشان از اثر محافظتی B۱۲ دارد. همه این موارد می تواند به خاطر خواص آنتی اکسیدانی و ضد التهابی B۱۲ باشد. خواص ضد التهابی و آنتی اکسیدانی B۱۲ احتمالاً نتیجه ای از ترکیب اثرات مستقیم و غیر مستقیم می باشد. این تأثیرات شامل تحریک فعالیت متیونین سنتتاز، واکنش مستقیم با اکسیژن Reavtive و نیتریک اکساید، تأثیر در ذخیره جزئی گلوکوتایون و تعدیل کردن مولکول های پیام رسان می‌باشد و بدین جهت B۱۲ دارای فعالیت آنتی اکسیدانی شاخص در جایگاه های فارماکولوژی بوده و موجب حفاظت های سلولی مهم علیه استرس های اکسیداتیو و التهاب می شود (۳). در پایان می توان بیان نمود که مصرف ویتامین B۱۲ در بیماران ام اس می توان به عنوان یک درمان مکمل در کنار سایر درمان های لحاظ کرد.

B۱۲ مشاهده گردید (۱۹، ۱۸). سیتوکین های TNF- $\alpha$  و اینتر فرون گاما از جمله سیتوکین های پس التهابی هستند که به وسیله سلول های T خود ایمنی ترشح شده و مستقیماً سد خونی مغزی را تخریب کرده و عاملی در جهت میلین زدایی محسوب می شود (۲). سطوح پلاسمایی TNF- $\alpha$  با شدت و سختی EAE و بیماری ام اس مرتبط بوده و بیان گر حالات ایمنی می باشد و افزایش TNF- $\alpha$  نمایان گر گسترش بیماری است (۱۶). با توجه به نقش TNF- $\alpha$  در گسترش بیماری و هدف درمانی آن در این مطالعه میزان آن در سرم رت های گروه‌های مختلف بررسی شد. گروهی که ویتامین B۱۲ را با دوز ۱۵ mg/kg کاهش معناداری نشان داده است. این نتایج در راستای مطالعاتی است که اعلام کرده اند B۱۲ داری تأثیرات تنظیم کنندگی ایمنی می باشد و این تأثیرات شامل تعدیل فعالیت سیتوکین های TNF- $\alpha$  است (۱۵، ۱۰). ناکارآیی و کمبود ویتامین B۱۲ منجر به شکل گیری ناقص پوشش میلین شده و میزان متیلاسیون پروتئین MBP که جزء اصلی میلین سیستم عصب مرکزی می باشد به صورت ناقص انجام می شود. همین امر می تواند باعث شروع فرآیند خود ایمنی شده و ساختار میلین مورد هدف دستگاه ایمنی قرار گیرد (۶، ۱). گزارش گردیده که بیماری MS باعث گسترش نا به-جای سلول های ایمنی می شود که همین امر افزایش نیاز به B۱۲ را به وجود می آورد. فرآیند های میلین زدایی و در پی آن تلاش مجدد برای بازسازی میلین مصرف B۱۲ افزایش می دهد که همه این موارد منجر به کاهش سطح سرمی آن در بیماران MS می شود (۱۴، ۱۱، ۶). Miler و همکارانش در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که در طی روند بیماری ام اس احیای مجدد میلین با افزایش مصرف B۱۲

#### منابع

1. Babior, B.M., Bunn, H.F., Braunwald, E., Fauci, A.S., Kasper, D.L., Hauser, S.L. (2001).

Harrison's principles of internal medicine, 15<sup>th</sup> ed. New-York: McGraw-Hill, 674-80.

2. Bielekova, B., Martin, R. (2004). Development of biomarkers in multiple sclerosis. *Brain*, 127; 1463- 1478.
3. Birch, C.S., Brasch, N.E., MsCaddin, A., Williams, JH.H. ( 2009). A novel role for vitamin B12; Cobalamins are intracellular antioxidant in vitro. *Biology and Medicine*, 47; 184-188.
4. Blakemore, W.F. (2007). Regeneration review repair in MS: the view of experimental pathology. *J Neurological Sci*, 125 ;1-4.
5. Chen, G.Q., Chen, Y.Y., Wang, X.S., Wu, S.Z., Yang, H.M., Xu, H.Q. (2010). Chronic caffeine treatment attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis induced by guinea pig spinal cord homogenates in Wistar rats. *Brain Res*, 1309; 116 -124.
6. Crellin, R.F, Bottiglieri, T., Reynolds, E.H. (1990). Multiple sclerosis and macrocytosis. *Acta Neurol Scand*, 81; 388-91.
7. Ferguson, C., Sarlieve, L.I, Vincendon, G. (1990). Multiple sclerosis; review of main experimental data and pathogenic hypotheses. *Rev Med Intern*, 11; 201- 208.
8. Hedruel, M.T., Gillett, A., Olsson, T., Jagodic, M. (2009). Characterization of multiple sclerosis candidate gene expression kinetics in rat experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neur Immunol*, 210; 30-39.
9. Markelov, V., Ttushin, M. (2006). Bee venom therapy and low dose Naltrexone for treatment of MS. *Nepal Journal of Neuro Sci*, 3;71-77.
10. Mastronardi, F.G., Min, W., Wang, H., Winer, S., Dosch, M., Boggs, J.M. (2004). Attenuation of experimental autoimmune encephalomyelitis and nonimmune demyelination by IFN-beta plus vitamin B12: treatment to modify notch-1/sonic hedgehog balance. *J Immunol*, 172; 6418-26.
11. Misra, U.K., Kalita, J., Das, A. (2003). Vitamin B12 deficiency neurological syndromes: a clinical MRI and electrodiagnostic study. *Clin Neurophysiol*, 43; 57-64.
12. Miller, J.W. (2002). Vitamin B12 deficiency, tumor necrosis factor-alpha, and epidermal growth factor: a novel function for vitamin B12?. *Nutr Rev*, 60;142-4.
13. Najim, A. D., Khojali, M., Habbosh, H., Farah, S. (1999). Macrocytosis in multiple sclerosis: a study in 82 de novo Arab patients. *J Neurol Neuro Surg Psychiatry*, 54; 415-6.
14. Oh, R., Brown, D.L. (2003). Vitamin B12 deficiency. *Am Fam Physician*, 67; 979-86.
15. Pitt, D., Nagel Meier, I. E., Wilson, H. C., Raine, C. (2003). Glutamate uptake by oligodendrocytes : Implications for excitotoxicity in MS. *Neurology*, 61; 1113-1120.
16. Pollak, Y., Ovadia, H., Orion, E., Weidenfeld, J., Yirmiya, R. (2003). The EAE-associated behavioral syndrome: I Temporal correlation with inflammatory mediators. *J of Neuroimmunol*, 137; 94-99.
17. Scherer, K. (2003). Neurologic manifestations of Vitamin B12 deficiency. *NEJM*, 348; 2208-2214.
18. Schneider, C., Shuetz, G., Zollner, T.M. (2009). Acute neuro inflammation in Lewis rats. A model for acute multiple sclerosis relapses. *J.of Neuroimmunol*, 213; 84 – 90.
19. Smith, T., Groom, A., Zhu, B., Turski, L. (2000). Auto immune encephalomyelitis ameliorated by AMPA antagonists. *Nat Med*, 6; 62-66.
20. Son, D.J., Lee, J.W., Lee, Y.H., Song, H.S., Lee, C.K., Hong, J.T. (2007). The therapeutic application of anti arthritis, pain –releasing, and anti cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacol & Therap*, 115; 246-270.