

# اثرات ترتینوئین بر روی سیمای بالینی و هیستوپاتولوژیک مدل موشی اسکروز متعدد

سید میثم ابطحی فروشانی<sup>۱</sup>، نوروز دلیرزاد<sup>۲</sup>، رحیم حب نقی<sup>۲</sup>، اصغر مرواریدی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>گروه میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران <sup>۲</sup>گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران  
تاریخ وصول: ۱۳۹۲/۸/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۲۱

## چکیده

زمینه و هدف: با وجود پیشرفت‌هایی که در سال‌های اخیر در امر درمان بیماری اسکروز متعدد حاصل شده است، بسیاری از بیماران کم‌تر از حد بهینه به درمان‌های موجود پاسخ می‌دهند. در مطالعات گذشته به اثرات ایمنومودولاتوری ترتینوئین اشاره شده است. هدف این مطالعه بررسی اثرات ترتینوئین بر روی سیمای بالینی و هیستوپاتولوژیک مدل موشی اسکروز متعدد بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی بیماری آنسفالومیلیت تجربی خود ایمنی از طریق ایمن‌سازی با پپتید MOG<sub>35-55</sub> و ادجوانت کامل فروند، در موش‌های ماده C57BL/6 القاء شد. موش‌های مبتلا در دو گروه ۷ تایی قرار گرفتند. ۷ سر موش نیز به عنوان گروه سالم در نظر گرفته شدند. درمان با ترتینوئین (۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم یک روز در میان) از زمان بروز علائم درمانگاهی در گروه درمانی (روز ۱۲) آغاز گشت. هم‌زمان، گروه شاهد تنها حلال دارو را دریافت نمودند. علائم تا زمان کشتار موش‌ها (روز ۳۳) روزانه ثبت گردید. بافت مغز نیز به منظور ارزیابی‌های نوروپاتولوژی برداشت گردید و مقاطع تهیه شده به شیوه هماتوکسیلین-اُئوزین و تولوئیدین بلو- مارکی رنگ‌آمیزی شدند. داده‌ها با آزمون آماری مان ویتنی - یو تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: تجویز ترتینوئین پس از بروز علائم بیماری به طور معنی داری موجب تخفیف بیماری گردید ( $P < 0.05$ ). نتایج هیستولوژیک حاکی از کاهش شدت ادم پارانشیم، ارتشاح سلولی و استحاله نرون‌ها و دمیالیناسیون در مغز موش‌های دریافت کننده ترتینوئین نسبت به گروه شاهد به طور معنی داری کاهش بود ( $P < 0.05$ ).

نتیجه‌گیری: استفاده درمانی از ترتینوئین، ممکن است به عنوان استراتژی سودمند در درمان اسکروز متعدد مد نظر قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: اسکروز متعدد، آنسفالومیلیت تجربی خود ایمن، ترتینوئین

\* نویسنده مسئول: دکتر سید میثم ابطحی فروشانی، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه میکروب شناسی

E-mail: meysamabtahi@hotmail.com

## مقدمه

بیماری اسکروز متعدد<sup>(۱)</sup> (MS) یک بیماری مزمن، پیش‌رونده و خود التهابی سیستم اعصاب مرکزی می‌باشد که به دلیل قابلیت شدیداً ناتوان کننده آن به روی فرد مبتلا، دارای اثرات اجتماعی و اقتصادی مهمی می‌باشد (۱). تعداد مبتلایان به اسکروز متعدد در حدود ۲/۵ میلیون نفر در سرتاسر دنیا حدس زده می‌شود (۲). این بیماری عمدتاً افراد بالغ جوان را در محدوده سنی ۳۰ سال گرفتار می‌نماید (۳ و ۱). به طوری که این بیماری بعد از تروما به عنوان دومین عامل ایجاد ناتوانی نورولوژیک محسوب می‌شود (۱). با وجود پیشرفت‌هایی که در سال‌های اخیر در امر درمان بیماری اسکروز متعدد حاصل شده است، بسیاری از بیماران به طور بهینه به درمان‌های یاد شده پاسخ نمی‌دهند، به طوری که مقوله درمان و جلوگیری از پیشرفت بیماری همچنان به عنوان یک چالش پیش رو مطرح می‌باشد. بنابراین دستیابی به روش‌های درمانی کم خطر و ارزان قیمت جهت افزودن به رژیم درمانی مبتلایان به اسکروز متعدد لازم به نظر می‌رسد (۴ و ۳). در این بین آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی<sup>(۲)</sup> (EAE) به عنوان مدل جانوری بیماری اسکروز متعدد فرصت مناسبی را جهت ارزیابی اولیه فرآورده‌های دارویی جدید فراهم نموده است (۵).

تریتینوئین (آل-ترانس رتینوئیک اسید) یک متابولیت فعال ویتامین آ می‌باشد که دارای اثرات ضدسرطانی، تعدیل کننده ایمنی و هم‌چنین

آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. تریتینوئین نسبت به سایر ایزومرهای طبیعی ویتامین آ پایدارتر بوده و قابلیت نفوذ بیشتری را به سلول‌های بدن دارد (۶). 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 و نفریت موثرند (۷-۱۱).

هدف این مطالعه بررسی اثرات تریتینوئین بر روی سیمای بالینی و هیستوپاتولوژیک مدل موشی اسکروز متعدد بود.

## روش بررسی

این مطالعه تجربی بر روی موش‌های ماده خالص (inbred) نژاد C57BL/6 با محدوده سنی ۶ تا ۸ هفته نر انجام شد که از انستیتو پاستور ایران خریداری شده بود. این موش‌ها در حیوان خانه پژوهشگاه 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 تأیید قرار گرفته است.

برای القاء EAE: مقدار ۲۰۰ میکروگرم پپتید MOG<sub>33-55</sub> با (M-E-V-G-W-Y-R-S-P-F-S-R-V-V-H-L-Y-R-NG-K) و درجه خلوص ۹۵ درصد (شرکت ANASPEC - آمریکا) در

1- Multiple Sclerosis (MS)  
2- Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAG)

صورت داخل صفاقی گردید. انتخاب دوز تزریقی بر مبنای مطالعات گذشته بر روی سایر مدل‌های بیماری خود ایمن صورت گرفته است (۱۴ و ۱۳، ۷).

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 درصد DMSO (دارونما) قرار گرفتند. در ضمن ۷ سر 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 فرآیند ایجاد بیماری را بدون دریافت پپتید MOG<sub>33-55</sub> طی کرده و هم‌زمان با آن‌ها تحت درمان با دارونما قرار گرفتند.

روز ۳۳ پس از القای بیماری (۲۱ روز پس از شروع درمان)، موش‌ها تحت بیهوشی عمیق با ترکیب کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) قرار گرفتند. آنگاه به سرعت بافت مغز خارج گردید و با برش ساژیتال به دو نیمکره تقسیم شده و کلیه نمونه در داخل فرمالین بافر ۱۰ درصد قرار داده شد. پس از طی مراحل معمول تهیه بلوک‌های پارافینی، نمونه‌های مغز به طوری که محل برش ساژیتال به طرف پایین باشد، داخل بلوک قرار گرفتند. در ادامه با استفاده از دستگاه میکروتوم برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرومتر از قالب‌های پارافینی تهیه گردید. در نهایت نمونه‌های بافتی با روش معمول رنگ‌آمیزی هم‌اتوکسیلین-ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. برای دیدن میلین تخریب شده اقدام

۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سالین (PBS) و ۱۰۰ میکرولیتر ادجوانت فروند کامل (شرکت سیگما آمریکا) مخلوط و به صورت زیر جلدی در ناحیه پشت هر موش تزریق گردید. مقدار ۴۰۰ نانوگرم سم سیاه سرفه (شرکت سیگما آمریکا) نیز در حجم ۳۰۰ میکرولیتر PBS در روز تزریق پپتید و ۴۸ ساعت بعد به صورت داخل صفاقی تزریق گردید (۱۲). روند بیماری و تغییرات وزن موش‌ها روزانه مورد ارزیابی قرار گرفت. مقیاس ارزیابی شدت بیماری شامل؛ صفر؛ عدم بروز بیماری، یک؛ فلج شدن دم، دو؛ اختلال در راه رفتن، سه؛ فلجی پاهای عقبی، چهار؛ فلجی چهار دست و پا و پنج؛ مرگ بودند.

۱۴ سر موش پس از القاء بیماری به دو گروه ۷ تایی با شرایط سنی و وزنی یکسان تقسیم شده، تا ۲۱ روز پس از بروز علائم درمانگاهی به شرح زیر تحت درمان قرار گرفتند؛

گروه تحت درمان؛ استوک تریتنوئین (شرکت سیگما - آمریکا) به میزان ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در PBS حاوی ۲ درصد DMSO حل گردید. پس از تقسیم دارو در لوله‌های 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 تریتنوئین (۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) پس از بروز اولین علائم درمانگاهی (۱۲ روز پس از القاء بیماری) در همه موش‌های گروه مطالعه به

مویرگی وجود داشت، فضاهای خالی بسیار وسیعی تشکیل گردیده بود. بزرگترین فضاهای ادماتوز در هیپوکامپ و اطراف شاخ آمون به وجود آمده بود. بافت مغز ادماتوز بوده و ادم در قسمت‌های عمقی مغز از قسمت کورتکس بیشتر بود (تصویر ۱) در لایه مولکولی مخچه در اطراف سلول‌های عصبی و اکسون‌های ریز و درشتی پیدا شده بود. در سلول‌های لایه پورکنژ نیز و اکسون‌های سیتوپلاسمی تشکیل گردیده است (تصویر ۲).

در ماده سفید مغز و در داخل میلین و در اطراف آکسون‌ها و اکسون‌های سفیدی پدیدار شده و میلین در حال از بین رفتن بود (تصویر ۳). در سیتوپلاسم بعضی از نورون‌های هرمی و اکسون‌های روشن با ماهیت دژنرسانس آبکی تشکیل شده بود (تصویر ۴).

در شبکه کوروئید تغییرات دژنراتیو به صورت و اکسون‌های ریز و درشت سفید رنگی در داخل سلول‌های پوششی و ترشح مایع صورتی رنگ نیز در فضای اطراف سلولی به وجود آمده است (تصویر ۲). در روی پرده‌های منژ تعداد زیادی لنفوسیت نفوذ کرده و این سلول‌ها وارد کورتکس مغز شده‌اند (تصویر ۱). در فضای اطراف عروقی سلول‌های لنفوسیتی وارد شده‌اند و کاف‌های اطراف عروقی (PVC) گردیده است (تصویر ۲).

در اثر حضور ادم و اوزونیک و وسیع شدن فضاهای اطراف عروقی به بافت عصبی فشار آمده و

به رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو- مارکی گردید. در این روش نمونه در تتراکسید اسمیوم ۱ درصد تثبیت شده و به شیوه معمول بلوک‌های پارافینه تهیه شد و با تکنیک تولوئیدن بلو رنگ‌آمیزی شدند (۱۵). کلیه مقاطع با سیستم میکروسکوپ نوری مدل LEICA dm500 ارزیابی و تصویربرداری شدند.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری مان ویتنی - یو تجزیه و تحلیل شدند.

#### یافته‌ها

بر اساس نتایج به دست آمده میانگین شدت نساتوانی نورولوژیک در طول دوره درمان در موش‌های تحت درمان با تریتینوئین ( $2/05 \pm 0/2$ ) نسبت به گروه شاهد ( $3/14 \pm 0/11$ ) کمتر بود ( $p < 0/001$ ). میانگین حداکثر شدت بیماری نیز در گروه موش‌های تحت درمان ( $3/8 \pm 0/18$ ) در مقایسه با موش‌های شاهد ( $2/9 \pm 0/19$ ) به طور معنی‌داری کمتر بود ( $p < 0/05$ ). در کنار روز ۱۸ پس از القاء (روز حداکثر میانگین شدت بیماری)، مقایسه تغییرات روزانه علایم بین دو گروه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در شدت علایم در بازه زمانی روزهای ۲۳ تا ۳۳ پس از القاء بیماری می‌باشد (نمودار ۱).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در موش‌های گروه شاهد در اطراف مویرگ‌های کوچک در تمام مناطق مغز اعم از ماده سفید و خاکستری مغز، مخچه، هیپوکامپ و نخاع و در کل هرجایی که

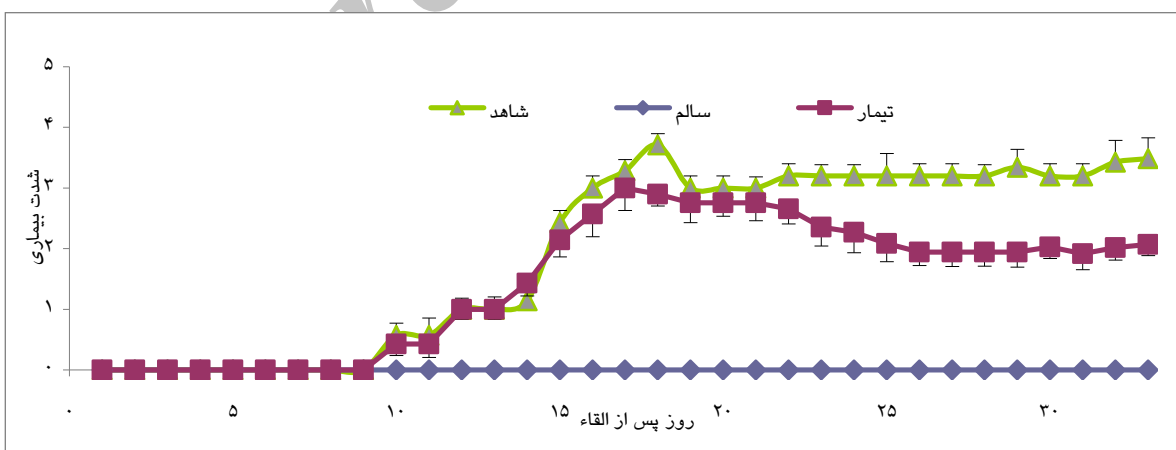
فروکش کرده و فضاهای اطراف عروقی کوچکتر شده‌اند (تصویر ۵).

#### بحث

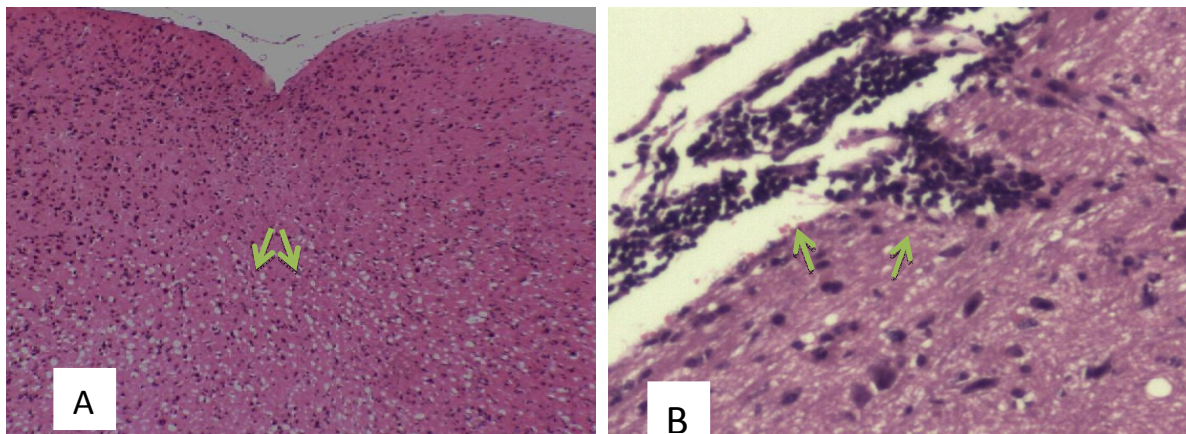
درمان بیماری‌های خود ایمن به طور معمول پس از بروز علائم درمانگاهی صورت می‌پذیرد (۱۶). البته علی‌رغم پیشرفت‌های صورت گرفته، همچنان یافتن ترکیبات دارویی جدید جهت درمان بیماری‌های خود ایمن از جمله اسکروز متعدد به دلیل ناکافی بودن پاسخ درمانی و یا اثرات جانبی فراوان داروهای موجود بسیار مورد توجه می‌باشد (۴ و ۳). تریئتینون از جمله ترکیباتی می‌باشد که در گذشته به اثرات تعدیل‌کنندگی آن اشاره شده است (۱۱-۷). در این مطالعه 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).

نورون‌های هرمی شکل به صورت دوکی در آمده‌اند و این فضاهای اطراف عروقی در بافت هیپوکامپ نیز تشکیل شده‌اند (تصویر ۳). در اطراف شاخ آمون و برآمدگی دنداندار هیپوکامپ حفرات بسیار بزرگ اطراف عروقی به وجود آمده‌اند. در نورون‌های گرد پاره‌هیپوکامپوس (نورون‌های بینابینی) در داخل سینوپلاسم نورون مایع جمع شده است (تصویر ۵). در مخچه نیز فضاهای اطراف عروقی بسیار وسیع شده و ادم و ازوژنیک تشکیل گردیده است (تصویر ۴).

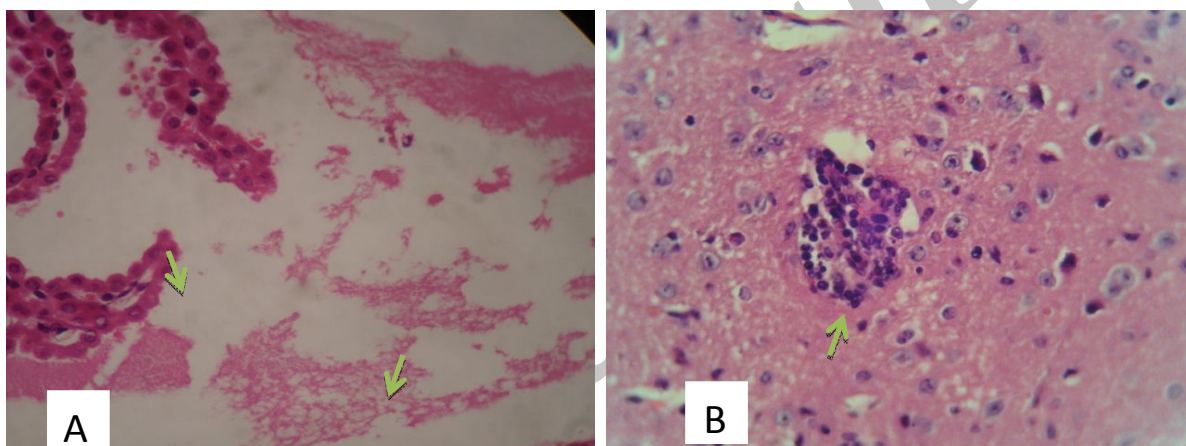
در گروه درمانی از وسعت فضاهای اطراف عروقی کاسته شده است، ولی همچنان خروج مواد شبه پروتئینی در اطراف عروق هرچند به صورت محدود وجود دارد (تصویر ۶). واکنش‌های طرف نورونی نیز بسیار کمتر شده و به صورت محدودتری در اطراف نورون‌های هرمی و نیز در اطراف نورون‌های بینابینی هیپوکامپ دیده می‌شود. در برآمدگی دنداندار و شاخ آمون هیپوکامپ ادم بسیار



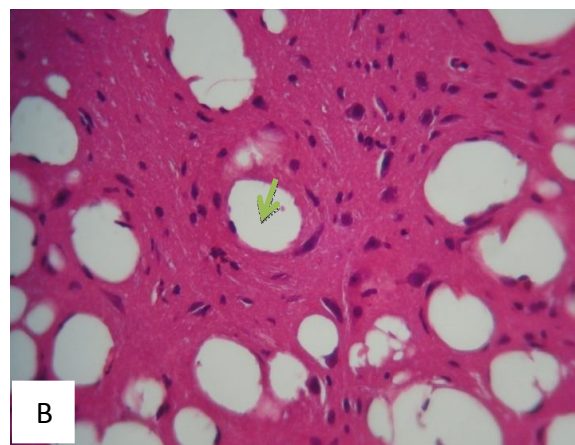
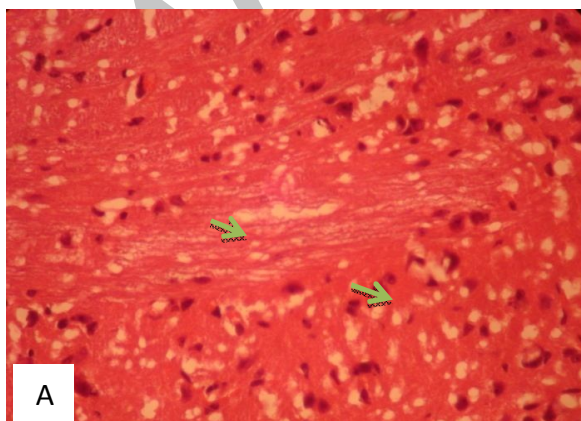
نمودار ۱. مقایسه میانگین شدت بیماری در روزهای مختلف در گروه‌های مورد مطالعه



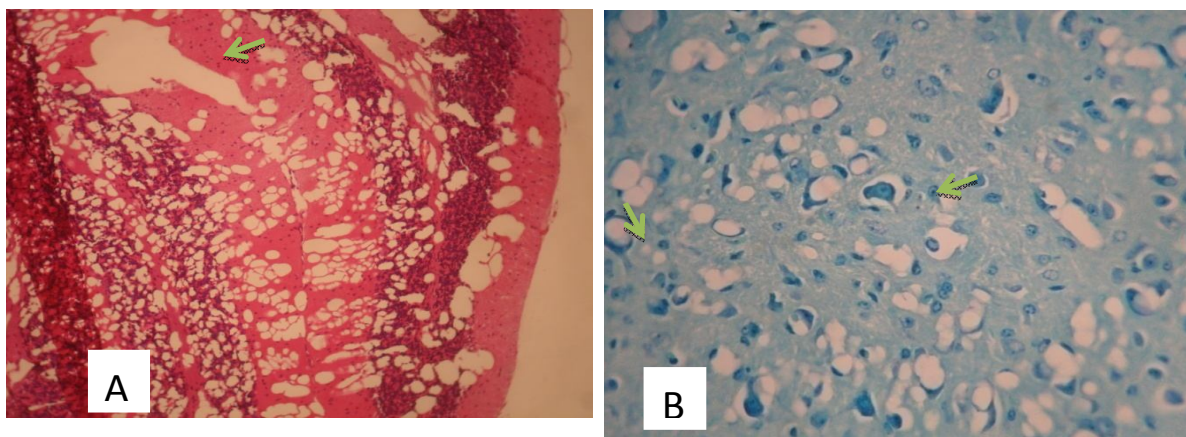
تصویر ۱) A: بافت مغز ادماتوز بوده و ادم در قسمت‌های عمقی مغز از قسمت کورتکس بیشتر می‌باشد. گروه بیمار B: در روی پرده‌های مننژ تعداد زیادی لنفوسیت نفوذ کرده و این سلول‌ها وارد کورتکس مغز شده‌اند. گروه بیمار (رنگ آمیزی هماتوکسین - ائوزین، میکروسکوپ نوری، بزرگنمایی ۲۰۰)



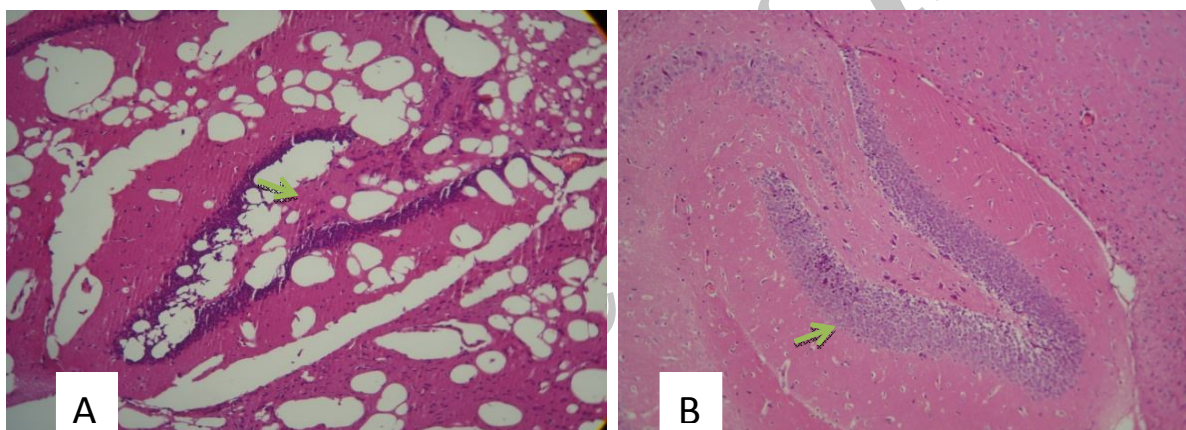
تصویر ۲) A: شبکه کوروئید و فضای بطنی اطراف، تغییرات دژنراتیو به صورت واکوئل‌های ریز سفید رنگی در داخل سلول‌های پوششی و ترشح مایع صورتی رنگ نیز در فضای اطراف، گروه بیمار B: در فضای اطراف عروقی سلول‌های لنفوسیتی وارد شده‌اند و P.V.C تشکیل گردیده است. گروه بیمار (رنگ آمیزی هماتوکسین - ائوزین، میکروسکوپ نوری، بزرگنمایی ۴۰۰)



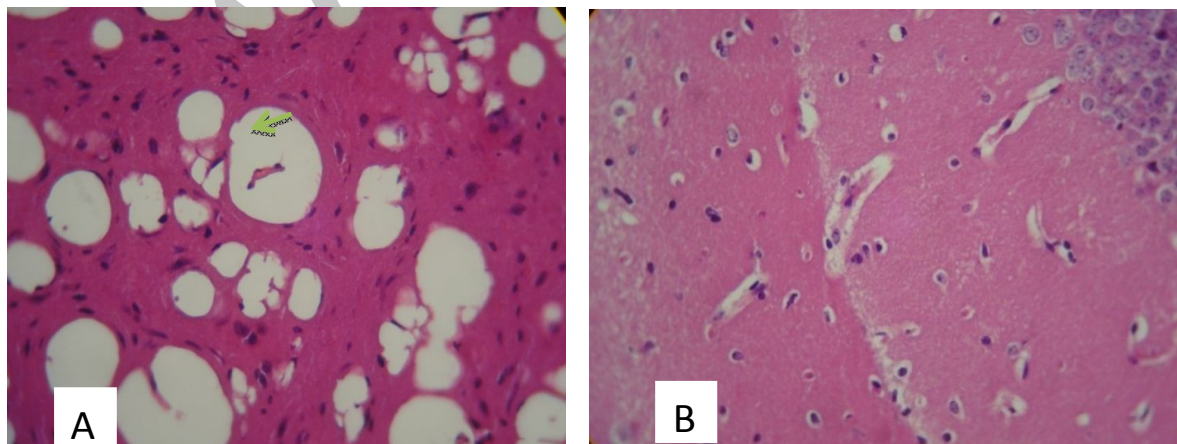
تصویر ۳) A: در ماده سفید مغز در اطراف آکسونها واکوئل‌های سفیدی پدیدار شده و میلین در حال از بین رفتن می‌باشد. گروه بیمار B: ادم وازوژنیک و تغییر شکل نوروها. گروه بیمار (رنگ آمیزی هماتوکسین - ائوزین، میکروسکوپ نوری، بزرگنمایی ۲۰۰)



تصویر ۴) **A**: در مخچه نیز فضاهای اطراف عروقی بسیار وسیع شده (ادم وازوژنیک) تشکیل گردیده است **B**: در داخل سیتوپلاسم نورون در چپ تصویر واکوئل روشن (دژنرسانس آبیکی) و در اطراف نورون هرمی شکل در وسط تصویر ادم در اطراف نورون (سیتوتوکسیک) دیده می‌شود، گروه بیمار (رنگ آمیزی تولوئیدن بلو- مارکی، میکروسکوپ نوری، بزرگنمایی ۲۰۰)



تصویر ۵) **A**: هیپوکامپ، اطراف شاخ آمون و برآمدگی دنداندار حفرات بسیار بزرگ اطراف عروقی به وجود آمده‌اند **B**: هیپوکامپ، گروه درمانی، اثری از حفرات یاد شده در این مقطع دیده نمی‌شود فضای اطراف عروقی مویرگ‌ها به صورت جزئی وسیع شده‌اند گروه درمان (رنگ آمیزی تولوئیدن بلو- مارکی، میکروسکوپ نوری، بزرگنمایی ۱۰۰)



تصویر ۶) **A**: در اطراف مویرگ‌های کوچک در تمام مناطق مغز فضاهای خالی بسیار وسیعی تشکیل گردیده، **B**: گروه درمان ، فضای اطراف عروق ، حضور مقدار کمی از مواد شبه پروتئینی گروه درمان (رنگ آمیزی تولوئیدن بلو- مارکی، میکروسکوپ نوری، بزرگنمایی ۲۰۰)

همکاران (۲۰۱۴) انجام شده است نقش درمان با تریتینوئین در کاهش تولید سایتوکاین‌های التهابی IL-17 و IFN- $\gamma$  در موش‌های مبتلا به EAE نشان داده شده است (۲۱). همچنین محققان یاد شده اخیراً نشان داده‌اند که حداقل بخشی از اثرات مفید ATRA در درمان EAE به دلیل کاهش سطح نیتریک اکسید و بهبود قابلیت دفاع آنتی‌اکسیدانی صورت می‌گیرد (۲۲).

در پژوهش حاضر در گروه درمانی ادم وازوژنیک و ادم سیتوتوکسیک (آستروسیتی) به میزان قابل توجهی کمتر شده است و در مناطق کمتری از بافت عصبی وجود دارد. همچنین در نورون‌های عصبی هیچ‌گونه ادم داخل سلولی (به صورت واکوئل روشن) وجود ندارد. از مجموع این نتایج و نتایج گزارش‌های محققان فوق‌الذکر چنین نتیجه‌گیری می‌شود که آل ترانس رتینوئیک اسید با جلوگیری از شکست سد خونی - مغزی و تولید رادیکال‌های اکسیژن و نیتریک اکساید توانسته است از آسیب به غشاءها شامل؛ غشاء سلول‌های اندوتلیال مویرگی در بافت عصبی، غشای پلاسمایی آستروسیت‌ها به عنوان سلول‌های واسط بین عروق و نورون‌ها و در نهایت آسیب به غشاء خود نورون جلوگیری کرده و مانع از نفوذ مایع به داخل سیتوپلاسم نورون و آستروسیت‌ها بشود. همچنین با جلوگیری از آسیب اندوتلیالی مویرگی مانع از نشت مواد شبه پروتئینی و نیز مایعات به داخل فضای اطراف عروقی گردیده است. گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن و یا نیتروژن، همچنین ممکن است که منجر به آسیب غلاف میلین

نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که در این شرایط، تجویز تریتینوئین موجب بهبود در سیمای بالینی و هیستوپاتولوژیک موش‌های مبتلا نسبت به گروه کنترل می‌گردد. آغاز علایم EAE با شکست سد خونی- مغزی و هجوم سلول‌های T خود واکنش‌گر، سلول‌های دندریتیک و ماکروفاژها به داخل سیستم عصبی مرکزی (CNS) همراه می‌باشد (۱۷). از نظر هیستوپاتولوژی بیماری EAE خود را به صورت التهاب پرده‌های مننژ، ارتشاح سلول‌های تک هسته‌ای به فضای اطراف عروقی و پارانشیم CNS، در همراهی با دمی‌لیناسیون موضعی و آسیب اکسونی نشان می‌دهد (۱۸). سلول‌های ارتشاح یافته به طور گسترده‌ای سایتوکاین‌های التهاب‌آور، نیتریک اکسید و گونه‌های فعال اکسیژن را تولید می‌نمایند و بدین ترتیب موجب آسیب به بافت عصبی می‌شوند (۱۹ و ۱۸).

به نظر می‌رسد که IL-17 (شاخص لنفوسیت‌های Th17) نقش اساسی در ایجاد و پیشبرد ادم، التهاب و شکست سد خونی مغزی در هردو بیماری EAE و MS بازی می‌نماید (۲۰ و ۱۹). ساز و کار IL-17 در پیشبرد شکست سد خونی مغزی ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن در سلول‌های اندوتلیال مغزی می‌باشد (۱۹). این در حالی است که سلول‌های Th1 مولد IFN- $\gamma$  از طریق القای واسطه‌های فعال اکسیژن و نیتریک اکسید در سلول‌های ماکروفاژ/میکروگلیال در ایجاد ضایعات بافتی از جمله دمی‌لینه شدن دخیل می‌باشند (۱۷). در مطالعه‌ای که به وسیله ابطحی فروشانی و



### تقدیر و تشکر

مطالعه حاضر بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد ایمنی شناسی مصوب دانشگاه ارومیه بود که با حمایت مالی دانشگاه ارومیه انجام شد. نگارندگان از زحمات مجموعه کارکنان پژوهشکده زیست فناوری و دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه کمال تقدیر و تشکر را دارند.

شده و زمینه پیشبرد حمله به وسیله سلول‌های ماکروفاژ/میکروگلیال را فراهم آوردند (۱). کاهش ترکیبات فوق به وسیله تریتینوئین می‌تواند از جمله عوامل مؤثر در کاهش شدت دمی‌لینه شدن در گروه درمانی باشد.

در مجموع بهبودی که در سیمای بالینی و هیستوپاتولوژیک EAE در پژوهش حاضر قابل مشاهده است ممکن است ناشی از کاهش سطح سایتوکاینهای پیش التهابی IL-17 و IFN- $\gamma$  در کنار اثرات آنتی‌اکسیدان تریتینوئین باشد. با این حال دخالت سایر سازوکارها نیز محتمل است که نیاز به تحقیقات بیشتر را ایجاب می‌کند. به طور جالب توجهی نشان داده شده است که در شرایط آزمایشگاهی اسید ریتینوئیک موجب تشدید فعالیت INF- $\beta$ -1b (از جمله داروهای تایید شده در درمان MS) در مهار فعالیت سلول‌های CD8<sup>+</sup> اختصاصی پادگن‌های میلی‌نی شده است (۲۳).

### نتیجه‌گیری

در مجموع این مطالعه نشان داد که تجویز تریتینوئین پس بروز علائم درمانگاهی موجب بهبود در سیمای بالینی و هیستوپاتولوژیک مدل موشی اسکروز متعدد می‌گردد. با توجه به اثرات مفید تریتینوئین در درمان آنسفالومیلیت تجربی خود ایمن، ممکن است که افزودن تریتینوئین به رژیم درمانی مبتلایان به MS دارای اثرات سودمند و ارزنده‌ای باشد.

## REFERENCES

1. Mao P, Reddy PH. Is multiple sclerosis a mitochondrial disease?. *Biochim Biophys Acta* 2010;1802(1): 66-79.
2. Etemadifar M, Janghorbani M, Shaygannejad V, Ashtari F. Prevalence of multiple sclerosis in Isfahan, Iran. *Neuroepidemiology* 2006; 27(1): 39-44.
3. Vosoughi R, Freedman MS. Therapy of MS. *Clin Neurol Neurosurg.* 2010;112(5):365-85.
4. Goldenberg MM. Multiple Sclerosis Review PT 2012; 37(3): 175-84.
5. 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(8): 1953-71.
6. 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; 9(11): 1615-21.
7. Nozaki Y, Yamagata T, Sugiyama M, Ikoma S, Kinoshita K, Funachi M. Anti-inflammatory effect of all-trans-retinoic acid in inflammatory arthritis. *Clin Immunol* 2006; 119(3): 272-9.
8. 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; 71(1): 250-8.
9. 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; 137(5): 1216-21.
10. 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; 60(10): 3118-27.
11. 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.
12. 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; 10(11): 1790-6.
13. 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; 170(11): 5793-8.
14. 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; 58(1): 146-55.
15. Scipo FD, Raimondo S, Tos P, Geuna S. A Simple Protocol for Paraffin-Embedded Myelin Sheath Staining With Osmium Tetroxide for Light Microscope Observation. *MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE* 2008; 71: 497-502.
16. 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;116(4): 1037-44.
17. Petro TM. Regulatory role of resveratrol on Th17 in autoimmune disease. *Int Immunopharmacol* 2011; 11(3): 310-8.
18. Kuersten S, Lehmann PV. The immune pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis: lessons learned for multiple sclerosis?. *J Interferon Cytokine Res* 2011; 31(12): 907-16.
19. Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. *Scand J Immunol* 2011; 74(1): 1-13.
20. Murdaca G, Colombo BM, Puppo F. The role of Th17 lymphocytes in the autoimmune and chronic inflammatory diseases. *Intern Emerg Med* 2011; 6(6): 487-95.
21. Abtahi Froushani SM, Delirez N, Hobbenaghi R, Mosayebi G. Synergistic effects of atorvastatin and all-trans retinoic acid in ameliorating animal model of multiple sclerosis. *Immunol Invest* 2014; 43(1): 54-68.
22. Morvaridi A, Delirez N, Hobbenaghi R, Abtahi SM, Malekinejad H. 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. *Razi Journal of Medical Sciences* 2013; 20(108): 1-18.
23. Pino-Lagos K, Benson MJ, Noelle RJ. Retinoic acid in the immune system. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1143: 170-87.

# The effects of Tretinoin on Clinical and Histopathological Aspects of the Mouse Model of Multiple Sclerosis

Abtahi Froushani SM<sup>1\*</sup>, Delirez N<sup>1</sup>, Hobbenaghi R<sup>2</sup>, Morvaridi A<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Veterinary Faculty, Urmia University, Urmia, Iran, <sup>2</sup>Department of Pathobiology, Veterinary Faculty, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 10 Nov 2013 Accepted: 12 Jan 2014

## Abstract

**Background & aim:** In spite of the progress achieved in the treatment of multiple sclerosis in recent years, many patients have been less responding than optimal to existing therapies. Previous studies have determined the immuno-modulatory potential of Tretinoin. The aim of the present study was to determine the effects of Tretinoin on the clinical and pathological features of multiple sclerosis mouse model.

**Methods:** In the present study, experimental autoimmune encephalomyelitis was induced by immunization with MOG35-55 peptide and complete Freund's adjuvant in mice C57BL / 6. Infected mice were divided into two groups of 7 mice. 7 mice were also used as controls. Tretinoin treatment (25 mg kg other day) was initiated as clinical signs appeared (day 12). Simultaneously, the control group received only the solvent. Symptoms were recorded daily until animals were slaughtered (day 33). In order to evaluate the neuropathology, the brain tissue was taken and sections were stained by hematoxylin and eosin and toluidine blue marquis methods. The data were analyzed by using Mann Whitney-U test.

**Results:** Administration of Tretinoin after the onset of symptoms led to significant pain relief ( $p < 0.05$ ). Histological findings showed decreased parenchymal edema, cellular infiltration and demyelization and degeneration of neurons in the brain were significantly reduced compared to control mice receiving Tretinoin ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** Tretinoin therapy, a useful strategy in the treatment of multiple sclerosis, should be considered.

---

\*Corresponding author: Dr Seyyed Meysam Abtahi Froushani, Department of microbiology, Veterinary Faculty, Urmia University, Urmia, Iran.  
E-mail: meysamabtahi@hotmail.com