تأثیر تروگزروتین بر روی تعدادی از سایتوکاین‌های پیش التهابی و تکثیر لنفوسیت‌ها در یک مدل حیوانی آنسفالومیلیت تجربی خودایمن

یاسر جعفری خطایلو[1]، سمیه احمدی افشار[2]*

تاریخ دریافت ۱۳۹۹/۰۱/۲۸ تاریخ پذیرش ۱۳۹۹/۰۵/۰٤

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: تحقیقات اخیر نقش مهم لنفوسیت‌های Th17 و سایر سایتوکاین‌ها را در پاتوژنز بیماری اسکلروز متعـدد مشخص نموده‌اند. باوجودی که مطالعات قبلی مؤید نقش ضدالتهابی تروگزروتین بودند، ولی تاکنون اثرات تروگزروتین بر روی بیماری اسکلروز متعـدد موردمطالعه قرار نگرفته است. در این مطالعه اثرات درمانی تروگزروتین بر روند آنسفالومیلیت تجربی خودایمن، از طریق کاهش تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی IL-17، IL-1 TNF-α و کاهش سطح نیتریک اکساید و کاهش تکثیر سلول‌های ایمنی، مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش کار: بیماری آنسفالومیلیت تجربی خودایمن با استفاده از پپتید MOG_{35-55}و ادجوانت کامل فروند در موش‌های ماده‌ی C57BL/6 القا شد. سپس موش‌ها در چهار گروه ۵ رأسی قرار گرفتند. در گروه‌درمانی بعد از ظهور علائم بالینی بیماری، درمان با تروگزروتین (روزانه 135 میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن) آغاز شد. تا زمان کشتار موش‌ها در روز بیست و یکم علائم بیماری به‌صورت روزانه ثبت گردید. سپس میزان تکثیر سلول‌های ایمنی به‌وسیله‌ی آزمون MTT، میزان تولید سایتوکاین‌ها به‌وسیله‌ی ELISA و میزان تولید نیتریک اکساید توسط آزمون گریس سنجیده شد.

یافته‌ها: تروگزروتین پس از بروز علائم به‌طور معنی‌داری موجب تخفیف بیماری گشت. تروگزروتین موجب کاهش معنی‌دار تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی IL-17، IL-1 TNF-α و کاهش سطح نیتریک اکساید، هم‌زمان با کاهش تکثیر سلول‌های ایمنی شد ($P<0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری: درمان با تروگزروتین پس از بروز علائم آنسفالومیلیت تجربی خودایمن ضمن کاهش تکثیر سلول‌های ایمنی خود واکنش‌گر و کاهش در سطح سایتوکاین‌های پیش التهابی و نیتریک اکساید، موجب بهبود بیماری می‌گردد.

کلیدواژه‌ها: آنسفالومیلیت تجربی خودایمن، تروگزروتین، سایتوکاین پیش التهابی، سلول‌های ایمنی

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و یکم، شماره ششم، ص ٤٩٨-٤٨٥، شهریور ۱۳۹۹

آدرس مکاتبه: گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران، تلفن: ۴۱۳۶۳۷۸۷۴۳

Email: afsharnegin92@gmail.com

مقدمه

تقریباً ۲،۵ میلیون نفر در سرتاسر جهان مبتلا به بیماری اسکلروز متعـدد (sclerosis Multiple) یا (MS) هستند، این بیماری یک بیماری مزمن عصبی-التهابی مغز و طناب نخاع است که یکی از دلایل عمده ناتوانی جسمی جدی در بزرگ‌سالان جوان به‌ویژه زنان به شمار می‌آید (۱) و ازآنجاکه سن شروع این بیماری سی سال می‌باشد، دارای اثرات و فشارهای فردی و اجتماعی و اقتصادی عمده می‌باشد (۲). اعتقاد بر این است که یک فرایند التهابی خود ایمنی به‌عنوان نیروی محرک آسیب بافت علت ایجاد این بیماری است (۳). شواهد تجربی و بالینی اخیر نشان می‌دهد که واسطه‌های التهابی، مانند سیتوکاین‌ها، ممکن است نقش مهمی در پاتوژنز MS داشته باشند (۴). التهاب در CNS محل اولیه آسیب در MS است (۵). در این بیماری، ماکروفاژها (میکروگلیا در مغز) و لنفوسیت‌ها در CNS (ماده سفید و ماده خاکستری) تجمع می‌یابند، که منجر به دمیلینه شدن و از بین رفتن آکسون‌ها می‌شود (۶). و این التهاب توسط سلول‌های T (عمدتاً سلول‌های $CD8^+$) و ماکروفاژهای فعال یا میکروگلیا، غالب می‌شود (۷). در مراحل اولیه، سلول T خود واکنشگر تهاجمی فعال‌شده از سد خونی- مغزی (BBB) عبور می‌کند. فعال شدن سلول‌های T دیواره عروق را هدف قرار داده و با ترشح تعداد زیادی سیتوکاین منجر به جذب سایر

[1] استادیار ایمونولوژی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

[2] دانشجوی دکتری ایمونولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (نویسنده مسئول)

سلول‌های التهابی ازجمله ماکروفاژها می‌شود (۷). سیتوکاین‌ها در پاتوژنز MS و نیز مدل‌های حیوانی بیماری مانند EAE، ازجمله در مرگ سلولی الیگودندروسیت‌ها، اختلال عملکرد عصبی و دژنراسیون آکسون‌ها نقش دارند (۸،۹). علاوه بر این، برخی از مطالعات بالینی بر روی انسان نقش اصلی سایتوکاین‌ها در MS را نشان داده است. سیتوکاین‌های بی‌شماری از عوامل اصلی در گسترش ضایعات MS در سطح پاسخ ایمنی هستند (۱۰). در میان این سایتوکاین‌ها، به نظر می‌رسد فاکتور نکروز دهنده‌ی تومور α (TNF-α)، اینترفرون γ (IFN-γ)، IL-1، IL-3، IL-4، IL-6، IL-10، IL-12 و IL-18 از مهم‌ترین سایتوکاین‌ها در شروع، شدت و پیشرفت بیماری MS باشند (۱۱).

IL-17 به‌تازگی یک عامل مهم سیستم ایمنی در التهاب در CNS در نظر گرفته شده است.IL-17 توسط سلول‌های T helper (Th) متمایز از سلول‌های سنتی Th1 و Th2 است و بنابراین این سلول‌های Th17 تعیین می‌شوند (۱۲). آن‌ها در سیستم‌های عصبی مرکزی و محیطی در EAE حضور دارند و یکی از واسطه‌های اصلی التهابی در MS هستند (۱۳). خنثی‌سازی IL-17 می‌تواند علائم بالینی را به میزان قابل‌توجهی کاهش دهد (۱۴). IL-17 می‌تواند با افزایش سایر سیتوکاین‌های پیش التهابی مانند TNF-α و کموکاین‌ها اثر پیش التهابی قوی را دلرا باشد (۱۵). دست‌کاری TNF-α و گیرنده‌های آن جنبه‌های بسیاری از عملکردهای آن را در یک بیماری خود ایمنی مانند MS نشان داده است. افزایش بیان TNF-α در CNS موازی پیشرفت بیماری در EAE است (۱۶). پیشنهاد شده است که IL-1 در شروع بیماری، توسعه، تقویت و مزمن شدن بیماری، نقش‌های چندجانبه ایفا می‌کند (۱۷). در هنگام القای EAE افزایش بیان IL-1 در CNS اتفاق می‌افتد (۱۸). IL-1 نقش مهمی در پلاریزیشن سلول‌های T به‌طرف Th17 (که نقش کلیدی در بیماری MS ایفا می‌کند)، دارد (۱۹،۲۰).

پس از کشف نقش مهم نیتریک اکسید (NO یا Nitric oxide) در التهاب، نقش NO (که یک مولکول پیام‌رسانی رادیکال آزاد با بیوشیمی بسیار پیچیده است)، در بیماری مالتیپل اسکلروز (MS)، موردتوجه قرار گرفت (۲۱). نیتریک اکسید در بالاتر از غلظت‌های طبیعی در ضایعات مولتیپل اسکلروزیس (MS) وجود دارد. این غلظت‌های بالا به دلیل ظهور شکل القایی نیتریک اکسید سنتاز (iNOS) در سلول‌هایی مانند ماکروفاژها و آستروسیت‌ها است. درواقع، غلظت نشانگرهای تولید NO (به‌عنوان‌مثال، نیترات و نیتریت) در CSF، خون و ادرار بیماران مبتلا به MS افزایش می‌یابد. شواهد و مدارک نشان می‌دهد که NO در بسیاری از ویژگی‌های بیماری ازجمله اختلال در سد خون-مغزی، آسیب الایگودندروسیت و دمیلیناسیون و تخریب آکسون نقش دارد و نیز باعث اختلال در هدایت آکسون می‌شود و از این طریق باعث کاهش عملکرد آن می‌شود (۲۲). نیتریک اکسید نقش مهمی در روند پاتولوژیک بیماری‌های دمیلینه کننده (مانند MS) ایفا می‌کند و می‌تواند متابولیسم انرژی الیگودندروسیت‌ها را از طریق واسطه آسیب به DNA، غشا و مجتمع‌های زنجیره تنفسی میتوکندری مختل کند. در پیشرفت MS، نیتریک اکسید به‌طور عمده دمیلینیشن، تخریب آکسون و مرگ سلولی را باعث می‌شود (۲۳).

سال‌ها است که آنسفالومیلیت خودایمن تجربی (EAE) یا (Experimental autoimmune encephalomyelitis)در موش به‌عنوان مدل حیوانی بیماری MS برای بررسی سیر بیماری‌زایی و ارزیابی داروهای جدید جهت درمان MS به‌طور گسترده مورداستفاده قرار گرفته است (۲۴).

برای بهبود علائم بیماری MS و کیفیت زندگی می‌توان از انواع داروها و سایر اقدامات درمانی استفاده کرد. و از این راه به کاهش فعالیت بیماری زمینه‌ای کمک کرد. این داروها و اقدامات درمانی التهاب واسطه ایمنی را مهار می‌کنند و روند بیماری زمینه‌ای را بدون درمان بیماری یا برگشت صدماتی که قبلاً رخ داده است کنترل می‌کنند (۲۰).

تروگزروتین (Troxerutin)، که به‌عنوان ویتامین P4 نیز شناخته می‌شود، یک مشتق‌تری هیدروکسی اتیلیت (trihydroxyethylated) از روتین بیوفلاوونوئید طبیعی است و می‌توان آن را در چای، قهوه، جوانه‌های ذرت، میوه یافت (۲۵،۲۶). این فلاونوئید به دلیل اثرات بیولوژیکی چندگانه‌ای مانند اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضد فیبرینولیتیک، آنتی ترومبوتیک و ضد نئوپلاستیک، توجه بسیاری را به خود جلب کرده است (۲۵،۲۷). اثر محافظ بافتی تروکسروتین در آسیب‌های کلیه (۲۸)، کبد (۲۹) و مغز (۲۷،۳۰) در مطالعات قبلی گزارش شده است. بااین‌حال، اطلاعات کم‌تری در موردمطالعه اثرات محافظت‌کننده تروکسروتین بر روی بیماری MS در دسترس است (۳۱).

لذا هدف از تحقیق حاضر، بررسی نخستین بار اثرات ضدالتهابی تروگزروتین بر روی بیماری MS از طریق بررسی میزان سایتوکاین‌های التهابی و میزان تولید نیتریک اکساید و نیز اثرات درمانی آن بر روی شدت MS در مدل EAE می‌باشد.

مواد و روش کار

این مطالعه از نوع مداخله‌ای -تجربی است که به‌صورت موردی-شاهدی و از مهرماه لغایت اسفندماه ۱۳۹۷ در دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز انجام شده است .جامعه موردمطالعه، شامل بیست موش ماده خالص (Inbred)نژاد C57BL/6 با محدوده سنی شش تا هشت هفته با متوسط وزن ۱۸/۸ گرم

می‌باشد که از انستیتو پاستور ایران خریداری شده بود .این حیوانات پس از خریداری در شرایط استاندارد آب، غذا، دما و نور کافی نگه‌داری شدند. و به ۴ گروه پنج‌تایی تقسیم شدند، گروه A شامل موش‌های سالم، گروه B شامل موش‌هایی که بیماری EAE در آن‌ها القا شد، گروه C شامل موش‌های مبتلا به EAE ای که تحت درمان با تروگزروتین قرار گرفتند، و گروه D شامل موش‌های سالمی که تروگزروتین را دریافت کردند، بودند.

تمامی ملاحظات اخلاقی لازم برای این کار روی نمونه‌های موش در این تحقیق رعایت شده است و توسط کمیته‌ی اخلاق دانشگاه تبریز (IR.TABRIZU.1131) تأیید شده است.

نحوه القای EAE:

مقدار ۲۰۰ میکروگرم پپتیدMOG_{33-55} با توالی (M-E-V-G-W-Y-R-S-P-F-S-R-V-V-H-L-Y-R-NG-K) و درجه خلوص ۹۵٪ (Anaspec Co., USA)در ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سالین (PBS) و ۱۰۰ میکرولیتر ادجوانت فروند کامل (Sigma Co., USA) مخلوط و به‌صورت زیرجلدی در ناحیه پشت هر موش تزریق گردید. مقدار ۴۰۰ نانوگرم سم سیاه‌سرفه (Sigma Co., USA) نیز در حجم ۳۰۰ میکرولیتر PBS در روز تزریق پپتید و ۴۸ ساعت بعد به‌صورت داخل صفاقی تزریق گردید. روند بیماری و تغییرات وزن مو شها به‌صورت روزانه ارزیابی شد. جهت ارزیابی شدت بیماری از مقیاس زیر استفاده گردید :صفر : عدم بروز بیماری، یک :اختلال در حرکت دم، دو :فلج شدن دم، سه :اختلال در راه رفتن، چهار :فلج یک پا، پنج :فلج دو پا، شش : فلج چهار دست و پا، هفت :مرگ (۳۲).

در گروه C، بعد از مشاهده‌ی علائم بیماری تروگزروتین (Sigma Co, USA) روزانه با دوز ۱۳۵ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن (پس از بروز اولین علائم درمانگاهی) به‌صورت داخل صفاقی تزریق گردید و تا ۲۱ روز پس از بروز علائم درمانگاهی تحت درمان قرار گرفتند .در گروه D نیز همین میزان تروگزروتین به موش‌های سالم تزریق شد. در گروه (B) موش‌های مبتلا به EAE ۱۲ روز پس از القای بیماری در حجمی مشابه با گروه قبلی تحت درمان با PBS حاویDMSO ۲ در صد (دارونما) قرار گرفتند. در ضمن ۵ رأس موش C57BL/6 که از نظر سن، جنس و وزن مشابه با سه گروه قبلی بودند، به‌عنوان گروه سالم غیر بیمار (A) در نظر گرفته شدند. این موش‌ها فرایند ایجاد بیماری را بدون در یافت پپتید MOG_{33-55} طی کردند و هم زمان با آن‌ها تحت درمان با دارونما قرار گرفتند.

برای تهیه‌ی کشت سلولی طحال و سنجش سایتوکاین‌های موجود در مایع رویی آن ۳ هفته بعد از آغاز درمان (روز ۳۱ پس از القا) موش‌ها نخاعی شدند.

تهیه کشت سلولی طحال و سنجش سایتوکی نهای در سوپ رویی کشت طحال:

۳ هفته پس از آغاز درمان موش‌ها تحت بیهوشی عمیق قرار گرفتند (کتامین ۱۰۰ mg/Kg و زایلازین ۱۰ mg/Kg، داخل صفاقی). بلافاصله، طحال موش‌ها تحت شرایط استریل خارج و بعد از قطعه شدن در ۵ml محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ FBS با استفاده از ته سرنگ ۵ میلی‌لیتری له گردید. در ادامه با استفاده از سرنگ ۵ml چندین بار عمل پر و خالی کردن به‌منظور حذف تجمعات بافتی صورت گرفت.

۲) بافت حاصل جهت تهیه سوسپانسیون سلولی از توری سیمی به قطر ۰/۲ میلی‌متر عبور داده شد.

۳) پس از سانتریفیوژ سوسپانسیون سلولی به‌دست آمده (۱۰ دقیقه در ۲۰۰g)، به‌منظور حذف گویچه‌های سرخ، به رسوب سلولی ۵ml بافر لیز کننده افزوده شد. بعد از ۵ دقیقه ضمن افزودن ۱۰ml محیط کشت نمونه‌ها بار دیگر به مدت ده دقیقه در ۲۰۰g سانتریفیوژ شدند. سپس رسوب سلولی در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰٪FBS به حالت سوسپانسیون در آورده شد.

۴) پس از فرآیند شمارش سلول‌ها، سوسپانسیون سلولی به تعداد ۲×۱۰^{۶} cell/ml از هر نمونه تهیه شد.

۵) این سلول‌ها در پلیت‌های کشت ۲۴ خانه در حضور و عدم حضور پپتید MOG_{33-55} به‌عنوان تحریک‌کننده آنتی‌ژنی با غلظت ۵۰µg/ml به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور حاوی ۵٪ CO_2 کشت داده شدند. پس از طی این مدت مایع رویی آن‌ها جمع‌آوری شد. مایع رویی جمع‌آوری شده از هر نمونه به‌طور مساوی در سه لوله اپندرف توزیع‌شده و تا زمان انجام آزمایشات الایزا در -۲۰^{o} C نگه‌داری شد

سنجش سایتوکین‌های موجود در مایع رویی کشت سلول‌های طحال:

سنجش هر یک از سایتوکین‌های TNF-α، IL-1 و IL-17 به‌صورت جداگانه و به شیوه الایزای ساندویچی توسط کیت تجاری الایزا (Bendermed Co., Germany) طبق دستورالعمل مندرج در کیت انجام گرفت.

بررسی میزان تکثیر سلو لهای ایمنی با روشMTT :

پس از طی مراحل ذکر شده، به دنبال شمارش سلول‌ها، سوسپانسیونی حاوی ۱×۱۰^{۶} cell/ml تهیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر از آن در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد و برای هر نمونه سه تکرار در حضور و عدم حضور پپتید MOG_{33-55} به‌عنوان تحریک‌کننده آنتی‌ژنی با غلظت ۵۰µg/ml در نظر گرفته شد و در سه چاهک از پلیت به‌عنوان بلانک از RPMI استفاده شد. پس از آن و به دنبال ۷۲ ساعت انکوباسیون در انکوباتور حاوی ۵

درصد CO_2 به هریک از چاهک‌ها ۲۵ میکرولیتر از محلول MTT با دز ۵ mg/ml در PBS اضافه گردید و به مدت ۴ ساعت انکوبه گردید. احیای ماده MTT توسط سلول‌های زنده ودر حال تکثیر منجر به تشکیل کریستال‌های فورمازون گردید که با افزودن DMSO به‌صورت محلول درآمد. شدت رنگ در طول موج ۴۹۰ نانومترتعیین شد و برای محاسبه شاخص تحریک از فرمول زیر استفاده گردید: (۳۳)

بلانک OD – در حضور پپتید OD

بلانک OD – در عدم حضور پپتید OD

اندازه‌گیری نیتریک اکساید:

سطح اکسید نیتریک توسط معرف Greiss با استفاده از پروتکل که در ابتدا توسط گریس توصیف شده بود (۳۴)، برآورد شد.. بدین منظور ماکروفاژهای صفاقی جمع‌آوری شد و به پلیت های ۹۶ خانه‌ای در غلظت $۰/۵\times۱۰^{۶}$ cell/ml با حضور پپتید MOG $_{33-55}$ به‌عنوان تحریک کننده آنتی‌ژنی با غلظت ۵۰µg/ml اضافه شد. این پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، ۵٪ CO2 در ۴۸ ساعت انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، تولید نیتریت توسط سلول‌ها با معرف گریس تعیین شد. غلظت نیتریت در هر نمونه با نمودار استاندارد از غلظت شناخته شده (در µM) از نیتریت سدیم (NaNO2) اندازه‌گیری شد.

بررسی شدت بیماری:

علاوه بر بررسی شدت بیماری در طول درمان ، ۱ روز پس از آخرین دز درمانی با داروی تروگزروتین به بررسی شدت بیماری طبق درجه بندی زیر پرداختیم : صفر :عدم بروز بیماری یک : اختلال در حرکت دم دو :فلج شدن دم سه :اختلال در راه رفتن چهار :فلج یک پا پنج :فلج دو پا شش :فلج چهار دست و پا هفت :مرگ(۳۲).

آنالیز آماری :

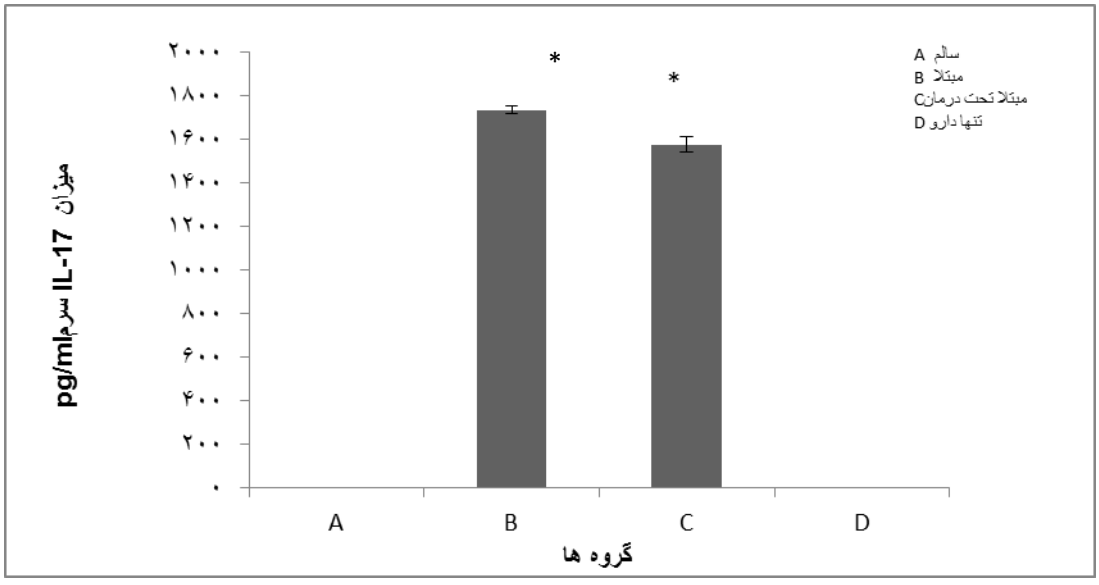
برای مقایسه داده‌های غیرپارامتری مثل شدت علائم درمانگاهی از آزمون Mann-Whitney U-test و برای بررسی تغییرات وزن نیزاز تست آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و Tukey's test استفاده گردید برای تجزیه وتحلیل سایر داده‌ها از Student's t-test استفاده گردید . P<0/05 به‌عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.از نرم افزار SPSS 21 برای تجزیه وتحلیل داده‌ها استفاده گردید.برای گزارش داده‌ها از Mean± SEM استفاده شد.

یافته‌ها

سنجش سایتوکین‌های موجود در مایع رویی کشت سلول‌های طحال:

ارزیابی سطح IL-17:

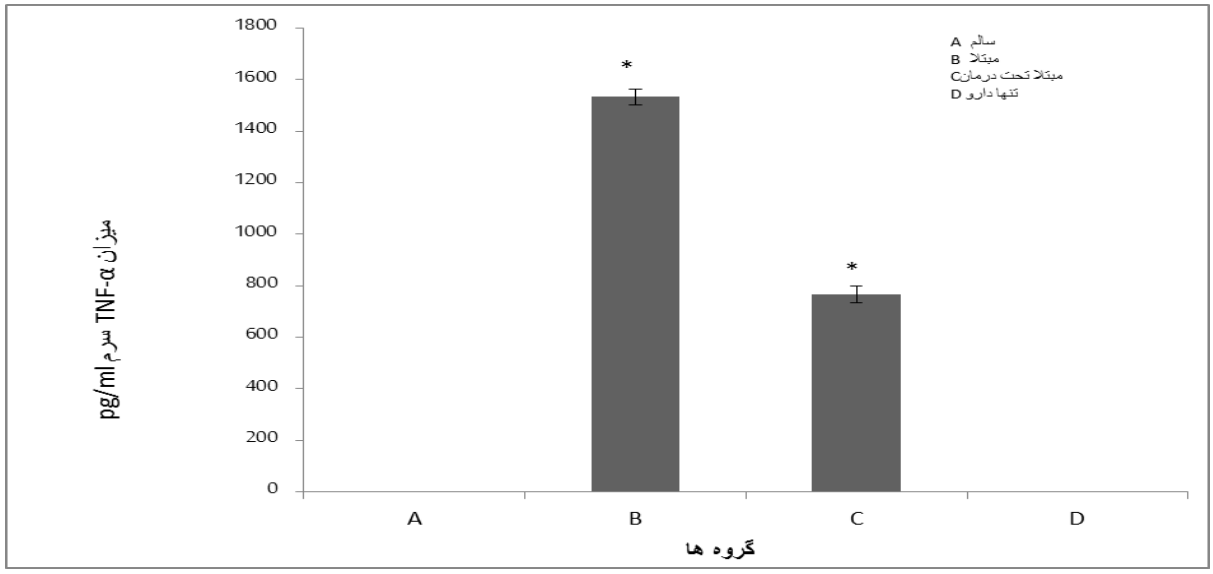
نتایج نشان داد که میزان سایتوکاین IL-17 در موش‌های گروه C که موش‌های بیمار تحت درمان با تروگزروتین بودند به‌طور معنا داری نسبت به گروه B (بیمار) کاهش یافته است (*P<0.05*) (نمودار ۱).



نمودار (۱): میزان سطح سایتوکاین IL-17 موجود در مایع رویی کشت سلول‌های طحال پس از تجویز تروگزروتین(× نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار در سطح ($p<0.05$))

ارزیابی سطح TNF-α:

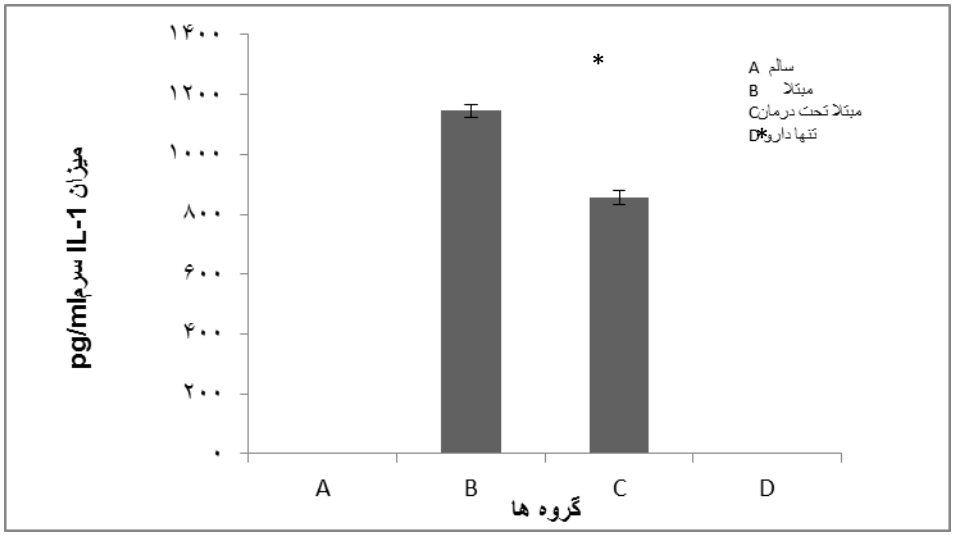
نتایج نشان داد که میزان سایتوکاین TNF-α در موش‌های گروه C که موش‌های بیمار تحت درمان با تروگزروتین بودند به‌طور معنا داری نسبت به گروه B (بیمار) کاهش یافته است ($P<0.05$) (نمودار ۲).



نمودار (۲): میزان سطح سایتوکاین TNF-α موجود در مایع رویی کشت سلول‌های طحال پس از تجویز تروگزروتین(*نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار در سطح ($p<0.05$))

ارزیابی سطح IL-1:

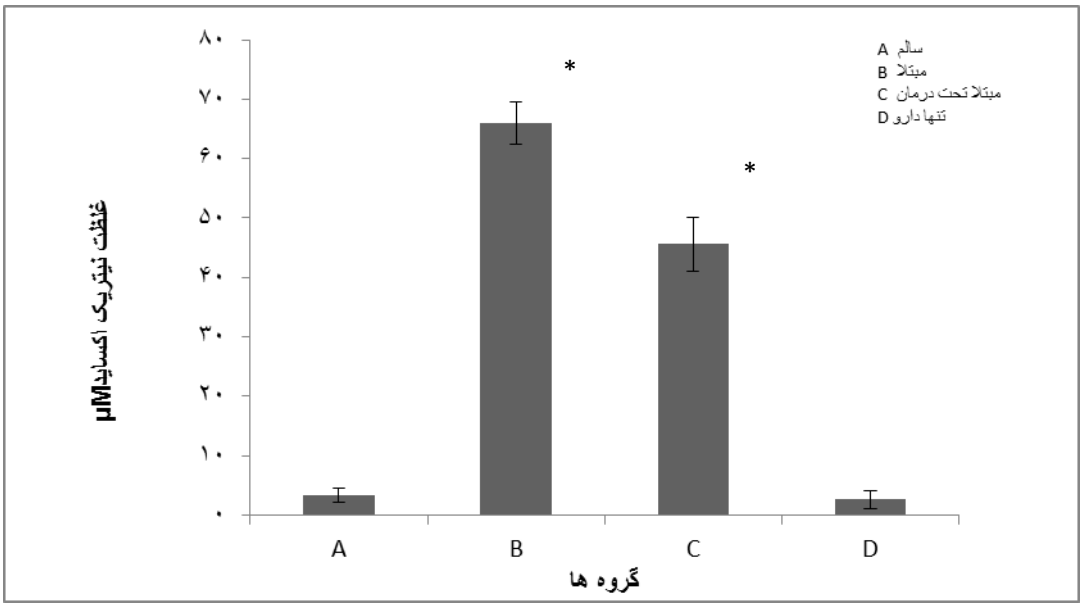
نتایج نشان داد که میزان سایتوکاین IL-1 در موش‌های گروه C که موش‌های بیمار تحت درمان با تروگزروتین بودند به‌طور معنا داری نسبت به گروه B (بیمار) کاهش یافته است ($P<0.05$) (نمودار ۳).



نمودار (۳): میزان سطح سایتوکاین IL-1 موجود در مایع رویی کشت سلول‌های طحال پس از تجویز تروگزروتین(*نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار در سطح ($p<0.05$))

ارزیابی سطح نیتریک اکساید:

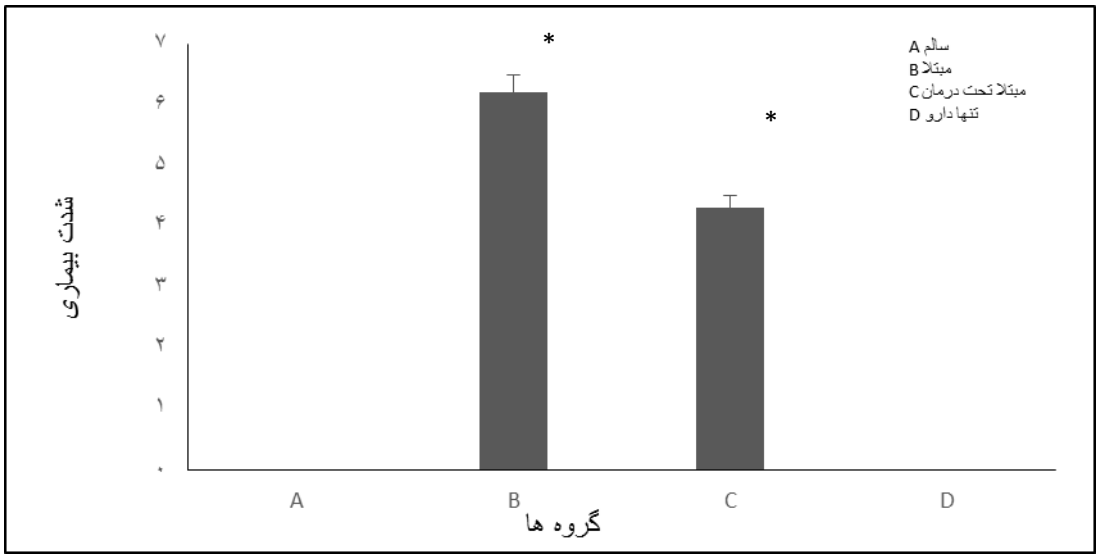
نتایج نشان داد که میزان نیتریک اکساید در موش‌های گروه C که موش‌های بیمار تحت درمان با تروگزروتین بودند به‌طور معنا داری نسبت به گروه B (بیمار) کاهش یافته است ($P<0.05$) (نمودار ۴).



نمودار (۴): میزان سطح نیتریک اکساید پس از تجویز تروگزروتین(*نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار در سطح $(p<0.05)$)

بررسی شدت بیماری:

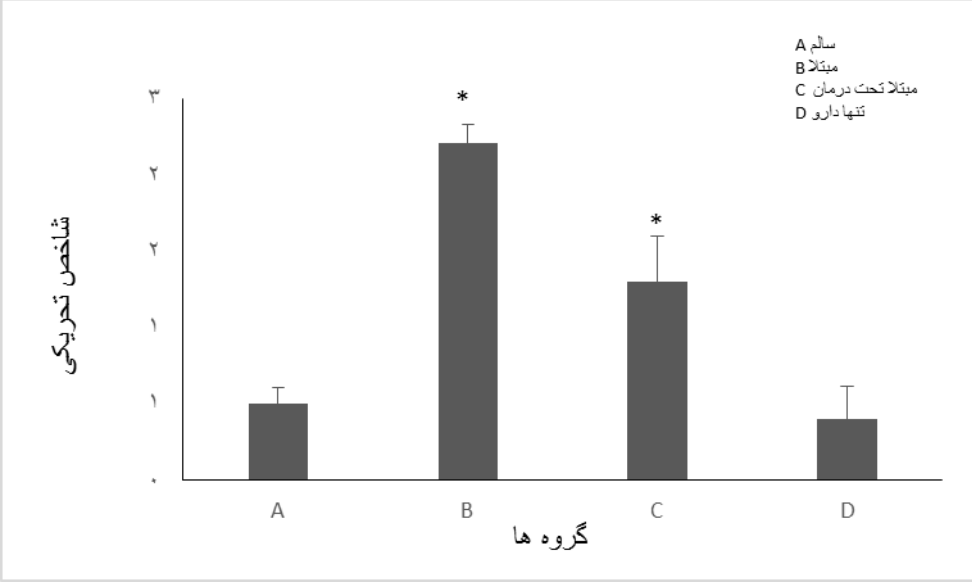
نتایج نشان داد که شدت بیماری در موش‌های گروه C که موش‌های بیمار تحت درمان با تروگزروتین بودند به‌طور معنا داری نسبت به گروه B (بیمار) کاهش یافته است ($P<0.05$) (نمودار ۵).



نمودار (۵): تغییرات شدت بیماری پس از تجویز تروگزروتین (*نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار در سطح $(p<0.05)$)

بررسی شاخص تحریکی:

نتایج نشان داد که شاخص تحریکی در موش‌های گروه C که موش‌های بیمار تحت درمان با تروگزروتین بودند به‌طور معنا داری نسبت به گروه B (بیمار) کاهش یافته است ($P<0.05$) (نمودار ۶).



نمودار (۶): تغییرات شاخص تحریکی پس از تجویز تروگزروتین(*نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار در سطح $(p<0.05)$)

بحث و نتیجه‌گیری

این مطالعه برای نخستین بار با هدف بررسی تأثیر داروی troxerutin برشدت بیماری و میزان تولید واسطه‌های التهابی در موش‌های مبتلا به آنسفالیت خود ایمنی تجربی (EAE) انجام شد. نتـایج بـه دست آمده نشان می‌دهد کـه ، تجـویز troxerutin موجب بهبود در سیمای بالینی نسبت به گـروه شـاهد مبـتلا بـه EAEشـد، که با تعدیل پاسخ‌های ایمنی به‌صورت کـاهش تکثیـر لنفوسیت‌ها و میزان تولید سایتوکاین ها همراه بود.

بسیاری از مطالعات بر روی بیماری MS، بر این موضوع که چگونه وقایع مولکولی و سلولی التهابی باعث ایجاد آسیب در نورون می‌شوند، تمرکز کرده‌اند. به‌عنوان‌مثال ، آسیب در نورون در حال حاضر نتیجه‌ای از دمیلیناسیون التهابی ناشی از فعال شدن سیستم ایمنی محیطی در نظر گرفته می‌شود و مطالعات اخیر در ارتباط با پیشرفت بیماری MS نشان می‌دهد که فرایندهای دمیلیناسیون التهابی باعث ایجاد آبشار حوادث در CNS ، ازجمله فعال سازی میکروگلیا و آسیب میتوکندری در آکسون‌ها می‌شوند که در این میان سیتوکاین‌های پیش التهابی از طریق مکانیسم‌های مختلفی نقش کلیدی در رخداد این آسیب‌ها در مدل‌های حیوانی MS مانند EAE بر عهده دارند (۲۰). سیتوکاین‌های بی‌شماری از عوامل اصلی در گسترش ضایعات MS در سطح پاسخ ایمنی هستند (۱۰) که در این میان به نظر می‌رسد ، فاکتور نکروز دهنده‌ی تومور-α (TNF- α) ، اینترفرون-γ (IFN-γ) ، IL-1، IL-3، IL-4، IL-6، IL-10، IL-12 و IL-18 در میزان بروز ، شدت و پیشرفت MS از نقش مهم‌تری برخوردار هستند (۱۱).

از میان این سایتوکاین‌ها، ما در این مطالعه، میزان تغییرات سه سایتوکاین IL-1 و IL-17 و TNF-α را در موش‌های مبتلا به EAE (گروه B) و موش‌های مبتلا یه EAE تحت درمان با troxerutin (گروهC) اندازه‌گیری کردیم.

IL-17 به‌تازگی یک عامل ایمونولوژیک مهم در التهاب CNS در نظر گرفته شده است. در واقع این سایتوکاین یک سایتوکاین پیش التهابی قوی است کـه بر روی سلول‌های بسیاری مانند سلول‌های اپیتلیال، انـدوتلیال و غیره اثـر می‌کند و باعث آزادسازی انواع بسیاری از واسطه‌های التهـابی می‌گردد (۳۵). IL-17 از سلول‌های T helper (Th) که از سلول‌های Th1 و Th2 متمایز هستند تولید می‌شود و این سلول‌ها، سلول‌های Th17 نامیده می‌شوند. (۹). IL-17 در مناطق عصبی محیطی و مرکزی در EAE وجود دارند و یکی از واسطه‌های اصلی التهابی درMS محسوب می‌شوند (۱۰). سلول‌های مولـد IL-17 در سـیر این بیماری بسیار سریع به بافت مهاجرت می‌کنند و بـا ایجاد شرایط التهـابی و شکسـت سـد خـونی مغـزی (که در واقع عملکرد اصلی IL-17 در روند ایمونوپاتوژنز EAE است)، زمینه‌ی ورود سایر سلول‌ها را به مغز فـراهم می‌کنند (۳۶). وجـود سـطح بالای IL-17 در پلاکهای مغزی

و مایع مغزی نخاعی مبتلایان به MS در مطالعه‌ای که Jadidi-Niaragh و همکاران که در سال ۲۰۱۱ انجام دادند، نشان دهنده‌ی نقش IL-17 در پاتوژنز MS است (۳۵) که در راستای نتایج ما در گروه غیر درمانی بود. Korn و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که تجویز آنتاگونیست IL-17 در موش‌های ایمن شده با پادتن میلینی با ممانعت از بروز کموکاین ها در مغز از بروز بیماری MS جلوگیری می‌کند که در راستای نتایج مطالعه حاضر می‌باشد (۳۷). از طرفی در مطالعه‌ی Balasa و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان داده شد که نقص در IL-17 منجر به ایجاد بیماری بسیار ملایم‌تر می‌شود و القا EAE در این موش‌ها بسیار دیرتر اتفاق می‌افتد (۳۶). در یک مطالعه بالینی که بر روی مدل EAE انجام گرفت نشان داده شد که شدت پاتولوژیک بیماری در حیواناتی که دارای کمبود در IL-17 هستند، کاهش می‌یابد (۳۸). و به‌طور کلی در مطالعه‌ی Schofield و همکاران که در سال ۲۰۱۶ انجام گرفت نشان داده شد که از دیدگاه بالینی ، IL 17 در سرم بیماران مبتلا به MS به‌طور قابل‌توجهی بالاتر از افراد سالم است (۳۹). مطالعات اخیر نشان می‌دهند عوامل کاهنده سطح این سایتوکاین مانند ویتامین D می‌تواند باعث اصلاح میزان IL-17 پاتوژنیک شود و ازاین‌رو می‌تواند برای بیماران مبتلا به MS سودمند باشد (۴۰). و حتی خنثی‌سازی IL-17 می‌تواند علائم بالینی را به میزان قابل‌توجهی کاهش دهد (۱۴) که تمامی این مطالعات در راستای نتایج تحقیق حاضر می‌باشد چنان که در گروه درمانی با دارو در اثر کاهش سطح IL-17 شاهد کاهش شدت و عوارض بیماری بودیم.

IL-17 می‌تواند باعث افزایش سایر سیتوکاین‌های پیش التهابی مانند TNF-α و کموکاین‌ها شود و ازاین‌رو می‌تواند اثر پیش التهابی قوی داشته باشد (۱۵). ازاین‌رو TNF-α نیز سایتوکاینی می‌باشد که مطابق با مطالعه‌ی ما در موش‌های مبتلا به EAE افزایش پیدا می‌کند. TNF-α یک سیتوکاین ضدالتهابی پلوتروپیک قوی است که توسط سلول‌های ایمنی مانند ماکروفاژها ، مونوسیت ها و سلول‌های T تمایز یافته تولید می‌شود (۴۱). TNF-α با پاسخ Th1 همراه است و نقش‌های متعددی در توسعه و عملکرد سیستم ایمنی بدن ایفا می‌کند. دست‌کاری TNF-α و گیرنده‌های آن جنبه‌های بسیاری از عملکردهای آن را در یک بیماری خود ایمن مانند MS نشان داده است.افزایش بیان TNF-α در CNS به موازات پیشرفت بیماری در EAE می‌باشد (۱۶). گزارش شده است که در انسان ، افزایش بیان قابل‌توجهی از TNF-α در ضایعات CNS در MS وجود دارد، که توسط ماکروفاژها ، میکروگلیا ها و آستروسیت‌ها در ضایعات فعال مزمن بیان شده‌اند (۴۲). Kuroda و همکاران در سال ۱۹۹۱ گزارش کرده‌اند که تزریق TNF-α منجر به طولانی شدن معنی‌دار EAE بالینی و نفوذ شدید سلولی در نخاع می‌شود (۴۳). و مطابق با این مطالعه Baker و همکاران در سال ۱۹۹۴ نشان داده‌اند که تزریق داخل جمجمه یا داخل صفاقی آنتی بادی‌های ضد TNF مانع القاء و پیشرفت EAE می‌شود (۴۴) از طرفی Kollias و همکاران در سال ۱۹۹۹ نشان دادند که بیماری دمیلینه کننده‌ی التهابی خود به خودی در CNS از بیان بیش از حد TNF-α در موش‌های ترنس ژن ایجاد می‌شود و خنثی‌سازی TNF-α توسط آنتی بادی ضد TNF-α موش تقریباً به‌طور کامل روند توسعه بیماری را معکوس می‌کند (۴۵). و تولید موضعی TNF-α توسط CNS بطور قدرتمند و انتخابی باعث القاء آپوپتوز در الیگودندروسیت‌ها می‌شود (۴۶،۴۷).

ولی نباید از نقش IL-1 در شروع ، گسترش ، تقویت و مزمن شدن بیماری گذشت (۱۷). IL-1 نقش مهمی در پلاریزیشن سلول‌های T به سمت Th17 دارد که این دسته از سلول‌های T نقش اساسی درپاتوژنز بیماری MS ایفا می‌کنند (۱۹). در یک مغز سالم ، سطح بیان IL-1 بسیار پایین است، بااین‌حال ، افزایش قابل‌توجهی در سطح IL-1 در مناطق مجزا مغز در شرایط خاص ، مانند التهاب سیستمیک ، آسیب ایسکمیک مغز و عفونت وجود دارد، و همچنین افزایش بیان IL-1 در CNS در هنگام القای EAE نیز مشاهده می‌شود (۲۰). Bauer و همکاران در سال ۱۹۹۳ نیز نشان دادند که در القاء EAE در CNS ، IL-1 دچار افزایش بیان می‌شود (۴۸). و حذف فعالیت گیرنده IL-1 از طریق بیان بیش از حد آنتاگونیست در CNS ، شدت این بیماری را در مدل موش EAE کاهش می‌دهد (۱۸). از طرفی تزریق IL-1 به مغز موش باعث افزایش مرگ و میر سلول عصبی و آدم می‌شود (۴۹) و بیان بیش از حد آنتاگونیست های گیرنده IL-1 در CNS این اثرات را مسدود می‌کند (۵۰). در مطالعه‌ی دیگر که Downen و همکاران در سال ۱۹۹۹ انجام دادند، نشان داده شد که افزودن IL-1 in vitro منجر به آپوپتوز سلول‌های عصبی می‌شود (۵۱) که که این اثرات نوروتوکسیک IL-1 به نظر می‌رسد وابسته به بیان iNOS شکل القایی نیتریک اکسید سنتاز باشد (۵۲).

نقش مولکول پیام‌رسانی رادیکال آزاد نیتریک اکسید (NO)، در بیماری MS به سرعت بعد از کشف نقش مهم NO در التهاب، مورد توجه قرار گرفت (۲۱). نشان داده شده است که اکسید نیتریک (NO) در بالاتر از غلظت‌های طبیعی در ضایعات مولتیپل اسکلروزیس (MS) وجود دارد.که این غلظت‌های بالا به دلیل ظهور شکل القایی نیتریک اکسید سنتاز (iNOS) در سلول‌هایی مانند ماکروفاژها و آستروسیت‌ها می‌باشد . شواهد فراوان نقش مهم NO در پاتوژنز بیماری MS و سهم آن در جنبه‌های مختلف این بیماری را نشان می‌دهد که NO در بسیاری از ویژگی‌های بیماری ازجمله التهاب، اختلال در سد خون-مغزی ، آسیب الیگودندروسیت و دمیلیناسیون و تخریب آکسون و مرگ نورون‌ها نقش دارد و از طرف

دیگر باعث اختلال در هدایت آکسون ها می‌شود و از این طریق باعث کاهش عملکرد آن‌ها می‌شود. بیشتر اقدامات مخرب NO احتمالاً به دلیل تشکیل پراکسی نیتریت از طریق واکنش با سوپراکسید است.NO- AND- MS در برخی مطالعات نشان داده شد که غلظت نشانگرهای تولید NO (به‌عنوان‌مثال ، نیترات و نیتریت) در CSF ، خون و ادرار بیماران مبتلا به MS افزایش یافته است (۲۱،۲۲) و تولید NO به میزان قابل‌توجهی در ضایعات بیماری MS ایجاد می‌شود ، که این یافته ناشی از بررسی پاتولوژیک ضایعات و مطالعات CSF ، خون و ادرار بیماران و طیف سنجی رزونانس پارامغناطیس الکترونی EAE می‌باشد (۵۳). در EAE به نظر می‌رسد NO نقش مهمی در آلودگی CNS ، در هر دو مدل حاد و مزمن بیماری دارد (۵۴). اکسید نیتریک (NO) و پراکسی نیتریت مشتق واکنش دهنده آن ($ONOO^-$) در پاتوژنز مولتیپل اسکلروزیس (MS) نقش مهمی ایفا می‌کنند به این طریق که آن‌ها با مهار زنجیره تنفسی میتوکندری و مهار آنزیم‌های کلیدی داخل سلول برای لیگودندروسیت ها و سلول‌های عصبی شرایط کشنده وتوکسیک فراهم می‌کنند همین طور مشخص گردیده اکسید نیتریک اکساید سنتاز (iNOS) در سیستم عصبی مرکزی حیوانات مبتلا به (EAE) و بیماران مبتلا به MS دچار افزایش بیان شده است و افزایش سطح نیترات و نیتریت به‌عنوان محصولات نهایی پایدار $NO / ONOO^-$ ، در مایع مغزی نخاعی ، سرم و ادرار این گونه بیماران دیده می‌شود (۵۵) و در نهایت Hooper و همکاران در سال ۱۹۹۵با استفاده از یک روش in vivo درموش مبتلا به EAE نشان داده‌اند که مقادیر زیادی NO در ۴ تا ۵ روز پس از انتقال سلول T در نخاع تولید می‌شود ، که با زمانی که موش‌ها دچار فلج بالینی شدند ارتباط داشت (۵۶).

ازجمله عوامل کاهنده‌ی شدت بیماری در گروه درمانی با troxerutin ، کاهش تکثیر لنفوسیت‌ها در پاسخ به تحریک مجدد با پپتید MOG است که در نتیجه می‌توان یکی ازعلل کاهش علائم و شدت بیماری را کاهش لنفوسیتهای اتوراکتیو در نظر گرفت.

مطالعات مختلفی نتایج مشابهی با کار ما در مورد اثرات ضدالتهابی این دارو بر روی سایر بیماری‌ها را گزارش کرده‌اند.

troxerutin به‌عنوان عضوی از خانواده فلاونوئید ، دارای اثرات مهاری بر پاسخ‌های التهابی مرتبط با فاکتور هسته‌ای تقویت‌کننده زنجیره کاپا از لنفوسیت‌های B (NF-κb) (که نقش مهمی در روند التهاب بازی می‌کند و سطح بیان iNOS را نیز کنترل می‌کند) بوده و از بافتهای مختلف در برابر التهاب محافظت می‌کند (۳۱،۵۷،۵۸).

در مطالعه‌ای که Hoseindoost و همکاران در سال ۲۰۱۹ بر روی تأثیر troxerutin بر سطح سیتوکاین‌های التهابی و سطح فاکتور نروتر فیک مشتق شده از مغز (BDNF)(brain-derived neurotrophic factor) در رت هایی با رژیم غذایی حاوی چربی بالا انجام دادند، نشان داده شد که troxerutin به‌طور قابل‌توجهی غلظت سایتوکاین‌های پیش التهابی IL-6 و TNF-α را کاهش داده و سطح BDNF را در مادران تغذیه شده با رژیم حاوی چربی بالا و فرزندان آن‌ها هم در سرم و هم در هیپوکامپ بهبود می‌بخشد و در واقع دارای اثرات ضدالتهابی در این دسته از موش‌ها می‌باشد، این یافته‌ها نشان داد که مصرف تروگزروتین در دوران بارداری اثرات محافظت‌کننده عصبی دارد (۵۹).

مطالعه‌ی دیگری در جهت بررسی اثرات محافظتی این دارو بر روی کبد موش در برابر صدمات اکسیداتیو ناشی از استرس D-Galactose انجام شده است که در آن نشان داده شد که troxerutin علائم مربوط به دیابت نوع ۲ ازجمله قند خون ناشتا را از طریق یک مکانیسم ضدالتهابی بهبود می‌بخشد. و به‌طور قابل‌توجهی پاسخ التهابی را در کبد موش مهار می‌کند. (۶۰).

اخیراً به اثبات رسیده که تنظیم فعال سازی NF-κB با درمان troxerutin سرکوب می‌شود و troxerutin می‌تواند با مهار فعال سازی NF-κB p65 شروع پاسخ التهابی را مهار کند. بعلاوه در همین مطالعه مشخص گردیده که troxerutin تا حد زیادی ضریب بیان iNOS را در کبد موش‌ها کاهش می‌دهد. که این نتایج حاکی از آن است که troxerutin می‌تواند فرآیندهای التهابی را با سرکوب بیان iNOS کاهش دهد (۶۱).

Badalzadeh و همکاران درسال ۲۰۱۶ نشان دادند که troxerutin به تنهایی میزان مهم‌ترین سیتوکین های پیش التهابی TNF-α و IL-1β را که اثرات منفی بر روی سلول‌های میوکارد ایسکمیک دارد، کاهش می‌دهد (۳۱).

و این دارو توانایی مهار بیان iNOS در کلیه موش‌های تحت درمان با D-gal را دارد که در همین راستا یافته‌های این مطالعه نشان داد troxerutin در مرحله اول رادیکال‌های آزاد اکسیژن را، که توسط D-gal القا می‌شود پاکسازی می‌کند، و در نتیجه از تولید بیش از حد NO ناشی از القای iNOS جلوگیری می‌کند. به عبارت دیگر، مهار تولید NO از طریق درمان troxerutin باعث انسداد روند التهابی می‌شود همچنین troxerutin می‌تواند از طریق مهار تنظیم NF-κB باعث سرکوب القا iNOS و تولید NO القایی شود (۵۸).

در راستای نتایج مقالات ذکر شده فوق ،نتایج مطالعه حاضر نشان داد درمان با troxerutin در مدل موشی بیماری MS موجب کاهش سطح سایتوکاین‌های IL-17، IL-1، TNF-α و نیزکاهش تولید نیتریک اکساید می‌گردد که در نتیجه آن منجربه بهبودی در سیمای بالینی گروه تحت درمان با دارو نسبت به گروه شاهد مبتلا به EAE شد. بنابراین این احتمال مطرح است که

افـزودن ایـن دارو بـه رژیـم درمـانی ایـن افـراد دارای اثـرات سودمندی باشد.

محدودیت‌های مطالعه: آماده سازی مواد لازم جهت القا بیماری و نحوه‌ی درســـت ترکیـب کردن آن‌ها و القا ســـخت بیماری جز محدودیت‌های این مطالعه بود.

تشکر و قدردانی

نگارندگان از زحمات دانشـکده‌ی دامپزشـکی دانشـگاه تبریز کمال تقدیر و تشکر را دارند. نویســـندگان اعـــلام می‌دارند کـــه هـــیچگونـه تضـاد منـــافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

References:

1. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. Lancet 2008; 372: 1502–17.
2. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. Nat Rev Immunol 2015; 15(9):545-58.
3. Wu GF, Alvarez E. The Immunopathophysiology of Multiple Sclerosis. Neurol Clin 2011;29:257-78.
4. Zhang JM, An J. Cytokines, Inflammation, and Pain. Int Anesthesiol Clin 2007;45:27-37.
5. Trapp BD, Nave KA. Multiple Sclerosis: An Immune or Neurodegenerative Disorder? Annu Rev Neurosci 2008;31:247-69.
6. Mao P, Reddy PH. Is Multiple Sclerosis a Mitochondrial Disease? Biochim Biophys Acta 2009;1802:66-79.
7. Goverman J. Autoimmune T Cell Responses in the Central Nervous System. Nat Rev Immunol 2009;9:393-407.
8. Wujek JR, Bjartmar C, Richer E, Ransohoff RM, Yu M, Tuohy VK, et al. Axon Loss in the Spinal Cord Determines Permanent Neurological Disability in an Animal Model of Multiple Sclerosis. J Neuropathol Exp Neurol 2002;61:23-32.
9. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of Multiple Sclerosis Lesions: Implications for the Pathogenesis of Demyelination. Ann Neurol 2000; 47:707-17.
10. Hamann I, Zipp F, Infante-Duarte C. Therapeutic Targeting of Chemokine Signaling in Multiple Sclerosis. J Neurol Sci 2008;274:31-8.
11. Imitola J, Chitnis T, Khoury SJ. Cytokines in Multiple Sclerosis: From Bench to Bedside. Pharmacol Ther 2005;106:163-77.
12. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-Producing Cd4+ Effector T Cells Develop Via a Lineage Distinct from the T Helper Type 1 and 2 Lineages. Nat Immunol 2005;6:1123-32.
13. Hofstetter HH, Ibrahim SM, Koczan D, Kruse N, Weishaupt A, Toyka KV, et al. Therapeutic Efficacy of Il-17 Neutralization in Murine Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. Cell Immunol 2005;237:123-30.
14. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. Il-23 Drives a Pathogenic T Cell Population That Induces Autoimmune Inflammation. J Exp Med 2005;201:233-40.
15. Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 Family Members and Inflammation. Immunity 2004;21:467-76.
16. Begolka WS, Miller SD. Cytokines as Intrinsic and Exogenous Regulators of Pathogenesis in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. Res Immunol 1998;149:771-81.
17. Pare A, Mailhot B, Levesque SA, Lacroix S. Involvement of the Il-1 System in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis: Breaking the Vicious Cycle between Il-1beta and Gm-Csf. Brain Behav Immun 2017;62:1-8.
18. Martin D, Near SL. Protective Effect of the Interleukin-1 Receptor Antagonist (Il-1ra) on Experimental Allergic Encephalomyelitis in Rats. J Neuroimmunol 1995;6:241-5.

19. El-Behi M, Ciric B, Dai H, Yan Y, Cullimore M, Safavi F, et al. The Encephalitogenicity of T(H)17 Cells Is Dependent on Il-1- and Il23-Induced Production of the Cytokine Gm-Csf. Nat Immunol 2011;12:568-75.
20. Wang K, Song F, Fernandez-Escobar A, Luo G, Wang JH, Sun Y. The Properties of Cytokines in Multiple Sclerosis: Pros and Cons. Am J Med Sci 2018; 356(6):552-60.
21. Encinas JM, Manganas L, Enikolopov. Nitric Oxide and Multiple Sclerosis. Curr Neurol Neurosci Rep 2005; 5:232–8.
22. Smith KJ, Lassmann H. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. Lancet Neurol 2002; 1(4):232-41.
23. Lan M, Tang X, Zhang J, Yao Z. Insights in pathogenesis of multiple sclerosis: nitric oxide may induce mitochondrial dysfunction of oligodendrocytes. Rev Neurosci 2018; 29(1):39-53.
24. Luccarini I, Ballerini C, Biagioli T, Biamonte F, Bellucci A, Rosi MC, et al. Combined treatment with atorvastatin and minocycline suppresses severity of EAE. Exp Neurol 2008; 211(1): 214-26.
25. Siegers CP, Syed Ali S, Tegtmeier M. Aescin and troxerutin as a successful combination for the treatment of inner ear perfusion disturbances. Phytomedicine 2008; 15(3): 160–3.
26. Vinothkumar R, Vinoth Kumar R, Karthikkumar V, Viswanathan P, Kabalimoorthy J, Nalini N. Oral supplementation with troxerutin (trihydroxyethylrutin), modulates lipid peroxidation and antioxidant status in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. Environ Toxicol Pharmacol 2014; 37: 174–84.
27. Lu J, Wu DM, Zheng ZH, Zheng YL, Hu B, Zhang ZF. Troxerutin protects against high cholesterol-induced cognitive deficits in mice. Brain 2011; 134: 783–97.
28. Liu CM, Ma JQ, Lou Y. Chronic administration of troxerutin protects mouse kidney against D-galactose-induced oxidative DNA damage. Food Chem Toxicol 2010; 48(10): 2809–17.
29. Zhang ZF, Fan SH, Zheng YL, Lu J, Wu DM, Shan Q, et al. Troxerutin improves hepatic lipid homeostasis by restoring NAD+-depletion-mediated dysfunction of lipin 1 signaling in high-fat diet-treated mice. Biochem Pharmacol 2014; 91(1): 74–86.
30. Lu J, Wu DM, Hu B, Cheng W, Zheng YL, Zhang ZF, et al. Chronic administration of troxerutin protects mouse brain against D-galactose-induced impairment of cholinergic system. Neurobiol Learn Mem 2010; 93(2): 157–64.
31. Badalzadeh R, Baradaran B, Alihemmati A, Yousefi B, Abbaszadeh A. Troxerutin Preconditioning and Ischemic Postconditioning Modulate Inflammatory Response after Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Rat Model. Inflammation 2016;40(1):136-43.
32. Skundric DS, Zakarian V, Dai R, Lisak RP, Tse HY, James J. Distinct immune regulation of the response to H-2b restricted epitope of MOG causes relapsing-remitting EAE in H-2b/s mice. J Neuroimmunol 2003; 136(1-2): 34-45.
33. van Meerloo J, Kaspers GJL, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. Methods Mol Biol 2011; 731:237-45.
34. Griess P. Ber Deutsch Chem Ges 1879;12:426–8.
35. Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. Scand J Immunol 2011; 74(1): 1-13.
36. Balasa R. T helper 17 cells in multiple scelerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. Rom J Neurol 2010; 9(4): 181-8.
37. Korn T, Oukka M, Kuchroo V, Bettelli E. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. Semin Immunol 2007; 19(6): 362-71.
38. Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, et al. Interleukin-17 Production in Central Nervous System-Infiltrating T

Cells and Glial Cells Is Associated with Active Disease in Multiple Sclerosis. Am J Pathol 2008;172:146-55.

39. Schofield C, Fischer SK, Townsend MJ, Mosesova S, Peng K, Setiadi AF, et al. Characterization of Il-17aa and Il-17ff in Rheumatoid Arthritis and Multiple Sclerosis. Bioanalysis 2016; 8:2317-27.
40. da Costa, DS, Hygino J, Ferreira TB, Kasahara TM, Barros PO, Monteiro C, et al. Vitamin D Modulates Different Il-17-Secreting T Cell Subsets in Multiple Sclerosis Patients. J Neuroimmunol 2016;299:8-18.
41. Bradley JR. Tnf-Mediated Inflammatory Disease. J Pathol 2008;214:149-60.
42. Cannella B, Raine CS. The Adhesion Molecule and Cytokine Profile of Multiple Sclerosis Lesions. Ann Neurol 1995;37:424-35.
43. Kuroda Y, Shimamoto Y. Human Tumor Necrosis Factor-Alpha Augments Experimental Allergic Encephalomyelitis in Rats. J Neuroimmunol 1991;34:159-64.
44. Baker D, Butler D, Scallon BJ, O'Neill JK, Turk JL, Feldmann M. Control of Established Experimental Allergic Encephalomyelitis by Inhibition of Tumor Necrosis Factor (Tnf) Activity within the Central Nervous System Using Monoclonal Antibodies and Tnf Receptor-Immunoglobulin Fusion Proteins. Eur J Immunol 1994;24:2040-8.
45. Kollias G, Douni E, Kassiotis G, Kontoyiannis D. The Function of Tumour Necrosis Factor and Receptors in Models of Multi-Organ Inflammation, Rheumatoid Arthritis, Multiple Sclerosis and Inflammatory Bowel Disease. Ann Rheum Dis 1999; 58:I32-39.
46. Probert L, Akassoglou K, Pasparakis M, Kontogeorgos G, Kollias G. Spontaneous Inflammatory Demyelinating Disease in Transgenic Mice Showing Central Nervous System-Specific Expression of Tumor Necrosis Factor Alpha. Proc Natl Acad Sci U S A 1995;92:11294-8.
47. Akassoglou K, Bauer J, Kassiotis G, Pasparakis M, Lassmann H, Kollias G, et al. 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 Oligodendrogliopathy. Am J Pathol 1998;153:801-13.
48. Bauer J, Berkenbosch F, Van Dam AM, Dijkstra CD. Demonstration of interleukin-1 beta in Lewis rat brain during experimental allergic encephalomyelitis by immunocytochemistry at the light and ultrastructural level. J Neuroimmunol 1993; 48: 13 – 21.
49. Stroemer RP, Rothwell NJ. Cortical protection by localized striatal injection of IL-1ra following cerebral ischemia in the rat. J Cereb Blood Flow Metab 1997; 17: 597 – 604.
50. Yang GY, Liu XH, Kadoya C, Zhao YJ, Mao Y, Davidson BL, et al. Attenuation of ischemic inflammatory response in mouse brain using an adenoviral vector to induce overexpression of interleukin-1 receptor antagonist. J Cereb Blood Flow Metab 1998; 18; 840 – 7.
51. Downen M, Amaral TD, Hua LL, Zhao ML, Lee SC. Neuronal death in cytokine-activated primary human brain cell culture: role of tumor necrosis factor-alpha. Glia 1999; 28: 114 – 27.
52. Stoll G, Jander S, Schroeter M. Cytokines in CNS disorders: neurotoxicity versus neuroprotection. J Neural Transm Suppl 2000; 59: 81 – 9.
53. Lin RF, Lin TS, Tilton RG, Cross AH. Nitric oxide localized to spinal cords of mice with experimental allergic encephalomyelitis: an electron paramagnetic resonance study. J Exp Med 1993; 178: 643–8.
54. Okuda Y, Nakatsuji Y, Fujimura H, Esumi H, Ogura T, Yanagihara T, et al. Expression of the inducible

isoform of nitric oxide synthase in the central nervous system of mice correlates with the severity of actively induced experimental allergic encephalomyelitis. J Neuroimmunol 1995; 62: 103-12.

55. Giovannoni G, Heales SJ, Land JM, Thompson EJ. The potential role of nitric oxide in multiple sclerosis. Am J Pathol 2008; 172(1):146-55.
56. Hooper DC, Ohnishi ST, Kean R, Numagami Y, Dietzschold B, Koprowski H. Local nitric oxide production in viral and autoimmune diseases of the central nervous system. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 5312-6.
57. Zhang Z, Wang X, Zheng G, Shan Q, Lu J, Fan S, et al. Troxerutin attenuates enhancement of hepatic gluconeogenesis by inhibiting NOD activation-mediated inflammation in highfat diet-treated mice. Int J Mol Sci 2016; 18: 31.
58. Fan SH, Zhang ZF, Zheng YL, Lu J, Wu DM, Shan Q, et al. Troxerutin protects the mouse kidney from d-galactosecaused injury through anti-inflammation and anti-oxidation. Int Immunopharmacol 2009; 9: 91-6.
59. Hoseindoost M, Alipour MR, Farajdokht F, Diba R, Bayandor P, Mehri K, et al. Effects of troxerutin on inflammatory cytokines and BDNF levels in male offspring of high-fat diet fed rats. Avicenna J Phytomed 2019; 9(6):597-605.
60. Zhanga ZF, Zhanga YG, Fanb SH, Zhuanga J, Zheng YL, Lu J, et al. Troxerutin protects against 2,2 ,4,4 -tetrabromodiphenyl ether (BDE-47)-induced liver inflammation by attenuating oxidative stress-mediated NAD+-depletion. J Hazard Mater 2015; 283;98-109.
61. Zhang ZF, Fan SH, Zheng YL, Lu J, Wu DM, Shan Q, et al. Troxerutin protects the mouse liver against oxidative stress-mediated injury induced by D-galactose. J Agric Food Chem 2009; 57(17):7731-6.

Original Article

THE EFFECT OF TROXEROTIN ON PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES AND LYMPHOCYTE PROLIFERATION IN AN ANIMAL MODEL OF AUTOIMMUNE EXPERIMENTAL ENCEPHALOMYELITIS

*Yaser Jafari Khataylou[1], Somayeh Ahmadiafshar[2] **

Received: 16 April, 2020; Accepted: 25 July, 2020

Abstract

Background & Aims: Recent studies have demonstrated an important role for Th-17 lymphocytes and other cytokines in pathogenesis of multiple sclerosis. Although previous studies have demonstrated the anti-inflammatory potential of troxerutin, the effects of troxerutin on multiple sclerosis have not been studied so far. The present study was carried out to investigate the therapeutic effects of troxerutin on experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by reducing the production of pro-inflammatory cytokines IL-17, IL-1, TNF-α, and reducing nitric oxide levels and reducing immune cell proliferation.

Materials & Methods: EAE was induced by MOG35-55 peptide and complete Freund's adjuvant in female C57BL/6 mice. The mice were placed in four therapeutic groups of 5. Treatment with troxerutin (135 mg/kg daily) was started in the treatment group when they developed a disability score. Signs of disease were recorded daily until the day 21 when mice were sacrificed. Then, Immune cells were tested to assess proliferation rate, cytokine, and nitric oxide by the 3-(4,5 dimethylthiozol-2-yl)-2,5- diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and Greiss, respectively.

Results: The troxerutin significantly decreased the clinical signs of established EAE. Troxerutin significantly decreased the production of pro-inflammatory cytokines IL-17, IL-1 TNF-α and decreased levels of nitric oxide, while reduced the proliferation of immune cells ($p<0.05$).

***Conclusion*:** Parallel with decreasing proliferation of Immune cells and cytokine production, troxerutin ameliorated established EAE.

Keywords: Experimental autoimmune encephalomyelitis, pro-inflammatory cytokines, troxerutin, Immune cells

Address: Faculty of veterinary medicine, University of Urmia, Urmia, Iran
Tel: +984136378743
Email: afsharnegin92@gmail.com

SOURCE: STUD MED SCI 2020: 31(6): 498 ISSN: 2717-008X

[1] Assistant professor Department of pathobiology, Faculty of veterinary medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2] Candidate for phd in Immunology Department of Microbiology, Faculty of veterinary medicine, University of Urmia, Urmia, Iran (Corresponding Author)