

## بررسی تأثیر ویتامین D<sub>3</sub> و عصاره زنجبیل بر علایم بالینی و شدت التهاب در بیماری آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی

عبدالله جعفرزاده<sup>۱</sup>، مرضیه محمدی کرد خلیلی<sup>۲</sup>، ریحانه آهنگر پروین<sup>۳</sup>، سید وهاب عزیزی<sup>۴</sup>، فاطمه ایوبی<sup>۵</sup>، زهرا تقی پور<sup>۶</sup>، علی شمسی زاده<sup>۷</sup>، رضا گوجانی<sup>۸</sup>، مریم نعمتی<sup>۹</sup>، محمد مؤذنی<sup>۹</sup>

دریافت مقاله: ۹۳/۱۲/۲۱

ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۳/۴/۱۸

دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۳/۶/۱۱

پذیرش مقاله: ۹۳/۶/۲۳

### چکیده

**زمینه و هدف:** بیماری آنسفالومیلیت خودایمن تجربی (EAE) با ارتشاح لکوسیتی سیستم عصبی مرکزی همراه می‌باشد. مطالعات نشانگر اثرات ضد التهابی ویتامین D<sub>3</sub> و زنجبیل می‌باشد. هدف این مطالعه بررسی اثر ویتامین D<sub>3</sub> و عصاره زنجبیل بر روی علایم بالینی EAE و میزان ارتشاح لکوسیتی است.

**مواد و روش‌ها:** مطالعه حاضر از نوع تجربی می‌باشد. القاء بیماری EAE با ایمونیزاسیون موش‌های C57BL/6 با تزریق پپتید ۳۵-۵۵ MOG مخلوط شده با ادجوانت کامل فروند صورت گرفت. گروه‌های مبتلا به EAE شامل دریافت کننده‌های ویتامین D<sub>3</sub>، عصاره زنجبیل، روغن زیتون، بافر فسفات سالین و همچنین PBS به عنوان کنترل تقسیم گردیدند. در روز ۳۱ موش‌های مورد مطالعه کشته شدند و علایم بالینی، شدت التهاب بیماری و تغییرات وزن نیز تا ۳۰ روز مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های حاصل توسط آزمون آماری t-test مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** گروه کنترل، علائم بالینی را ۱۰ روز پس از القاء نشان دادند. این علایم در گروه دریافت کننده ویتامین D<sub>3</sub> و عصاره زنجبیل در روز ۱۳ و ۱۵، پس از القاء EAE دیده شد. میانگین حداکثر شدت بیماری در گروه کنترل ویتامین D<sub>3</sub> (1/۸۷±۱/۶۱)، گروه کنترل زنجبیل (1/۹۲±۱/۷۹)، گروه ویتامین D<sub>3</sub> (1/۰۵±۱/۰۱) و در گروه زنجبیل (0/۷۳±۰/۸۱) می‌باشد. ویتامین D<sub>3</sub> و عصاره زنجبیل به طور معنی‌داری (p=۰/۰۵) باعث افزایش وزن بدن نسبت به گروه کنترل می‌شوند. موش‌های تحت درمان ارتشاح سلول‌های التهابی کمتری را در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهند. نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که ویتامین D<sub>3</sub> و عصاره زنجبیل می‌تواند در جلوگیری از پیشرفت بیماری و نیز کاهش ارتشاح لکوسیتی در CNS مؤثر باشند.

**واژه‌های کلیدی:** آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی، ویتامین D<sub>3</sub>، عصاره زنجبیل، علایم بالینی

۱- (نویسنده مسئول) استاد ایمونولوژی، گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، دانشکده پزشکی و گروه ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دانشکده پزشکی، کرمان، ایران

تلفن: ۰۳۴-۳۴۲۵۵۲۱۱، دورنگار: ۰۳۴-۳۴۲۵۵۲۰۹، پست الکترونیک: jafarzadeh14@yahoo.com

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد ایمونولوژی، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد ایمونولوژی، گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران

۴- دانشجوی دکتری فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران

۵- دانشیار بافت‌شناسی، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران

۶- دانشیار فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران

۷- کارشناس ارشد اپیدمیولوژی، گروه اپیدمیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران

۸- کارشناس آزمایشگاه، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

۹- استاد ایمونولوژی، گروه ایمونولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

مقدمه

و سبب افزایش مقاومت این سلول در مقابل پاسخ ایمنی شدید می‌شود [۵].

نقش ویتامین D<sub>3</sub> بعنوان سرکوب کننده سیستم ایمنی، طی مطالعات حیوانی که در آن‌ها تجویز ویتامین D<sub>3</sub> سبب جلوگیری یا مهار چشمگیر بیماری‌های اتوایمیون شده است نیز نشان می‌دهد که ویتامین D<sub>3</sub> اثر بازدارنده‌ای را در آغاز و پیشرفت EAE (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis) دارد [۶]. مطالعات همچنین گزارش کرده‌اند ویتامین D<sub>3</sub> از طریق القاء آپوپتوز (مرگ برنامه ریزی شده سلول) در سلول‌های التهابی از پیشرفت بیماری EAE جلوگیری می‌کند. ویتامین D<sub>3</sub> می‌تواند بعنوان تنظیم کننده عوامل نسخه برداری عمل کند و با مهار تولید سایتوکاین‌های التهابی (IL-6 و IFN- $\gamma$ ) سبب کاهش شدت بیماری گردد [۷]. گزارش شده است ویتامین D<sub>3</sub> با کاهش بیان مولکول MHCII و سلول‌های دندرتیک و نقص در تمایز و بلوغ سلول‌های DC از مغز استخوان، باعث تعدیل پاسخ ایمنی می‌شود که می‌تواند در کاهش شدت بیماری EAE نقش داشته باشد [۸]. گیاه زنجبیل (*Zingiber Officinale Roscoe*) با نام علمی می‌باشد که دارای بوی معطر و مطبوع می‌باشد و از نظر طعم تند و معطر است. گیاه زنجبیل از جمله گیاهان دارویی، بخصوص در کشور ایران می‌باشد، که در طب قدیم ایران به عنوان گیاه ضد آماس معرفی شده است و برای درمان بیماری‌های مختلف شامل تهوع، اختلالات گوارشی، اختلال تنفسی، تصلب شرائین، میگرن، افسردگی، زخم معده، افزایش کلسترول استفاده می‌گردد. همچنین، از اثرات زنجبیل می‌توان به کاهش درد، درمان آرتريت روماتوئید، خاصیت ضدالتهابی، آنتی و آنتی‌اکسیدانی اشاره کرد. خاصیت ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی زنجبیل با

مالتیپل اسکلروزیس (MS)، بیماری خود ایمنی سیستم اعصاب مرکزی می‌باشد. این بیماری اغلب در سنین بین ۲۰ تا ۴۰ سالگی بروز می‌کند و در بین زنان شایع‌تر می‌باشد [۱]. در این بیماری سیستم ایمنی موجب حذف میلین ماده سفید مغز و ایجاد پلاک‌های متعدد در این ناحیه می‌گردد. علت ایجاد پلاک‌های مغزی در این بیماری، ارتشاح لنفوسیت‌ها و ماکروفاژها به مغز و ایجاد واکنش التهابی می‌باشد. علت این بیماری مشخص نیست، ولی مجموعه‌ای از عوامل محیطی، عفونی، ژنتیکی، ایمنی، ویروس‌ها، سموم، سوخت‌وساز و موادی چون نیتریک اکسید را در بروز آن دخیل می‌دانند. هر عاملی که مانع از ارتشاح سلولی به مغز گردد یا منجر به کاهش میزان ارتشاح گردد می‌تواند از پیشرفت بیماری جلوگیری کند [۲-۴].

ویتامین D<sub>3</sub> دقیقاً یک ویتامین نیست، زیرا در پوست و تحت اکثر شرایط قابل سنتز است. این سنتز منبع اصلی تأمین ویتامین D<sub>3</sub> می‌باشد. ویتامین D<sub>3</sub> ممکن است از طریق مواد غذایی تأمین شود، اما بخش عمده ویتامین D<sub>3</sub> مورد نیاز برای بدن از طریق تابش اشعه ماورای بنفش خورشید به لایه اپیدرم پوست تولید می‌شود. نواحی استوایی در طول سال، بیشترین تابش ماورای بنفش را دریافت می‌کنند. ویتامین D<sub>3</sub> در روند متابولیسم استخوان، تنظیم تکثیر و تمایز سلولی و همچنین تنظیم پاسخ‌های ایمنی، نقش مهمی دارد. گیرنده‌های ویتامین D<sub>3</sub> به طور گسترده در سلول‌های دستگاه ایمنی وجود دارند و شکل فعال این ویتامین (۱، ۲۵- دی هیدروکسی کوله کلسی فرول) توانایی اصلاح و تغییر سلول‌های دندرتیکی را دارد

حدود ۲۲-۲۰ درجه سانتی‌گراد ثابت نگه داشته شود. بعد از یک هفته عادت به شرایط جدید، آزمایش بر روی حیوانات شروع شد.

عصاره طبق روش Ajith و همکاران تهیه شد. به این صورت که ریزوم زنجبیل از هر بار یوم اصفهان خریداری شد و پس از تأیید توسط کارشناس مربوطه جهت تهیه عصاره مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از هاون، زنجبیل به قطعات کوچک‌تر تقسیم‌شده، سپس آسیاب شد و پودر یکنواختی به دست آمد. هم حجم زنجبیل اتانول ۵۰٪ به پودر زنجبیل اضافه شد و در بن ماری دمای ۷۰ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ساعت قرار داده شد. سوسپانسیون حاصله سانتریفوژ (۲۵۰۰g) به مدت ۱۵ دقیقه) و مایع رویی آن جداشده، سپس مایع رویی در بن ماری دمای ۴۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا الکل آن کاملاً تبخیر شود. بدون خالص‌سازی بیشتر، عصاره خالص ژله قهوه‌ای رنگ زنجبیل را در محلول بافر فسفات سالین (به عنوان حامل زنجبیل) حل گردید و مورد استفاده قرار گرفت [۱۳].

جهت القاء بیماری، مقدار ۳۰۰ میکروگرم پپتید M-E-V-G-W-Y-R-S-P-F-S-R-) با توالی MOG35-55 (B-V-H-L-Y-R-N-G-K) و درجه خلوص بیشتر از ۹۵٪ (شرکت PROSPEC، روسیه)، در ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سالین و ۱۰۰ میکرو لیتر ادجوانت کامل فروند (سیگما3) مخلوط و به صورت زیر جلدی در ناحیه پشت به هر موش C57BL/6 تزریق گردید. مقدار ۴۰۰ نانوگرم سم سیاه‌سرفه در مرحله صفر و ۴۸ ساعت بعد از ایمونیزاسیون به صورت داخل صفاقی تجویز شد [۱۴]. روند بیماری روزانه توسط یک فرد و در ساعات مشخصی از روز مورد بررسی قرار گرفت و شدت بیماری از صفر (عدم ابتلا به

جلوگیری از سنتز سائتوکاین‌های پیش التهابی شامل IL-1 و TNF می‌باشد [۹-۱۰]. ترکیب شیمیایی روغن زنجبیل حاوی bisabolene و sesquiterpens می‌باشد که از طریق مهار مستقیم مسیر سیکلو اکسیژناز و ۵- لپو اکسیژناز نیز خاصیت ضدالتهابی خود را ایفا می‌کند. در راستای اثرات ضدالتهابی این گیاه گزارش‌های متعدد نشان داده‌اند که ترکیبات فعال این گیاه مثل جینجرول، شوگولول و کورکومین به خوبی توانایی مهار تولید پروستاگلاندین‌ها، نیتريت اکساید و حتی اینترلوکین‌های درگیر در التهاب را دارند [۱۱].

در خصوص عملکرد ویتامین D<sub>3</sub> و عصاره زنجبیل در مهار بیماری‌ها مکانیسم‌های متعددی را مطرح می‌کنند. این احتمال وجود دارد که ویتامین D<sub>3</sub> و عصاره زنجبیل از طریق جلوگیری از ارتشاح سلولی بتوانند موجب مهار بیماری گردند [۷، ۱۲]. بر این اساس در مطالعه حاضر اثر ویتامین D<sub>3</sub> و عصاره زنجبیل بر میزان ارتشاح لکوسیتی و شدت علائم بالینی در مغز و نخاع موش‌های مبتلا به انسفالومیلیت خود ایمن تجربی (EAE) به عنوان مدل حیوانی مولتیپل اسکلروزیس (MS) مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع تجربی می‌باشد. جهت این تحقیق ۳۰ سر موش نر خالص (inbred) نژاد C57BL/6 با محدوده سنی ۶ تا ۸ هفته از مؤسسه سرم‌سازی رازی تهیه شد. در طول تحقیق این حیوانات به مدت ۱۲ ساعت در تاریکی و ۱۲ ساعت در روشنایی قرار گرفتند ( زمان روشنایی ۷ صبح تا ۷ شب). موش‌ها دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند همچنین، در طی تحقیق سعی شد تا دما در

بیماری)، یک (اختلال در حرکت دم)، دو (فلج شدن دم)، سه (فلجی یک پا)، چهارم (فلجی هر دو پا)، پنج (فلجی کامل دستوپا) تا شش (مرگ) درجه بندی شد [۱۵].

جهت بررسی تأثیر ویتامین D<sub>3</sub> و عصاره زنجبیل، ۳۰ سرموش در ۵ گروه (در هر گروه ۶ سر) با شرایط سنی و وزنی یکسان به طور تصادفی تقسیم بندی شدند و تا ۳۰ روز پس از القاء EAE تحت درمان با ویتامین D<sub>3</sub> قرار گرفتند. یک گروه از موش های مورد مطالعه موش های مبتلا به EAE تحت درمان با ویتامین D<sub>3</sub> بودند که به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن، ۲۰۰ نانوگرم ویتامین D<sub>3</sub> در روغن زیتون (حامل ویتامین D<sub>3</sub>) هر دو روز در میان به صورت داخل صفاقی دریافت کردند [۱۶]. گروه کنترل ویتامین D<sub>3</sub>، موش های مبتلا به EAE بودند که به هر موش ۰/۰۲ میلی لیتر روغن زیتون هر دو روز در میان به صورت داخل صفاقی تزریق شد.

همچنین یک گروه از موش های مبتلا به EAE تحت درمان با عصاره هیدرو الکلی زنجبیل بودند، که هر کدام به میزان ۳۰۰ mg/kg هر یک روز در میان به صورت داخل صفاقی عصاره دریافت کردند. گروه شاهد زنجبیل، موش های مبتلا به EAE بودند که به هر موش ۱۰۰ میکرو لیتر PBS هر یک روز در میان به صورت داخل صفاقی تزریق شد. در ضمن ۶ سر موش که از نظر جنس، نژاد، سن و وزن با ۴ گروه مذکور مشابه بودند بعنوان موش های سالم غیر بیمار در نظر گرفته شد که تنها PBS دریافت کردند. انتخاب دوز تزریقی عصاره زنجبیل بر اساس مطالعه ای مشابهی بود که از این عصاره جهت درمان بیماری ها در مدل های حیوانی استفاده شده است [۱۷].

پس از گذشت ۳۰ روز از زمان ایجاد EAE، ساقه مغز و نخاع (در سطح مهره های T9-T11) حیوانات (۵ سر از هر

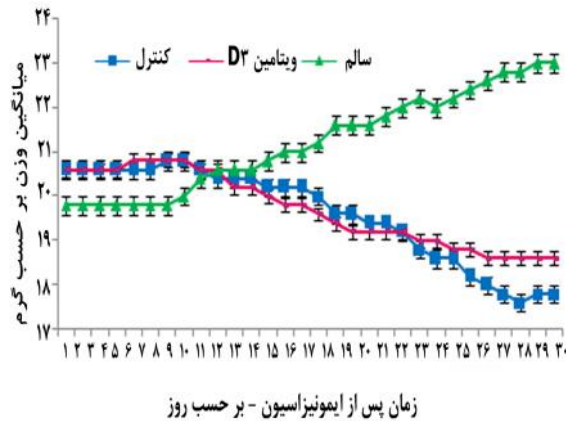
گروه) خارج و در محلول فرمالین بافر خنثی ۱۰٪ قرار گرفت [۱۸]. نمونه ها ۴۸ ساعت پس از تثبیت در محلول فرمالین، جهت پاساژ بافتی در داخل دستگاه آماده سازی بافت (Tissue prosessor مدل Citadel1000) قرار گرفتند. پس از پاساژ بلوک های پارافینی تهیه شد. نمونه های بافتی داخل بلوک قرار گرفتند. سپس با استفاده از میکروتوم (مدل Leitz 1215، ساخت کشور آمریکا) از نمونه ها، برش های ۸ میکرونی در جهت طولی تهیه گردی، برش ها به صورت سریالی (serial section) از ابتدا، وسط و انتهای نمونه تهیه گردید. اما جهت مطالعه و رنگ آمیزی به صورت یک در میان از مجموع لام ها ۱۲ برش برای هر نمونه (ساقه مغز یا نخاع) انتخاب شد. بنابراین در هر گروه مجموعاً ۶۰ برش از ساقه مغز و ۶۰ برش نخاع با روش هماتوکسیلین - ائوزین (H&E) رنگ آمیزی گردید، سپس نمونه ها از نظر تعداد محل های ارتشاح و شدت ارتشاح لکوسیته با استفاده از میکروسکوپ OLYMPUS BX51 (ساخت کشور ژاپن) مورد بررسی قرار گرفتند [۱۹].

اطلاعات پس از جمع آوری وارد نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ و نرم افزار Excel نسخه ۲۰۱۰ شد. در تجزیه و تحلیل داده ها از آزمون های توصیفی برای ویژگی های کلی جمعیت مورد بررسی و آزمون t زوجی برای مقایسه میانگین وزن، شدت بیماری و تعداد سلول های ارتشاحی در گروه های تحت درمان و کنترل استفاده شد. سطح معنی داری در آزمون ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

### نتایج

با بررسی روند بیماری در هر گروه و مقایسه روز شروع بیماری و شدت بیماری، مشخص شد که بین روز شروع بیماری در گروه های EAE درمان نشده (کنترل) و درمان

درمان با ویتامین D<sub>3</sub> نیز کاهش وزن کمتری در مقایسه با گروه کنترل در روزهای ۳۰-۲۶ داشتند، اما اختلاف وزن دو گروه از نظر آماری معنی دار نبود (p=۰/۹۸۸) (نمودار ۲).



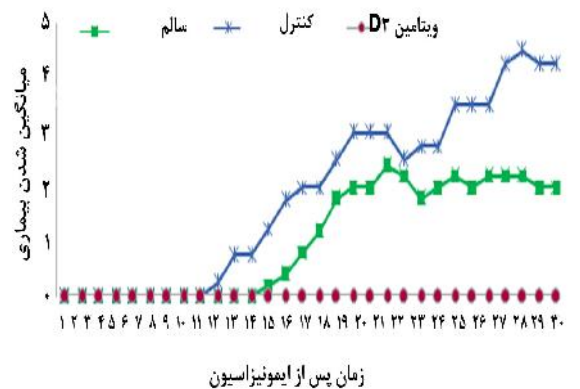
نمودار ۲- مقایسه میانگین تغییرات وزن در موش‌های مبتلا به EAE درمان نشده (کنترل) و موش‌های مبتلا به EAE تحت درمان با ویتامین D<sub>3</sub> و موش‌های سالم

با بررسی روند بیماری در هر گروه و مقایسه روز شروع بیماری و شدت بیماری، مشخص شد بین روز شروع بیماری در گروه‌های درمان نشده (کنترل) و درمان شده (با عصاره زنجبیل) تفاوت چشمگیری دیده می‌شود. روز شروع بیماری در موش‌های مبتلا به EAE درمان نشده (کنترل)، ۱۰ روز پس از زمان ایجاد EAE در حالی که در موش‌های تحت درمان با عصاره زنجبیل زمان شروع علائم ۱۵ روز پس از القاء EAE بوده است (نمودار ۳).

با مقایسه میانگین حداکثر شدت بیماری در گروه‌های مختلف، مشخص شد که میانگین حداکثر شدت بیماری در موش‌های تحت درمان با عصاره زنجبیل (۰/۷۳ ± ۰/۸۱) در مقایسه با موش‌های مبتلا به EAE درمان نشده (گروه کنترل) (۱/۹۲ ± ۱/۷۹) کمتر می‌باشد و این اختلاف از نظر آماری معنی دار بود (p < ۰/۰۰۱) (نمودار ۳).

شده (ویتامین D<sub>3</sub>) تفاوت چشمگیری دیده می‌شود. زمان شروع بیماری در موش‌های مبتلا به EAE درمان نشده (کنترل)، ۱۰ روز پس از زمان ایمونیزاسیون با پپتید MOG، در حالی که در موش‌های تحت درمان با ویتامین D<sub>3</sub> زمان شروع علائم ۱۳ روز پس از ایمونیزاسیون با پپتید MOG بود.

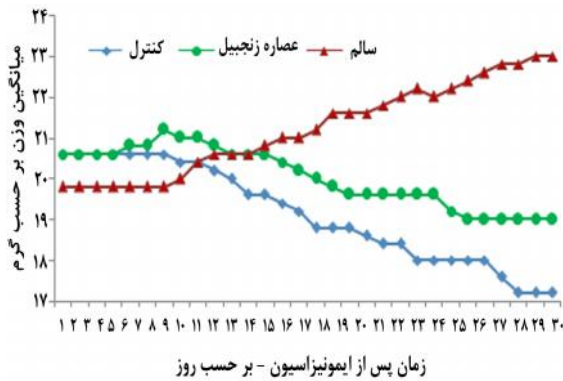
با مقایسه میانگین حداکثر شدت بیماری در گروه‌های مختلف، مشخص شد که میانگین حداکثر شدت بیماری در موش‌های تحت درمان با ویتامین D<sub>3</sub> (۱/۰۵ ± ۱/۰۱) در مقایسه با موش‌های مبتلا به EAE درمان نشده (کنترل) (۱/۸۷ ± ۱/۶۱) کمتر می‌باشد (p < ۰/۰۰۱) (نمودار ۱).



نمودار ۱- مقایسه میانگین شدت بیماری در روزهای مختلف پس از ایمونیزاسیون در موش‌های مبتلا به EAE درمان نشده (کنترل) و موش‌های مبتلا به EAE تحت درمان با ویتامین D<sub>3</sub> (p < ۰/۰۰۱).

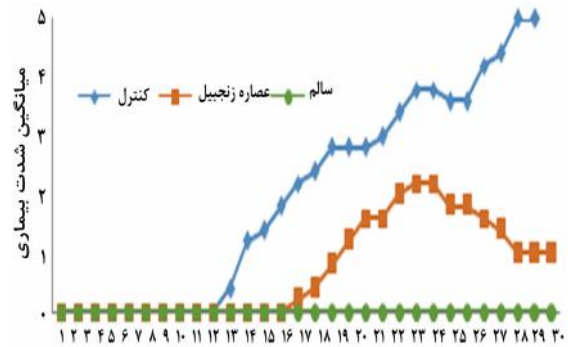
با بررسی تغییرات وزن در موش‌های مبتلا به EAE درمان نشده (کنترل) و موش‌های سالم، مشخص گردید میانگین وزن موش‌های مبتلا به EAE در مقایسه با موش‌های سالم به طور معنی داری در روزهای ۲۰-۱۷ و روزهای ۳۰-۲۱ کمتر است (به ترتیب p=۰/۰۲ و p=۰/۰۰۱). با مقایسه میانگین تغییرات وزن در موش‌های مبتلا به EAE درمان نشده (کنترل) و موش‌های تحت درمان با ویتامین D<sub>3</sub> مشخص گردید که موش‌های تحت

اما اختلاف وزن دو گروه از نظر آماری معنی‌دار نبود ( $p=0/932$ ) (نمودار ۴).



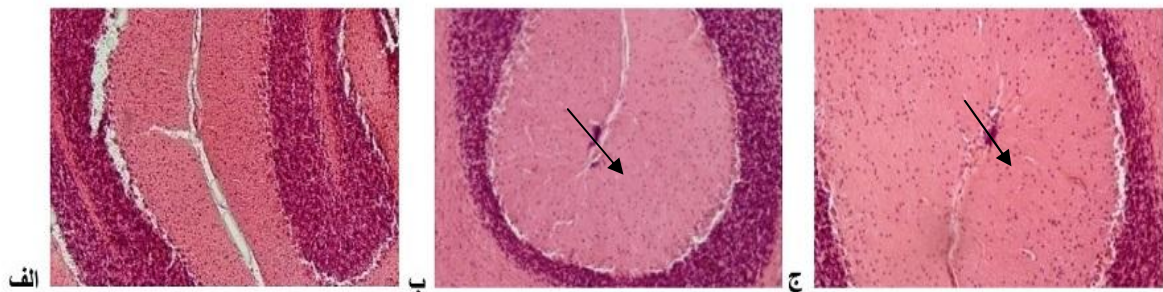
نمودار ۴- مقایسه میانگین تغییرات وزن در موش‌های مبتلا به EAE درمان نشده (کنترل) و موش‌های مبتلا به EAE تحت درمان با عصاره زنجبیل و موش‌های سالم

بررسی برش‌های مغزی در موش‌های C57BL/6 از نظر میزان ارتشاح لکوسیتی نشان داد میانگین تعداد مناطق ارتشاح سلولی در مغز موش‌های مبتلا به EAE درمان شده با ویتامین D<sub>3</sub> در مقایسه با گروه درمان نشده (گروه کنترل) به طور قابل توجهی کمتر بود (شکل ۱). در مقایسه میانگین تعداد محل‌های ارتشاح در موش‌های مبتلا به EAE درمان شده با ویتامین D<sub>3</sub> ( $23/40 \pm 1/68$ ) با گروه درمان نشده ( $35/60 \pm 1/12$ ) این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود ( $p < 0/001$ ) (نمودار ۵).



نمودار ۳- مقایسه میانگین شدت بیماری در روزهای مختلف پس از ایمونیزاسیون در موش‌های مبتلا به EAE درمان نشده (کنترل) و موش‌های مبتلا به EAE تحت درمان با عصاره هیدرولیک زنجبیل ( $p < 0/001$ ).

با بررسی تغییرات وزن در موش‌های مبتلا به EAE درمان نشده (کنترل) و موش‌های سالم، مشخص گردید میانگین وزن موش‌های مبتلا به EAE در مقایسه با موش‌های سالم به طور معنی‌داری در روزهای ۱۷-۲۰ و روزهای ۲۱-۳۰ کمتر است (به ترتیب  $p < 0/001$  و  $p < 0/001$ ). همچنین، با مقایسه میانگین تغییرات وزن در موش‌های مبتلا به EAE درمان نشده (کنترل) و موش‌های تحت درمان با عصاره زنجبیل مشخص گردید موش‌های تحت درمان با عصاره زنجبیل نیز کاهش وزن کمتری در مقایسه با گروه کنترل در روزهای ۲۶-۳۰ داشتند،

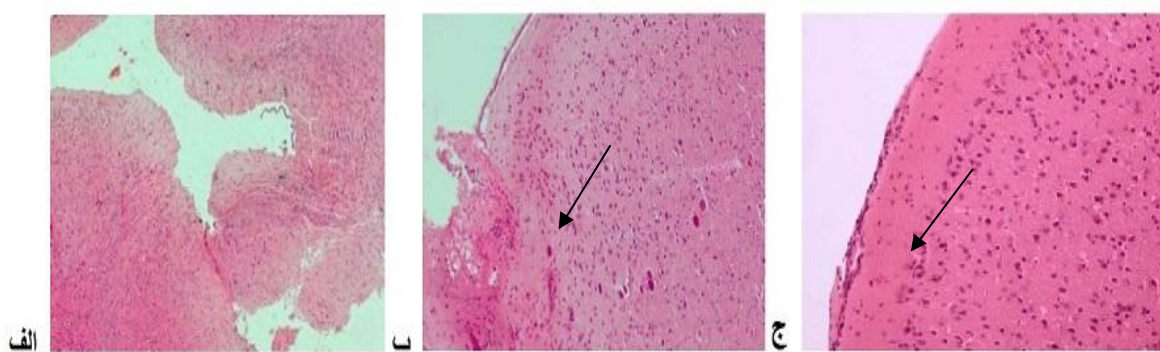


شکل ۱- مقایسه ارتشاح سلولی در بافت نرم شامه مغز موش‌های سالم (الف) و موش‌های مبتلا به EAE درمان نشده (ب) و درمان شده با ویتامین D<sub>3</sub> (ج). برش‌ها با قطر ۸ میکرون از مغز تهیه گردید و با روش هماتوکسیلین-ئوزین رنگ آمیزی و با بزرگنمایی (۴۰×۴۰) بررسی شد.

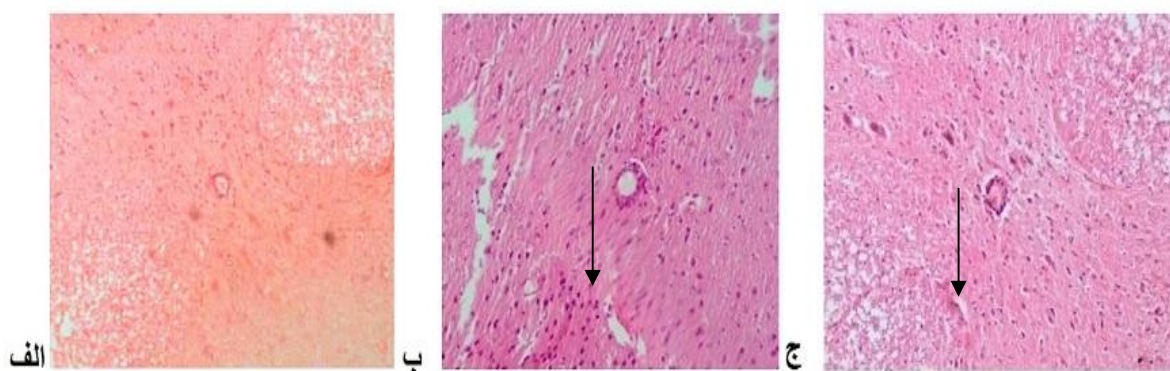


قابل توجهی کمتر بود (شکل‌های ۲ و ۳). در مقایسه میانگین تعداد محل‌های ارتشاح در موش‌های مبتلا به EAE درمان شده با عصاره هیدرو الکلی زنجبیل (۲۲/۸۰±۱/۹۲) با گروه درمان نشده (۳۵/۸۰±۱/۳۰) این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار (p<۰/۰۰۱) بود (نمودار ۵).

همچنین، در این مطالعه بررسی برش‌های مغزی- نخاعی در موش‌های C57BL/6 از نظر میزان ارتشاح لکوسیتی نشان داد، که میانگین تعداد مکان‌های ارتشاح سلولی در مغز و نخاع موش‌های مبتلا EAE درمان شده با عصاره زنجبیل در مقایسه با گروه درمان نشده (کنترل) به طور

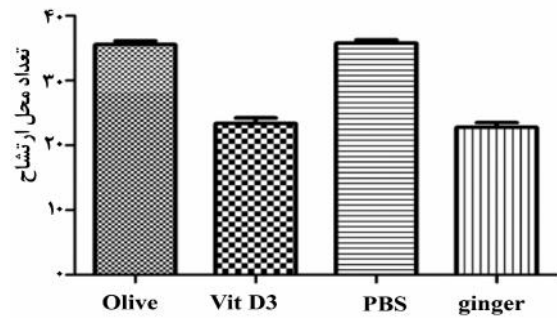


شکل ۲- مقایسه ارتشاح سلولی در مغز موش‌های سالم (الف) و موش‌های مبتلا به EAE درمان نشده (ب) و درمان شده با ویتامین D<sub>3</sub> (ج). برش‌ها با قطر ۸ میکرون از مغز تهیه گردید و با روش هماتوکسیلین-انوزین رنگ‌آمیزی و با بزرگنمایی (۴۰×۴۰) بررسی شد.



شکل ۳- مقایسه ارتشاح سلولی در نخاع موش‌های سالم (الف) و موش‌های مبتلا به EAE درمان نشده (ب) و درمان شده با ویتامین D<sub>3</sub> (ج). برش‌ها با قطر ۸ میکرون از نخاع تهیه گردید و با روش هماتوکسیلین-انوزین رنگ‌آمیزی و با بزرگنمایی (۴۰×۴۰) بررسی شد.





نمودار ۵- میزان ارتشاح در گروه‌های تحت درمان با ویتامین D<sub>3</sub> و عصاره زنجبیل

### بحث

EAE (مدل حیوانی MS) یک بیماری مختص به عضو می باشد که سیستم عصبی مرکزی را درگیر می کند و از دسته بیماری های التهابی است که با ارتشاح لکوسیتهی به بافت مغز و نخاع همراه است. سلول های ارتشاح یافته به بافت مغز و نخاع موجب ایجاد واکنش های التهابی در این بافت ها شده و سبب تخریب میلین می شوند و شدت ضایعات به میزان ارتشاح سلولی بستگی دارد [۲۰].

نتایج این تحقیق نشان داد که تجویز عصاره زنجبیل و ویتامین D<sub>3</sub> به موش های مبتلا به EAE با کاهش در شدت علائم بالینی بیماری و تاخیر مرحله شروع یا حمله بیماری در مقایسه با گروه کنترل همراه می باشد. بررسی برش های مغزی- نخاعی نیز نشان داد تعداد مناطق ارتشاح در مغز و نخاع موش هایی که تحت درمان با عصاره زنجبیل و ویتامین D<sub>3</sub> قرار داشتند به طور چشمگیری در مقایسه با گروه درمان نشده کمتر می باشد. این نتایج حاکی از این مطلب می باشد که بین شدت بیماری و میزان ارتشاح سلولی ارتباط وجود دارد. علت کاهش ارتشاح سلولی به مغز موش های مبتلا به EAE که تحت درمان با عصاره زنجبیل و ویتامین D<sub>3</sub> بودند، آشکار نیست.

مطالعات نشان می دهد که عصاره زنجبیل و ویتامین D<sub>3</sub> در تعدیل پاسخ های ایمنی نقش دارد [۲۱-۲۲]. در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس و EAE با افزایش نفوذپذیری سد خونی- مغزی، امکان ارتشاح لکوسیته ها به مغز و نخاع افزایش می یابد. برخی گزارش ها نشان از کاهش سطح فسفولیپیدها و اسیدهای چرب غیراشباع در بیماران مبتلا به این بیماری دارد [۲]. مطالعات نشان می دهد که در پاتوژنز بیماری MS، ایمنی سلولی به ویژه پاسخ های Th1 نقش اساسی را دارا می باشد [۲۳].

استفاده از ویتامین D<sub>3</sub> به عنوان یک عامل تعدیل کننده سیستم ایمنی در درمان بیماری MS، مورد توجه محققین قرار گرفته است. مطالعات نشان می دهند که ویتامین D<sub>3</sub> در کاهش شدت بیماری های خود ایمن از جمله MS مؤثر می باشد، ولی هنوز در خصوص چگونگی تأثیر ویتامین D<sub>3</sub> بر مهار بیماری، اطلاعات روشنی در دسترس نیست. گزارش شده است ویتامین D<sub>3</sub> از طریق مهار پاسخ های Th1 و کاهش تولید IL-2 و IFN- $\gamma$  باعث مهار بیماری می گردد [۲۴]. این ویتامین همچنین می تواند با افزایش تولید IL-10 از سلول های TCD4<sup>+</sup>، در مهار بیماری EAE مؤثر باشد [۲۵]. این گونه می توان احتمال داد که یکی از دلایل کاهش ارتشاح سلولی به مغز و نخاع در موش های تحت درمان با ویتامین D<sub>3</sub> ممکن است ناشی از افزایش آپوپتوز سلول های ارتشاح یافته به مغز و نخاع باشد. همچنین به افزایش تولید سایتوکاین تعدیل کننده پاسخ ایمنی (IL-10)، کاهش تولید سایتوکاین های پیش التهابی (IL-2 و IFN- $\gamma$ ) در تأخیر و کاهش علائم بالینی می توان اشاره کرد.

طریق از ارتشاح سلول‌های التهابی به بافت مغز و نخاع جلوگیری کرده و حذف میلین کمتر رخ می‌دهد. لازم به ذکر است انجام این پژوهش با محدودیت‌هایی همراه نبوده است.

### نتیجه‌گیری

این‌گونه می‌توان احتمال داد که عصاره هیدروآلکلی زنجبیل با ترمیم ضایعات ایجادشده در سد خونی مغزی، کاهش تولید سایتوکاین‌های پیش‌التهابی و کاهش تولید کموکاین‌ها و بیان گیرنده‌های آن‌ها در جلوگیری از ارتشاح لکوسیتی به مغز و نخاع نقش داشته باشد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل نتایج پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد ایمونولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان می‌باشد و به این وسیله از جناب آقای حسین خرم‌دل آزاد و سرکار خانم فاطمه رضایی کهمینی که در انجام این تحقیق ما را یاری رساندند، تشکر و قدردانی می‌شود.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تجویز عصاره هیدروآلکلی زنجبیل به موش‌های مبتلا به EAE باعث کاهش ارتشاح لکوسیتی به مغز می‌گردد. با بررسی برش‌های مغزی نیز مشخص گردید تعداد مکان‌های ارتشاح و همچنین میانگین سلول‌های ارتشاح یافته به مغز و نخاع با شدت بیماری ارتباط مستقیم دارد. گزارش‌شده است زنجبیل تکثیر سلول‌های T را در *In vitro* مهار می‌کند [۲۶]. مطالعات متعدد نیز نشان دادند که زنجبیل خاصیت ضد التهابی دارد و نقش مهمی در سرکوب واسطه‌های التهابی ایفا می‌کند. همچنین کموکاین‌ها و گیرنده‌های آن‌ها نیز نقش عمده‌ای در فراخوانی لکوسیت‌ها و سایر سلول‌ها به محل التهاب ایفا می‌کنند که عصاره زنجبیل می‌تواند تولید کموکاین‌ها و بیان گیرنده‌های آن‌ها را مهار می‌کند [۱۲]. و احتمالاً بدین

## References

- [1] Barnes D. MULTIPLE SCLEROSIS: current status and strategies for the future. *Brain* 2002; 125(8): 1923-1924.
- [2] Hemmer B. Multiple sclerosis—a coordinated immune attack across the blood brain barrier. *Current Neurovascular Res* 2004; 1(2): 141-50.
- [3] Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis—the plaque and its pathogenesis. *New England J Med* 2006; 354(9): 942-55.
- [4] Henderson AP. Multiple sclerosis: distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. *Ann Neurol* 2009; 66(6): 739-53.
- [5] Kreutz M. 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> production and vitamin D<sub>3</sub> receptor expression are developmentally regulated during differentiation of human monocytes into macrophages. *Blood* 1993; 82(4): 1300-07.
- [6] Simpson S. Higher 25 hydroxyvitamin D is associated with lower relapse risk in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2010; 68(2): 193-203.

- [7] Gill D, Tan PH. Induction of pathogenic cytotoxic T lymphocyte tolerance by dendritic cells: a novel therapeutic target. *Expert Opinion Therapeutic Targets* 2010; 14(8): 797-824.
- [8] Gauzzi MC. Suppressive effect of 1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D3 on type I IFN-mediated monocyte differentiation into dendritic cells: impairment of functional activities and chemotaxis. *J Immunol* 2005; 174(1): 270-6.
- [9] Ahui MLB. Ginger prevents Th2-mediated immune responses in a mouse model of airway inflammation. *International Immunopharmacol* 2008; 8(12): 1626-32.
- [10] Barceloux DG. Medical toxicology of natural substances: foods, fungi, medicinal herbs, plants, and venomous animals. John Wiley & Sons. 2008.
- [11] Pongrojapaw DC, Somprasit A, Chanthasenanont. A randomized comparison of ginger and dimenhydrinate in the treatment of nausea and vomiting in pregnancy. *J Med Assoc Thailand*, 2007; 90(9): 1703.
- [12] Phan PV. Ginger extract components suppress induction of chemokine expression in human synoviocytes. *J Alternative & Complementary Med* 2005; 11(1): 149-54.
- [13] Ajith, T., V. Nivitha, and S. Usha, < i> Zingiber officinale</i> Roscoe alone and in combination with  $\alpha$ -tocopherol protect the kidney against cisplatin-induced acute renal failure. *Food and chemical toxicology* 2007; 45(6):. 921-927.
- [14] Skundric DS. Distinct immune regulation of the response to H-2< sup> b</sup> restricted epitope of MOG causes relapsing–remitting EAE in H-2< sup> b/s</sup> mice. *J Neuroimmunol* 2003; 136(1): 34-45.
- [15] Fleming KK. Statistical analysis of data from studies on experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunology* 2005; 170(1): 71-84.
- [16] Guna Sherlin D, Verma R. Vitamin D ameliorates fluoride-induced embryotoxicity in pregnant rats. *Neurotoxicol Teratol* 2001; 23(2): 197-201.
- [17] Aeschbach R. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxy-tyrosol. *Food Chem Toxicol* 1994;32(1): 31-6.
- [18] Eltayeb S. Chemokine receptor expression and function in experimental autoimmune neuroinflammation. 2007: Institutionen für medicin/Department of Medicine.
- [19] Kota N P, Krishna K, Polasa. Alterations in antioxidant status of rats following intake of ginger through diet. *Food Chem* 2008; 106(3): 991-6.
- [20] Lemire J.1, 25-Dihydroxyvitamin D3–a hormone with immunomodulatory properties. *Zeitschrift für Rheumatologie* 2000; 59(1): 124-7.
- [21] El-Abhar HS, Hammad LN, Gawad HSA, Modulating effect of ginger extract on rats with ulcerative colitis. *J Ethnopharmacol* 2008;. 118(3): 367-72.
- [22] Kamen DL, Tangpricha V. Vitamin D and molecular actions on the immune system: modulation of innate

- and autoimmunity. *J Molecular Med* 2010; 88(5): 441-50.
- [23] Fox EJ. Immunopathology of multiple sclerosis. *Neurol* 2004; 63(12 suppl 6): S3-S7.
- [24] Mattner F. Inhibition of Th1 development and treatment of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis by a non hypercalcemic analogue of 1, 25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Euro J Immunol* 2000; 30(2): 498-508.
- [25] Boonstra A. 1 $\alpha$ , 25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> has a direct effect on naive CD4+ T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol* 2001; 167(9): 4974-80.
- [26] ZhouH.,Deng Y M, Xie QM.The modulatory effects of the volatile oil of ginger on the cellular immune response in vitro and in vivo in mice. *J Ethnopharmacol* 2006; 105(1):. 301-5.

## Evaluation of the Effect of Vitamin D<sub>3</sub> and Ginger Extract on the Clinical Symptoms and the Severity of Inflammation in EAE

A. Jafarzadeh<sup>1</sup>, M. Mohammadi kordkheyl<sup>2</sup>, R. Ahangar-Parvin<sup>3</sup>, S.V. Azizi, F. Ayobi<sup>4</sup>, Z. Taghipour<sup>5</sup>, A. Shamsizadeh<sup>6</sup>, R. Goujani<sup>7</sup>, M. Nemati<sup>8</sup>, M. Moazeni<sup>9</sup>

Received: 12/03/2014 Sent for Revision: 09/07/2014 Received Revised Manuscript: 02/09/2014 Accepted: 14/09/2014

**Background and Objective:** The anti-inflammatory effects of the vitamin D and ginger have been demonstrated in some studies. The aim of this study was to evaluate the effects of vitamin D and ginger extract on the clinical symptoms and leukocyte infiltration of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).

**Materials and Methods:** For the induction of EAE, the (C57BL/6) were immunized subcutaneously MOG peptide emulsified in complete Freund's adjuvant. The mice divided into EAE group including: vitamin D-treated, ginger extract-treated, olive oil and phosphate-buffered saline, and also one group which was considered as normal group and received only PBS(phosphat- Buffered Saline). The mice were sacrificed at day 31 after immunization and the leukocytes infiltration was evaluated in the CNS (central nervous system). The EAE scores and the body weight were evaluated till day 30. Data were analyzed using *t*-test.

**Results:** Two control groups showed the clinical symptoms at day 10, whereas vitamin D and ginger-treated groups exhibited the symptoms at days 13 and 15, respectively. The maximum mean score of disease was (1.87±1.61), (1.92±1.79), (1.05±1.01), and (0.73±0.81) for olive oil-, PBS-, vitamin D<sub>3</sub>-, and ginger-treated groups, respectively. Vitamin D<sub>3</sub> and ginger extract increased the body weight significantly (P =0.05) as compared to control groups. The leukocytes infiltration was also significantly lower in treated groups as compared to control group.

**Conclusion:** These observations represent that the vitamin D<sub>3</sub> and ginger extract have significant capability to attenuate the EAE severity.

**Key words:** EAE, Vitamin D<sub>3</sub>, Ginger extract, Clinical symptoms

**Funding:** This research was funded by both Kerman University of Medical Sciences and Rafsanjan University of Medical Sciences.

**Conflict of interest:** None declared.

**Ethical approval:** The Ethics Committee of Rafsanjan University of Medical Sciences approved the study

**How to cite this article:** Mohammadi M, Ahangar-Parvin R, Azizi SV, Ayobi F, Taghipour Z, Shamsizadeh A, Moazeni M, Goujani R, Nemati M, Jafarzadeh A. Evaluation of the Effect of Vitamin D<sub>3</sub> and Ginger Extract on the Clinical Symptoms and the Severity of Inflammation in EAE. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2014; 13(7): 683-94. [Farsi]

1- Prof., of Immunology, Dept. of Microbiology and Immunology, School of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, and Dept. of Immunology, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

Corresponding Author, Tel: (034) 34255211, Fax: (034) 34255209, E-mail: jafarzadeh14@yahoo.com

2- MSc Student of Immunology, Dept. of Immunology, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

3- MSc Student of Immunology, Dept. of Microbiology and Immunology, School of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

4- PhD Student, Dept. of Physiology, School of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

5- Associate Prof., of Histology, Dept. of Anatomy, School of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

6- Associate Prof., Dept. of Physiology, School of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

7- MSc of Epidemiology, Dept. of Epidemiology, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

8- Laboratory Technician of Immunology, Dept. of Immunology, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

9- Prof., Dept. of Immunology, School of Medicine, Tarbiat Modares of Medical Sciences, Tehran, Iran