مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۳، آبان ۱۳۹۳، ۶۹۴-۶۸۳

بررسی تأثیر ویتامین D_3 و عصاره زنجبیل بر علایم بالینی و شدت التهاب در بیماری آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی

عبدالله جعفرزاده[۱]، مرضیه محمدی کرد خیلی[۲]، ریحانه آهنگر پروین[۳]، سید وهاب عزیزی[۲]، فاطمه ایوبی[۴]، زهرا تقی‌پور[۵]، علی شمسی‌زاده[۶]، رضا گوجانی[۷]، مریم نعمتی[۸]، محمد مؤذنی[۹]

دریافت مقاله: ۹۲/۱۲/۲۱ 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_3 و زنجبیل می‌باشد. هدف این مطالعه بررسی اثر ویتامین D_3 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 ۵۵-۳۵ MOG مخلوط شده با ادجوانت کامل فروند صورت گرفت. گروه‌های مبتلا به EAE شامل دریافت کننده‌های ویتامین D_3، 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 ۱۰روز پس از القاء نشان دادند. این علایم در گروه دریافت کننده ویتامین D_3، و عصاره زنجبیل در روز ۱۳ و ۱۵، پس از القاء EAE دیده شد. میانگین حداکثر شدت بیماری در گروه کنترل ویتامین D_3(۱/۶۱±۱/۸۷)، گروه کنترل زنجبیل(۱/۷۹±۱/۹۲)، گروه ویتامین D_3 (۱/۰۱±۱/۰۵) و در گروه زنجبیل (۰/۸۱ ±۰/۷۳) می‌باشد. ویتامین D_3 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_3 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_3، عصاره زنجبیل، علایم بالینی

۱ـ (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: ۳۴۲۵۵۲۱۱-۰۳۴، دورنگار: ۳۴۲۵۵۲۰۹-۰۳۴، 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
۴ـ دانشجوی دکترای فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران
۵ـ 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
۹ـ استاد ایمونولوژی، گروه ایمونولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

مقدمه

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_3 دقیقاً یک ویتامین نیست، زیرا در پوست و تحت اکثر شرایط قابل سنتز است. این سنتز منبع اصلی تأمین ویتامین D_3 می‌باشد. ویتامین D_3 ممکن است از طریق مواد غذایی تأمین شود، اما بخش عمده ویتامین D_3 موردنیاز 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_3 در روند متابولیسم استخوان، تنظیم تکثیر و تمایز سلولی و همچنین تنظیم پاسخ‌های ایمنی، نقش مهمی دارد. گیرنده‌های ویتامین D_3 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 دندریتیکی را دارد و سبب افزایش مقاومت این سلول در مقابل پاسخ ایمنی شدید می‌شود [۵].

نقش ویتامین D_3 بعنوان سرکوب‌کننده سیستم ایمنی، طی مطالعات حیوانی که در آن‌ها تجویز ویتامین D_3 سبب جلوگیری یا مهار چشمگیر بیماری‌های اتوایمیون شده است نیز نشان می‌دهد که ویتامین D_3 اثر بازدارنده‌ای را در آغاز و پیشرفت EAE (Experimetal Autoimmune Encephalomyelitis) دارد [۶]. مطالعات همچنین گزارش کرده‌اند ویتامین D_3 از طریق القاء آپوپتوز (مرگ برنامه ریزی‌شده سلول) در سلول‌های التهابی از پیشرفت بیماری EAE جلوگیری می‌کند. ویتامین D_3 می‌تواند بعنوان تنظیم‌کننده عوامل نسخه‌برداری عمل کند و با مهار تولید سایتوکاین‌های التهابی (IL-6 و IFN-γ) سبب کاهش شدت بیماری گردد [۷]. گزارش شده است ویتامین D_3 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 (Ginger) با نام علمی Zingiber Officinale Roscoe می‌باشدکه 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 معرفی‌شده 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 آرتریت روماتوئید، خاصیت ضدالتهابی، آنتی و آنتی‌اکسیدانی اشاره کرد. خاصیت ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی زنجبیل با

جلوگیری از سنتز سایتوکاین‌های پیش التهابی شامل IL-1 و TNF می‌باشد [۱۰-۹]. ترکیب شیمیایی روغن زنجبیل حاوی bisabolene و sesquiterpens می‌باشد که از طریق مهار مستقیم مسیر سیکلو اکسیژناز و ۵- لیپو 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، نیتریت اکساید و حتی اینترلوکین‌های درگیر در التهاب را دارند [۱۱].

در خصوص عملکرد ویتامین D_3 و عصاره زنجبیل در مهار بیماری‌ها مکانیسم‌های متعددی را مطرح می‌کنند. این احتمال وجود دارد که ویتامین D_3 و عصاره زنجبیل از طریق جلوگیری از ارتشاح سلولی بتوانند موجب مهار بیماری گردند [۱۲، ۷]. بر این اساس در مطالعه حاضر اثر ویتامین D_3 و عصاره زنجبیل بر میزان ارتشاح لکوسیتی و شدت علایم بالینی در مغز و نخاع موش‌های مبتلا به انسفالومیلیت خود ایمن تجربی(EAE) به‌عنوان 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 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 هرباریوم 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 مورداستفاده قرار گرفت [۱۳].

جهت القاء بیماری، مقدار ۳۰۰ میکروگرم پپتید MOG35-55 با توالی (M-E-V-G-W-Y-R-S-P-F-S-R-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 به‌صورت 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

بیماری)، یک (اختلال درحرکت دم)، دو (فلج شدن دم)، سه (فلجی یک‌پا)، چهارم (فلجی هر دو پا)، پنج (فلجی کامل دست‌وپا) تا شش (مرگ) درجه‌بندی شد [۱۵].

جهت بررسی تأثیر ویتامینD_3 و عصاره زنجبیل،۳۰ سرموش در ۵ گروه (در هر گروه ۶ سر) با شرایط سنی و وزنی یکسان به طور تصادفی تقسیم‌بندی شدند و تا ۳۰ روز پس از القاء EAE تحت درمان با ویتامینD_3 قرار گرفتند. یک گروه از موش‌های مورد مطالعه موش‌های مبتلا به EAE تحت درمان با ویتامین D_3 بودند که به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن، ۲۰۰ نانوگرم ویتامین D_3 در روغن زیتون (حامل ویتامین D_3) هر دو روز در میان به صورت داخل صفاقی دریافت کردند [۱۶]. گروه کنترل ویتامین D_3، موش‌های مبتلا به EAE بودند که به هر موش ۰/۰۲ میلی‌لیتر روغن زیتون هر دو روز در میان به صورت داخل صفاقی تزریق شد.

همچنین یک گروه از موش‌های مبتلا به EAE تحت درمان با عصاره هیدرو الکلی زنجبیل بودند، که هر کدام به میزان ۳۰۰mg/kg هر یک روز در میان به صورت داخل صفاقی عصاره دریافت کردند. گروه شاهد زنجبیل، موش‌های 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 موش‌های سالم غیر بیمار در نظر گرفته شد که تنها PBS دریافت کردند. انتخاب دوز تزریقی عصاره زنجبیل بر اساس مطالعه‌ی مشابهی بود که از این عصاره جهت درمان بیماری‌ها در مدل‌های حیوانی استفاده‌شده است [۱۷].

پس از گذشت ۳۰ روز از زمان ایجاد EAE، ساقه مغز و نخاع (در سطح مهره‌های 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 آماده‌سازی بافت (Tissue prossesor مدل Citadel1000) قرار گرفتند. پس از پاساژ بلوک‌های پارافینی تهیه شد. نمونه‌های بافتی داخل بلوک قرار گرفتند. سپس با استفاده از میکروتوم (مدل Leitz 1215، ساخت کشور آمریکا) از نمونه‌ها، برش‌های ۸ میکرونی در جهت طولی تهیه گردی، برش‌ها به صورت سریالی (serial section) از ابتدا، وسط و انتهای نمونه تهیه گردید. اما جهت مطالعه و رنگ‌آمیزی به صورت یک در میان از مجموع لام‌ها 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) رنگ‌آمیزی گردید، سپس نمونه‌ها ازنظر تعداد محل‌های ارتشاح و شدت ارتشاح لکوسیتی با استفاده از میکروسکوپ OLYMPUS BX51 (ساخت کشور ژاپن) مورد بررسی قرار گرفتند [۱۹].

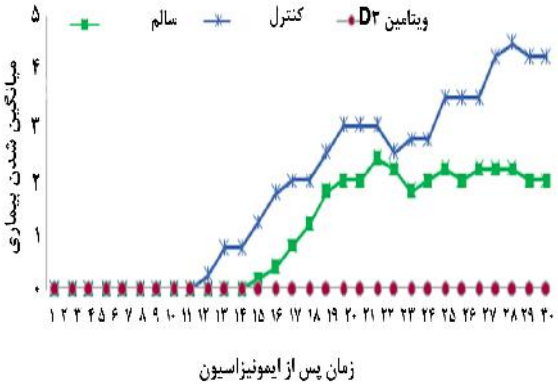
اطلاعات پس از جمع‌آوری وارد نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ و نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۱۰ شد. در تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون‌های توصیفی برای ویژگی‌های کلی جمعیت مورد بررسی و آزمون t زوجی برای مقایسه میانگین وزن، شدت بیماری و تعداد سلول‌های ارتشاحی در گروه‌های تحت درمان و کنترل استفاده شد. سطح معنی‌داری در آزمون‌ها 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 گروه‌هایEAE درمان نشده (کنترل) و درمان

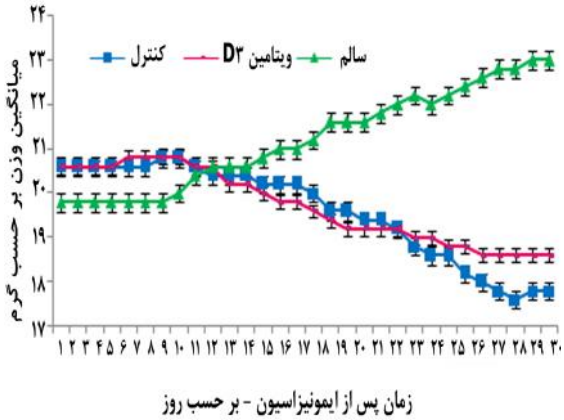
شده (ویتامین D_3) تفاوت چشمگیری دیده می‌شود. زمان شروع بیماری در موش‌های مبتلا به EAE درمان نشده (کنترل)، ۱۰ روز پس از زمان ایمونیزاسیون با پپتید MOG، درحالی‌که در موش‌های تحت درمان با ویتامین D_3 زمان شروع علایم ۱۳ روز پس از ایمونیزاسیون با پپتید MOG بود.

با مقایسه میانگین حداکثر شدت بیماری در گروه‌های مختلف، مشخص شد که میانگین حداکثر شدت بیماری در موش‌های تحت درمان با ویتامین D_3 (۱/۰۱±۱/۰۵) 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_3 (p<۰/۰۰۱).

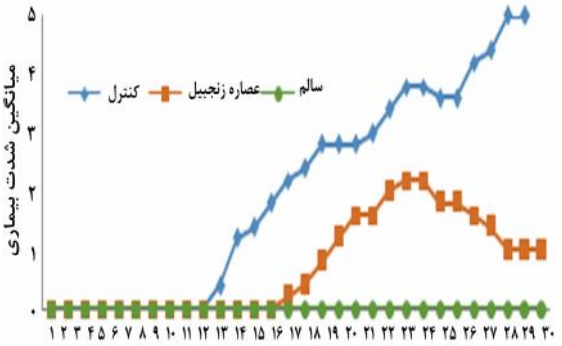
با بررسی تغییرات وزن در موش‌های مبتلا به EAE درمان نشده (کنترل) و موش‌های سالم، مشخص گردید میانگین وزن موش‌های مبتلا به EAE در مقایسه با موش‌های سالم به طور معنی‌داری در روزهای ۲۰-۱۷ و روزهای ۳۰-۲۱ کمتر است (به ترتیب p=۰/۰۲ و p=۰/۰۰۱). با مقایسه میانگین تغییرات وزن در موش‌های مبتلا به EAE درمان نشده (کنترل) و موش‌های تحت درمان با ویتامین D_3 مشخص گردید که موش‌های تحت درمان با ویتامین D_3 نیز کاهش وزن کمتری در مقایسه با گروه کنترل در روزهای ۳۰-۲۶ داشتند، اما اختلاف وزن دو گروه از نظر آماری معنی‌دار نبود (p=۰/۹۸۸) (نمودار ۲).



نمودار ۲- مقایسه میانگین تغییرات وزن در موش‌های مبتلا به EAE درمان‌نشده (کنترل) و موش‌های مبتلا به EAE تحت درمان با ویتامین D_3 و موش‌های سالم

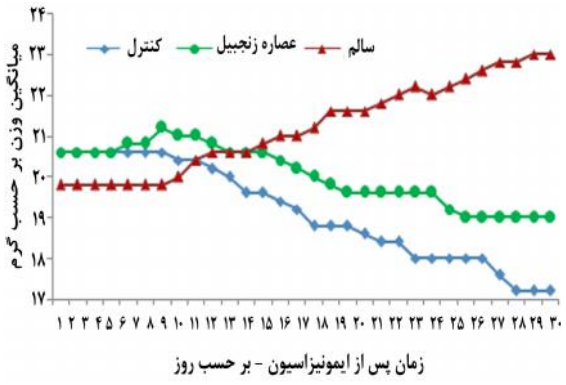
با بررسی روند بیماری در هر گروه و مقایسه روز شروع بیماری و شدت بیماری، مشخص شد بین روز شروع بیماری در گروه‌های درمان نشده (کنترل) و درمان شده (با عصاره زنجبیل) تفاوت چشمگیری دیده می‌شود. روز شروع بیماری در موش‌های مبتلا به EAE درمان‌نشده (کنترل)، ۱۰ روز پس از زمان ایجاد EAE درحالی که در موش‌های تحت درمان با عصاره زنجبیل زمان شروع علایم ۱۵روز پس از القاء EAE بوده است (نمودار۳).

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



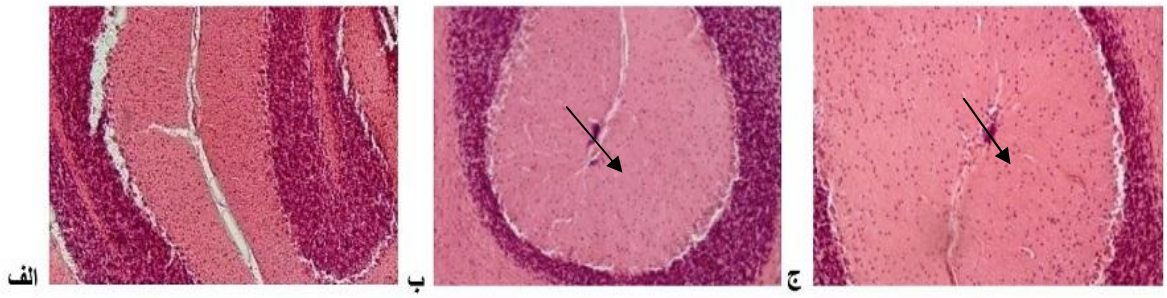
نمودار۳- مقایسه میانگین شدت بیماری در روزهای مختلف پس از ایمونیزاسیون در موش‌های مبتلا به EAE درمان نشده (کنترل) و موش‌های مبتلا به EAE تحت درمان با عصاره هیدرو الکلی زنجبیل (p<۰/۰۰۱).

با بررسی تغییرات وزن در موش‌های مبتلا به EAE درمان‌نشده (کنترل) و موش‌های سالم، مشخص گردید میانگین وزن موش‌های مبتلا به EAE در مقایسه با موش‌های سالم به طور معنی‌داری در روزهای ۲۰-۱۷ و روزهای ۳۰-۲۱ کمتر است (به ترتیب p<۰/۰۰۱ و p<۰/۰۰۱). 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 ۳۰-۲۶ داشتند، اما اختلاف وزن دو گروه از نظر آماری معنی‌دار نبود (p=۰/۹۳۲) (نمودار ۴).



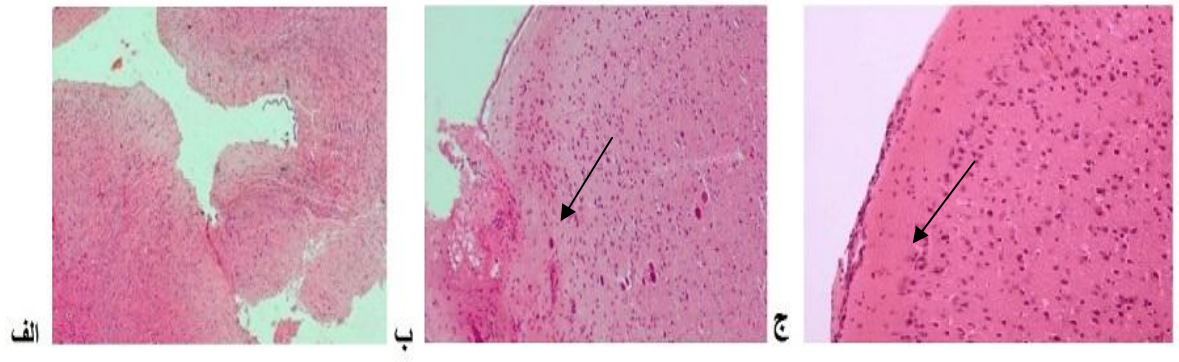
نمودار ۴- مقایسه میانگین تغییرات وزن در موش‌های مبتلا به EAE درمان نشده (کنترل) و موش‌های مبتلا به EAE تحت درمان با عصاره زنجبیل و موش‌های سالم

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_3 در مقایسه با گروه درمان نشده (گروه کنترل) به طور قابل‌توجهی کمتر بود (شکل ۱). در مقایسه میانگین تعداد محل‌های ارتشاح در موش‌های مبتلا به EAE درمان شده با ویتامین D_3 (۱/۶۸±۲۳/۴۰) با گروه درمان نشده (۱/۱۲±۳۵/۶۰) این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود (p<۰/۰۰۱) (نمودار ۵).



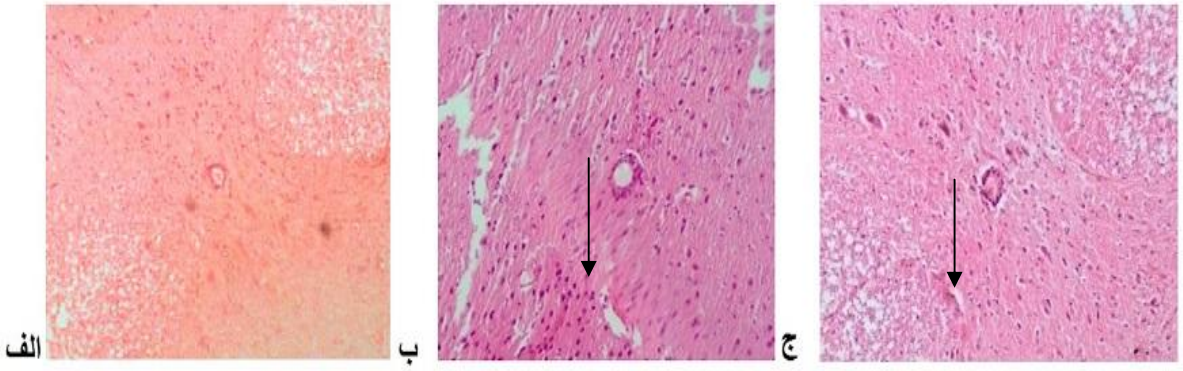
شکل ۱- مقایسه ارتشاح سلولی دربافت نرم شامه مغز موش‌های سالم (الف) و موش‌های مبتلا به EAE درمان نشده (ب) و درمان شده با ویتامین D_3 (ج). برش‌ها با قطر ۸ میکرون از مغز تهیه گردید و با روش هماتوکسیلین -ائوزین رنگ‌آمیزی و با بزرگنمایی (۴۰×۴۰) بررسی شد.

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



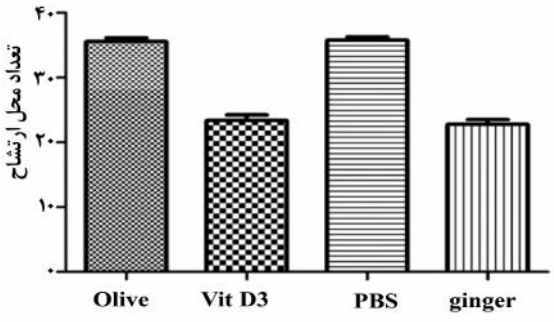
شکل ۲- مقایسه ارتشاح سلولی در مغز موش‌های سالم (الف) و موش‌های مبتلا به EAE درمان نشده (ب) و درمان شده با ویتامین D_3 (ج).

برش‌ها با قطر ۸ میکرون از مغز تهیه گردید و با روش هماتوکسیلین -ائوزین رنگ‌آمیزی و با بزرگنمایی (۴۰ × ۴۰) بررسی شد.



شکل ۳- مقایسه ارتشاح سلولی در نخاع موش‌های سالم (الف) و موش‌های مبتلا به EAE درمان‌نشده (ب) و درمان شده با ویتامین D_3 (ج).

برش‌ها با قطر ۸ میکرون از نخاع تهیه گردید و با روش هماتوکسیلین- ائوزین رنگ‌آمیزی و با بزرگنمایی (۴۰×۴۰) بررسی شد.



نمودار ۵- میزان ارتشاح در گروه‌های تحت درمان با ویتامینD_3 و عصاره زنجبیل

بحث

EAE (مدل حیوانی MS) یک بیماری مختص به عضو می‌باشد که سیستم عصبی مرکزی را درگیر می‌کند و از دسته بیماری‌های التهابی است که با ارتشاح لکوسیتی به بافت مغز و نخاع همراه است. سلول‌های ارتشاح یافته به بافت مغز و نخاع موجب ایجاد واکنش‌های التهابی در این بافت‌ها شده و سبب تخریب میلین می‌شوند و شدت ضایعات به میزان ارتشاح سلولی بستگی دارد [۲۰].

نتایج این تحقیق نشان داد که تجویز عصاره زنجبیل و ویتامین D_3 به موش‌های مبتلا به EAE با کاهش در شدت علایم بالینی بیماری و تاخیر مرحله شروع یا حمله بیماری در مقایسه با گروه کنترل همراه می باشد. بررسی برش‌های مغزی- نخاعی نیز نشان داد تعداد مناطق ارتشاح در مغز و نخاع موش‌هایی که تحت درمان با عصاره زنجبیل و ویتامین D_3 قرار داشتند به طور چشمگیری در مقایسه با گروه درمان نشده کمتر می‌باشد. این نتایج حاکی از این مطلب می‌باشد که بین شدت بیماری و میزان ارتشاح سلولی ارتباط وجود دارد. علت کاهش ارتشاح سلولی به مغز موش‌های مبتلا به EAE که تحت درمان با عصاره زنجبیل و ویتامین D_3 بودند، آشکار نیست.

مطالعات نشان می‌دهد که عصاره زنجبیل و ویتامین D_3 در تعدیل پاسخ‌های ایمنی نقش دارد [۲۲-۲۱]. در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس و EAE با افزایش نفوذپذیری سد خونی– مغزی، امکان ارتشاح لکوسیت‌ها به مغز و نخاع افزایش می‌یابد. برخی گزارش‌ها نشان از کاهش سطح فسفولیپیدها و اسیدهای چرب غیراشباع در بیماران مبتلا به این بیماری دارد[۲]. مطالعات نشان می‌دهد که در پاتوژنز بیماری MS، ایمنی سلولی به ویژه پاسخ‌های Th1 نقش اساسی را دارا می‌باشد[۲۳]. استفاده از ویتامین D_3 به عنوان یک عامل تعدیل‌کننده سیستم ایمنی در درمان بیماری MS، مورد توجه محققین قرارگرفته است. مطالعات نشان می‌دهند که ویتامین D_3 در کاهش شدت بیماری‌های خود ایمن ازجمله MS مؤثر می‌باشد، ولی هنوز در خصوص چگونگی تأثیر ویتامینD_3 بر مهار بیماری، اطلاعات روشنی در دسترس نیست. گزارش‌شده است ویتامین D_3 از طریق مهار پاسخ‌های Th1 و کاهش تولید IL-2 و IFN-γ باعث مهار بیماری می‌گردد [۲۴]. این ویتامین همچنین می‌تواند با افزایش تولید IL-10 از سلول‌های $TCD4^+$، در مهار بیماری EAE مؤثر باشد [۲۵]. این گونه می‌توان احتمال داد که یکی از دلایل کاهش ارتشاح سلولی به مغز و نخاع در موش‌های تحت درمان با ویتامین D_3 ممکن است ناشی از افزایش آپوپتوز سلول‌های ارتشاح یافته به مغز و نخاع باشد. همچنین به افزایش تولید سایتوکاین تعدیل‌کننده پاسخ ایمنی (IL-10)، کاهش تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی (IL-2 و IFN-γ) در تأخیر و کاهش علایم بالینی می‌توان اشاره کرد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تجویز عصاره هیدروالکلی 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 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 هیدروالکلی زنجبیل با ترمیم ضایعات ایجادشده در سد خونی مغزی، کاهش تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی 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.

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] FrohmanEM, 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 D3 production and vitamin D3 receptor expression are developmenta-lly 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 1α, 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] Pongrojpaw 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 α-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 för 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): I24-7.

[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 D3. *Euro J Immunol* 2000; 30(2): 498-508.

[25] Boonstra A. 1α, 25-Dihydroxyvitamin D3 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_3 and Ginger Extract on the Clinical Symptoms and the Severity of Inflammation in EAE

A. Jafarzadeh[1], M. Mohammadi kordkheyli[2], R. Ahangar-Parvin[3], S.V. Azizi, F. Ayobi[4], Z. Taghipour[5], A. Shamsizadeh[6], R. Goujani[7], M. Nemati[8], M. Moazeni[9]

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 includimg: 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 D3-, and ginger-treated groups, respectively. Vitamin D3 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_3 and ginger extract have significant capability to attenuate the EAE severity.

Key words: EAE, Vitamin D_3, 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_3 and Ginger Extract on the Clinical Symptoms and the Severity of Inflammation in EAE. *J RafsanjanUniv 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