

## بررسی تأثیر مقادیر مختلف زهر زنبور عسل بر سطح سرمی اینترلوکین ۶ در رت‌های لوئیس EAE (مدلی برای مطالعه مالتیپل اسکلروزیس)

دکتر بریچهر یغمائی<sup>۱</sup>، دکتر محمد نبیونی<sup>۲</sup>، دکتر مهدی مهدوی<sup>۳</sup>، طاهره مهرورز<sup>۴</sup>، زهرا نظری<sup>۵</sup>

۱. دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران

۲. استادیار، گروه سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران

۳. استادیار، گروه ویروس شناسی، انستیتو پاستور تهران

۴. کارشناس ارشد فیزیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران

۵. دانشجوی دکتری، گروه سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران

### چکیده

**سابقه و هدف:** مالتیپل اسکلروزیس یک بیماری خودایمنی سیستم عصبی مرکزی است. آنسفالومیلیتیس آلرژیک تجربی (EAE) مدل مناسبی برای بیماری MS می‌باشد. با توجه به اینکه در مطالعات قبلی زهر زنبور عسل (BV) توانسته است بیان فاکتور التهابی TNF $\alpha$  را کاهش دهد، در این مطالعه فرض بر این بود که زهر زنبور بتواند با کاهش سطح سرمی اینترلوکین ۶، جهت درمان MS به کار رود. **مواد و روشها:** رت‌ها با امولسیون نخاع خوکچه هندی و ادجوانت کامل فروند ایمونیزه شدند. اولین نشانه‌های بیماری ۹ روز پس از ایمونیزه شدن نشان داده شد. رت‌های مورد آزمایش به چهار گروه تقسیم شدند: گروه کنترل، گروه تجربی اول شامل رت‌های القا شده و درمان شده ۱ میلی‌گرم در هر کیلوگرم وزن بدن، گروه تجربی دوم شامل رت‌های القا شده با درمان ۲ میلی‌گرم در هر کیلوگرم وزن بدن و گروه شم. علائم کلینیکی در هر روز درمان بررسی شدند. همچنین سرم خون جهت بررسی سطح IL $_6$  به روش الایزا جمع‌آوری شد. بافت مغز حاصل از هر چهار گروه نیز جهت بررسیهای بافتی استخراج شد. جهت تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از آزمون one-way ANOVA استفاده شد.

**یافته‌ها:** نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اوتوزین نشان داد که در گروه‌های تیمار شده توسط BV میزان التهاب بافت عصبی کاهش می‌یابد. نتایج تست الایزا نیز افزایش سطح IL $_6$  در گروه شم (۲۰۱ پیکوگرم بر میلی‌لیتر) و کاهش آن در گروه‌های درمان شده (به ترتیب ۱۰۱ و ۸۰ پیکوگرم بر میلی‌لیتر برای گروه‌های درمان شده توسط ۱ و ۲ میلی‌گرم زهر زنبور) را نشان داد. **نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد که BV موجب کاهش سطح سرمی سیتوکاین IL $_6$  در مدل EAE رت می‌شود. همچنین نشان داده شد که در حیوانات تیمار شده توسط BV علائم کلینیکی بیماری کاهش می‌یابد. بنابراین توصیه می‌شود اثرات زهر زنبور در مبتلایان به MS نیز مورد بررسی قرار گیرد.

**واژگان کلیدی:** آنسفالومیلیتیس آلرژیک تجربی، مالتیپل اسکلروزیس، زهر زنبور عسل، IL $_6$

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Yaghmaei P, Nabiuni M, Mahdavi M, Mehrvarz T, Nazari Z. The effects of honey bee venom on the serum interleukin 6 level in EAE Lewis rats; a model for the study of multiple sclerosis. *Pejouhandeh* 2013;18(2):69-75.

### مقدمه

MS یک بیماری مزمن سیستم عصبی مرکزی است که با مولتی دمیالینه شدن التهابی و نقصان میلینی همراه است (۱). این بیماری معمولاً در سنین ۲۰-۴۰ سالگی فرد را گرفتار می‌کند (۲). یافته‌های اخیر نشان می‌دهد که ایجاد خودایمنی در افراد به ترکیبی از عوامل محیطی و ژنتیکی بستگی دارد (۳). MS باعث اختلال در عملکرد حسی و حرکتی، اتونومیک و درک عصبی شخص می‌گردد. سلول‌های TCD4<sup>+</sup> خودواکنشگر، نقش محوری را در پاتوژنز بیماری دارند (۴). اغلب مطالعاتی که برای شناسایی سلول‌های T اختصاصی علیه

MS یک بیماری مزمن سیستم عصبی مرکزی است که با مولتی دمیالینه شدن التهابی و نقصان میلینی همراه است (۱). این بیماری معمولاً در سنین ۲۰-۴۰ سالگی فرد را گرفتار می‌کند (۲). یافته‌های اخیر نشان می‌دهد که ایجاد خودایمنی در افراد به ترکیبی از عوامل محیطی و ژنتیکی بستگی دارد (۳). MS باعث اختلال در عملکرد حسی و حرکتی، اتونومیک و درک عصبی شخص می‌گردد. سلول‌های TCD4<sup>+</sup> خودواکنشگر، نقش محوری را در پاتوژنز بیماری دارند (۴). اغلب مطالعاتی که برای شناسایی سلول‌های T اختصاصی علیه

\*نویسنده مسؤول مکاتبات: طاهره مهرورز؛ تهران، پونک، انتهای بزرگراه اشرفی اصفهانی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، دانشکده علوم؛ تلفن: ۶۶۵۶۴۵۴-۹۱۲-۹۸+؛ پست الکترونیک: fm7377@yahoo.com

پروتئین‌ها و پپتیدهای مختلفی نظیر ملیتین، آپامین، فسفولیپاز A<sub>2</sub>، و هیالورونیداز است که یک تحریک کننده قوی سیستم دفاعی جاندار هدف می‌باشد (۱۳). این ماده با بالا بردن سطح کورتیکواستروئیدها، می‌تواند تأثیر بسزایی در درمان بیماریهای مفاصل داشته باشد. همچنین با القا ترشح کاتکول آمین‌ها از غدد فوق کلیه تأثیر ضد التهابی خود را اعمال می‌کند (۱۴). اگر چه تزریق BV در تخفیف دردهای تونیک و افزایش حساسیت به درد مؤثر است؛ ولی مدارکی نیز دال بر اثرات ضد التهابی و ضد دردی این ترکیب در واکنشهای التهابی وجود دارد.

در این مطالعه القا دمیلیناسیون به روش EAE و التهاب و تأثیرگذاری زهر زنبور عسل بر میزان سیتوکین پیش‌التهابی IL<sub>6</sub> در سرم خون مورد بررسی قرار گرفت. این تحقیق در آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی تکوینی دانشکده علوم زیستی دانشگاه خوارزمی و مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی این دانشگاه در سال تحصیلی ۹۱-۹۰ انجام گرفت.

### مواد و روشها

تحقیق حاضر به روش تجربی و جامعه مورد بررسی شامل ۴۰ سر رت ماده نژاد لوئیس تهیه شده از شرکت داروپخش به وزن  $180 \pm 20$  گرم بود. رت‌ها با نخاع خوکچه هندی (تهیه شده از مؤسسه سرم‌سازی رازی کرج)، و ادجوانت کامل فروند (Sigma F5881, CFA) که حاوی مایکوباکتریای کشته شده در امولسیون آب و روغن می‌باشد ایمونیزه شدند. در ابتدا خوکچه‌های هندی توسط کلروفورم بیهوش شدند. نخاع خارج شده در پتری دیش حاوی سالین گذاشته شد. نخاع برای ادامه کار به مدت ۱۵ دقیقه به دمای ۴۰- انتقال داده شد. غلظت مایکوباکتریوم موجود در ادجوانت‌های کامل فروند تجاری ۱ mg/ml است که آن را باید حداقل به ۴ mg/ml رساند. ادجوانت تغلیظ شده به نسبت ۱:۱ به نخاع اضافه شد و توسط هموزنایزر به مدت ۳۰ دقیقه با همدیگر مخلوط شدند. سپس این ترکیب به هر موش به صورت زیرجلدی به میزان ۰/۲ ml تزریق شد.

در مطالعات انجام گرفته از روشهای متفاوتی برای درجه‌بندی شدت بیماری در EAE استفاده شده است. در همه این روشها، درجه بیماری هر یک از گروهها در آن روز، عبارت است از میانگین شدت بیماری در تمام موشهایی که در آن گروه قرار دارند. عدم ابتلا به بیماری (۰)، اختلال در حرکت دم (۱)، فلج شدن دم (۲)، اختلال در راه رفتن (۳)، فلجی یک

MBP (myelin basic protein) و یا (proteo lipid protein) صورت گرفته‌اند، نشان‌دهنده افزایش تعداد این سلول‌ها در افراد مبتلا به MS در مقایسه با افراد سالم می‌باشند. به نظر می‌رسد که عوامل دیگری همچون ایمنی ذاتی و افزایش بیان برخی مولکول‌های کمک تحریکی و افزایش ترشح سیتوکاین‌های پیش‌التهابی در فعال شدن و افزایش تعداد این سلول‌ها مؤثر باشد (۵). در آنسفالومیلیت تجربی تأکید بر روی کاراکترهای نوروایمونولوژیکی است که با بیماری درگیر هستند که از آن جمله می‌توان سیتوکاین‌ها، کموکاین‌ها و مولکول‌های چسبنده را نام برد (۴). سیتوکاین‌ها را می‌توان به دو شکل پیش‌التهابی و التهابی تقسیم نمود. چنین استنتاج می‌شود که بیماری MS یک بیماری خودایمن با الگوی Th1 بوده و سیتوکاین‌های التهابی مربوطه، در تشدید علایم و بروز ضایعات، نقش برجسته‌ای دارند (۶). اینترلوکین ۶ (IL<sub>6</sub>) نقش مؤثری در پاتوژنز آنسفالومیلیت تجربی دارد (۷). بررسیها نشان داده‌اند که آنتی‌بادی ضد IL<sub>6</sub> در کاهش اثرات آنسفالیت آلرژیک تجربی (EAE) در موش مؤثر است. IL<sub>6</sub> سیتوکاینی دارای چندین عملکرد در سیستم دفاعی بیماریهای خودایمنی است. همچنین می‌تواند پاسخ فاز حاد کبدی را در جهت القا تولید ایمنوگلوبولین‌ها از سلول‌های B و نیز ترشح IL<sub>2</sub> که از رشد سلول‌های T حاصل می‌شود را میسر سازد. IL<sub>6</sub> توسط لنفوسیت‌ها و مونوسیت‌ها در سیستم ایمنی تولید می‌شود. مدارکی نیز دال بر نقش این سیتوکاین در مدل EAE در رت‌های لوئیس که مدل شبیه به MS است را نشان می‌دهد (۸). نقش ترانس سیگنالینگ IL<sub>6</sub> در مدل‌های حیوانی در شرایط *in vivo* در بیماریهای التهابی مانند التهاب صفاق، آرتریت روماتوئید و سرطان روده بزرگ نشان داده شده است (۹). نقش IL<sub>6</sub> در فعالیت MBP در رت‌های لوئیس القا شده EAE نشان داده شده است. در مدل فعال MBP-EAE اگرچه ترانس سیگنالینگ IL<sub>6</sub> نمی‌تواند نقش عمده‌ای در سلول‌های T داشته باشد، ولی نقش محوری و اساسی را در تولید Th17 دارد (۱۰). بسیاری از مفاهیم فعلی ما در مورد بیماری MS مربوط است به یافته‌های محققین در مدل حیوانی این بیماری که ما آن را تحت عنوان آنسفالیت آلرژیک تجربی می‌شناسیم. مدل EAE اولین بار در سال ۱۸۸۵ با واکسیناسیون خرگوش سالم با نخاع خرگوش مبتلا به هاری توسط لوئی پاستور ارائه گردید (۱۱). EAE یک مدل مناسب برای بررسی شاخصهای التهابی در بیماری MS می‌باشد که در این مدل حیوان در معرض مستقیم سلول‌های T بر علیه آنتی‌ژن‌های میلینی و القا دمیلیناسیون قرار می‌گیرد (۱۲). زهر زنبور عسل (BV) حاوی

شد. نتایج بعد از تهیه نمودار استاندارد، برای تعیین غلظت سیتوکاین در هر یک از چاهکها مورد ارزیابی قرار گرفت.

### بررسیهای بافتی

برای بررسی بافتی، مغزها پس از خارج نمودن از جمجمه برای ادامه کار و مراحل آماده‌سازی و برشهای بافتی به فالكون‌های حاوی فرمالین ۱۰٪ انتقال داده شدند. نمونه‌ها با تیغ بیسوری به برشهای ۳-۲ میلی‌متری در مقاطع مختلف تقسیم و شماره‌گذاری شدند. سپس نمونه‌ها در دستگاه T.P (tissue processor) قرار داده شدند. این دستگاه به‌ترتیب نمونه‌ها را در محلولهای فرمالین، الکل رقیق، الکل غلیظ، گزیل و پارافین مذاب غوطه‌ور می‌کند. سپس نمونه‌ها از پارافین مذاب خارج گشته و در قالبهای آلومینیومی قرار داده شدند و با پارافین قالب‌گیری گشتند. پس از آن با استفاده از دستگاه میکروتوم قالبهای پارافینی برش داده شدند که ضخامت این برشها بین ۴-۳ میکرون است. لام‌ها ابتدا در فور ۷۰-۶۰ درجه و سپس در گزیل قرار داده شدند تا بقایای پارافین خارج شود. سپس لام‌ها در الکل قرار داده شدند تا گزیل از روی لام پاک شود. به منظور رنگ‌آمیزی، لام‌ها ابتدا با رنگ هماتوکسیلین، و پس از شستشو با اتوزین رنگ شدند.

### آنالیز آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری جهت مقایسه داده‌های گروه کنترل، شم و تجربی از نرم‌افزار SPSS17 و آزمون آماری one-way ANOVA استفاده شد و مقادیر p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی شد. سپس نمودارهای مربوطه بوسیله نرم‌افزار EXCEL رسم گردید.

### یافته‌ها

#### بررسی شدت بیماری در گروههای مختلف

رت‌های لوئیس ایمونیزه شده با ترکیب نخاع کوچک هندی و ادجوانت کامل فروند در مدل EAE، التهاب و علائم اولیه کلینیکی را نشان دادند. شروع علائم بیماری در روز نهم پس از القا بود که با اختلال در حرکت دم آغاز شد. در روزهای ۱۳-۱۲ پس از القا (۳ تا ۴ روز از شروع علائم) اوج بیماری مشاهده شد که در این زمان موشها از هر دو پا فلج شدند. رت‌های مورد استفاده وزن  $170 \pm 20$  g داشتند. یکی از شاخصهای این بیماری کاهش وزن می‌باشد که توزین روزانه آنها نشان داد که وزن اکثریت موشها پس از القا نسبتاً کاهش یافت. گروه کنترل هیچیک از علائم بیماری را نشان نداد. رت‌های گروه شم نسبت به سایر گروههای تیمار در مراحل

پا (۴)، فلج هر دو پا (۵)، فلج کامل دست و پا (۶) و مرگ (۷). روز القا روز صفر در نظر گرفته می‌شود؛ سپس هر روز موشها به دقت توزین شده و علائم کلینیکی آنها ثبت می‌شود. علائم بیماری از روز نهم مشاهده شد؛ که اولین علائم با اختلال در حرکت دم و فلج شدن دم همراه است. اجازه داده شد که علائم کلینیکی در اکثریت موشها مشاهده شود؛ سپس ۳۰ سر موش در سه گروه جای داده شدند:

- گروه شم: گروهی که در آنها بیماری القا شد؛ علائم هم ظاهر شد ولی تنها سالیان دریافت کردند.

- گروه تجربی اول: گروهی که در آنها بیماری القا شد و به مدت ۱۰ روز ۰/۲ ml محلول زهر زنبور محلول در نرمال سالیان با غلظت ۱ mg/kg به صورت درون صفاقی دریافت نمودند.

- گروه تجربی دوم: گروهی که در آنها بیماری القا شد؛ پس از ظهور علائم به مدت ۱۰ روز با ۰/۴ ml زهر زنبور محلول در نرمال سالیان با غلظت ۲ mg/kg به صورت درون صفاقی تیمار شدند.

گروه کنترل: گروهی که القا نشدند و تفاوت آنها با گروه اول این است که سالیان دریافت نکردند.

تمامی گروهها به طور روزانه طی ۱۰ روز القا، توزین شده و با هم مقایسه شدند. روز القا روز صفر در نظر گرفته شد.

#### بررسی سطح IL6 در سرم خون به روش الیزا

در روز بیست و یکم پس از القا حیوانات با هیدروکلرید کتامین (۱۲۰-۱۰۰ mg/kg) و هیدروکلرید گزیلین (۲۴ mg/kg) بیهوش شده و از قلب آنها خون گرفته شد. نمونه‌های خونی گرفته شده در دستگاه سانتریفیوژ با دور ۲۵۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد تا سرم آن برای تکنیک الیزا جدا شود. از این تکنیک به منظور تعیین سطح سیتوکاین IL6 در سرم و در نتیجه تعیین شاخص برای پاسخ مسیر Th1 استفاده شد. در این مطالعه از کیت الیزا با شماره کاتالوگ DY506 برای اندازه‌گیری سطح سرمی اینترلوکین ۶ و مطابق با پروتوکول شرکت سازنده استفاده گردید. در سنجش فوق که از نوع ساندویچی آویدین بیوتین می‌باشد، آنتی‌بادی ضد IL6 کف پلیت کوت می‌شود و پس از بلاکینگ توسط BSA (Bovine Serum Albumin)، استانداردهای مربوط به کیت اضافه می‌شود؛ در مرحله بعد آنتی‌بادی بیوتینه ضد IL6 و در نهایت محلول استرپتوآویدین متصل به HRP اضافه می‌شود و پس از مراحل شستشو و افزودن سوبسترا واکنش رنگی ایجاد می‌شود. نتایج در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط نتایج در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط ELISA reader خوانده

تجربی، گروه تجربی دوم که غلظت ۲ mg/kg از BV را دریافت کرده بود، نسبت به گروه شم و گروه تجربی اول وزن بیشتری را نشان داد که نشان دهنده وابسته به دوز بودن اثر BV می‌باشد.

### بررسی‌های هیستولوژیک

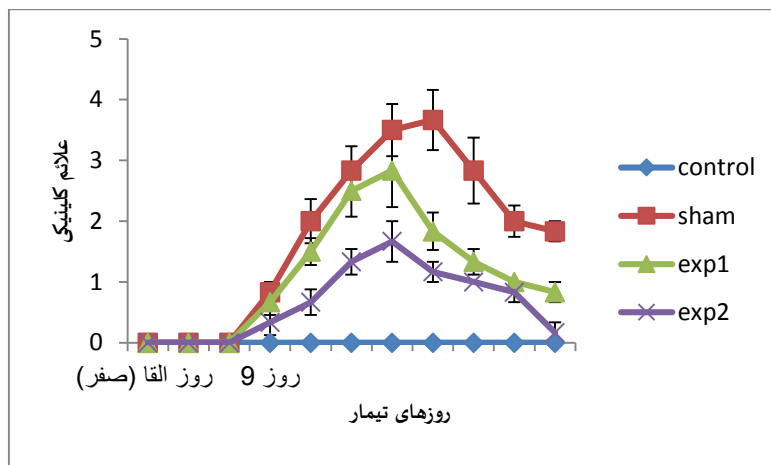
پس از آماده‌سازی بافتی و تهیه برشهای میکروسکوپی به ضخامت ۳-۴ میکرون از مغز، رنگ‌آمیزی به روش هماتوکسیلین و ائوزین انجام شد. بررسی بخش عصبی نشان داد که با القا بیماری، التهاب و دمیلینه شدن دیده می‌شود و با پیشرفت بیماری، این دمیلینه شدن بخش بیشتری را به خود اختصاص می‌دهد. این در حالی بود که فرآیند رمیلینه شدن در گروههای تحت تیمار با BV مشاهده شد (شکل ۱).

بالتری از بیماری قرار داشتند و همچنین مدت زمان بیشتری از بیماری را نشان می‌دادند. این در حالی بود که حیوانات گروه تجربی دوم در مراحل بسیار پایین بیماری باقی ماندند (نمودار ۱)

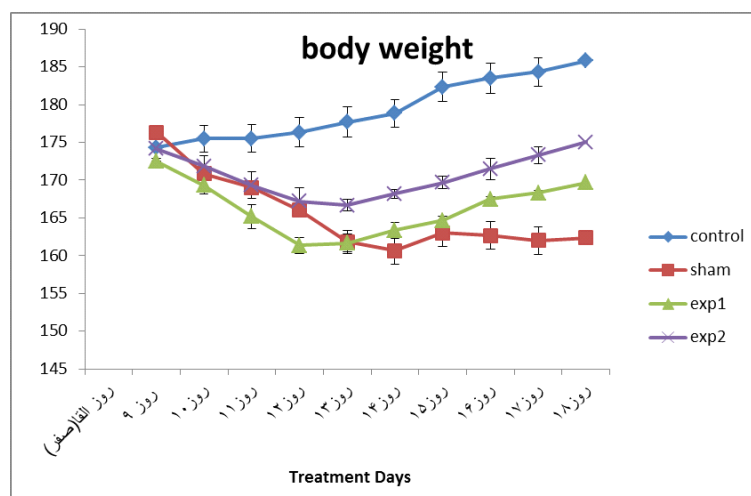
### نتایج حاصل از توزین رت‌های القا شده و درمان شده

#### با BV:

نمودار توزین رت‌ها در روزهای تیمار در نمودار ۲ نشان داده شده است. از روز نهم پس از القا رت‌ها وارد فاز بیماری شدند، گروه کنترل (گروهی که دست نخورده باقی ماندند) وزن طبیعی خود را حفظ کردند. گروه شم (که بیماری در آنها القا شد، اما تنها نرمال سالیین دریافت کردند) کمترین وزن را داشتند. در حالی که گروههای تحت تیمار با BV نسبت به گروه شم افزایش وزن را نشان دادند. در میان گروههای



نمودار ۱. نمودار شدت علائم کلینیکی برحسب روزهای پیگیری و به تفکیک گروههای مورد مطالعه شامل گروه تجربی اول (exp1، القاء و تحت درمان با ۱ mg/kg زهر زنبور)، گروه تجربی دوم (exp2، القاء و تحت درمان با ۲ mg/kg زهر زنبور)، گروه شم و گروه کنترل. گروه شم نسبت به سایر گروههای تیمار مرحله بالاتر بیماری و مدت زمان بیشتری از بیماری را نشان می‌دهد. گروه تجربی دوم نیز در مراحل بسیار پایین بیماری باقی ماند. Mean±SD

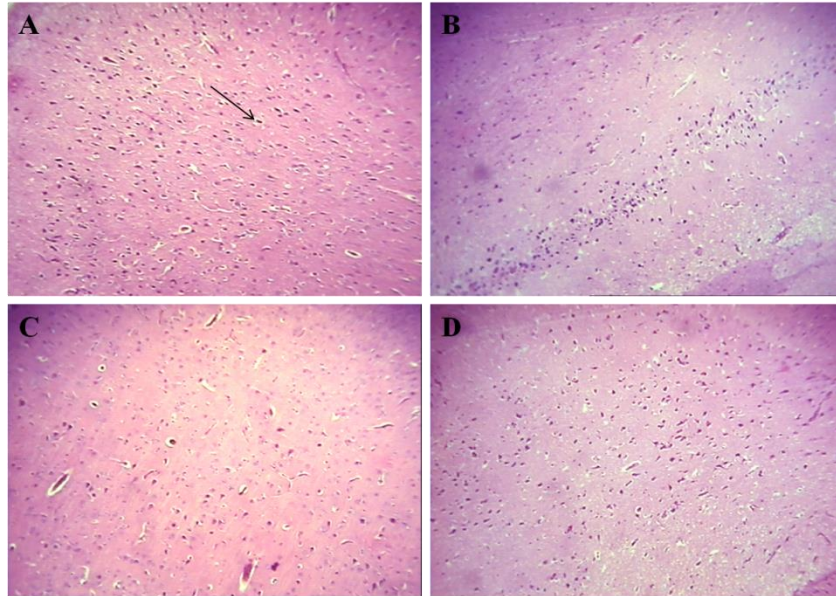


نمودار ۲. مقایسه وزن حیوانات برحسب گرم و بر اساس روزهای پیگیری به تفکیک گروههای مورد مطالعه شامل گروه کنترل، گروه تیمار شده با زهر زنبور، گروه تجربی اول (القاء و تحت درمان با ۱ mg/kg زهر زنبور)، گروه تجربی دوم (القاء و تحت درمان با ۲ mg/kg زهر زنبور). گروه شم (القاء بیماری و دریافت نرمال سالیین) کمترین وزن را داشتند، در حالیکه تیمار با زهر زنبور از کاهش وزن رت‌ها جلوگیری نمود، به طوری که گروه تجربی دوم نسبت به گروه تجربی اول و گروه شم وزن بیشتری را نشان دادند. Mean±SD

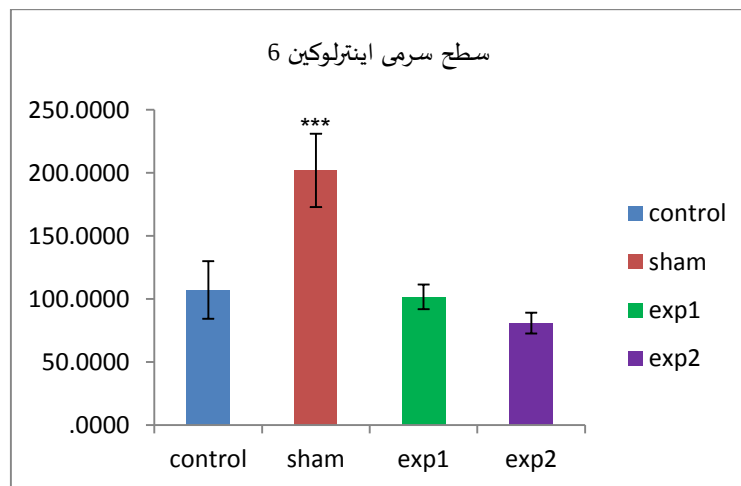
### نتایج حاصل از بررسی سطح IL<sub>6</sub> به روش الیزا

IL<sub>6</sub> در گروه تیمار دوم کاهش بیشتری را نشان می‌دهد و این نتایج نشان داد که تیمار با زهر زنبور به صورت وابسته به دوز باعث کاهش سطح این مارکر می‌شود.

بررسی مقایسه‌ای سطح سرمی سیتوکاین پیش‌التهابی IL<sub>6</sub> به روش الیزا در گروه‌های مختلف کنترل، شم و همچنین گروه‌های تیمار شده با BV در نمودار ۳ نشان داده شده است.



شکل ۱: فتو میکروگراف رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین از بافت مغز. A: گروه کنترل (بدون القا). B: گروه شم. C: گروه تیمار شده با ۱ mg/kg زهر زنبور، D: گروه تیمار شده با ۲ mg/kg زهر زنبور. پیکان بخش‌های میلینی را نشان می‌دهد. همانطور که در شکل نشان داده شده است، در گروه شم میزان میلین به شدت کاهش یافته است، در حالی که پس از تیمار با زهر زنبور میزان رملینه شدن افزایش یافته است.



نمودار ۳: مقایسه سطح سرمی اینترلوکین ۶ برحسب گروه‌های مورد مطالعه شامل گروه کنترل (بدون القا و تزریق زهر زنبور)، گروه شم (القا و تزریق سالین)، گروه تجربی اول (القا و تحت درمان با ۱ mg/kg زهر زنبور)، و گروه تجربی دوم (القا و تحت درمان با ۲ mg/kg زهر زنبور). نتایج این بررسی تفاوت معنی‌داری را با  $p < 0.001$  در مورد میزان اینترلوکین ۶ در سرم خون رت‌های گروه شم نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد، در حالی که اختلاف این مارکر مولکولی در گروه‌هایی که با زهر زنبور درمان شده‌اند نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نیست. Mean $\pm$ SD

### بحث

ظرف سالهای اخیر تحقیقات گسترده‌ای در خصوص اهمیت آنها در پاتوژنز بیماری MS انجام شده است (۱۵). در واکنش‌های التهابی، این سیتوکاین‌های پیش‌التهابی در سطح سرم افزایش می‌یابند و استفاده از ادجوانت فروند و نخاع

در این تحقیق نشان داده شد که زهر زنبور می‌تواند موجب کاهش اینترلوکین ۶ شود. سیتوکاین‌های پیش‌التهابی در تشدید علائم و بروز ضایعات در بیماری MS نقش برجسته‌ای دارند که از آن جمله می‌توان به IL<sub>6</sub> و IL<sub>17</sub> اشاره کرد که

همکاران در سال ۲۰۰۵ به بررسی سیتوکاین‌های پیش‌التهابی در رت‌های لوئیس آنفالومیلیت تجربی پرداختند و افزایش این سیتوکاین‌ها را در بیماری MS نشان دادند (۱۶).

استفاده از سموم طبیعی در درمان بعضی امراض از دیر زمان ریشه در فرهنگ و تمدن بشری داشته و در این میان زهر زنبور عسل جایگاه ویژه‌ای دارد. ملیتین و فسفولپیاز A2 دو ترکیب اصلی BV هستند، که به طور عمومی نقش مهمی در سوزش، درد و واکنش‌های آلرژیک ایفا می‌کند (۲۱). در مجموع، شواهد، وابسته به دوز بودن BV را چه در مطالعات حیوانی و چه در رده‌های سلولی نشان می‌دهند و همچنین مطالعات نشان داده‌اند که درمان توسط BV اثرات جانبی کمی را بر جای می‌گذارد (۲۲). در سال ۲۰۱۰ نیز نشان داده شد که تیمار با BV موجب کاهش سیتوکاین‌های پیش‌التهابی نظیر TNF $\alpha$  و اینترلوکین ۸ و ۱ در بیماری Acne vulgaris می‌گردد (۲۳). به هر حال، در خصوص تعمیم یافته‌ها به بیماری MS باید در نظر داشت که هر چند EAE یک مدل شناخته شده برای MS است ولی همانگونه که ذکر شد دارای نواقصی نیز می‌باشد، مانند عدم relapsing مجدد در رت‌ها، ولی در گروه‌های انسانی دمیلینه شدن و relapsing به طور مزمین باقی می‌ماند. به نظر می‌رسد که در تعمیم داده‌های به دست آمده از بیماری EAE به MS باید ملاحظات بیشتری اعمال کنیم.

### نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر را می‌توان در دو بخش مطالعات بافتی و سرمی مورد ارزیابی قرار داد. مطالعات سرمی نشان داد که گروه‌های تیمار سطح سرمی سیتوکاین پایینتری را نسبت به گروه شم داشتند، و در گروه شم به علت عدم دریافت BV و بالا بودن سطح IL $\alpha$  ترمیم با تأخیر بیشتری همراه بود. بنابراین به نظر می‌رسد BV می‌تواند به عنوان یک فاکتور ضد التهابی در درمان مدل EAE عمل نماید. یافته‌های بافتی نیز تأیید کننده همین ادعاست. در این مطالعه با توجه به تمام قرائنی که در بالا مطرح شد و نیز با توجه به درگیر بودن این بیماری با الگوی سیتوکاین‌های پیش‌التهابی Th1 و برجسته بودن نقش کلیدی IL $\alpha$  در تخریب و آسیب بافت عصبی، می‌توان این احتمال را داد که تیمار با BV سبب کاهش سیتوکاین‌های پیش‌التهابی گشته، و سبب افزایش خود تجدید شونده‌گی سلول‌های عصبی شود.

### تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد در آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی تکوینی دانشکده علوم زیستی دانشگاه

خوکچه در مدل EAE با تقلید از بیماری MS، منجر به تغییرات سیتوکاین‌ها می‌گردد. در سال‌های اخیر در مطالعات مختلفی با استفاده از روش EAE در رت‌های لوئیس، ایجاد بیماری القا شده است (۱۷-۱۵). در پژوهش حاضر که همسو با تحقیقات گذشته صورت گرفت، در حیوانات مبتلا درجات متفاوتی از تخریب میلین دیده شد. این آثار التهابی، هم در نخاع و هم در مغز وجود داشت و همراه با علائم ظاهری فلج در اندامها بروز نمود، به طوری که از روز نهم پس از القا علائم شروع بیماری در رت‌ها با اختلال در حرکت دم آغاز شد. در روزهای آتی به فلج شدن دم، اختلال در حرکت دم، فلج شدن یک پا، و فلج شدن هر دو پا ایجاد شد. در گروه شم که نخاع خوکچه و ادجوانت کامل فروند را دریافت کرده بودند حتی اختلال در حرکت دستها نیز دیده می‌شد، در این گروه رت‌ها به شدت کاهش وزن داشته و حتی به وزن ۱۴۰-۱۳۵ گرم رسیده بودند که این نتایج با تحقیقات اشنایدر و همکاران در سال ۲۰۰۹ مطابقت داشت (۱۸). در این پروژه سیتوکاین‌های سرمی رت‌های القا شده تحت تیمار با زهر زنبور و همچنین رت‌های القا شده‌ای که تنها نرمال سالین دریافت نمودند به روش الیزا اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که سیتوکاین‌های پیش‌التهابی در گروه‌های تحت درمان کاهش می‌یابد، به طوری که سطح IL $\alpha$  در گروه تجربی دوم که میزان زهر بیشتری را دریافت کرده بودند (۲ mg/kg) کاهش بیشتری را نشان می‌دهد. این احتمال وجود دارد که BV به کار برده شده در گروه‌های تیمار ۱ و ۲ با کاهش سطح سیتوکاین‌های پیش‌التهابی سرم خون برگشت به حالت نرمال را در رت‌ها میسر ساخته و بنابراین رت‌های تیمار ۲ در همان مرحله دوم علائم کلینیکی باقی ماندند، درحالی که گروه‌های دیگر به مراحل بالاتری رسیدند، به طوری که در رت‌های گروه شم که دریافت کننده ترکیب هموزن نخاع و ادجوانت بودند و تنها سالین دریافت کردند، تا مرحله ۶ بیماری پیش رفتند. در سیستم عصبی سلول‌های بنیادی عصبی پتانسیل خودتجدیدشوندگی داشته و خاصیت تمایز به انواع سلول‌های گلیالی و نورونها را دارا می‌باشند (۱۹). مطالعات حاکی از آن است که سیتوکاین‌های پیش‌التهابی که از الگوی Th1 پیروی می‌کنند، تکثیر و نوروژنزی را در سلول‌های چندتوانه و سلول‌های پیش‌ساز عصبی کاهش می‌دهند (۲۰). در این بین IL $\alpha$  یکی از سیتوکاین‌های کلیدی در مهار تکثیر و مهاجرت سلول‌های بنیادی عصبی می‌باشد. این سیتوکاین سبب تخریب سد خونی مغزی شده و با عبور از این سد شرایط آپوپتوز را برای الیگودندروسیت‌ها فراهم می‌سازد. Imitola و

دانشکده علوم زیستی صمیمانه سپاسگزاری می‌نماید.

خوارزمی و مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی این دانشگاه انجام شده که از حمایت‌های مدیریت این مرکز و

## REFERENCES

1. Mars LT, Saikali P, Liblau RS, Arbour N. Contribution of CD8 T lymphocytes to the immuno-pathogenesis of multiple sclerosis and its animal models. *Biochim Biophys Acta* 2011;1812(2):151-61.
2. Kurtzke JF. Epidemiology and multiple sclerosis. *Rev Neurol*, 2002;35(12):1177.
3. Goodnow CG, Sprent J, Fazekas B, Vinuesa CG. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* 2005;435:590-7.
4. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:683-747.
5. Seamons AA, Perchellet, Goverman J. Immune tolerance to myelin proteins. *Immunol Res* 2003;28(3):201-21.
6. Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, Benvenuto F, Bottinelli D, Lira S, et al. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol* 2009;10(5):514-23.
7. Linker RA, Lühder F, Kallen KJ, Lee DH, Engelhardt B, Rose-John S, et al. IL-6 transsignalling modulates the early effector phase of EAE and targets the blood-brain barrier. *J Neuroimmunol* 2008;205(1-2):64-72
8. Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research *Brain*. 2006;129(Pt 8):1953-71.
9. Nowell MA, Richards PJ, Horiuchi S, Yamamoto N, Rose-John S, Topley N, et al. Soluble IL-6 receptor governs IL-6 activity in experimental arthritis: blockade of arthritis severity by soluble glycoprotein 130. *J Immunol* 2003;171(6):3202-9.
10. Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of TH17 cells. *Nature* 2008;453:1051-7.
11. Lindsey JW. History, clinical signs, and disease course. In: Lavi E, Constantinescu CS, editors. *Experimental models of multiple sclerosis*. New York: Springer; 2005. pp.1-9.
12. Hemmer B, Archelos JJ, Hartung HP. New concepts in the immunopathogenesis of MS. *Nat Rev Neurosci* 2002;3(4):291-301.
13. Mirshafiey A, Mohsenzadegan, M., Antioxidant therapy in multiple sclerosis. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2009;31(1):13-29.
14. Yonamine CM, Costa H, Silva JAA, Muramoto E, Rogero JR, Troncone LRP, et al . Biodistribution studies of bee venom and spider toxin using radiotracers. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis* 2005;11(1):39-50.
15. Mix E, Meyer-Rienecker H, Hartung HP, Zettl UK. Animal models of multiple sclerosis—Potentials and limitations. *Prog Neurobiol* 2010;92(3):386-404.
16. Imitola J, Chitnis T, Khoury SJ. Cytokines in multiple sclerosis: from bench to bedside. *Pharmacol Ther* 2005;106(2):163-77
17. 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(1):146-55
18. Schneider C, Schuetz G, Zollner TM. Acute neuroinflammation in Lewis rats — A model for acute multiple sclerosis relapses. *J Neuroimmunol* 2009;213(1-2):84-90.
19. Pluchino S, Zanutti L, Martino G. Rationale for the use of neural stem/precursor cells in immune-mediated demyelinating disorders. *J Neurol* 2007;254(Suppl 1):I/23–I/28.
20. Ekdahl CT, Claasen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(23):13632-7
21. Kim HW, Kwon YB, Ham TW, Roh DH, Yoon SY, Lee HJ, et al. Acupoint stimulation using bee venom attenuates formalin-induced pain behavior and spinal cord fos expression in rats. *J Vet Med Sci* 2003;65(3):349-55.
22. Hamedani M, Vatanpour H, Saadat F, Reza Khorramzadeh M, Mirshafiey A. Bee venom, immunostimulant or immunosuppressor?.insight into the effect on matrix metalloproteinases and interferons. *Immunopharmacol. Immunotoxicol* 2005;27(4):671-81.
23. Han SM, Lee KG, Yeo JH, Baek HJ, Park K. Antibacterial and anti-inflammatory effects of honeybee (*Apis mellifera*) venom against acne-inducing bacteria. *J Med Plant Res* 2010;4(6):459-64.