

مقاله پژوهشی

اثر آستاگزانتین طبیعی در پیشگیری و درمان انسفالومیلیت تجربی خودایمن (EAE)

پریسا کریشچی خیابانی^{۱*}، سایه بیداران^۲

^۱ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
^۲ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* نویسنده مسئول مکاتبات: parisakerishchi@yahoo.com

تاریخ پذیرش: دی ۱۴۰۰

تاریخ دریافت: مرداد ۱۴۰۰

چکیده

مخمر فافیا رودوزیما حاوی کاروتنوئید آستاگزانتین می باشد که خاصیت آنتی اکسیدانتی و ضد التهابی قوی دارد. در مطالعه پیش رو اثر آستاگزانتین فافیا رودوزیما در موش مدل بیماری مالتیپل اسکلروزیس (MS) مورد بررسی قرار گرفت. مدل بیماری MS یا آنسفالومیلیت تجربی خود ایمن (EAE) با استفاده از پپتید 55-35 MOG در موش های ماده C57BL/6 ایجاد گردید. برای این مطالعه چهار گروه در نظر گرفته شد: موش های گروه کنترل طبیعی، گروه بیمار، گروه پیشگیری دریافت کننده آستاگزانتین یک هفته قبل از القا بیماری و گروه های درمانی که آستاگزانتین را پس از ایمونیزاسیون و ظهور اولین نشانه بیماری دریافت کرده بودند. هر گروه شامل ۷ سر موش بود. مصرف آستاگزانتین تا ۳۵ روز پس از ایمونیزاسیون ادامه یافت و هر روز به مقدار ۴۰۰ mg/kg آستاگزانتین فافیا رودوزیما مصرف می شد به این صورت که پلت مصرفی روزانه به این مقدار آستاگزانتین مخلوط می شد. علائم بالینی و میانگین وزن بدن روزانه بررسی می شد. همچنین میزان تکثیر لنفوسیت ها به وسیله آزمون MTT، میزان تولید سایتوکاین التهابی IL23 و ضد التهابی IL4 به وسیله ELISA سنجیده شد مشاهدات نشان داد میانگین شدت بیماری در تمامی گروه های تجربی نسبت به گروه بیمار (EAE) کاهش معنی داری یافته است همچنین میانگین وزن بدن در گروه های پیشگیری و درمان افزایش معنی داری نسبت به گروه بیمار EAE نشان می دهند ($P < 0/001$). تجویز آستاگزانتین منجر به کاهش معنی دار سطح سایتوکاین التهابی IL23 و افزایش معنی دار سطح سایتوکاین ضد التهابی IL4 در هر دو گروه تجربی گردید ($P < 0/001$). نتایج آزمون MTT نیز نشان دهنده کاهش مقادیر شاخص تحریک (میزان تکثیر سلول های ایمنی) در هر دو گروه پیشگیری و درمانی می باشد ($P < 0/001$). با توجه به شواهد بدست آمده، پیش بینی می شود آستاگزانتین دارای پتانسیل ویژه ای برای پیشگیری و درمان بیماری MS در افراد مستعد به بیماری یا مبتلا باشد که این امر نیازمند مطالعات گسترده تری می باشد.

کلیدواژه ها: آستاگزانتین، آنسفالومیلیت تجربی خود ایمن، اینترلوکین ۴ (IL4)، اینترلوکین ۲۳ (IL23)، فافیا رودوزیما، مالتیپل اسکلروزیس.

مقدمه

مخمر *Phaffia rhodozyma* با تولید کاروتنوئید آستاگزانتین که خواص آنتی‌اکسیدانتی و ضدالتهابی و ضد استرس اکسیداتیو دارد مدتهاست توجه محققین را به خود جلب کرده است [۱]. این کاروتنوئید از بعضی جلبک‌ها و جانوران دریایی نیز استخراج می‌شود ولی تکثیر مخمر فافیا رودوزیما نسبت به جلبک و جانوران دریایی راحت‌تر و از لحاظ اقتصادی به صرفه می‌باشد [۲]. مدل حیوانی بیماری (MS) (Multiple Sclerosis) انسفالومیلیت تجربی خودایمن (EAE) می‌باشد که در مطالعات بالینی مورد استفاده قرار می‌گیرد. نتایج مطالعات بر روی حیوان مدل نشان داده است، فعالیت و نفوذ سلول‌های TCD4+ در سیستم عصبی منجر به افزایش سطح تولید سایتوکاین‌های التهابی شده است [۳].

کاروتنوئید آستاگزانتین بواسطه محلول بودن در چربی از سد خونی-مغزی عبور می‌کند و سلول‌های عصبی را در برابر آسیب اکسایشی محافظت می‌کند و به فعالیت‌های التهابی واکنش نشان می‌دهد [۴ و ۵].

لنفوسیت‌های Th2، قادرند اینترلوکین‌های ضدالتهابی مانند IL-4 را تولید و ترشح نمایند. IL-4 بر روی بیان فاکتور نسخه‌برداری GATA3 در سلول‌های T دست نخورده (Naïve) اثر گذاشته و بیان سایتوکاین التهابی IFN- γ را متوقف می‌کند و تولید سلول‌های Th1 کاهش یافته و هدایت تمایز سلول‌های T دست نخورده به سمت سلول‌های Th2 رخ می‌دهد [۶].

در مطالعه پیش رو اثر آنتی‌اکسیدانتی کاروتنوئید آستاگزانتین مستخرج از مخمر فافیا رودوزیما هم بصورت پیشگیری و هم درمان بر روی پاسخ التهابی ایجاد شده توسط فعالیت لنفوسیت‌های T خود واکنش‌گر Auto-reactive و پاسخ ضد التهابی Th2 در مدل حیوانی بیماری مالتیپل اسکلروزیس (EAE) مورد بررسی قرار گرفت و با ایجاد مدل بیماری و دمیلیناسیون سلول‌های عصبی، تاثیر این کاروتنوئید بر تغییرات سطوح سایتوکاین‌های التهابی IL23 و ضدالتهابی IL4 مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر به روش تجربی بود و جامعه مورد بررسی شامل ۲۸ سر موش ماده C57BL/6 در محدوده سنی ۷ هفته‌ای

از انستیتو پاستور تهران با میانگین وزنی (mean \pm SD) ۰/۲۱ \pm ۱۸/۲۶ گرم تهیه شد و در شرایط نور و رطوبت و دمای اپتیموم و مناسب در حیوانخانه دانشگاه نگهداری شدند. در این پژوهش کلیه موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شده است.

جهت ایجاد مدل بیماری مالتیپل اسکلروزیس (EAE) ۲۰۰ میکروگرم پپتید (Eurogentec co, Belgium) MOG₃₅₋₅₅ را در ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سدیم (PBS) و ۱۰۰ میکرولیتر ادجوانت فروند کامل (Sigma، آمریکا) حل نموده و به صورت زیر جلدی در ناحیه پشت هر موش با سوزن گیج ۲۲ به هر سر موش تزریق شد. ۴۰۰ نانوگرم پرتوسیس توکسین (Sigma، آمریکا) نیز در حجم ۳۰۰ میکرولیتر PBS حل کرده و در روز اول ایمونیزاسیون بصورت داخل صفاقی تزریق گردید و مرتبه دوم نیز ۴۸ ساعت بعد از ایمونیزاسیون ۴۰۰ نانوگرم پرتوسیس توکسین (Sigma، آمریکا) در حجم ۳۰۰ میکرولیتر PBS حل کرده و مجدد به صورت داخل صفاقی تزریق گردید [۷ و ۸].

کاروتنوئید آستاگزانتین مخمر فافیا رودوزیما مطابق با متد حلال قطبی و غیرقطبی توسط آزمایشگاه تحقیقاتی بیولوژی گیاهی دانشگاه تهیه و استخراج شده بود [۹]. موش‌های C57BL/6 روزانه mg/kg ۴۰۰ کاروتنوئید آستاگزانتین را به همراه غذای مصرفی دریافت می‌کردند بطوریکه پلت‌های مصرفی در این مقدار آستاگزانتین مخمر فافیا غلظانیده شده بودند [۸ و ۱۰].

مطابق با گروه‌بندی زیر مصرف کاروتنوئید آستاگزانتین صورت پذیرفت و تا ۳۵ روز پس از ایمونیزاسیون ادامه یافت:

موش‌های گروه کنترل سالم: گروهی که بیمار نشده و آب و غذای مصرفی آن‌ها فاقد کاروتنوئید مستخرج از مخمر فافیا بود، گروه موش‌های بیمار (EAE): موش‌هایی که بیمار شدند ولی دارو دریافت نکردند، گروه موش‌های تجربی پیشگیری: یک هفته قبل از ایمونیزاسیون، آستاگزانتین مخمر فافیا را همراه با خوراک مصرفی به طور روزانه دریافت کرده بودند و گروه موش‌های تجربی درمانی: موش‌ها بعد از ایمونیزاسیون و با اولین نشانه از ابتلا به بیماری (روز یازدهم پس از ایمونیزاسیون)، آستاگزانتین مخمر فافیا را همراه با خوراک مصرفی بصورت روزانه دریافت کرده بودند.

روند تغییرات وزن و شدت علائم بالینی به صورت روزانه مورد بررسی صورت گرفت. برای ارزیابی شدت بیماری از سیستم نمره‌دهی مطابق جدول ۱ استفاده شد.

دقیقه ضمن افزودن ۱۰ میلی لیتر محیط کشت، نمونه‌ها بار دیگر سانتریفیوژ تکرار شد. رسوب سلولی در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰% FBS به حالت سوسپانسیون در آورده شد. پس از فرآیند شمارش سلول‌ها بوسیله متد رنگ‌آمیزی با تریپان بلو، سوسپانسیونی حاوی 1×10^6 cell/ml تهیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر از آن در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ته صاف ریخته شد. برای هر نمونه سه تکرار در حضور $50 \mu\text{g/ml}$ از پپتید MOG₃₅₋₅₅ و سه تکرار بدون حضور پپتید در نظر گرفته شد. به عنوان شاهد نیز در سه چاهک، فقط از محیط کشت RPMI-1640 استفاده شد. بعد از ۷۲ ساعت گرمادهی در انکوباتور ۵% CO₂، به هر چاهک ۲۵ میکرولیتر محلول MTT افزوده شده و به مدت ۴ ساعت دیگر در انکوباتور قرار داده شد. در این مدت ماده MTT توسط سلول‌های زنده که در حال تکثیر می‌باشند احیا شده و کریستال‌های فورمازون تشکیل گردید، سپس با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به صورت محلول درآمده و شدت رنگ در طول موج ۴۹۰nm خوانش گردید و شاخص تحریک با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید [۱۱].

$$\text{شاخص تحریک} = \frac{\text{OD بلانک - OD در حضور پپتید}}{\text{OD بلانک - OD در عدم حضور پپتید}}$$

آنالیز آماری

جهت بررسی آماری از نرم‌افزار SPSS ویراست ۲۱ و برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Excel نسخه ۲۰۱۰ استفاده شد. داده‌ها به صورت Mean \pm SEM گزارش گردید. جهت مقایسه میانگین وزن، میزان تکثیر لنفوسیت‌ها، سطح سایتوکاینها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و Tukey's test و جهت مقایسه میانگین شدت بیماری از Mann Whitney-U استفاده گردید. تمام آنالیزها سطح معنی‌داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

روز سی و پنجم پس از ایمونیزاسیون، موش‌ها تحت بیهوشی عمیق قرار گرفتند (کتامین ۱۰۰ mg/Kg و زایلازین ۱۰ mg/Kg داخل صفاقی (ip). طحال تحت شرایط استریل خارج و بعد از قطعه شدن در ۲ml محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰%، FBS قرار گرفته و با استفاده از ته سرنگ له شده و برای تهیه سوسپانسیون سلولی مناسب از توری به قطر ۰/۲ میلی‌متر عبور داده شدند. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰ g با سانتریفیوژ یخچال‌دار، سانتریفیوژ و به منظور حذف گویچه‌های سرخ، به رسوب سلولی ۵ ml بافر لیز کننده افزوده شد و چندین بار عمل سانتریفیوژ انجام شد تا رسوب سلولی در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰% FBS به حالت سوسپانسیون در آورده شد. بعد از فرآیند شمارش سلول‌ها، سوسپانسیون سلولی به تعداد 2×10^6 cell/ml از هر نمونه تهیه و سلول‌ها در پلیت‌های کشت ۲۴ خانه در حضور پپتید MOG₃₅₋₅₅ با غلظت ۵۰ میکروگرم در لیتر به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور CO₂ دار ۵ درصد کشت داده شدند. پس از طی این مدت مایع رویی آن‌ها جمع‌آوری شده و از هر نمونه به طور مساوی در سه لوله اپندرف توزیع و تا زمان انجام آزمایشات الایزا در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سنحش هر یک از سایتوکاین‌های IL4 و IL23 بوسیله کیت الایزا (Abcam، آمریکا) به شیوه پروتکل شرکت سازنده کیت صورت گرفت، به هر نمونه دو خانه (کنترل سالم، گروه بیمار و گروه‌های تجربی) اختصاص داده شد و یک جفت خانه، شاهد و هفت جفت خانه برای نمونه استاندارد در نظر گرفته شد. خوانش در طول موج ۴۵۰ نانومتر بوسیله ELISA Reader انجام شد. نتایج بدست آمده بعد از تهیه نمودار استاندارد، برای تعیین غلظت سایتوکاین مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت ارزیابی میزان تکثیر سلول‌های ایمنی با متد MTT طحال موشها تحت شرایط استریل و در ۲ml محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰%، FBS له گردیده و از توری سیمی به قطر ۰/۲ میلی‌متر عبور داده شدند. به منظور حذف گویچه‌های سرخ، به رسوب سلولی ۵ ml بافر لیز کننده افزوده شد. بعد از ۵

جدول ۱. علائم بالینی و درجه شدت بیماری در موش مدل مالتیپل اسکلروزیس (EAE)

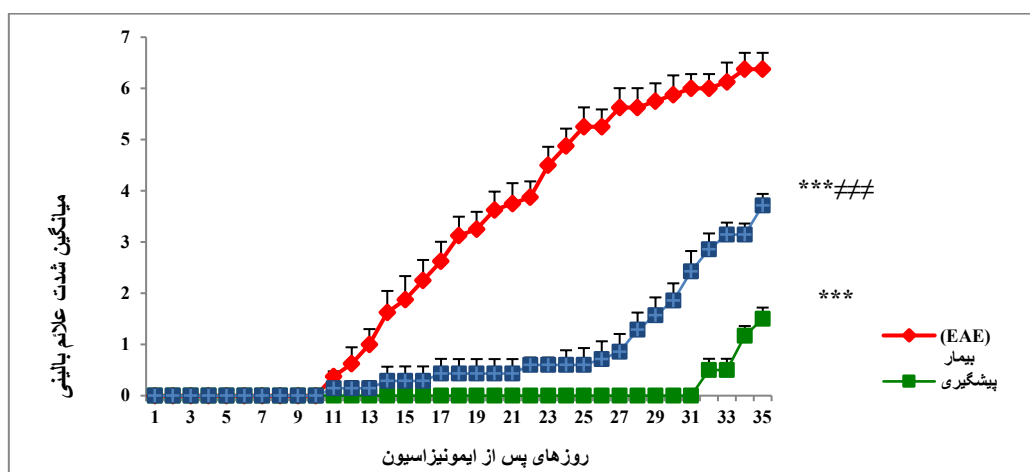
علائم بالینی	عدم بروز بیماری	شل شدن دم	فلج شدن دم	اختلال در راه رفتن	فلجی یک پا	فلجی دو پا	فلجی چهار دست و پا	مرگ
درجه شدت بیماری	صفر	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷

یافته‌ها

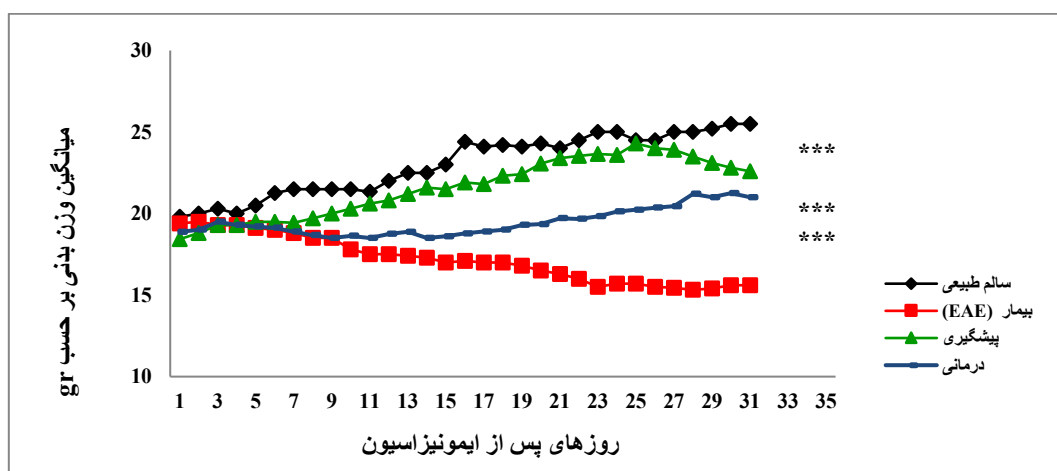
درمانی علائم بالینی به ترتیب از روز ۳۰ام و ۱۵ام پس از ایمونیزاسیون قابل مشاهده بود.

تغییرات میانگین وزن در بین گروه‌های تحت مطالعه نشان داد که میانگین وزن گروه EAE پس از ایمونیزاسیون نسبت به گروه‌های دریافت کننده کاروتنوئید آستاگزانتین فافیا رودوزیما کاهش چشمگیری داشته است. این افزایش وزن در تمامی گروه‌های تجربی پیشگیری و درمانی مانند گروه سالم طبیعی نسبت به تغییرات میانگین وزن بدن در موش‌های گروه EAE بدون درمان اختلاف معنی‌داری در سطح ($P < 0.001$) را نشان می‌دهد (نمودار ۲).

شدت علائم بالینی در گروه‌های پیشگیری و درمانی که کاروتنوئید آستاگزانتین فافیا رودوزیما را دریافت کرده اند، نسبت به گروه بیمار EAE کاهش معنی‌داری داشته است ($P < 0.001$) میانگین شدت بیماری در گروه پیشگیری که هفت روز قبل از القا بیماری آستاگزانتین فافیا رودوزیما دریافت کرده بودند نسبت به گروه درمانی در سطح ($P < 0.001$) کاهش یافته بود (نمودار ۱). میزان بروز و شیوع بیماری در گروه بیمار بدون درمان EAE از روز یازدهم پس از ایمونیزاسیون شروع شد و در گروه پیشگیری و



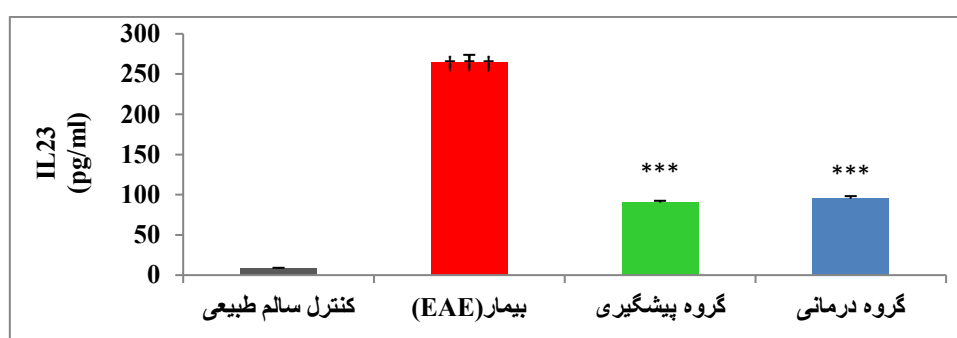
نمودار ۱، تغییرات میانگین شدت علائم بیماری در گروه EAE: میانگین شدت بیماری در تمامی گروه‌های تجربی (پیشگیری و درمانی) نسبت به گروه بیمار (EAE) کاهش معنی‌داری یافته است ($P < 0.001$ ***) و میانگین شدت علائم بیماری در گروه درمانی در مقایسه با گروه پیشگیری افزایش معنی‌داری یافته است ($P < 0.001$ ***).
 (* ارائه دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه EAE و \neq نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه پیشگیری)



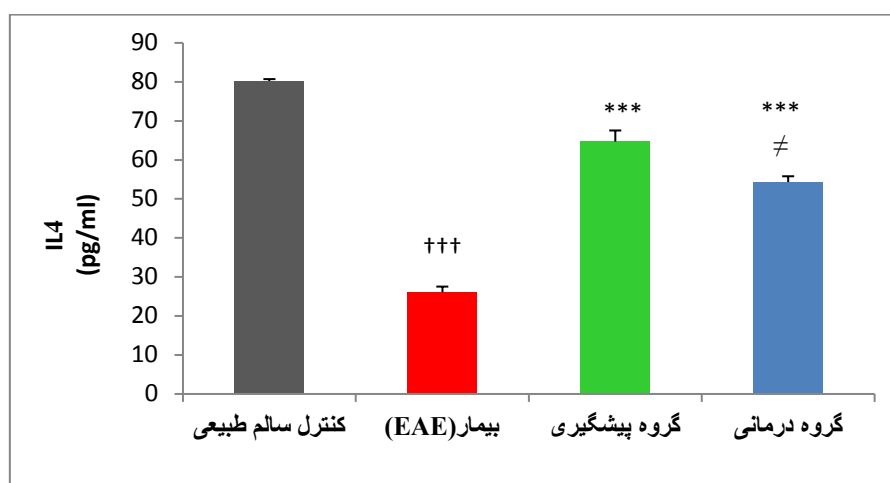
نمودار ۲: میانگین وزنی بدن، میانگین وزن بدن در گروه کنترل طبیعی و گروه‌های پیشگیری و درمان افزایش معنی‌داری نسبت به گروه بیمار EAE نشان می‌دهند ($P < 0.001$, $n=7$ ***)

مشاهده شد سطح سایتوکاین ضدالتهابی IL4 در گروه‌های پیشگیری و درمان که مطابق پروتکل آستاگزانتین مستخرج از مخمر فافیا رودوزیما را دریافت کرده بودند نسبت به گروه EAE افزایش معنی‌داری یافته است ($P < 0/001$). همچنین مقادیر IL4 در گروه درمانی نسبت به گروه پیشگیری کاهش معنی‌داری در سطح ($P < 0/05$) نشان داد. سطح سایتوکاین ضدالتهابی IL4 در گروه EAE، نسبت به گروه موش‌های کنترل سالم کاهش معنی‌داری یافته است ($P < 0/001$) (نمودار ۴).

سطح سایتوکاین التهابی IL23 در تمامی گروه‌های تجربی پیشگیری و درمان که کاروتنوئید آستاگزانتین فافیا رودوزیما دریافت کرده بودند در مقایسه با سطح IL23 در گروه EAE کاهش معنی‌داری را در سطح ($P < 0/001$) ارائه داد. همچنین سطح سایتوکاین IL23 در گروه بیمار EAE نسبت به گروه کنترل طبیعی افزایش معنی‌داری در سطح ($P < 0/001$) نشان داد (نمودار ۳).
سطح سایتوکاین ضدالتهابی IL4 در موش‌های C57BL/6، نیز پنج هفته پس از ایمونیزاسیون مورد بررسی قرار گرفت و



نمودار ۳: بررسی مقایسه‌ای سطح سایتوکاین التهابی IL23، ۵ هفته پس از ایمونیزاسیون در موش‌های C57BL/6، مقادیر IL23 در تمامی گروه‌های تجربی پیشگیری و درمان در مقایسه با سطح IL23 در گروه EAE کاهش معنی‌داری را در سطح $P < 0.001$ ارائه می‌دهد. همچنین سطح سایتوکاین IL23 در گروه بیمار EAE نسبت به گروه کنترل طبیعی افزایش معنی‌داری در سطح $P < 0.001$ نشان می‌دهد (* ارائه دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه EAE و + نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل طبیعی)



نمودار ۴: بررسی سطح سایتوکاین ضد التهابی IL4 در موش‌های C57BL/6، ۵ هفته پس از ایمونیزاسیون. سطح سایتوکاین ضدالتهابی IL4 در گروه‌های پیشگیری و درمان نسبت به گروه EAE افزایش معنی‌داری یافته است ($P < 0.001$ ***). همچنین مقادیر IL4 در گروه درمانی نسبت به گروه پیشگیری کاهش یافته است ($P < 0.05$ ≠)، سطح سایتوکاین ضدالتهابی IL4 در گروه EAE، نسبت به گروه موش‌های کنترل سالم کاهش معنی‌داری یافته است $P < 0.001$ +++ (* ارائه دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه EAE و ≠ نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه پیشگیری، + نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل سالم)

کاروتنوئید آستاگزانتین این مخمر بواسطه قدرت آنتی اکسیدانتی قوی سبب تقویت سیستم ایمنی می شود و این کاروتنوئید یک آنتی اکسیدانت طبیعی فوق العاده قوی می باشد [۱۵].

در این مطالعه اثر کاروتنوئید آستاگزانتین مستخرج از فافیا رودوزیما را در مراحل قبل از ابتلا (پیشگیری) و پس از ابتلا به بیماری (درمان) بر روی بروز علائم بالینی و شدت بیماری و نقش حفاظتی این کاروتنوئید بر روی فاکتورهای التهابی و ضدالتهابی بررسی شد. با مطالعه نتایج بدست آمده مشاهده شد علائم بالینی و شدت بیماری در گروه های تجربی پیشگیری و درمانی نسبت به گروه EAE کاهش معنی داری یافته بود و این علائم بالینی در گروه پیشگیری نیز نسبت به گروه درمانی کاهش معنی داری را ارائه میداد. همچنین میانگین وزن در گروه بیمار نسبت به گروه های تجربی پیشگیری و درمانی که کاروتنوئید آستاگزانتین مصرف کرده بودند کاهش معنی داری یافته بود. سطح سایتوکاین التهابی، IL23 نیز در دو گروه تجربی پیشگیری و درمانی در قیاس با گروه بیمار کاهش معنی دار داشته و در مقابل سطح سایتوکاین ضدالتهابی، IL4 در هر دو گروه تجربی پیشگیری و درمانی افزایش چشمگیری نسبت به گروه بیمار (EAE) ارائه داد و سطح IL4 در گروه پیشگیری نسبت به گروه درمانی افزایش معنی داری داشت. سنجش میزان تکثیر لنفوسیت ها که بوسیله معنی داری Proliferation index ارزیابی شد در هر دو گروه های تجربی پیشگیری و درمانی در مقایسه با گروه بیمار EAE کاهش یافته بود.

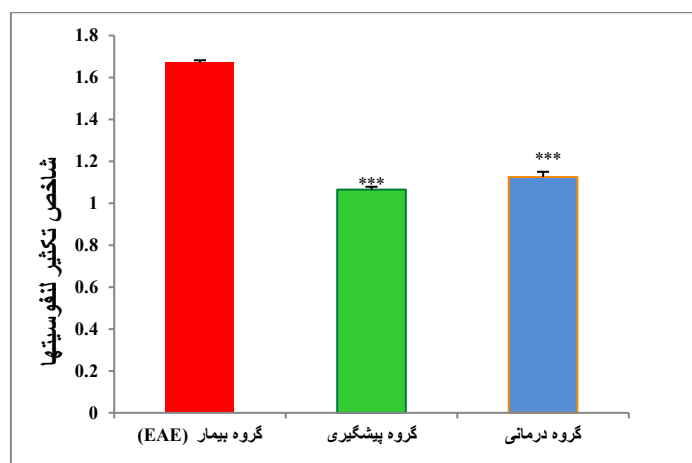
مشاهدات تست MTT بدنال تحریک مجدد لنفوسیت های طحال با پیتید MOG در محیط کشت نشان می دهد تکثیر لنفوسیتی در گروه های پیشگیری و درمانی موش های دریافت کننده آستاگزانتین مخمر فافیا در مقایسه با گروه EAE بدون درمان کاهش معنی داری یافته است ($P < 0.001$) (نمودار ۵).

بحث و نتیجه گیری

مولتیپل اسکلروزیس (MS) بیماری التهابی مزمن است که همراه با پروسه دژنراتیو سیستم عصبی مرکزی (CNS) و تخریب میلین مشخص می شود. با مطالعات بالینی و ارائه مدل حیوانی بیماری مالتیپل اسکلروزیس (EAE) به وضوح تاثیر سایتوکاین های التهابی و ضدالتهابی را در بروز بیماری و روند بهبودی می توان مشاهده کرد [۱۲، ۱۳].

مخمر فافیا رودوزیما دارای کاروتنوئید آستاگزانتین بوده که طبق مطالعات انجام شده خاصیت آنتی اکسیدانتی قوی دارد. مطالعه بر روی ساختار مولکولی آستاگزانتین توجیه کننده فعالیت آنتی اکسیدانتی و ضدالتهابی آن می باشد. این مولکول در دو انتهای خود دارای گروه های هیدروکسیلی و کتونی بوده که در مرکز مولکول به زنجیره پلی ان متصل شده است. بوسیله بنیان هیدروکسیلی به بخش لیپیدی غشا نفوذ کرده و سیالیت غشا را کاهش داده و سبب حفظ یکپارچگی و عملکرد غشا می شود [۲، ۱۴].

در مطالعه ای که توسط Zho و همکاران در ۲۰۲۱ بر روی فافیا رودوزیما انجام شد بر این امر صحه گذاشته شده که



نمودار ۵. میزان تکثیر لنفوسیت ها با روش MTT ۵ هفته پس از ایمونیزاسیون: میزان تکثیر لنفوسیت ها در تمامی گروه های تجربی پیشگیری و درمان نسبت به گروه موش های بیمار EAE کاهش معنی داری در سطح ($P < 0.001$) نشان دادند. (* ارائه دهنده اختلاف معنی دار با گروه

(EAE)

مهارى آستاگزانتين بر فعاليت سلول‌هاى Th1 و در مقابل افزايش بيان IL4 را گزارش دادند [۲۶].

با توجه به اين موضوع كه پيشرفت بيمارى بواسطه فعاليت سايتوكاين‌هاى Th1 و توليد سايتوكاين‌هاى التهابى است [۲۷]. مطالعاتى كه در شرايط *in vitro* صورت پذيرفت اثر تنظيم كندگى آستاگزانتين را بر روى واكنش سلول‌هاى ايمنى و توليد سايتوكاين‌هاى Th1 پيشنهاد داد [۲۸].

در مطالعاتى كه توسط بيداران و همكاران بر روى اثربخشى آستاگزانتين مستخرج از جلبك هماتوكوكوس پلوياليس بر روى موش C57BL6 مدل EAE انجام شد نيز نتايج مشابهى با اين تحقيق ارائه داد. بطوريكه ميزان سايتوكاين‌هاى التهابى در موشهاى گروههاى تجربى كاهش معنى دارى يافته و در مقابل سطح سايتوكاين ضدالتهابى در گروههاى دريافت كننده آستاگزانتين بدست آمده از جلبك هماتوكوكوس پلوياليس افزايش يافته بود [۸].

محققين معتقدند آستاگزانتين از طريق مكانيسم تنظيم سيگنال ERK بر روى رشد، تكثير و تمايز سلول‌هاى عصبى تاثير مى‌گذارد. سيگنال ERK با تاثير بر MAPKs (پروتئين كيناز فعال شده با ميتوزن) سبب تنظيم عملكرد سلولى، بيان ژن، تكثير، تمايز و بقا سلولى و آپوپتوزيس مى‌گردد. در واقع MAPKs نقش مداخله‌گر را در واكنش‌هاى سلولى نسبت به سايتوكاين‌هاى التهابى دارد [۲۹].

از سوى ديگر سرکوب گونه‌هاى اكسيژن فعال (ROS) بوسيله آستاگزانتين كه القا كننده بيان هسته‌اى NF-κB مى‌باشد، باعث كاهش توليد سايتوكاين‌هاى التهابى مى‌گردد [۳۰].

در اين مطالعه نيز كاهش سطح IL-23، در گروه‌هاى پيشگيرى و درمانى در مقايسه با گروه موش‌هاى بيمار EAE منعكس كننده اثرات مهاركننده آستاگزانتين بر روى فعاليت سلول‌هاى T ترشح كننده سايتوكاين‌هاى التهابى مى‌باشد. افزايش سطح IL4 در گروه‌هاى پيشگيرى و درمانى در مقايسه با گروه موش‌هاى بيمار نيز ارائه دهنده اثر آستاگزانتين بر تقويت عملكرد سلول‌هاى Th2 بوده كه منجر به توليد و افزايش سايتوكاين ضد التهابى IL4 شده است.

شواهد نشان مى‌دهد در بيمارى‌هاى خودايمنى مانند مالتپيل اسكلروزيس، در ابتدا سلول‌هاى Th1 وارد عمل مى‌شوند و سبب ايجاد واكنش‌هاى التهابى توسط سيستم ايمنى مى‌شود [۱۶]. سپس سلول‌هاى Th2 فعال مى‌شوند كه بيانگر فعاليت ضد التهابى لنفوسيت‌ها بوده و سايتوكاين‌هاى تنظيم كننده و ضدالتهابى سيستم ايمنى مانند IL4 را توليد و ترشح مى‌كنند. IL23 نقش مهمى در التهاب مغزى دارد. اين سايتوكاين موجب توليد سايتوكاين التهابى IL17 از لنفوسيت‌هاى T مى‌شود [۱۸]، [۱۷].

سلول‌هاى عرضه كننده آنتى ژن حرفه‌اى (Antigen presenting cells) در بيماران مبتلا به MS سبب فعال شدن سلول‌هاى ترشح كننده سايتوكاين التهابى مانند IL23 مى‌شوند [۱۹، ۲۰].

ماست سل‌ها نيز تحت تاثير سايتوكاين ضد التهابى IL4 سبب تمايز سلول‌هاى T به سلول‌هاى Th2 شده و از شدت التهاب مى‌كاهند [۲۱].

بنابر گزارشات سلول‌هاى Th17 در بيماريه‌هاى خودايمنى اثرات خود را از طريق IL23 اعمال مى‌كنند. سلول‌هاى Th17 در ايجاد مدل آنسفالميليت خودايمنى تجربى (EAE) و تشديد تخريب بافت عصبى در مولتپيل اسكلروزيس نقش موثرى داشته‌اند [۲۲].

سايتوكاين IL-23 قادر به فعال كردن فاكتر رونويسى STAT3 / STAT4 در سلول‌هاى T بوده كه در نهايت منجر به فعال شدن Th1/Th17 و بروز بيمارى خودايمنى در سيستم عصبى مركزى مى‌شود (۲۳). سايتوكاين IL23 از طريق مسير STAT3 در تمايز سلول‌هاى Th1 و Th17 نقش به سزايى دارند [۲۴].

جهت تشخيص و ارزيابى بيمارى MS و همچنين وضعيت بهبودى بيمار، بررسى ميزان سطح IL-4 در سرم و مايع مغزى-نخاعى مى‌تواند رهگشا باشد. بررسى تغييرات سطح IL4 نشاندهنده اهميت اين سايتوكاين در سنجش و بررسى حالات بيمار مى‌باشد (۲۵).

Zhu و همكاران در سال ۲۰۲۰ تاثير آستاگزانتين بر روى موشهاى مدل زوال عقل عروقى را مورد بررسى قرار دادند و اثرات

¹ Mitogen-activated protein kinase

همچنین تکثیر سلول‌های لنفوسیتی به‌عنوان شاخص تحریکی در تمامی گروه‌های تجربی دریافت‌کننده آستاگزانتین مخمر فافیا رودوزیما نسبت به گروه موش‌های بیمار (EAE) بطور معنی‌داری تنزل یافته است. کاهش تکثیر لنفوسیت‌های T تحریک شده با پروتئین 35-55 MOG که یک فاکتور مهم در پاتوژنز بیماری است بوسیله اثر تنظیم‌کاهشی آستاگزانتین رخ داده است [۲۸].

با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق، تصور می‌شود کاهش علائم بالینی و شدت بیماری در موش‌های مدل EAE تحت تیمار ناشی از اثرات تجویز آستاگزانتین می‌باشد و با ایجاد کاهش سیالیت غشا و حفظ ساختار و عملکرد مناسب غشا و با توجه به ساختار مولکولی آستاگزانتین، نفوذ این آنتی‌اکسیدانت به سد خونی - مغزی سبب تعدیل علائم و شدت بیماری بخصوص در گروه پیشگیری شده است. از سوی دیگر کاهش سطح سایتوکاین التهابی IL23 در موش‌های گروه‌های تجربی می‌تواند ناشی از توقف بیان فاکتورهای نسخه بردار STAT3 و STAT4 و بدنبال تاثیر و نفوذ آستاگزانتین باشد.

با توجه به شواهد و اطلاعات بدست آمده از این مطالعه می‌توان خوشبین بود که آستاگزانتین به‌عنوان یک ترکیب در دارو و مکمل‌ها بتواند در پیشگیری از ابتلا، درمان و کاهش التهاب و جلوگیری از پیشرفت آسیب بافت عصبی در افراد مبتلا به بیماری MS نقش موثری داشته باشد.

نتیجه‌گیری

پتانسیل قوی آنتی‌اکسیدانتی و ضدالتهابی آستاگزانتین و عملکرد و رفتار آن با توجه به ساختار خاص مولکولی آستاگزانتین که یک ترکیب محلول در چربی بوده و در نتیجه به راحتی از سد خونی مغزی عبور می‌کند، سبب شده است به‌عنوان یک کاندید محافظتی جهت جلوگیری از تخریب بافت و سلول‌های عصبی پیشنهاد شود. آستاگزانتین همچنین با کاهش سطح بیان STAT3 و STAT4، سطوح سایتوکاین‌های التهابی را تعدیل و کاهش داده و سبب تقویت پاسخ‌های سایتوکاین ضدالتهابی می‌شود. با وجود این شواهد و مدارک، پیشنهاد می‌گردد محققین در زمینه فارماکوکینوزی جهت تجویز آستاگزانتین برای پیشگیری و درمان بیماری MS در افراد مستعد یا مبتلا، مطالعات گسترده‌تری را ارائه دهند.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله از تمامی افرادی که در پیشرفت این تحقیق یاری رسانیده اند قدردانی و سپاسگزاری می‌نمایند.

References

- [1] Chang MX, and Xiong F, Astaxanthin and its Effects in Inflammatory Responses and Inflammation-Associated Diseases: Recent Advances and Future Directions, *Molecules* 2020, 25(22), 5342; doi:10.3390/molecules25225342
- [2] Ranga Rao A, Phang SM, Ravi S, Aswathanarayana RG, Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications—A review, *Mar. Drugs* 2014, 12, 128–152
- [3] Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG, T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*, 2015; 74(1): 5-17.
- [4] Kistler A, Metabolism and CYP-inducer properties of astaxanthin in man and primary human hepatocytes, *Arch. Toxicol.*, 2002; 665-675
- [5] Bennedsen, M., Wang X, Willen R, Wadstrom T, Andersen LP, Treatment of H. pylori infected mice with antioxidant astaxanthin reduces gastric inflammation, bacterial load and modulates cytokine release by splenocytes. *Immunol. Lett.*, 1999, 70, 185–189
- [6] Zhang Y, Zhang Y, Gu W, He L, Sun B, Th1/Th2 cell's function in immune system. *Advances Experimental Medicine Biology*, 2014; 841: 45-65.
- [7] Mosayebi G, Moazzeni S M, Sanati M H, Effect of sex on susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis induced with MOG35-55 peptide in C57BL/6 Mice. *Medical Journal of Tabriz Univ of Med Sci*, 2006; 27(4):95-100.
- [8] Bidaran S, Ahmadi AR, Yaghmaei P, Sanati MH, Ebrahim-Habibi A. Astaxanthin effectiveness in preventing multiple sclerosis in animal model, *Bratislav Med J* 2018; 119 (3);160 – 166
- [9] Chunhua YIN, Shuzhen YANG, Xiaolu LIU, Hai YAN. Efficient Extraction of

- Astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* with Polar and Non-polar Solvents after Acid Washing. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2013, 21 (7), 776-780.
- [10] Yuri T, Yoshizawa K, Emoto Y, Kinoshita Y, Yuki M, Tsubura A. Effects of Dietary Xanthophylls, Canthaxanthin and Astaxanthin on N-Methyl-N-nitrosourea-induced Rat Mammary Carcinogenesis. *In Vivo*. 2016 11-12; 30(6):795-800.
- [11] Faridi Sh, Delirez N, and Abtahi Froushani SM, Beneficial Effects of Hydroalcoholic Extract of Saffron in Alleviating Experimental Autoimmune Diabetes in C57bl/6 Mice, *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2019; 18(1):38-47.
- [12] Hedegaard C J, Krakauer M, Bendtzen K, Lund H, Sellebjerg F, and Nielsen C H, T helper cell type 1 (Th1), Th2 and Th17 responses to myelin basic protein and disease activity in multiple sclerosis, *Immunology*, 2008; 125(2): 161-169.
- [13] López-Chiriboga AS and Flanagan EP, Diagnostic and therapeutic approach to autoimmune neurologic disorders, *Semin Neurol*, 2018 Jun; 38(3):392-402
- [14] Brotosudarmo THP, Limantara L, Setiyono E, Heriyanto, Structures of Astaxanthin and Their Consequences for Therapeutic Application, *International Journal of Food Science*, 2020 July; 2020, 16 pages
- [15] Zhu Y, Yin L, Ge J, Wu X, Peng Y, Zhang T, Jiang M, Astaxanthin supplementation enriches productive performance, physiological and immunological responses in laying hens, *Anim Biosci*, 2021 Mar; 34(3):443-448.
- [16] Kivisäkk P, Mahad DJ, Callahan MK, Sikora K, Trebst C, Tucky B, *et al*. Expression of CCR7 in multiple sclerosis: implications for CNS immunity, *Ann Neurol*, 2004; 55: 627-638.
- [17] Farrar JD, Murphy KM, Type I interferons and T helper development, *Immunol Today*, 2000; 21: 484-489.
- [18] Lovett-Racke AE, Rocchini AE, Choy J, Northrop SC, Hussain RZ, Ratts RB, *et al*. Silencing T-bet defines a critical role in the differentiation of autoreactive T lymphocytes, *Immunity*, 2004; 21: 719-731.
- [19] Kokhaei P, Choudhury A, Mahdian R, Lundin J, Moshfegh A, Osterborg A, Mellstedt H, Apoptotic tumor cells are superior to tumor cell lysate and tumor cell RNA in induction of autologous T cell response in B-CLL, *Leukemia*, 2004; 18: 1810-1815.
- [20] Huang YM, Xiao BG, Ozenci V, Kouwenhoven M, Teleshova N, Fredrikson S, Link H, Multiple sclerosis is associated with high levels of circulating dendritic cells secreting proinflammatory cytokines, *J Neuroimmunol*, 1999; 99: 82-90.
- [21] Christy AL, Brown MA, The multitasking mast cell: positive and negative roles in the progression of autoimmunity, *J Immunol*, 2007; 179: 2673-2679.
- [22] Hiltensperger M and Korn Th, The Interleukin (IL)-23/T helper (Th)17 Axis in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis, *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2018 Jan; 8(1): a029637(16 pages)
- [23] Lee PW, Smith AJ, Yang Y, Selhorst AJ, Liu Y, Racke MK, and Lovett-Racke AE, IL-23R-activated STAT3/STAT4 is essential for Th1/Th17-mediated CNS autoimmunity, *JCI Insight*. 2017; 2(17): e91663(20 pages)
- [24] von Essen MR, Søndergaard HB, Petersen ERS and Sellebjerg F, IL-6, IL-12, and IL-23 STAT-Pathway Genetic Risk and Responsiveness of Lymphocytes in Patients with Multiple Sclerosis, *Cells*, 2019 Mar; 26;8(3):285(15 pages)
- [25] Martynova E, Goyal M, Johri Sh, Kumar V, Khaibullin T, Rizvanov AA, Verma S, Khaiboullina SF, and Baranwal M, Serum and Cerebrospinal Fluid Cytokine Biomarkers for Diagnosis of Multiple Sclerosis, *Mediators of Inflammation*, 2020; Vol; 2020:1-10
- [26] Zhu N, Liang X, Zhang M, Yin X, Yang H, Zhi Y, Ying G, Zou J, Chen L, Yao X and Li H. Astaxanthin protects cognitive function of vascular dementia, *Behav Brain Funct*, 2020; 16:10
- [27] Miller SD & Karpus WJ. The immunopathogenesis and regulation of Tcell-mediated demyelinating diseases. *Immunology Today*, 1994; 15:356-361.

- [28] Kuan-Hung L, Kao-Chang L, Wan-Jung L, Philip-Aloysius T, Thanasekaran J, Thanasekaran J, and Joen-Rong Sh. Astaxanthin, a Carotenoid, Stimulates Immune Responses by Enhancing IFN- and IL-2 Secretion in Primary Cultured Lymphocytes in Vitro and ex Vivo. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17(1):44; 1-10.
- [29] Kim YH, Koh HK, Kim DS. Down-regulation of IL-6 production by astaxanthin via ERK-, MSK-, and NFkappaB- mediated signals in activated microglia. *Int Immunopharmacol.* 2010b; 10:1560–1572.
- [30] Speranza L, Pesce M, Patruno A, Franceschelli S, de Lutiis MA, Grilli A, Felaco M, Astaxanthin treatment reduced oxidative induced pro-inflammatory cytokines secretion in U937: SHP-1 as a novel biological target, *Mar Drugs*, 2012 Apr; 10(4), 890–9.

The effect of natural Astaxanthin on the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)

Kerishchi Khiabani P^{1*}, Bidaran S²

¹ Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Department of Biology, Faculty of Sciences, Parand Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

* (Corresponding author): parisakerishchi@yahoo.com

Received: July 2021

Accepted: December.2021

Abstract

Phaffia rhodozyma contains the carotenoid astaxanthin, which has *strong antioxidant* activity and anti-inflammatory properties. In the present study, the Effects of astaxanthin produced by *Phaffia rhodozyma* on multiple sclerosis (MS) model of mice were investigated. Mice model of MS or experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) was developed using MOG35-55 peptide in female C57BL/6 mice. Four groups were considered for this study: normal control group mice, EAE group, prevention group mice that received astaxanthin a week before immunization and treatment group that received astaxanthin after immunization at the time of first sign of EAE. Each group consisted of 7 mice. Astaxanthin consumption up to 35 days after immunization continued. Each day 400 mg of *Phaffia rhodozyma* astaxanthin was consumed in this way, the daily consumption pellet was mixed with this amount of astaxanthin. Daily clinical signs and mean body weight were monitored then proliferation was measured by MTT assay; IL23 level (proinflammatory cytokines) and IL4 level (anti-inflammatory cytokine) were measured by ELISA. Observations showed that the mean disease severity in all experimental groups was significantly reduced compared to the EAE group and the mean body weight in the experimental groups had a significant increase compared to the EAE group (P<0.001). Also, Astaxanthin administration significantly reduced the level of inflammatory cytokine, IL23 and increased the level of anti-inflammatory cytokine, IL4 in both experimental groups (P<0.001). The results of MTT test also show a decrease in Proliferation index (The rate of proliferation of immune cells) in both prevention and treatment groups. P<0.001. According to the evidence, it is anticipated that Astaxanthin has special potential for the prevention and treatment of MS in susceptible or diseased individuals, that this requires more extensive studies.

Keywords: Astaxanthin, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), Interlukin 4 (IL4), Interlukin 23 (IL23), *Phaffia rhodozyma*, Multiple Sclerosis.