DOI: 10.22122/jims.v37i539.11901 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و هفتم/شماره‌ی ۵۳۹/هفته‌ی سوم مهر ۱۳۹۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۳/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۶/۴ تاریخ چاپ: ۱۳۹۸/۷/۱۵

بررسی تأثیر ضد التهابی سیاه‌دانه بر روی موش‌های صحرایی ماده‌ی مبتلا به آنسفالومیلیت آلرژیک تجربی

اکبر کریمی[۱]، الهام اعتمادی[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: Multiple sclerosis (MS)، بیماری مزمن و التهابی سیستم عصبی است و پیشرفت بیماری با افزایش سیتوکاین‌های خاص ارتباط دارد. آنسفالومیلیت آلرژیک تجربی، به عنوان یک مدل حیوانی برای بیماری MS در نظر گرفته می‌شود و از آن برای ارزیابی روند بیماری و فرایند درمانی استفاده می‌گردد. با توجه به مطالعات انجام شده در زمینه‌ی فواید گیاه سیاه‌دانه، این مطالعه، با هدف بررسی تأثیر ضد التهابی سیاه‌دانه بر روی موش‌های صحرایی ماده‌ی مبتلا به آنسفالومیلیت آلرژیک تجربی انجام شد.

روش‌ها: در این مطالعه، تعداد ۲۴ سر موش صحرایی ماده‌ی بالغ نژاد Lewis (با میانگین سن ۸-۶ هفته و وزن ۲۲۰-۲۰۰ گرم) در چهار گروه (n = ۶) تقسیم شدند. گروه شاهد نرمال‌سالین و موش‌های صحرایی مبتلا به آنسفالومیلیت آلرژیک تجربی (Experimental autoimmune encephalomyelitis یا EAE) تحت درمان، ۰/۰۵ سی‌سی عصاره‌ی هیدروالکلی سیاه‌دانه را در دزهای (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن) به صورت یک روز در میان به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند. عامل نکروز دهنده‌ی تومور آلفا (Tumor necrosis factor-α یا TNF-α)، پروتئین واکنشگر C (C-Reactive protein یا CRP)، نیترات و تغییرات وزن بدن روزانه ثبت گردید. بعد از پایان دوره‌ی ۱۵ روزه، میزان تولید TNF-α و CRP با استفاده از روش Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) و میزان نیترات توسط دستگاه High-performance liquid chromatography (HPLC) اندازه‌گیری شد. اطلاعات به دست آمده، با استفاده از آزمون‌های آماری One-way ANOVA، Mann-Whitney و آزمون Duncan مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: سطوح سرمی TNF-α، CRP و نیترات سرم وابسته به دز در گروه‌های تیمار نسبت به گروه شاهد به صورت معنی‌داری کاهش نشان داد ($P < ۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: به دلیل این که وضعیت التهاب در روند بیماری MS نقش به‌سزایی دارد، اثرات ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی و محافظتی عصاره‌ی سیاه‌دانه در دز (۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن) موجب کاهش عوامل التهابی و بهبود وضعیت التهابی در موش‌های صحرایی مبتلا به آنسفالومیلیت آلرژیک تجربی می‌گردد.

واژگان کلیدی: سیاه‌دانه، ضد التهاب، آنسفالومیلیت آلرژیک تجربی

ارجاع: کریمی اکبر، اعتمادی الهام. **بررسی تأثیر ضد التهابی سیاه‌دانه بر روی موش‌های صحرایی ماده‌ی مبتلا به آنسفالومیلیت آلرژیک تجربی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۸؛ ۳۷ (۵۳۹): ۹۶۴-۹۵۸

مقدمه

Multiple sclerosis (MS) بیماری نورولوژیک مزمن و التهابی سیستم عصبی مرکزی است که در آن غلاف‌های میلین سلول‌های عصبی در نتیجه‌ی ترکیبی از حملات ایمونولوژیک و اختلال در الیگودندروسیت‌ها آسیب می‌بینند. اگر چه علت بیماری مشخص نیست، اما مکانیزم اصلی آن، آسیب زدن توسط سیستم ایمنی بدن یا اختلال در سلول‌های تولید کننده‌ی غلاف میلین است. این بیماری، در زنان بیشتر از مردان است و نسبت بروز آن در حدود ۳ به ۱ می‌باشد (۲-۱). آنسفالومیلیت آلرژیک تجربی (Experimental autoimmune encephalomyelitis یا EAE)، مدل حیوانی بیماری MS است که در آن سیستم ایمنی به پروتئین میلین سیستم عصبی حمله می‌کند و باعث از بین رفتن میلین و الیگودندروسیت‌ها می‌شود (۳). هر دو بیماری آنسفالومیلیت آلرژیک تجربی و MS، دارای ماهیت التهابی به دلیل حمله‌ی سلول‌های ایمنی می‌باشند (۴).

گزارش شده است که سیتوکاین‌های التهابی، عامل اصلی التهاب در روند بیماری MS هستند. استفاده از آنسفالومیلیت آلرژیک تجربی، بیشتر نقش سیتوکاین ها و آسیب سیستم اعصاب مرکزی ناشی از

۱- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه پیام نور مرکز تهران، تهران، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه پیام نور مرکز تهران، تهران، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: الهام اعتمادی

Email: elham.etmadi@gmail.com

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

سیتوکاین‌ها در فرایند التهاب عصبی و روشی برای توسعه‌ی درمانی که بتواند روند بیماری را معکوس نماید، مشخص می‌کند (۵).

Tumor necrosis factor-α (TNF-α)، سیتوکاین التهابی است و در سیستم عصبی مرکزی به طور عمده توسط میکروگلیا، نورون‌ها و آستروسیت‌ها ایجاد می‌شود و در غلظت‌های بالا، می‌تواند باعث التهاب و آسیب اندام شود (۷-۶).پروتئین واکنشگر C (C-Ractive protein یا CRP)، یک نشانگر التهابی است که توسط سیتوکاین‌های تحریک کننده‌ی کبدی نظیر TNF-α و اینترلوکین (IL-1 و IL-6) تولید می‌گردد (۸).

برخی مطالعات، نشان می دهند که نیتریک اکسید و مشتقات واکنش‌پذیر آن در هماهنگی پاسخ التهابی در پاتوژنز MS که یک بیماری التهابی است، نقش به سزایی دارد. کاهش غلظت نیتریک اکسید سرم، می‌تواند تأثیر بالقوه و تغییر دهنده‌ای در درمان بیماری MS داشته باشد (۹). استفاده از داروهای گیاهی به طور قابل توجهی در بیماران MS افزایش یافته است. به تازگی، مطالعات متعددی نشان داده‌اند برخی از ترکیبات گیاهی دارای اثرات ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی باعث بهبود ترمیم میلین و سرکوب التهاب می‌شوند (۱۰).

گیاه سیاه‌دانه با نام علمی Nigella sativa، دارای اثرات درمانی مختلف نظیر ضد سرطان، ضد درد، ضد میکروب، ضد التهاب و خواص آنتی‌اکسیدانی است. مطالعات آزمایشگاهی، اثرات روغن سیاه‌دانه و ترکیب فعال آن، تیموکینون را به عنوان عامل ضد التهابی و مهار کننده‌ی تولید واسطه‌های التهابی نشان دادند (۱۱). متأسفانه، در حال حاضر درمان MS ممکن نیست؛ علاوه بر این، تمام داروهای تأیید شده برای درمان MS، عوارض بالقوه‌ی جدی دارند و در درمان طولانی مدت، بیماران از بروز این عوارض رنج می‌برند. بنابراین، تلاش برای یافتن درمان کامل و مؤثر، هنوز در حال انجام است. در سال‌های اخیر، تنها روش‌های درمانی جدید بر مبنای اثرات ضد التهابی و مهار کننده‌ی پیشرفت بیماری مطرح شده‌اند. از این رو، با توجه به مطالعات انجام شده در زمینه‌ی فواید گیاه سیاه‌دانه، هدف از انجام این مطالعه، بررسی تأثیر ضد التهابی سیاه‌دانه بر روی موش‌های صحرایی ماده‌ی مبتلا به آنسفالومیلیت آلرژیک تجربی بود.

روش‌ها

این مطالعه‌ی تجربی، بر روی ۲۴ سر موش صحرایی ماده‌ی بالغ نژاد Lewis با میانگین وزنی ۲۲۰-۲۰۰ گرم و محدوده‌ی سنی ۸-۶ هفته از مؤسسه‌ی سرم‌سازی رازی تهیه شد. این پژوهش، مصوب شورای پژوهشی دانشگاه پیام نور مرکز تهران با کد کمیته‌ی اخلاق به شماره‌ی ۹۰۲۶ بود. موش‌ها در لانه‌ی حیوانات دانشگاه پیام نور مرکز اصفهان نگهداری شدند و طی دوره‌ی تیمار، مطابق شرایط استاندارد (تحت دمای ۲۵-۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت ۵۵-۵۰ و تناوب روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته) قرار داشتند. همچنین، دسترسی آزادانه به آب و غذای کافی برای آن‌ها تأمین گردید. موش‌ها طبق اصول مراقبت از حیوانات آزمایشگاهی، پس از یک هفته سازگاری با شرایط محیط و تعیین وزن هر حیوان، در گروه های مختلف به طور تصادفی در چهار گروه (n = ۶) (یک گروه شاهد و سه گروه تیمار) تقسیم شدند. گروه شاهد، یک روز در میان، ۱ سی‌سی نرمال‌سالین دریافت کردند و به عنوان گروه سالم در نظر گرفته شدند. گروه‌های تیمار به صورت یک روز در میان میزان ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره‌ی سیاه‌دانه را دریافت کردند.

مواد مورد استفاده: مواد مورد استفاده در مطالعه ی حاضر، عبارت از ادجوانت کامل فروند (Sigma, USA)، کیت مخصوص TNF-α (Abcam, UK) و مطابق با دستورالعمل کیت به شماره‌ی ab 460700، کیت مخصوص CRP (Omega, UK) و دستگاه High-performance liquid chromatography (HPLC) (Waters, USA) بودند.

روش القای EAE: جهت بررسی روند تأثیر عصاره‌ی سیاه‌دانه بر روند بیماری آنسفالومیلیت آلرژیک تجربی، ۱۸ سر موش صحرایی ماده به سه گروه (n = ۶) برای القای بیماری تقسیم شدند. بیماری در موش‌های صحرایی ماده با استفاده از نخاع خوکچه‌ی هندی به شرح زیر القا شد. خوکچه‌های هندی بیهوش و سپس، نخاع تازه‌ی آن‌ها جدا شد. میزان ۱ گرم از بافت نخاع خوکچه‌ی هندی با ۱ سی‌سی سرم فیزیولوژی ترکیب شد و با دستگاه Shaker مخلوط گردید تا یک مخلوط یک‌دست تهیه شود. آن‌گاه، به میزان ۲ سی‌سی ادجوانت کامل فروند به آن اضافه شد و مخلوط به دست آمده، با استفاده از دستگاه Shaker مخلوط شد تا یک ترکیب امولسیون شده حاصل گردد. میزان ۲۵۰ میکرولیتر از ترکیب مورد نظر به صورت زیر جلدی در ناحیه‌ی پشت هر یک از موش‌ها تزریق شد (۱۲). بررسی شرایط بالینی روز اول تزریق نخاع خوکچه‌ی هندی به عنوان روز صفر پس از واکسینه کردن موش‌ها در نظر گرفته شد. روند بیماری (شدت ناتوانی حرکتی) به صورت روزانه مورد بررسی قرار گرفت.

برای ارزیابی شدت بیماری، از مقیاس ۶ نمره‌ای شامل نمره‌ی صفر (عدم بروز بیماری)، نمره‌ی ۱ (اختلال در حرکت دم)، نمره‌ی ۲ (فلج شدن دم)، نمره‌ی ۳ (فلج جزیی دو پا)، نمره‌ی ۴ (فلج کامل پاها و فلج جزیی دست‌ها)، نمره ی ۵ (فلج کامل چهار دست و پا) و نمره‌ی ۶ (مرگ) استفاده گردید (۱۲). شدت بیماری طبق این مقیاس درجه‌بندی شد. به منظور ارزیابی اثرات درمانی عصاره‌ی سیاه‌دانه بر روند بیماری پس از ایجاد آنسفالومیلیت آلرژیک تجربی و با بروز اولین علایم بالینی، هر سه گروه تیمار تحت درمان قرار گرفتند.

روش تهیه‌ی عصاره‌ی سیاه‌دانه: دانه‌های سیاه‌دانه‌ی گونه‌ی Nigella sativa تهیه و توسط بخش گیاه‌شناسی دانشگاه پیام نور مرکز اصفهان تأیید شد. سپس، توسط آسیاب برقی از آن‌ها پودر تهیه شد. ۳۰ گرم از پودر تهیه شده درون یک ارلن استریل قرار داده شد و به میزان ۴۰ سی‌سی به آن محلول آب و الکل (۳۰ درصد آب و ۷۰ درصد اتانول ۹۶ درجه) اضافه شد. مخلوط به دست آمده، به مدت ۷۲ ساعت در دمای محیط نگهداری شد. سپس، مخلوط با استفاده از دستگاه Shaker به طور کامل مخلوط شد و با کاغذ صافی واتمن صاف و پس از صاف نمودن (۱۳)، مقدار باقی‌مانده‌ی عصاره در محلول محاسبه و از آن دزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم/کیلوگرم تهیه شد (۱۴).

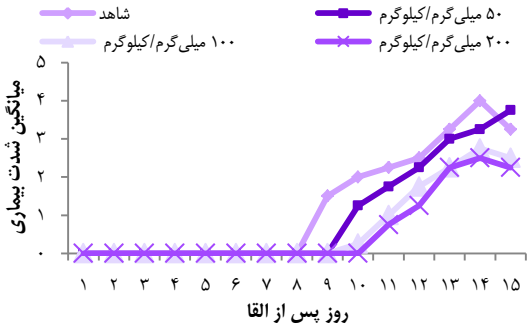
درمان موش‌های مبتلا به EAE با عصاره ی سیاه‌دانه: چهار گروه موش صحرایی مورد مطالعه، شامل گروه شاهد و سه گروه تیمار بودند. گروه شاهد، به صورت یک روز در میان ۱ سی‌سی نرمال‌سالین دریافت کردند. گروه‌های تیمار نیز به صورت یک روز در میان به ترتیب ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره‌ی سیاه‌دانه را دریافت کردند. عصاره با استفاده از سرنگ انسولین ۱ سی سی و به روش درون صفاقی به میزان ۰/۰۵ سی سی هر روز به موش‌ها تزریق شد. تمام تزریق‌ها، به مدت ۱۵ روز و در ساعت ۱۲-۱۰ صورت گرفت.

اندازه‌گیری میزان TNF-α، CRP و نیترات: در روز ۱۵ موش‌ها کشته شدند و با استفاده از خون‌گیری مستقیم از قلب آن‌ها، نمونه‌ی خون تهیه شد. پس از جداسازی سرم از نمونه‌ی خون، میزان TNF-α آن‌ها با روش Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) و با استفاده از کیت مخصوص TNF-α، میزان TNF-α در سرم آن‌ها اندازه‌گیری شد. سطح سرمی CRP نیز اندازه‌گیری شد. برای ارزیابی نیترات پس از جدا کردن سرم هر یک از نمونه ی خون‌ها، سرم به نسبت ۱:۱ با استون در میکروتیوپ‌های اپندرف مخلوط گردید تا پروتئین‌های سرمی حذف شوند. آن گاه، مخلوط به دست آمده از فیلتر سرنگی Millipore به اندازه‌ی ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد تا یک محلول صاف و شفاف به دست آید و در نهایت، میزان ۲۰ میکرولیتر از آن به دستگاه HPLC تزریق گردید و با HPLC، میزان نیترات هر یک در شرکت داروسازی داروپخش اندازه‌گیری شد. ۰/۱۵۰ گرم نیتریت پتاسیم با آب مقطر خالص (Ultrapure) به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد تا غلظت معادل ۱۰۰۰ قسمت در میلیون (Parts-per-million یا PPM) از محلول به دست آید. ۱ سی‌سی از این محلول در بالن به حجم ۱۰۰ رسانده شد تا غلظت ۱۰ قسمت در میلیون ایجاد شود. از این محلول، ۱ سی‌سی برداشته و به حجم ۱۰۰ رسانده شد تا محلول نهایی با غلظت برابر با ۰/۱ قسمت در میلیون حاصل شود. ۰/۱۳۷ گرم از نیترات پتاسیم به یک بالن ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل شد و با آب مقطر خالص به حجم مورد نظر با غلظت ۱۰۰۰ قسمت در میلیون رسید. سپس، یک سی‌سی از این محلول برداشته و در بالن ۱۰۰ میلی‌لیتری دیگری به حجم مورد نظر با غلظت ۱۰ قسمت در میلیون رسانده شد. در نهایت، ۸ میلی‌لیتر از این محلول برداشته و با حجم مورد نظر به غلظت ۰/۸ قسمت در میلیون رسانده شد. سیستم HPLC شامل یک پمپ Waters مدل Sis و دتکتور Photodiode array (PDA) شرکت Waters مدل ۹۹۶ تجهیز شده با یک لوب ۲۰ میکرولیتر ساخت آمریکا بود. جهت ثبت نتایج و گرفتن انتگرال، از نرم‌افزار Millenium نسخه‌ی ۳۲ استفاده شد و موبایل فاز ۱/۰ میلی‌لیتر/دقیقه و ستون به کار رفته، ۲۵۰ × ۴۰۶ میلی‌متر مربع – DS Hypeosil بود که طول موج مورد استفاده، برابر ۲۱۰ نانومتر بود (۱۵).

در این مطالعه، نتایج به دست آمده به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده است. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون‌های آماری One-way ANOVA، Mann-Whitney و آزمون Duncan انجام گرفت. تمام آزمون‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۹ (version 19, SPSS Inc., Chicago, IL) و در سطح معنی‌داری $P < ۰/۰۵۰$ انجام شد.

یافته‌ها

پس از القای بیماری، شرایط بالینی موش‌های صحرایی ماده مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس جدول ۱، به آن‌ها امتیاز داده شد و هر روز میانگین امتیازها ثبت شد. نتایج حاصل از بررسی در شکل ۱ آمده است.



شکل ۱. تغییرات شدت شرایط بد بالینی در روزهای مختلف بعد از ایجاد آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی در گروه‌های تحت درمان. شروع شرایط بد بالینی در گروه‌های گیرنده‌ی عصاره‌ی سیاه‌دانه از روز ۸ به روزهای ۹ و ۱۰ به تأخیر افتاده است و در گروه‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره‌ی سیاه‌دانه، شدت علایم بالینی را کاهش داده است، اما تنها در گروه ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، این کاهش معنی‌دار بوده است ($P < ۰/۰۵۰$).

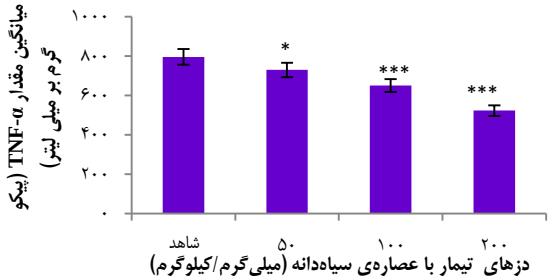
جدول ۱. بررسی و مقایسه‌ی میانگین وضعیت میزان سطح سرمی Tumor necrosis factor-α (TNF-α)، C reactive protein (CRP) و نیترات در گروه‌های مورد مطالعه

متغیر	گروه شاهد	دزهای مختلف تیمار با عصاره‌ی سیاه‌دانه (میلی‌گرم/کیلوگرم)			مقدار P
		۵۰	۱۰۰	۲۰۰	
TNF-α (پیکوگرم/میلی‌لیتر)	۷۹۶/۶۷ ± ۳۶/۶۹	*۷۳۰/۰۰ ± ۴۴/۲۷	***۶۵۱/۶۷ ± ۷۷/۳۰	***۵۲۳/۳۳ ± ۷۱/۷۴	< ۰/۰۰۱
CRP (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	۱۳/۰۰ ± ۱/۴۱	۱۲/۵۰ ± ۱/۳۷	*۱۱/۳۳ ± ۱/۳۶	**۹/۵۰ ± ۱/۸۷	< ۰/۰۱۰
نیترات سرم (قسمت در میلیون)	۷۱/۰۰ ± ۵/۱۷	۷۳/۱۷ ± ۴/۸۷	۶۷/۱۷ ± ۳/۳۷	***۵۵/۰۰ ± ۷/۸۹	< ۰/۰۰۱

* اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه شاهد (P < ۰/۰۵۰)؛ ** اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه شاهد (P < ۰/۰۱۰)؛ *** اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه شاهد (P < ۰/۰۰۱)

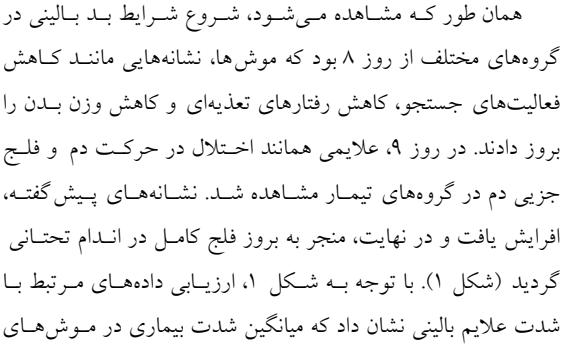
TNF-α: Tumor necrosis factor-α; CRP: C reactive protein

همان طور که مشاهده می‌شود، شروع شرایط بد بالینی در گروه‌های مختلف از روز ۸ بود که موش‌ها، نشانه‌هایی مانند کاهش فعالیت‌های جستجو، کاهش رفتارهای تغذیه‌ای و کاهش وزن بدن را بروز دادند. در روز ۹، علایمی همانند اختلال در حرکت دم و فلج جزیی دم در گروه‌های تیمار مشاهده شد. نشانه‌های پیش‌گفته، افزایش یافت و در نهایت، منجر به بروز فلج کامل در اندام تحتانی گردید (شکل ۱). با توجه به شکل ۱، ارزیابی داده‌های مرتبط با شدت علایم بالینی نشان داد که میانگین شدت بیماری در موش‌های تحت درمان با ۰/۰۵ سی سی عصاره‌ی سیاه‌دانه در همه‌ی گروه‌ها نسبت به گروه شاهد کاهش یافت و شرایط بد بالینی از روز ۸ به روزهای ۹ و ۱۰ به تأخیر افتاد و با مقایسه ی میانگین شدت بیماری مشخص شد که در گروه عصاره‌ی ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، نسبت به گروه شاهد به صورت معنی‌داری کاهش نشان داد (P < ۰/۰۵۰) (شکل ۱). عصاره‌ی سیاه‌دانه با دز ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، می‌تواند به صورت معنی داری علایم و نشانه‌های سخت بالینی در موش‌های مبتلا به آنسفالومیلیت آلرژیک تجربی را کاهش دهد. سطوح سرمی TNF-α در گروه‌های تیمار ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم سیاه‌دانه /کیلوگرم سیاه‌دانه نسبت به گروه شاهد به صورت معنی‌داری کاهش نشان داد (P < ۰/۰۰۱) (شکل ۲، جدول ۱).



شکل ۲. مقایسه‌ی میانگین میزان تغییرات سطح سرمی Tumor necrosis factor-α (TNF-α) به تفکیک گروه‌های مختلف

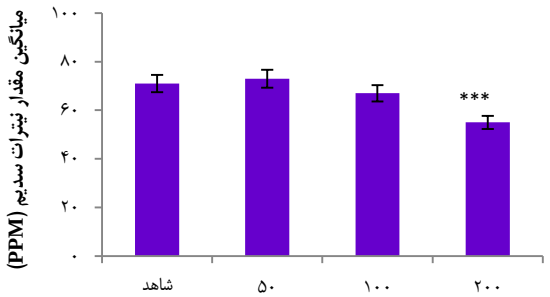
* P < ۰/۰۵۰ اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه شاهد؛ *** P < ۰/۰۰۱ اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه شاهد



شکل ۳. مقایسه‌ی میانگین میزان تغییرات سطح سرمی C reactive protein (CRP) به تفکیک گروه‌های مختلف

* اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه شاهد (P < ۰/۰۵۰)؛ ** اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه شاهد (P < ۰/۰۱۰)

میانگین میزان CRP در گروه‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره‌ی سیاه‌دانه نسبت به گروه شاهد به صورت معنی‌داری کاهش نشان داد (P < ۰/۰۱۰) (شکل ۳، جدول ۱). همچنین، اختلاف میانگین نیترات سرم در گروه ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره‌ی سیاه‌دانه نسبت به گروه شاهد به صورت معنی‌داری کاهش نشان داد (P < ۰/۰۰۱) (شکل ۴، جدول ۱).



شکل ۴. مقایسه‌ی میانگین میزان تغییرات سطح سرمی نیترات به تفکیک گروه‌های مختلف

*** اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه شاهد (P < ۰/۰۰۱)

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که تجویز درمانی و مصرف عصاره ی سیاه‌دانه بر روی موش‌های صحرایی ماده‌ی مبتلا به آنسفالومیلیت آلرژیک تجربی، باعث تأخیر در شروع حمله‌ی بیماری و کاهش شدت شرایط بد بالینی گردید.

در ضمن، با توجه به نمودارهای ارایه شده در شکل‌های ۴-۱، وضعیت التهابی سطوح سرمی TNF-α، CRP و نیترات سرم در موش های صحرایی ماده‌ی مبتلا به آنسفالومیلیت آلرژیک تجربی به صورت معنی داری نسبت به گروه شاهد کاهش نشان داد که این کاهش، نشان از خواص ضد التهابی سیاه‌دانه می‌باشد. طی پیشرفت بیماری MS، سلول‌های T فعال می شوند و ماکوفاژها سیتوکاین‌های ضد التهابی مانند TNF-α، اینترلوکین‌های IL-1 و IL-6 و گاما اینترفرون را ترشح می‌کنند. این سیتوکاین‌ها، می‌توانند نیتریک اکسید را در سیستم عصبی افزایش دهند (۱۶). نیتریک اکسید، بسیار ناپایدار است و به سرعت به نیترات و نیتریت تبدیل می‌شود که منعکس کننده‌ی غلظت نیتریک اکسید هستند (۱۷). تیموکینون سیاه‌دانه، تولید نیتریک اکسید توسط ماکروفاژها را مهار می‌کند؛ این نشان می‌دهد که تیموکینون، اثر مهاری بر تولید نیتریک اکسید از طریق کاهش نیتریک اکسید سنتاز mRNA/NOS (Messenger RNA) می‌کند و ممکن است در بهبود شرایط التهابی و خودایمنی مؤثر باشد. از آن جایی که تیموکینون، جزء اصلی و فعال در دانه‌های سیاه‌دانه است، بنابراین، باعث کاهش قابل توجهی در گروه دریافت کننده‌ی عصاره‌ی سیاه‌دانه می‌شود (۱۸).

سطوح سرمی TNF-α با شدت و سختی آنسفالومیلیت آلرژیک تجربی و بیماری MS در ارتباط است و نقش مهمی در شروع و گسترش بیماری دارد (۱۲). تجویز روزانه ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره‌ی سیاه‌دانه به مدت ۲۱ روز به صورت خوراکی سبب کاهش سطح سیتوکین‌های التهابی و افزایش سیتوکین‌های ضد التهابی می‌گردد. تیموکینون، به عنوان ماده‌ی ضد التهابی به طور قابل توجهی باعث کاهش عوامل التهابی مانند عامل نکروز دهنده‌ی تومور آلفا و اینترلوکین ۱ و ۶ در موش‌های صحرایی می باشد. آنسفالومیلیت آلرژیک تجربی، می‌تواند با تیموکینون درمان گردد و بهبود یابد؛ تیموکینون، از پیشرفت بیماری جلوگیری می‌کند (۱۹).

در مطالعه ی حاضر، مشاهده شد که TNF-α در گروه‌های تیمار با دزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم و نیترات سرم در گروه ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم تحت درمان با عصاره‌ی سیاه‌دانه نسبت به گروه شاهد کاهش نشان داد. نتایج مطالعات قبلی با مطالعه ی حاضر مطابقت دارد. همچنین، نشانگر التهابی CRP مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد میزان سطوح سرمی CRP در گروه‌های تیمار ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم تحت درمان با عصاره‌ی سیاه‌دانه نسبت به گروه شاهد کاهش یافت و این کاهش، می‌تواند نتیجه‌ی حاصل از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی سیاه‌دانه باشد (۱۱).

شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد تعامل پیچیده‌ای بین مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی درون‌زا و برون‌زا وجود دارد. در شرایط فیزیولوژیک، تعادل بین این دو، از استرس اکسیداتیو و افزایش نیتروژن محافظت می‌کند. از سوی دیگر، عامل هسته‌ای تولید شده از اریتروئیدها (Nuclear factor erythroid-derived 2-like2 یا Nrf2) در دفاع از آنتی‌اکسیدان‌ها شرکت می‌کنند. این مولکول، به شدت در تنظیم بسیاری از ژن‌های مختلف مرتبط با فرایندهای التهابی، تنظیم سلول‌های بنیادی و بازسازی آن‌ها نقش دارد (۲۰). در آنسفالومیلیت آلرژیک تجربی، با کاهش آنتی‌اکسیدان‌ها میزان بیان Nrf2 نیز کاهش می‌یابد (۲۱). گزارش شده است که فعال‌سازی Nrf2 به مهار تولید و ترشح سیتوکاین‌های التهابی کمک می‌کند (۲۲). نتایج مطالعات پیش گفته با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر مطابقت دارد. در این مطالعه، می‌توان چنین بیان نمود که اثرات محافظتی عصاره‌ی سیاه‌دانه بر روی موش‌های ناشی از آنسفالومیلیت آلرژیک تجربی، شرایط بد بالینی و میزان سطوح سرمی TNF-α، CRP و نیترات سرم در گروه‌های تیمار تحت درمان نسبت به گروه شاهد کاهش یافته است و این کاهش، می‌تواند به علت نقش ضد التهابی و خواص آنتی‌اکسیدانی سیاه‌دانه باشد (۱۱) که با مهار و سرکوب کردن مولکول‌های التهابی، آن‌ها را به شدت کنترل می‌کند (۲۳).

در پایان، می‌توان نتیجه گرفت به دلیل این که وضعیت التهاب در روند بیماری MS نقش به سزایی دارد، اثرات ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی و محافظتی عصاره‌ی سیاه‌دانه در دز ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، موجب کاهش عوامل التهابی و بهبود وضعیت التهابی در موش‌های صحرایی مبتلا به آنسفالومیلیت آلرژیک تجربی می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از طرح پژوهشی به شماره‌ی ۱۰/۹۰۲۶ می‌باشد. بدین وسیله، از همکاری و پشتیبانی دانشگاه پیام نور مرکز اصفهان و عزیزانی که ما را در انجام این طرح یاری نمودند، تقدیر و تشکر می‌شود.

References

1. Nakahara J, Maeda M, Aiso S, Suzuki N. Current concepts in multiple sclerosis: Autoimmunity versus oligodendrogliopathy. Clin Rev Allergy Immunol 2012; 42(1): 26-34.
2. Bove R, Chitnis T. Sexual disparities in the incidence and course of MS. Clin Immunol 2013; 149(2): 201-10.
3. Moore GR. Current concepts in the neuropathology and pathogenesis of multiple sclerosis. Can J Neurol Sci 2010; 37(Suppl 2): S5-15.
4. Morvaridi A, Delirezh N, Hobbenaghi R, Abtahi Froushani SM, Malekinejad H. The effects of all-trans retinoic acid on clinical symptoms, nitric oxide levels and total antioxidant capacity of plasma in mouse model of multiple sclerosis. Razi J Med Sci 2013; 20(108): 11-9. [In Persian].
5. Palle P, Monaghan KL, Milne SM, Wan ECK. Cytokine Signaling in multiple sclerosis and its therapeutic applications. Med Sci (Basel) 2017; 5(4).
6. Lim SY, Constantinescu CS. TNF-a: A paradigm of paradox and complexity in multiple sclerosis and its animal models. Open Autoimmun J 2010, 2: 160-70.
7. Linkermann A, Stockwell BR, Krautwald S, Anders HJ. Regulated cell death and inflammation: An auto-amplification loop causes organ failure. Nat Rev Immunol 2014; 14(11): 759-67.
8. Wang Z, Hoy WE. C-reactive protein and the risk of developing type 2 diabetes in Aboriginal Australians. Diabetes Res Clin Pract 2007; 76(1): 37-43.
9. Niedziela N, Adamczyk-Sowa M, Niedziela JT, Mazur B, Kluczewska E, Sowa P, et al. Assessment of serum nitrogen species and inflammatory parameters in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with different therapeutic approaches. Biomed Res Int 2016; 2016: 4570351.
10. Mohajeri M, Sadeghizadeh M, Najafi F, Javan M. Polymerized nano-curcumin attenuates neurological symptoms in EAE model of multiple sclerosis through down regulation of inflammatory and oxidative processes and enhancing neuroprotection and myelin repair. Neuropharmacology 2015; 99: 156-67.
11. Fahmy HM, Noor NA, Mohammed FF, Elsayed AA, Radwan NM. Nigella sativa as an anti-inflammatory and promising remyelinating agent in the cortex and hippocampus of experimental autoimmune encephalomyelitis-induced rats. The Journal of Basic and Applied Zoology 2014; 67(5): 182-95.
12. 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.
13. Mirdar S, Arabzadeh E, Arzani A, Ahmadi S, Neyestani F, Baghbani M. Comparison of time periods and different patterns of tipper with black currant supplementation on weight variation and endurance performance of the growing male Wistar rats. Journl of Applied Exercise Physiology 2013; 10(20): 115-28. [In Persian].
14. Modaresi M, Poor-Naji N. The effect of black seed (Nigella sativa) hydro-alcoholic extract on breeding factors in female mice. J Shahrekord Univ Med Sci 2012; 13(6): 63-70. [In Persian].
15. Xia DS, Deng DJ, Wang SL. Destruction of parotid glands affects nitrate and nitrite metabolism. J Dent Res 2003; 82(2): 101-5.
16. Poyraz T, Idiman E, Uysal S, Iyilikci L, Ozakbas S, Coskuner PE, et al. The cooling effect on proinflammatory cytokines interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and nitric oxide in patients with multiple sclerosis. ISRN Neurol 2013; 2013: 964572.
17. Roghani M, Mahboudi F, Saharian MA, Etemadifar M, Esfahani AN, Nahrevanian H, et al. Concentrations of nitric oxide metabolites in the serum of Iranian multiple sclerosis patients. J Neurol Sci 2010; 294(1-2): 92-4.
18. Noor NA, Fahmy HM, Mohammed FF, Elsayed AA, Radwan NM. Nigella sativa amliorates inflammation and demyelination in the experimental autoimmune encephalomyelitis-induced Wistar rats. Int J Clin Exp Pathol 2015; 8(6): 6269-86.
19. Umar S, Zargan J, Umar K, Ahmad S, Katiyar CK, Khan HA. Modulation of the oxidative stress and inflammatory cytokine response by thymoquinone in the collagen induced arthritis in Wistar rats. Chem Biol Interact 2012; 197(1): 40-6.
20. Draheim T, Liessem A, Scheld M, Wilms F, Weissflog M, Denecke B, et al. Activation of the astrocytic Nrf2/ARE system ameliorates the formation of demyelinating lesions in a multiple sclerosis animal model. Glia 2016; 64(12): 2219-30.
21. Morales Pantoja IE, Hu CL, Perrone-Bizzozero NI, Zheng J, Bizzozero OA. Nrf2-dysregulation correlates with reduced synthesis and low glutathione levels in experimental autoimmune encephalomyelitis. J Neurochem 2016; 139(4): 640-50.
22. Murakami S, Motohashi H. Recent advances in elucidating KEAP1-NRF2 functions in hematopoietic/immune cells and leukemic cells. Rinsho Ketsueki 2016; 57(10): 1860-8.
23. Butt MS, Sultan MT. Nigella sativa: Reduces the risk of various maladies. Crit Rev Food Sci Nutr 2010; 50(7): 654-65.

DOI: *10.22122/jims.v37i539.11901* *Published by Vesnu Publications*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 37, No. 539, 3rd Week, October 2019**

Received: 09.06.2019 Accepted: 26.08.2019 Published: 07.10.2019

Investigating the Anti-inflammatory Effect of Nigella Sativa in Female Rats with Experimental Allergic Encephalomyelitis

Akbar Karimi[1], Elham Etemadi[2]

Original Article

Abstract

Background: Multiple sclerosis (MS) is a chronic and inflammatory disease of the nervous system, and the progression of the disease is associated with an increase in specific cytokines. Experimental allergic encephalomyelitis is considered as an animal model for MS, and is used to assess the disease process and therapeutic process. According to studies on the benefits of Nigella sativa, the aim of this study was to evaluate the anti-inflammatory effect of Nigella sativa on female rats with experimental allergic encephalomyelitis.

Methods: In this study, 24 adult Lewis female rat (average age of 6 to 8 weeks, weighing 200-220 g) were selected in 4 groups of 6. The control mice received normal saline and the ones with experimental allergic encephalomyelitis received 0/05 cc of hydroalcoholic extract of Nigella sativa at doses of 50, 100, and 200 mg/kg body weight every other day as intraperitoneal injection. Symptoms of disease and body weight changes were recorded in daily bases. Tumor necrosis factor-α (TNF-α), C-reactive protein (CRP), nitrate, and body weight changes were recorded daily. After the end of the period (15 days), the production of TNF-α and CRP was measured using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nitrate levels using high-performance liquid chromatography (HPLC). The collected data were analyzed using one-way ANOVA and Duncan tests.

Findings: Serum levels of TNF-α, CRP, and nitrate were significantly lower in treatment groups than the control group ($P < 0.001$).

Conclusion: Because inflammation plays an important role in the process of MS, the anti-inflammatory, antioxidant, and protective effects of the extract of dandelion (200 mg/kg body weight) reduce inflammatory factors and improve inflammatory status in rats with experimental allergic encephalomyelitis.

Keywords: Nigella sativa, Anti-Inflammatories, Experimental allergic encephalomyelitis

Citation: Karimi A, Etemadi E. **Investigating the Anti-inflammatory Effect of Nigella Sativa in Female Rats with Experimental Allergic Encephalomyelitis.** J Isfahan Med Sch 2019; 37(539): 958-64.

1- Assistant Professor, Department of Biology, School of Science, Payame Noor University, Tehran, Iran
2- Department of Biology, School of Science, Payame Noor University, Tehran, Iran
Corresponding Author: Elham Etemadi, Email: elham.etmadi@gmail.com