

## بررسی اثر ویتامین D<sub>3</sub> در ارتشاح لکوسیتی به مغز موشهای مبتلا به آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی

قاسم مسیبی<sup>1</sup>، علی قضاوی<sup>2</sup>، حسین صالحی<sup>3</sup>

1- استادیار، دانشگاه علوم پزشکی اراک، گروه ایمنی شناسی

2- مربی، عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی اراک، گروه ایمنی شناسی

3- مربی، عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی اراک، گروه بافت شناسی

یافته / دوره هشتم / شماره 3 / پاییز 85 / مسلسل 29

### چکیده

دریافت مقاله: 85/2/25، پذیرش مقاله: 85/6/6

**Ø** مقدمه: در بیماریهایی مثل مولتیپل اسکلروزیس و آنسفالومیلیت خودایمن تجربی ارتشاح لکوسیتی به داخل سیستم عصبی مرکزی در پاتوژنز و پیشرفت بیماری مؤثر می باشد. برخی بررسی ها نشان می دهد که تجویز ویتامین D<sub>3</sub> (فرم فعال ویتامین D) به موشهای مبتلا به EAE، شدت بیماری را تعدیل می کند. هدف از این مطالعه، بررسی کار آمدی ویتامین D<sub>3</sub> در مهار EAE، اثر ویتامین D<sub>3</sub> روی میزان ارتشاح لکوسیتی به مغز موشهای مبتلا به EAE مورد مطالعه می باشد.

**Ø** مواد و روش ها: موش های نر نژاد C57BL/6 در دو گروه درمانی (هر گروه 8 رأس) با شرایط سنی و وزنی مشابه قرار گرفتند. موش های گروه مطالعه (مبتلا به EAE تحت درمان با ویتامین D<sub>3</sub>) یک روز در میان 5 میکروگرم ویتامین D<sub>3</sub> به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی از سه روز قبل تا 19 روز پس از ایجاد بیماری دریافت کردند. موش های گروه شاهد (مبتلا به EAE درمان نشده) تنها حلال ویتامین را با همان جدول زمانی دریافت نمودند. همچنین 5 رأس موش نر نژاد C57BL/6 با شرایط سنی و وزنی مشابه به عنوان گروه سالم در نظر گرفته شد.

**Ø** یافته ها: نتایج نشان داد که شدت علائم کلینیکی در موش های تحت درمان با ویتامین D<sub>3</sub> (3/2±0/8) در مقایسه با گروه درمان نشده (5/3±0/44) بطور معنی داری کمتر می باشد (p<0/001). همچنین اختلاف معنی داری در تعداد سلولهای ارتشاح یافته به مغز، بین موشهای مبتلا به EAE درمان شده با ویتامین D<sub>3</sub> و درمان نشده مشاهده شد (p<0/01).

**Ø** بحث و نتیجه گیری: این نتایج مشخص می نماید که درمان با ویتامین D<sub>3</sub> موجب کاهش ارتشاح لکوسیت ها به مغز موشهای مبتلا به EAE شده و سبب کاهش ضایعات پاتولوژیک و علائم کلینیکی و تعدیل بیماری می گردد. لذا ویتامین D<sub>3</sub> ممکن است در درمان بیماریهای التهابی همراه با ارتشاح سلولی به داخل بافت، مفید باشد.

واژه های کلیدی: مولتیپل اسکلروزیس، آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی، ویتامین D<sub>3</sub>، ارتشاح لکوسیتی، موش نژاد C57BL/6

## مقدمه

بیماری مولتیپل اسکلروزیس<sup>1</sup> از دسته بیماریهای خود ایمن التهابی است که سیستم عصبی مرکزی را درگیر می کند (1). علامت بارز و مشخص پاتولوژی بیماری، وجود پلاکهای متعدد می باشد که در ماده سفید مغز به دلیل تخریب میلین ظاهر می گردد. علت ایجاد پلاکهای مغزی، ارتشاح لنفوسیتها و ماکروفاژها به مغز و ایجاد واکنش التهابی می باشد. علائم و نشانه های عصبی در بیماران، به وسعت و محل پلاک بستگی دارد (2، 3). هر عاملی که مانع از ارتشاح سلولی به مغز گردد یا میزان ارتشاح را کاهش دهد، می تواند از پیشرفت بیماری جلوگیری کند. مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می دهد در مناطقی که غذاهای سرشار از ویتامین D<sub>3</sub> مصرف می کنند یا در معرض بیشتر با نور خورشید قرار دارند، شیوع مولتیپل اسکلروزیس کمتر است (4-6).

مطالعات انجام شده بر روی آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی<sup>2</sup> (مدل حیوانی مولتیپل اسکلروزیس) نیز نشان می دهد که ویتامین D<sub>3</sub> از پیشرفت بیماری جلوگیری می کند (7، 8). چگونگی مهار آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی توسط ویتامین D<sub>3</sub> مشخص نیست. پاره ای مطالعات نشان می دهد که ویتامین D<sub>3</sub> با اثر ایمونومودولاتوری موجب مهار پاسخهای ایمنی می شود (9، 10). اسپچ<sup>3</sup> و همکاران نشان دادند که ویتامین D<sub>3</sub> از طریق القا آپوپتوز در سلولهای التهابی از پیشرفت بیماری جلوگیری می کند (11). ویتامین D<sub>3</sub> ممکن است به عنوان یک تنظیم کننده فاکتور های نسخه برداری عمل کند و با مهار تولید سیتوکاینهای التهابی سبب کاهش شدت بیماری گردد (12، 13). در هر صورت در خصوص عملکرد ویتامین D<sub>3</sub> در مهار بیماری مکانیسم های متعددی را مطرح می کنند. این احتمال وجود دارد که ویتامین D<sub>3</sub> با جلوگیری از ارتشاح سلولی بتواند در مهار بیماری مؤثر باشد. براین اساس در مطالعه حاضر اثر ویتامین D<sub>3</sub> بر میزان ارتشاح لکوسیتی به مغز موشهای مبتلا به آنسفالومیلیت خود ایمن

تجربی به عنوان مدل حیوانی مولتیپل اسکلروزیس، مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی که به صورت موردی - شاهدی انجام شده، جامعه مورد مطالعه، موشهای نر خالص<sup>4</sup> نژاد C57BL/6 با محدوده سنی 6 تا 8 هفته بودند که از مرکز تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی تهیه شدند.

## القا EAE:

مقدار 200 میکروگرم پپتید MOG35-55 با توالی (M-E-V-G-W-Y-R-S-P-F-S-R-V-V-H-L-Y-R-) (N-G-K) و درجه خلوص بیشتر از 95% (شرکت فارما 2، روسیه)، در 100 میکرولیتر بافر فسفات سالین و 100 میکرولیتر ادجوانت کامل فروند (سیگما3)، مخلوط و به صورت زیر جلدی در ناحیه پشت به هر موش C57BL/6 تزریق گردید. مقدار 400 نانوگرم سم سیاه سرفه (سیگما) در حجم 300-400 میکرولیتر بافر فسفات در مرحله صفر و 48 ساعت بعد از ایمونیزاسیون به صورت داخل صفاقی تجویز شد (14). جهت گروه کنترل نیز مراحل فوق اعمال شد با این تفاوت که به آنها پپتید MOG35-55 تجویز نشد. روند بیماری و تغییرات وزن موشها روزانه مورد بررسی قرار گرفت و شدت بیماری از صفر (عدم ابتلا به بیماری)، یک (اختلال در حرکت دم)، دو (فلج شدن دم)، سه (اختلال در راه رفتن)، چهار (فلجی یک پا)، پنج (فلجی هر دو پا)، شش (فلجی کامل دست و پا) تا هفت (مرگ) درجه بندی شد (15).

درمان موشهای مبتلا به EAE با ویتامین D<sub>3</sub>

جهت تأثیر ویتامین D<sub>3</sub> بر روند بیماری EAE، از موشهای نر نژاد C57BL/6 (6-8 هفته ای) استفاده شد. 16 رأس موش سه روز قبل از ایجاد بیماری، به 2 گروه (در هر

1. Multiple sclerosis
2. experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)
3. Spach
4. inbred

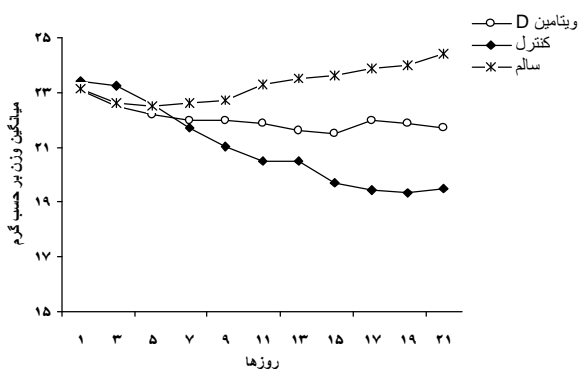
رنگ آمیزی شدند و از نظر تعداد محل های ارتشاح و شدت ارتشاح لکوسیتهی با استفاده از میکروسکوپ نیکن - مدل لاب فوت دو<sup>2</sup> مورد بررسی قرار گرفتند (18).

آنالیز آماری:

جهت مقایسه میانگین ها (میانگین وزن و شدت بیماری و تعداد سلولهای ارتشاحی) از روش غیر پارامتریک من ویتنی<sup>3</sup> استفاده شد. از آزمون فریدمن<sup>4</sup> به منظور بررسی تغییرات شدت بیماری در هر گروه و برای مقایسه وزن در روزهای مختلف نیز از روش اندازه گیری تکراری<sup>5</sup> استفاده گردید.  $p < 0/05$  به عنوان سطح معنی دار بودن داده ها در نظر گرفته شد.

### یافته ها

با بررسی تغییرات وزن در موشهای مبتلا به EAE درمان نشده (کنترل) و موشهای سالم مشخص گردید که میانگین وزن موشهای مبتلا به EAE در مقایسه با موشهای سالم بطور معنی داری کمتر است ( $p < 0/001$ ). با مقایسه میانگین تغییرات وزن در موشهای مبتلا به EAE درمان نشده (کنترل) و موشهای تحت درمان با ویتامین D<sub>3</sub> مشخص گردید که موشهای تحت درمان با ویتامین D<sub>3</sub> کاهش وزن کمتری در مقایسه با گروه درمان نشده داشتند (نمودار 1).



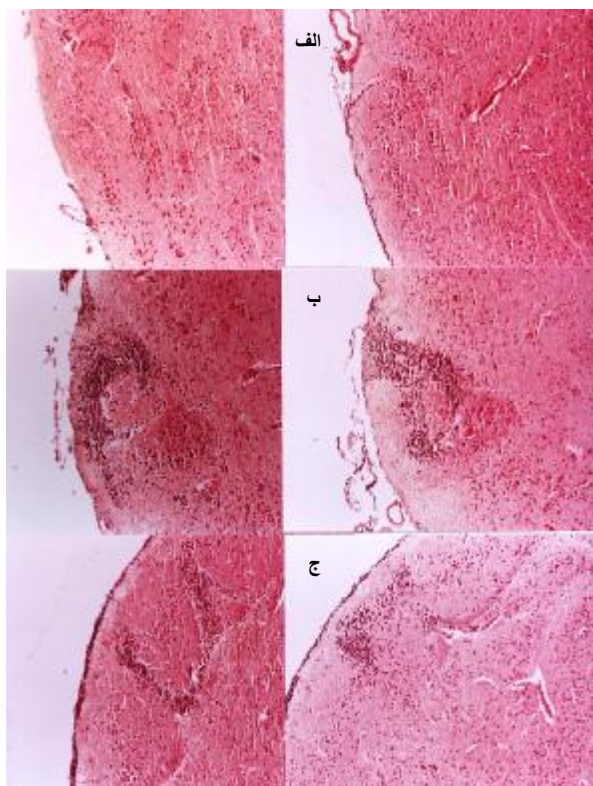
نمودار شماره 1- مقایسه میانگین تغییرات وزن در موشهای مبتلا به EAE درمان نشده (کنترل) و موشهای مبتلا به EAE تحت درمان با ویتامین D<sub>3</sub> و موشهای سالم

گروه 8 رأس) با شرایط سنی و وزنی یکسان تقسیم بندی شدند و به صورت زیر تا روز نوزدهم پس از ایجاد EAE، تحت درمان قرار گرفتند. گروه مطالعه: موشهای مبتلا به EAE که به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، 5 میکروگرم ویتامین D<sub>3</sub> در 150 میکرولیتر روغن کنجد هر دو روز یک بار به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. گروه شاهد: موشهای مبتلا به EAE که به هر موش 150 میکرو لیتر روغن کنجد هر دو روز یک بار به صورت داخل صفاقی تجویز شد. در ضمن 5 رأس موش که از نظر جنس، نژاد، سن و وزن با دو گروه مذکور مشابه بودند به عنوان موشهای سالم غیر بیمار در نظر گرفته شد که تنها روغن کنجد دریافت نمودند. انتخاب دوز تزریقی ویتامین در این مطالعه بر اساس مطالعات مشابهی بود که از این ویتامین جهت درمان بیماریها در مدل‌های حیوانی استفاده شده است (16).

تهیه برشهای مغزی و بررسی ارتشاح سلولی:

پس از گذشت بیست روز از زمان ایجاد EAE، مغز حیوانات (5 رأس از هر گروه) خارج و در محلول فرمالین بافره خنثی 10 درصد قرار گرفت. پس از 48 ساعت، با برش سائیتال مغز به دو قسمت تقسیم شد. نیمکره چپ هر موش مجدداً در فیکساتور گذاشته شد. با توجه به اینکه اختلالات با درگیری اندام های حرکتی سمت راست همراه بود، نیمکره سمت چپ جهت مطالعه مناسب تر می باشد. سپس نمونه ها در داخل دستگاه فراهم آورنده بافت<sup>1</sup> (مدل DS2000/H) قرار داده شده تا پاساژ بافتی صورت گیرد. پس از پاساژ بلوک های پارافینی تهیه شد. نمونه های بافتی در جهت طولی، به طوری که محل برش سائیتال به طرف پایین باشد، داخل بلوک قرار گرفتند. با استفاده از میکروتوم (مدل 4055) از نمونه ها، برشهای با ضخامت 8 میکرونی تهیه گردید و به فاصله هر ده برش، یک برش انتخاب شد. برای هر نمونه 12 برش و در هر گروه مجموعاً 60 برش تهیه شد. این برشها طولی (سائیتال) تهیه شد تا حواشی بطن های طرفی در برش نشان داده شود، زیرا بیشتر پلاک ها و ارتشاح لکوسیتهی در اطراف بطن های طرفی دیده می شود (17). نمونه ها با روش هماتوکسیلین-ئوزین

1. Tissue Processor  
2. Nikon-Model labphot-2  
3. Mann Whitney-U  
4. Friedman  
5. Repeated measurement



شکل شماره ۱- مقایسه ارتشاح سلولی در مغز موشهای سالم (الف) و موشهای مبتلا به EAE درمان نشده (ب) و درمان شده با ویتامین (ج). برشها با قطر 8 میکرون از مغز تهیه گردید. نمونه ها با روش هماتوکسیلین - ائوزین رنگ آمیزی و با بزرگنمایی (10<sup>10</sup>) بررسی شدند

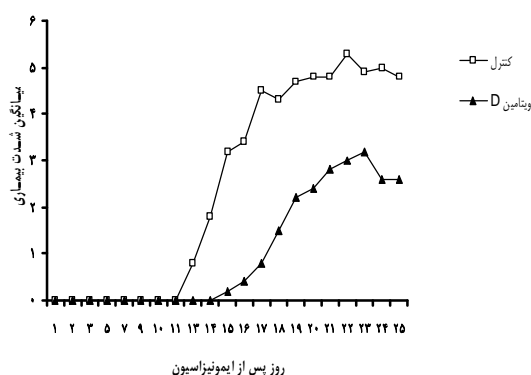
### بحث و نتیجه گیری

بیماری مولتیپل اسکلروزیس و آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی (مدل حیوانی مولتیپل اسکلروزیس) از دسته بیماریهای التهابی هستند که با ارتشاح لکوسیتی به بافت مغز و نخاع همراه است. سلولهای ارتشاح یافته به بافت مغزی موجب ایجاد واکنشهای التهابی در بافت مغزی شده و سبب تخریب میلین می شوند. شدت ضایعات به میزان ارتشاح سلولی بستگی دارد (1-3).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تجویز ویتامین D<sub>3</sub> به موش های مبتلا به EAE باعث کاهش شدت علائم کلینیکی بیماری می گردد. همچنین در این گروه مرحله شروع یا حمله بیماری در مقایسه با گروه کنترل (درمان نشده) با تأخیر همراه

با بررسی روند بیماری در هر گروه و مقایسه روز شروع بیماری و شدت بیماری مشخص گردید که بین روز شروع بیماری در گروههای درمان نشده و درمان شده تفاوت قابل توجه ای وجود دارد. روز شروع بیماری در موشهای مبتلا به EAE درمان نشده 11 روز پس از زمان ایجاد EAE بود در حالی که در موشهای تحت درمان با ویتامین D<sub>3</sub>، زمان شروع علائم 15 روز پس از القا EAE بود (نمودار 2).

با مقایسه میانگین حداکثر شدت بیماری در گروههای مختلف مشخص شد که میانگین حداکثر شدت بیماری در موشهای تحت درمان با ویتامین D<sub>3</sub> ( $3/2 \pm 0/8$ ) در مقایسه با موشهای مبتلا به EAE درمان نشده ( $5/3 \pm 0/44$ ) به طور معنی داری کمتر می باشد ( $p < 0/001$ ) (نمودار 2).



نمودار شماره 2- مقایسه میانگین شدت بیماری در روزهای مختلف پس از ایمونیزاسیون در موشهای مبتلا به EAE درمان نشده (کنترل) و موشهای مبتلا به EAE تحت درمان با ویتامین D<sub>3</sub>

بررسی برشهای مغزی از نظر میزان ارتشاح لکوسیتی نشان داد که میانگین تعداد مکانهای ارتشاح سلولی در موشهای مبتلا به EAE درمان شده با ویتامین D<sub>3</sub> در مقایسه با گروه درمان نشده بطور قابل توجهی کمتر بود (شکل 1). همچنین با شمارش تقریبی سلولهای ارتشاح یافته در محلهای ارتشاح مشخص گردید که میانگین تعداد سلولها در محل ارتشاح در موشهای مبتلا به EAE درمان شده ( $63 \pm 13$ ) در مقایسه با گروه درمان نشده ( $120 \pm 20$ ) کمتر است ( $p < 0/01$ ).

ارتشاح یافته به بافت مغزی باشد. این احتمال را نیز می توان مطرح نمود که ویتامین D<sub>3</sub> ممکن است با تأثیر بر روی سد خونی - مغزی و افزایش پایداری این سد، سبب کاهش ارتشاح سلولی گردد. در هر صورت مکانیسم دقیق ویتامین D<sub>3</sub> در مهار بیماری EAE و کاهش ارتشاح سلولی مشخص نیست و نیاز به مطالعات بیشتری در این زمینه دارد.

در مجموع ویتامین D<sub>3</sub> با کاهش ارتشاح سلولی به بافت مغز از پیشرفت بیماری EAE جلوگیری می کند و باعث تأخیر در شروع بیماری و کاهش شدت بیماری می شود. به نظر می رسد که ویتامین D<sub>3</sub> بتواند در درمان بیماریهای التهابی از جمله مولتیپل اسکلروزیس که با ارتشاح سلولی به داخل بافت همراه است، مفید باشد.

### تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک می باشد که بدینوسیله از زحمات همه همکاران محترم آن معاونت و شورای محترم پژوهشی تشکر و قدردانی می نمایم.

است. با بررسی برشهای مغزی نیز مشخص گردید که تعداد مکانهای ارتشاح و همچنین تعداد سلولهای ارتشاح یافته به مغز در موشهای که تحت درمان با ویتامین D<sub>3</sub> قرار داشتند به طور قابل توجهی در مقایسه با گروه درمان نشده کمتر است. این نتایج نشان داد 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 ویتامین D<sub>3</sub> بودند، مشخص نیست.

یافته های قبلی نشان می دهد که ویتامین D<sub>3</sub> در تعدیل پاسخهای ایمنی نقش دارد (19). ویتامین D<sub>3</sub> ممکن است با مهار تولید سیتوکاین های التهابی باعث کاهش فراخوانی سلولی به محل التهاب گردد. برخی گزارشات نشان می دهد که ویتامین D<sub>3</sub> سبب کاهش تولید IFN- $\gamma$  و IL-2 می شود (20). این سیتوکاینها در تکثیر سلولی نقش دارند و کاهش این سیتوکاین ها باعث کاهش تکثیر سلولی در محل التهاب می شود (21، 22).

برخی گزارشات حاکی از آن است که ویتامین D<sub>3</sub> با القا آپوپتوز در تعدیل پاسخهای ایمنی نقش دارد (7). یکی از دلایل کاهش ارتشاح سلولی به مغز در موشهای تحت درمان با ویتامین D<sub>3</sub> ممکن است ناشی از افزایش آپوپتوز سلولهای

## References

- Lassmann H. Multiple sclerosis pathology: evolution of pathogenetic concepts. *Brain Pathol.* 2005; 15(3): 217-22
- Hemmer B, Cepok S, Zhou D, Sommer N. Multiple sclerosis a coordinated immune attack across the blood brain barrier. *Curr Neurovasc Res.* 2004; 1(2): 141-50
- Zhao C, Fancy SP, Kotter MR, Li WW, Franklin RJ. Mechanisms of CNS remyelination the key to therapeutic advances. *J Neurol Sci.* 2005 15; 233(1-2): 87-91
- Schwarz S, Leweling H. Multiple sclerosis and nutrition. *Mult Scler.* 2005; 11(1): 24-32
- Ebers GC, Sadovnick AD, Veith R. Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology.* 2004; 63(5): 939
- Ponsonby AL, Lucas RM, Van der Mei IA. A potential role for UVR and Vitamin D in the induction of Multiple Sclerosis, Type 1 Diabetes, Rheumatoid Arthritis. *Photochem Photobiol.* 2005 Feb 1; [Epub ahead of print]
- Spach KM, Hayes CE. Vitamin confers protection from autoimmune encephalomyelitis only in female mice. *J Immunol.* 2005; 175(6): 4119-26
- Garcion E, Sindji L, Nataf S, Brachet P, Darcy F, Montero-Menei CN. Treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis in rat by 1, 25- dihydroxyvitamin leads to early effects within the central nervous system. *Acta Neuropathol (Berl).* 2003; 105(5): 438-48
- May E, Asadullah K, Zugel U. Immunoregulation through 1, 25- dihydroxyvitamin and its analogs. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2004; 3(4): 377-93
- Deluca HF, Cantorna MT. Vitamin D: its role and uses in immunology. *FASEB J.* 2001; 15(14): 2579-85
- Spach KM, Pedersen LB, Nashold FE, Kayo T, Yandell BS, Prolla TA, et al. Gene expression analysis suggests that 1, 25- dihydroxyvitamin reverses experimental autoimmune encephalomyelitis by stimulating inflammatory cell apoptosis. *Physiol Genomics.* 2004; 18(2):141-51
- Hahn HJ, Kuttler B, Mathieu C, Bouillon R. 1, 25- Dihydroxyvitamin reduces MHC antigen expression on pancreatic beta-cells in vitro. *Transplant Proc.* 1997 Jun; 29(4): 2156-7
- Cantorna MT, Humpal-Winter J, DeLuca HF. In vivo upregulation of interleukin-4 is one mechanism underlying the immunoregulatory effects of 1, 25- dihydroxyvitamin D(3). *Arch Biochem Biophys.* 2000; 377(1): 135-8
- Skundric DS, Zakarian V, Dai R, Lisak RP, Tse HY, James J. Distinct immune regulation of the response to H-2b restricted epitope of MOG causes relapsing-remitting EAE in H-2b/s mice. *J Neuroimmunol.* 2003; 136(1-2): 34-45
- Costa O, Divoux D, Ischenko A, Tron F, Fontaine M. Optimization of an animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis achieved with a multiple MOG (35-55) peptide in C57BL6/J strain of mice. *J Autoimmun.* 2003; 20(1): 51-61
- Lemire JM, Archer DC. 1, 25- dihydroxyvitamin prevents the in vivo induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest.* 1991 Mar; 87(3): 1103-7

17. Frosch MP, Anthony DC, De Girolami U. The central nervous system. In; Kumar V, Abbas AK, Fausto N. editors. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7th ed. Elsevier Saunders. 2005: 1347-420
18. Chan K and Lowe J. Techniques in neuropathology. In: Bancroft JD, Gamble M. editors. Theory and practice of histological techniques. Churchill Livingstone. 2002: 371-414
19. Lemire J. 1, 25-Dihydroxyvitamin a hormone with immunomodulatory properties. Z Rheumatol. 2000; 59 Suppl 1: 24-7
20. Mattner F, Smioldo S, Galbiati F, Muller M, Di Lucia P, Poliani PL, et al. Inhibition of Th1 development and treatment of chronic-relapsing experimental allergic encephalomyelitis by a non-hypercalcemic analogue of 1,25-dihydroxyvitamin D(3). Eur J Immunol. 2000 Feb; 30(2): 498-508
21. Cantorna MT, Woodward WD, Hayes CE, DeLuca HF. 1, 25-dihydroxyvitamin is a positive regulator for the two anti-encephalitogenic cytokines TGF-beta 1 and IL-4. J Immunol. 1998 Jun 1; 160 (11): 5314-9
22. Yan SS, Wu ZY, Zhang HP, Furtado G, Chen X, Yan SF, et al. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by selective blockade of encephalitogenic T-cell infiltration of the central nervous system. Nat Med. 2003; 9(3): 287-93