

پیش‌درمانی با پیپرین سیستم ایمنی را در مدل دمیلیناسیون موضعی هیپوکامپ تعدیل می‌کند

حنازه روشن‌بخش^۱ (M.Sc.)، محمود اله دادی سلمانی^۱ (Ph.D.)، سیمین نامور آغداش^۲ (Ph.D.)، سید راحله احمدیان^۳ (M.Sc.)، فرشته پورعبدالحسین^۴ (Ph.D.)

۱- دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

۳- کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

۴- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۵/۶

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۱-۳۲۱۹۹۵۹۲-۰۱۱ pourabdolhossein@gmail.com

چکیده

هدف: فرایندهای التهابی نقش مهمی در پاتوفیزیولوژی بیماری مالتیپل اسکلروزیس (MS) دارند، بنابراین کنترل آن‌ها می‌تواند استراتژی موثری در درمان MS باشد. پیپرین (اصلی‌ترین آلکالوئید فلفل سیاه) تعدیل‌کننده سیستم ایمنی و ضد التهاب است. در این پژوهش اثر پیش‌درمانی با پیپرین بر ترمیم میلین، بیان ژن سایتوکاین‌های التهابی و ضدالتهابی و فاکتورهای رشد بررسی شد.

مواد و روش‌ها: موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار (۲۵۰-۲۰۰ گرم) در ۴ گروه آزمایشی (۱: کنترل، ۲: لیزولستین، ۳: لیزولستین+حلال، ۴: پیش‌درمان با پیپرین+لیزولستین) مورد مطالعه قرار گرفتند (n=۸). پیش‌درمانی با پیپرین با دوز ۵mg/kg دو هفته قبل از القاء مدل موضعی دمیلیناسیون با تزریق دو طرفه لیزولستین در نواحی CA1 هیپوکامپ، تا پایان دوره انجام شد. ترمیم میلین با رنگ آمیزی اختصاصی میلین مورد بررسی قرار گرفت. ارزیابی فعالیت آستروسیت‌ها با تکنیک ایمونوهیستوشیمی و بیان ژن‌های IL-1 β , TNF- α , NF-KB, FOXP3, IL-10, BDNF, NGF در بافت هیپوکامپ، با qPCR انجام شد.

یافته‌ها: پیش‌درمانی با پیپرین به صورت معناداری وسعت دمیلیناسیون را کاهش و میزان شدت میلین را افزایش داد. هم‌چنین باعث کاهش فعالیت سلول‌های گلیال، کاهش بیان سایتوکاین‌های التهابی (IL-1 β و TNF- α , NF-kB) و افزایش بیان سایتوکاین‌های ضدالتهابی (FOXP3, IL-10) در بافت هیپوکامپ شد. افزایش سطح بیان BDNF و NGF نیز در گروه پیش‌درمان مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: پیپرین فرایند ترمیم میلین را از طریق کاهش سایتوکاین‌های التهابی و فعالیت سلول‌های گلیال و افزایش سایتوکاین‌های ضد التهابی و فاکتورهای رشد بهبود می‌بخشد.

واژه‌های کلیدی: پیپرین، غلاف میلین، مالتیپل اسکلروز، هیپوکامپ

مقدمه

مغز است که این عوامل سبب بروز الگوهای متنوع پاتولوژیک می‌شوند [۵]. با وجود مطالعات گسترده در مورد MS، اتیولوژی آن تا حد زیادی ناشناخته است و روش مناسبی جهت پیشگیری از بیماری MS وجود ندارد [۶]. در بیماری MS نفوسیت‌های T فعال (CD4⁺) [۷] با عبور از سد خونی - مغزی سبب فعال شدن آستروسیت‌ها و میکروگلیاها شده و اثر مخربی بر روی الیگودندروسیت‌ها می‌گذارند. سایتوکاین‌های التهابی (IL-2)، فاکتور نکروز توموری آلفا (TNF- α) و اینترفرون گاما (INF- γ) در فعال‌سازی پاسخ‌های خودایمنی، نقش‌های کلیدی

مالتیپل اسکلروزیس (MS) یک بیماری مزمن، التهابی و ناتوان‌کننده سیستم عصبی مرکزی (CNS) است [۱]. دمیلیناسیون یکی از مهم‌ترین علائم پاتولوژیک بیماری MS است [۲]. MS یک بیماری خودایمنی در CNS است که در آن نفوسیت‌های T اختصاصی علیه آنتی‌ژن‌های میلین واکنش التهابی داده و منجر به دمیلیناسیون می‌شوند [۳، ۴]. عوامل پاتوفیزیولوژیک MS شامل القای استرس اکسیداتیو، ناکارآمدی سد خونی مغزی و واکنش‌های خودایمنی و التهابی در پارانشیم

مواد و روش‌ها

داروها

پیرین (با درجه خلوص $>98\%$) و لیزولسیتین (با درجه خلوص $>99\%$) از شرکت مرک و سیگما-آلدريج (آلمان) خریداری شدند. دوز پیرین مورد استفاده در گروه پیش‌درمان بر اساس گزارشات قبلی انتخاب شد [۳۱، ۳۲]. از ترکیب نرمال سالین ۰/۹٪، اتانول ۷۰٪ و توئین ۱٪ به عنوان حلال پیرین استفاده شد. تزریق حلال در گروه شاهد درمان به صورت روزانه داخل صفاقی انجام شد.

حیوانات

در این مطالعه تجربی، موش‌های نر نژاد ویستار با محدوده وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم از مرکز حیوانات دانشگاه علوم پزشکی بابل تهیه و در شرایط استاندارد آزمایشگاهی بدون محدودیت به دسترسی به آب و غذا، تحت چرخه‌ی نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و با درجه حرارت 22 ± 2 سانتی‌گراد نگهداری شدند. تمامی آزمایش‌ها با رعایت قوانین اخلاقی برخورد با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه دامغان انجام گردید.

گروه‌بندی آزمایش

تعداد ۳۲ سر موش به صورت تصادفی در ۴ گروه ۸ تایی کنترل، بیمار، شاهد درمان، پیش‌درمان تقسیم‌بندی شدند.

۱- گروه کنترل (سالین)، که ۲ میکرولیتر سالین را به صورت تک دوز و دو طرفه در ناحیه CA1 هیپوکامپ به عنوان حلال لیزولسیتین دریافت کردند.

۲- گروه بیمار (لیزولسیتین)، که لیزولسیتین ۱٪ را به میزان ۲ میکرولیتر به صورت تک دوز و دو طرفه در ناحیه CA1 هیپوکامپ دریافت کردند.

۳- گروه شاهد درمان (حلال پیرین)، حلال پیرین را از دو هفته قبل از تزریق لیزولسیتین ۱٪ را به میزان ۲ میکرولیتر به صورت دو طرفه در ناحیه CA1 هیپوکامپ تا پایان دوره‌ی آزمایش (۲۶ روز) به صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

۴- گروه پیش‌درمان، که دو هفته قبل از القاء دمیلیناسیون درمان پیرین را با دوز ۵ mg/kg/day آغاز و تا پایان دوره‌ی آزمایش (۲۶ روز)، به صورت داخل صفاقی دریافت کردند [۳۲، ۳۱].

القاء دمیلیناسیون موضعی

جهت ایجاد مدل دمیلیناسیون موضعی، حیوانات پس از بی‌هوشی عمیق با کتامین و زایلازین تحت جراحی استریوتاکسی قرار گرفتند. به این منظور، مشخصات ناحیه تزریق ($AP: -3/6$ ، $DV: -3/2$ ، $ML: 1 \pm 6$) با استفاده از اطلس پاکسینوس [۳۳] بر روی جمجمه علامت‌گذاری شده و

ایفا می‌نمایند [۸] و به سلول‌های آلیگودندروسیت یا غشاهای میلین آسیب می‌رسانند [۹].

نوروتروفیک‌های BDNF، NGF و گیرنده‌های آن‌ها نقش مهمی را در پیشگیری از آسیب سلول و بقای نورون‌ها ایفا می‌کنند [۱۰]. فاکتور رشد مشتق از مغز (BDNF) موجب افزایش سیناپس‌های عصبی و گسترش ارتباطات نورونی نیز می‌گردد [۱۱]، هم‌چنین BDNF بیان پروتئین‌های ساختاری اصلی میلین مانند MBP را نیز تنظیم کند [۱۲] و ترمیم میلین را تسریع می‌کند [۱۳]. فاکتور رشد عصب (NGF) بازسازی آکسونی، تکثیر و تمایز آلیگودندروسیت‌ها را در محل دمیلیناسیون تسهیل می‌کند و در تنظیم پروتئین‌های ساختاری میلین دخالت دارد [۱۴]. از آن‌جایی که التهاب نقش مهمی در پاتوفیزیولوژی بیماری MS دارد، کنترل آن از پیشرفت بیماری جلوگیری کرده و فرآیند ترمیم را تسهیل می‌کند. در سال‌های اخیر پیشرفت قابل توجهی در توسعه درمان‌های ضد التهابی و تعدیل‌گر ایمنی وجود داشته [۱۵]، اما تاکنون درمان قطعی برای بیماری MS وجود ندارد [۱۶]. درمان‌های ترکیبی [۱۷، ۱۵] و گیاهان دارویی به عنوان درمان‌های مکمل در برخی بیماری‌های تحلیل‌برنده عصبی مورد توجه بوده است و تاثیر آن در پیشگیری و جلوگیری از پیشرفت این بیماری‌ها مورد تایید است [۱۸-۲۰]. پیرین یک ترکیب آلکالوئید است که از میوه‌ی گیاه فلفل سیاه استخراج می‌شود و دارای اثرات تعدیل‌کننده ایمنی، آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و ضد سرطان می‌باشد [۲۱، ۲۰]. پیرین می‌تواند با کاهش سایتوکاین‌های IL-2، TNF- α و NF-KB سبب مهار فرایند التهابی شود [۲۲، ۲۳]. با افزایش استرس اکسیداتیو و فاکتورهای التهابی در حین بیماری MS، پیرین با مهار فرایند التهابی و استرس اکسیداتیو می‌تواند کاندید مناسبی برای پیشگیری از پیشرفت بیماری و تسهیل فرایند ترمیم باشد. یکی از رایج‌ترین مدل‌ها جهت بررسی ظرفیت ترمیمی مغز در بیماری MS، القای دمیلیناسیون موضعی با توکسین می‌باشد [۲۴، ۲۵]. تزریق توکسین با شکست نسبی در سد خونی-مغزی منجر به هجوم سلول‌های التهابی به منطقه تزریق و ایجاد پلاک دمیلینه در محل می‌شود [۲۶]. لیزولسیتین یکی از سم‌های شناخته شده برای القای دمیلیناسیون است [۲۷] که در مطالعات گذشته برای القای دمیلیناسیون در هیپوکامپ [۲۸-۳۰] استفاده شده است. در این مطالعه جهت القای دمیلیناسیون موضعی در ناحیه CA1 هیپوکامپ از لیزولسیتین استفاده شد و اثر پیش‌درمانی با پیرین با دوز ۵ mg/kg بر میزان بیان سایتوکاین‌های التهابی و ضد التهابی، فاکتورهای رشد و توان ترمیم میلین در ناحیه هیپوکامپ در مدل موضعی دمیلیناسیون در هیپوکامپ بررسی شد.

تزریق توسط سرنگ همیلتون انجام شد. دمیلیناسیون با تزریق دو طرفه محلول ۱٪ لیزولستین در محلول استریل سالین ۰/۹٪ با حجم ۲ میکرولیتر در ناحیه CA1 هیپوکامپ القاء شد [۲۸-۳۰]. در حیوانات گروه کنترل با همان مشخصات اطلس و حجم یکسان، نرمال سالین به صورت دو طرفه تزریق شد.

مطالعات بافت‌شناسی

رنگ‌آمیزی لوگزال فست بلو (LFB)

حیوانات با محلول بافر فسفات و پارافرمالدهید ۴٪ پرفیوژن شدند و در پایان مغز حیوانات خارج گردیده به مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در محلول پارافرمالدهید ۴٪ قرار گرفت. بافت‌ها پس از آب‌گیری در الکل‌ها با درصد خلوص متفاوت، تحت شفاف‌سازی با زایلول قرار گرفته و در نهایت با پارافین بلوک‌گیری شدند. در پایان فرآیند بافتی، برش‌های کروئال ۶ میکرومتری از مغز به صورت سریال توسط دستگاه میکروتوم (LeicaRM2135، آلمان) تهیه شد و بر روی لام‌های آغشته به چسب آلومین قرار داده شد. روش رنگ‌آمیزی LFB بر اساس گزارشات قبلی انجام شد [۲۸، ۳۴]. جهت ارزیابی روند دمیلیناسیون در هیپوکامپ در گروه‌های مختلف، نمونه‌های بافتی تحت رنگ‌آمیزی LFB و کرزیل فست ویوله (CFV) قرار گرفتند. بدین منظور پس از دی‌پارافینه‌سازی با زایلول و انجام مراحل آب‌گیری در الکل، نمونه‌ها ۳ ساعت در محلول ۰/۱٪ (LFB Atom Scientific، انگلستان) حل شده در الکل ۹۵٪ در حمام بافتی ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از شست و شوی بافت‌ها توسط آب مقطر، نمونه‌ها با قرار گرفتن در رنگ کرزیل فست ویوله (سیگما، آلمان) به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق کنتراست داده شدند. پس از شستشو با آب جاری و آب‌گیری مجدد در الکل اسلایدها به وسیله زایلول شفاف‌سازی و با استفاده از چسب اتنالان (مرک، آلمان) لامل با زاویه ۴۵ درجه تدریج بر روی لام قرار گرفت. جهت مشاهدهی دمیلیناسیون لام‌ها از میکروسکوپ (Olympus BX-51) و جهت تصویربرداری از دوربین DP-27 استفاده شد. به منظور کمی کردن وسعت دمیلیناسیون و اندازه‌گیری شدت میلین (Optical density) از نرم‌افزار Image J استفاده شد [۲۸]. به طور میانگین با مشاهده و آنالیز ۹ اسلاید از هر حیوان در هر گروه داده‌های نهایی به دست آمدند (n=۳). بنابراین ۲۷ اسلاید برای هر گروه آزمایشی مورد بررسی قرار گرفت.

رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس

پس از پرفیوژن حیوانات، نمونه‌های مغز طی ۲ ساعت در محلول پارافرمالدهید ۴٪ قرار داده شد و آب‌گیری توسط محلول سوکروز (۳۰٪) طی ۴۸ ساعت انجام شد. سپس توسط چسب بافتی Thermo Scientific در دمای ۴۰- بلوک‌گیری

انجام شد. برش‌های کروئال ۱۰ میکرومتری توسط دستگاه کرایو (MICROM HM 525, Thermo Scientific) تهیه شد و در اسلایدهای super-frost جمع‌آوری شد (Thermo Scientific). جهت رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس مقاطع هیپوکامپ پس از شست‌وشو با PBS به مدت ۱ ساعت در محلول مسدودکننده حاوی، سرم نرمال بز ۱۰٪ و BSA ۴٪ و تریتون X100 ۰/۳٪ (سیگما) در PBS انکوبه شدند. بعد از آن، مقاطع در غلظت مناسب آنتی‌بادیلی کلونال GFAP خرگوش ۱:۱۰۰۰، Dako، (Z0334) انکوبه شده و به مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از شست‌وشو با PBS، مقاطع بافتی در آنتی‌بادی ثانویه علیه خرگوش جفت شده با A31572 Alexa 555, Invitrogen به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از شست‌وشوی مناسب در PBS رنگ‌آمیزی هسته‌ای توسط ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر Hoechst 33342 به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. پس از ۲ بار شست‌وشو اسلایدها با PBS، با استفاده از مانیت ایمونوفلورسانس متوسط Southern Biotech، (آمریکا) انجام شد و اسلایدها زیر میکروسکوپ (Olympus BX-51) مورد ارزیابی و جهت تصویربرداری از دوربین DP-27 استفاده شد.

استخراج RNA، سنتز cDNA و نسخه‌برداری معکوس (Real-Time PCR)

به منظور جداسازی RNA خالص (Total RNA) از بافت هیپوکامپ، از کیت استخراج Super RNA یکتا تجهیز آزما (YTA) مطابق با پروتکل استخراج آن استفاده شد. جهت تعیین غلظت نمونه‌های RNA جدا شده از هر کدام از نمونه‌ها، از دستگاه NanoDrop استفاده و میزان جذب آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر قرائت گردید و غلظت آن نیز محاسبه شد. از نسبت OD260/OD280 برای بررسی خلوص RNA استفاده گردید. هم‌چنین ۲ میکرولیتر از RNA روی ژل ۱/۲٪ الکتروفورز گردید و کیفیت RNA استخراج شده تایید شد. سنتز cDNA با استفاده از مقدار ۲ میکروگرم از RNA و به مطابق با پروتکل کیت یکتا تجهیز انجام شد. پرایمرهای اختصاصی برای بیان ژن‌های؛ فاکتور رشد مشتق از مغز (BDNF)، فاکتور رشد مشتق از نورون (NGF)، اینترلوکین-۱۰ (IL-10)، اینترلوکین-۱ بتا (IL-1β) فاکتور تومور نکروز (TNF-α)، فاکتور هسته‌ای تقویت‌کننده زنجیره سبک کاپا (NF-KB)، اسکرپین (FOXP3) استفاده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز (qPCR) در جدول ۱ توضیح داده شده است. ۱ میکرولیتر cDNA، ۱۰ میکرولیتر از مستر میکس سایبرگرین (کیژن، آلمان) و ۵ pmol/μL از هر یک از پرایمرها (فضا‌پژوه، تهران-ایران) به همراه ۸ میکرولیتر از nuclease free water در

آنالیز آماری

داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف از معیار نمایش داده شد. برای مقایسه‌ی گروه‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه و به دنبال آن آزمون توکی استفاده شد. در همه‌ی محاسبات آماری، $P < 0.05$ به عنوان حداقل سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار (Graph pad Prism) نسخه ۷ صورت گرفت.

حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر جهت واکنش نسخه‌برداری معکوس (real-time PCR) میکس شدند. دمای آنلینگ زن‌ها در جدول ۲ آمده است. واکنش‌ها به صورت دویار تکرار انجام شد. جهت کنترل مثبت و ارزیابی واکنش RT از زن مرجع (GAPDH) به‌عنوان یک زن Housekeeping استفاده شد. بیان نسبی زن مورد نظر در مقایسه با بافت کنترل، توسط روش $2^{-Ct\Delta\Delta}$ محاسبه و به صورت Fold Change گزارش شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش qPCR.

Gene Symbol Forward Reverse	Accession ID	Sequence (5'→3')
GAPDH	NM_017008.4F	ACGGCAAGTTCAACGGCACAG
	NM_017008.4R	GACATACTCAGCACCAGCATCACC
IL-1	NM_03512.2F	GGACCCAAGCACCTTCTTTT
	NM_03512.2R	AGACAGCACGAGGCATTTT
TNF- α	NM_012675.3F	ACCACGCTCTTCTGTCTACTG
	NM_012675.3R	CTTGGTGGTTTGCTACGAC
NF-KB1	NM_001276711.1F	CTATGACAGCAAAGCCCCCA
	NM_001276711.1R	ACATCCGTGGGGGAAAAGTC
IL-10	NM_012854.2F	CACTGCTATGTTGCTGCTC
	NM_012854.2R	TGTCCAGCTGGTCCTTCTTT
FoxP3	NM_006256731.2F	AGAGTTTCTCAAGCACTGCCAAGC
	NM_006256731.2R	TGCATAGTCCCAGCTTCTCCTTT
BDNF	NM_001270630.1F	GTCGCACGGTCCCCATG
	NM_001270630.1R	ACCTGGTGGAACTCAGGGT
NGF	NM_001277055.1F	GCATCGCTCTCCTTCACAGA
	NM_001277055.1R	CGCTATGCACCTCAGAGTGG

انتخاب شد. در هیپوکامپ حیوانات گروه کنترل که سالیان را به صورت دوطرفه دریافت کرده بودند، دمیلیناسیونی مشاهده نشد (شکل A1). بیش‌ترین وسعت دمیلیناسیون پس از تزریق لیزولستین در گروه بیمار نسبت به گروه کنترل ایجاد شد (آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی، $P < 0.0001$) و همچنین گروه شاهد درمان نسبت به گروه کنترل دارای بیش‌ترین وسعت دمیلیناسیون می‌باشد (آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی، $P < 0.0001$). (شکل ۱ A-C, E). وسعت دمیلیناسیون در گروه پیش‌درمان پیرین کاهشی معنی‌دار ($P < 0.0001$) را نسبت به دو گروه شاهد درمان و بیمار نشان داد (شکل ۱ D, E). مقایسه وسعت دمیلیناسیون در گروه پیش‌درمان ($P < 0.05$) با گروه کنترل نمایانگر افزایش وسعت دمیلیناسیون نسبت به گروه کنترل هستند. برای تایید بیش‌تر ما شدت رنگ میلین (Optical density) را در همان مقاطع مغزی توسط نرم‌افزار Image J آنالیز کرده و در شکل ۱ F نمایش دادیم. داده‌ها نشان می‌دهند که شدت رنگ میلین در گروه‌های بیمار و شاهد درمان کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل دارد (آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی، $P < 0.0001$) و در گروه پیش‌درمان شدت رنگ میلین

جدول ۲. دمای مناسب جهت تکثیر پرایمرها.

Primer Name	Annealing Temp
GAPDH	۶۰
IL-1 β	۶۳
TNF- α	۶۰
NF-KB	۶۲
IL-10	۶۲
FoxP3	۶۳
BDNF	۶۰
NGF	۶۰

نتایج

پیش‌درمانی با پیرین وسعت دمیلیناسیون در مدل موضعی دمیلیناسیون در هیپوکامپ را کاهش داد جهت تشخیص و تایید القاء دمیلیناسیون توسط تزریق لیزولستین ۱٪ به صورت دو طرفه در ناحیه CA1 هیپوکامپ رت از رنگ‌آمیزی اختصاصی میلین (LFB) که به صورت اختصاصی میلین را به رنگ آبی تیره در می‌آورد، استفاده شد. مقاطع کرونال با فواصل برابر برای آنالیز کمی (توسط نرم‌افزار Image J) دمیلیناسیون و ترمیم حاصل از پیش‌درمانی پیرین

پیش‌درمان پیپرین نسبت به گروه بیمار و شاهد درمان کاهش یافت.

در مورد سایتوکاین‌های ضد التهابی، داده‌های ما نشان داد که القاء دمی‌لیناسیون با لیزولستین منجر به کاهش معنی‌دار بیان ژن IL-10 در گروه‌های بیمار و شاهد درمان نسبت به گروه کنترل شد ($P < 0.01$), آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی، نمودار A-شکل ۴). در حالی که پیش‌درمانی با پیپرین توانست به طور معنی‌داری سطح بیان این ژن را نسبت به گروه‌های بیمار و شاهد درمان ($P < 0.01$) افزایش دهد (آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی، نمودار A-شکل ۴). FOXP3 یک فاکتور رونویسی تنظیم‌کننده در فرآیند سازمان‌دهی بیان ژن در زمینه تکامل و سازمان‌دهی عملکرد لنفوسیت‌های T تنظیم‌کننده محسوب می‌شود [۳۵]. در این مطالعه سطح بیان ژن FOXP3 در گروه‌های بیمار و شاهد درمان نسبت به گروه کنترل کاهش ولی این تغییر به لحاظ آماری معنی‌دار نبود. اما در گروه پیش‌درمان با پیپرین افزایش بیان این ژن نسبت به گروه کنترل ($P < 0.01$) و گروه‌های بیمار و شاهد درمان ($P < 0.01$) به صورت قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت (آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی، نمودار B، شکل ۴). بنابراین پیش‌درمانی با پیپرین با اثر بر فاکتورهای پیش‌التهابی و ضدالتهابی موجب تعدیل سیستم ایمنی به نفع بهبود و ترمیم میلین شد.

پیش‌درمانی با پیپرین سطح بیان فاکتورهای رشد BDNF و NGF را افزایش داد

بررسی داده‌های ما نشان داد که، سطح بیان BDNF در گروه‌های بیمار و شاهد درمان ($P < 0.05$) به طور معناداری پایین‌تر از گروه کنترل بود. همچنین بیان ژن BDNF در گروه‌های پیش‌درمان با پیپرین افزایش معنی‌داری نسبت به گروه بیمار و شاهد درمان ($P < 0.01$) و همچنین کنترل ($P < 0.01$) داشت (آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی، نمودار A-شکل ۵). در این مطالعه سطح بیان ژن NGF به عنوان یک فاکتور رشد مشتق از نورون در گروه‌های مختلف ارزیابی شد. داده‌های ما تغییر معنی‌داری در بیان این ژن در گروه‌های بیمار و شاهد درمان نسبت به کنترل نشان نداد. در مقایسه بیان ژن NGF در گروه پیش‌درمان پیپرین افزایش معنی‌داری نسبت به دو گروه شاهد درمان و بیمار مشاهده شد ($P < 0.01$), آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی، نمودار B-شکل ۵). این نتایج تأکیدی بر اثربخشی پیش‌درمانی با پیپرین بر تسریع فرآیند ترمیم میلین از طریق افزایش فاکتورهای رشد می‌باشد.

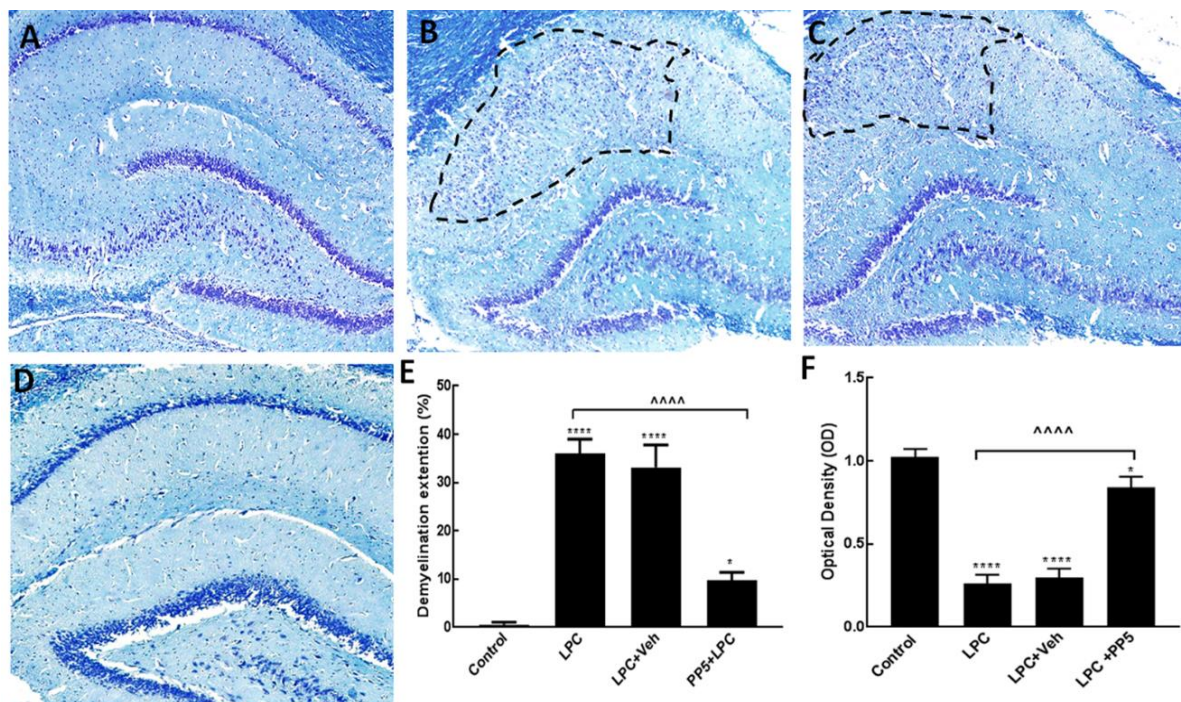
افزایش قابل ملاحظه‌ای نسبت به گروه‌های بیمار و شاهد درمان پیدا کرده است ($P < 0.001$) و در حالی که شدت رنگ در این گروه نسبت به گروه کنترل پایین‌تر می‌باشد ($P < 0.05$), شکل F1).

پیش‌درمانی با پیپرین میزان آستروسیت‌های فعال پس از القای دمی‌لیناسیون را کاهش داد

جهت ارزیابی اثر پیش‌درمانی پیپرین بر فعالیت آستروسیت‌ها، از تکنیک ایمونوهیستوشیمی با آنتی‌بادی اختصاصی علیه آستروسیت‌ها (GFAP) استفاده شد. همان‌طور که در شکل ۲ پیداست تعداد سلول‌های GFAP مثبت (آستروسیت‌ها فعال) در ناحیه CA1 در گروه بیمار نسبت به گروه کنترل بیش‌تر است (شکل ۲ A-B). همچنین در گروه شاهد درمان، حلال پیپرین تعداد آستروسیت‌های فعال را تغییر نداد ولی در گروه پیش‌درمان با پیپرین، به نظر می‌رسد که تعداد آستروسیت‌های فعال نسبت به گروه بیمار و شاهد درمان کاهش یافته است (شکل ۲ C-D).

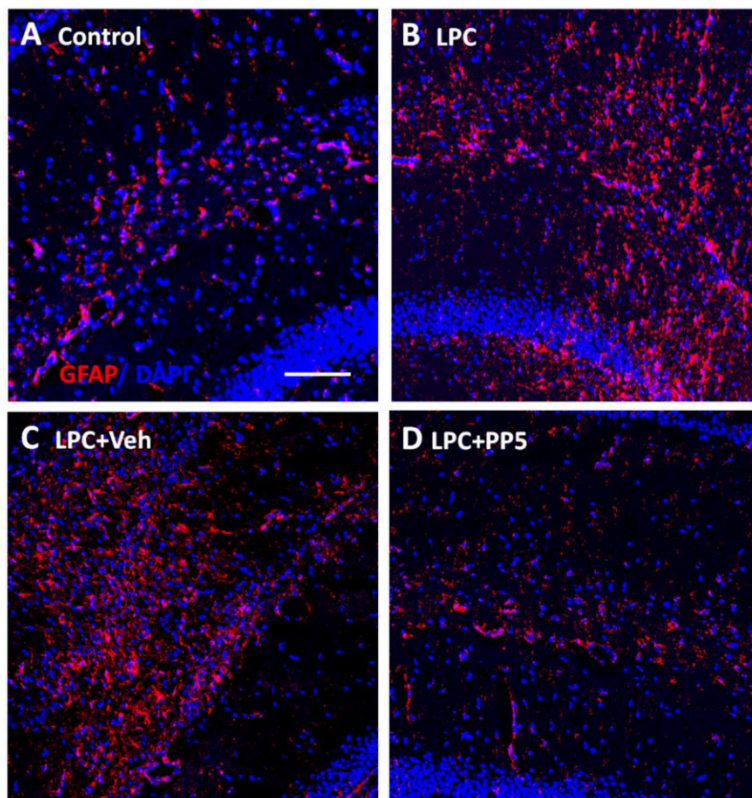
پیش‌درمانی با پیپرین باعث تعدیل سطح سیستم ایمنی، کاهش سایتوکاین‌های التهابی و افزایش سایتوکاین‌های ضد التهابی شد

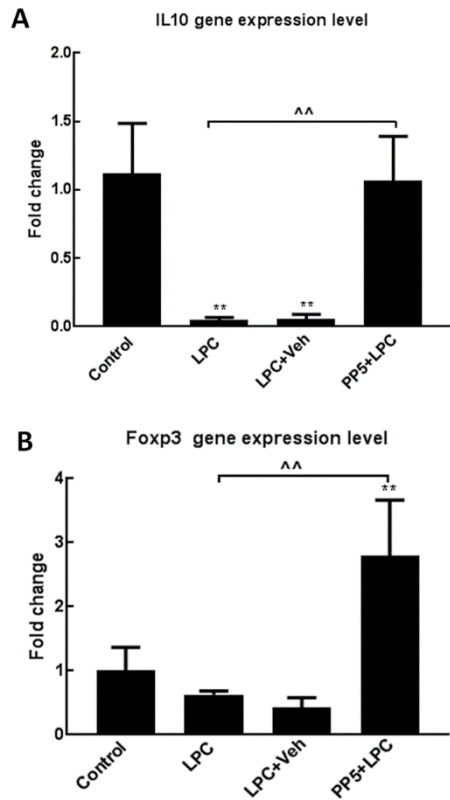
اثر پیش‌درمانی با پیپرین بر میزان بیان ژن سایتوکاین‌های التهابی IL-1 β , TNF- α و NF-KB و ضد التهابی IL-10 و FOXP3 با استفاده از تکنیک qRT-PCR مطالعه شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که، بیان ژن NF- κ B بعد از دمی‌لیناسیون در گروه بیمار و شاهد درمان ($P < 0.01$) افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشته است. اما در گروه پیش‌درمان پیپرین بیان این ژن کاهش معنی‌داری نسبت به گروه بیمار و شاهد درمان داشته است ($P < 0.01$) آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی، نمودار A-شکل ۳). همین الگوی تغییرات مشابه، در بیان ژن سایتوکاین‌های TNF- α و IL-1 β نیز مشاهده شد. به طوری که القاء دمی‌لیناسیون در گروه‌های بیمار و شاهد درمان به طور معناداری سبب افزایش سطح بیان ژن‌های TNF- α ($P < 0.01$) و IL-1 β ($P < 0.01$) نسبت به گروه کنترل شد (آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی، نمودار B و C-شکل ۳). پیش‌درمانی با پیپرین سبب کاهش معنی‌دار بیان ژن‌های TNF- α و IL-1 β در گروه‌های بیمار و شاهد درمان شد ($P < 0.01$) (آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی، نمودار B و C-شکل ۳). با بررسی داده‌های فوق، بیان سه فاکتور پیش‌التهابی IL-1 β , TNF- α , NF-KB پس از القاء مدل دمی‌لیناسیون، در گروه‌های بیمار و شاهد درمان نسبت به گروه کنترل افزایش و در گروه



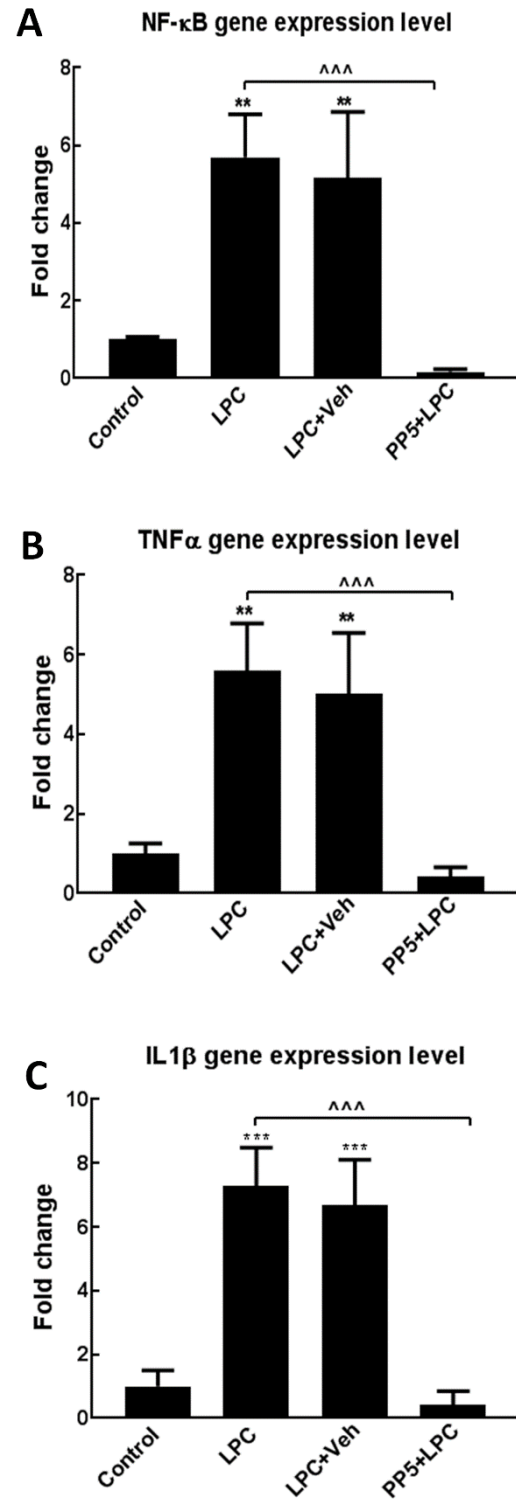
شکل ۱. پیش درمانی با پیپرین میزان وسعت دمی‌لیناسیون بافتی را کاهش و شدت میلین را افزایش داد. (A) رنگ آمیزی میلین گروه کنترل، هیچگونه ضایعه دمی‌لیناسیون را در نواحی بافت هیپوکامپ حیوانات این گروه نشان نمی دهد. (B-C) وسعت دمی‌لیناسیون در هیپوکامپ گروه بیمار و گروه شاهد درمان نسبت به گروه کنترل ($***P < 0.0001$) افزایش معنادار یافته است. (D, E) وسعت دمی‌لیناسیون در هیپوکامپ حیوانات گروه پیش درمان نسبت به گروههای بیمار و شاهد درمان کاهش معنی داری یافت. (F) آنالیز شدت رنگ میلین (optical density) در هر سه گروه کاهش معناداری را نسبت به گروه کنترل نشان می دهد ($*P < 0.05$, $***P < 0.0001$). اما این میزان در گروه پیش درمان نسبت به گروه های بیمار و شاهد درمان افزایش معناداری را نشان می دهد ($****P < 0.0001$).

شکل ۲. پیش درمانی با پیپرین سطح فعالیت سلول های آستروسیت را کاهش می دهد. رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی با مارکر آستروسیتی GFAP (قرمز) و مارکر هسته (آبی) در گروه های کنترل (A)، بیمار (B)، شاهد درمان (C) و پیش درمان با پیپرین (D)، همانطور که از شکل پیداست سطح فعالیت آستروسیت ها و میزان بیان GFAP در گروه های بیمار و شاهد درمان نسبت به کنترل افزایش قابل ملاحظه ای را نشان می دهد (C-A). پیش درمانی با پیپرین نیز سطح سلول های GFAP مثبت را نسبت به گروه بیمار و شاهد درمان کاهش می دهد (D).





شکل ۴. پیش درمانی با پیپرین بیان ژن سایتوکاین های ضد التهابی را افزایش می دهد. بیان سایتوکاین های ضد التهابی IL-10 (A) در در گروه های بیمار و شاهد درمان نسبت به گروه کنترل بطور معناداری کاهش (** $P < 0.01$) و در گروه پیش درمان پیپرین نسبت به گروه های بیمار و شاهد درمان بطور معناداری افزایش یافت (B) در مورد بیان FoxP3. میزان آن در گروه پیش درمان نسبت به گروه کنترل (** $P < 0.01$) و گروه های بیمار و شاهد درمان ($P < 0.01$) افزایش قبل ملاحظه ای داشت.



شکل ۳. پیش درمانی با پیپرین بیان ژن سایتوکاین های التهابی را کاهش می دهد. بیان سایتوکاین های التهابی NF-κB (A), TNF-α (B) و IL-1β (C) در گروه های بیمار و شاهد درمان نسبت به گروه کنترل بطور معناداری افزایش یافت (*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$) و پیش درمانی پیپرین توانست کاهش معنی داری در هر سه فاکتور التهابی نسبت به گروه بیمار و شاهد درمان ایجاد کند ($P < 0.001$).

شکل ۵. پیش درمانی با پیپرین سطح بیان فاکتورهای رشد BDNF و NGF را افزایش می دهد. بیان ژن BDNF (A) در گروه های بیمار و شاهد درمان

Vaibhav ۲۰۱۲ و همکارانش، به بررسی اثر پیش‌درمان پیرین روی التهاب وابسته به ایسکمی مغزی در رت‌های نر نژاد ویستار پرداختند. حجم انفارکت ایجاد شده در گروهی که از قبل پیرین به آن‌ها تجویز شده بود کاهش قابل ملاحظه‌ای یافته بود. پیرین به طور موفقیت‌آمیزی سطح سایتوکاین‌های پیش‌التهابی IL-1 β ، IL-6 و TNF- α را در گروه ایسکمیک کاهش داده و موجب کاهش بیان COX2, NOS-2, NF-KB گردید [۴۳]. در توافق با مطالعات گذشته مطالعه ما نیز نشان داد که پیرین توانسته با کاهش فاکتورهای التهابی و آستروسیت‌های فعال، سبب کاهش وسعت دمیلیناسیون گردد. در سال ۲۰۱۳، xiaozhou ying و همکارانش نشان دادند که پیش‌درمانی با پیرین موجب کاهش تولید مدياتورهای التهابی شد و به طور قابل توجهی بیان ژن‌های TNF- α , iNOS را کاهش داد. هم‌چنین پیرین فعال‌سازی NF-KB را کاهش داد [۴۴]. در سال ۲۰۱۵، Singh و همکارانش به بررسی اثر پیرین توام با کورکومین در مدل القایی هاتینینگتون پرداختند. در گروه مورد آزمایش تجویز کورکومین و نیز کورکومین به همراه پیرین به مدت ۲۱ روز قبل از تجویز NP-۳ انجام شد و اثر سودمندی در برابر نقص حرکتی و بیوشیمیایی و نوروشیمیایی ایجاد شده به وسیله NP-۳ نسبت به گروه شاهد داشت. نکته قابل توجه این بررسی، افزایش قابل توجه اثرات حفاظتی کورکومین به همراه پیرین، نسبت به کورکومین تنها بوده است [۴۵].

در بررسی اثرات ضد التهابی پیرین، گزارشات نشان داده‌اند که این اثربخشی می‌تواند ناشی از کاهش تولید فاکتورهایی از قبیل TNF- α , IL-2, NF-KB و سبب مهار مسیره‌های التهابی شود و بدین طریق از فعالیت سلول‌های T و عوارض بعدی جلوگیری کند [۲۳، ۲۲]. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۱، sabiana و همکارانش نقش پیرین روی تشکیل کریستال مونوسدیم اورات (یک عامل التهابی) را در مدل تجربی آرتریت نقرسی مطالعه کردند. در حیوانات تحت القاء کریستال مونوسدیم اورات، سطح بیان آنزیم‌های لیزوزومی، لیپید پروکسیداسیون و TNF- α افزایش و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی کاهش یافت. این تغییرات به وسیله پیرین به سطح نرمال برگشت. این مطالعه به وضوح اثر مهاری پیرین روی کریستال‌های مونوسدیم اورات ایجادکننده التهاب را نشان داد و این‌که پیرین می‌تواند به عنوان یک دارو در درمان آرتریت حاد نقرسی مطرح شود [۴۶].

مطابق با گزارشات موجود بررسی داده‌های این مطالعه نیز نشان داد که، پیرین با مهار فرآیند التهابی و فعالیت سلول‌های گلیال ناشی از القاء لیزولستین، تا حدود قابل توجهی شرایط را به نفع ترمیم میلین پیش برده است. در این راستا، برای درک اثربخشی پیرین بر فرآیند ترمیم میلین، به بررسی سه گروه از

نسبت به گروه کنترل بطور معناداری کاهش ($P < 0.05$) و درگروه پیش‌درمان پیرین نسبت به گروه کنترل ($P < 0.01$) و گروه‌های بیمار و شاهد درمان ($P < 0.001$) بطور معناداری افزایش یافت. سطح بیان NGF (B) در گروه پیش‌درمان نسبت به گروه بیمار و شاهد درمان افزایش معناداری را نشان می‌دهد ($P < 0.01$).

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه اثر محافظتی پیرین به‌عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی موثر، نه تنها فرآیند التهاب را در شرایط استرس اکسیداتیو و التهاب عصبی تعدیل می‌کند بلکه می‌تواند با افزایش سطح فاکتورهای رشد BDNF و NGF شرایط را به نفع بهبود و ترمیم میلین پیش ببرد. در مطالعه حاضر، پیش‌درمانی با پیرین با جلوگیری از گسترش نواحی دمیلینه موجب کاهش دمیلیناسیون بافتی و تسریع فرآیند ترمیم میلین شد. داده‌های ما نشان داد که پیرین موجب کاهش بیان واسطه‌های التهابی مانند TNF- α , NF-KB, IL-1 β و فعالیت سلول‌های گلیال در مدل دمیلیناسیون موضعی در هیپوکامپ شده است. علاوه بر آن، ارزیابی داده‌های ما نشان داد که، سطح بیان ژن سایتوکاین‌های ضد التهابی مانند IL-10 و FOXP3 در گروه پیش‌درمان نسبت به گروه‌های کنترل، بیمار و شاهد درمان افزایش چشم‌گیری داشته است. جالب توجه است که، پیش‌درمانی با پیرین میزان بیان ژن‌های BDNF و NGF را نیز نسبت به گروه بیمار و شاهد درمان افزایش داد.

در این مطالعه، تزریق موضعی لیزولستین در ناحیه CA1 هیپوکامپ جهت القاء مدل دمیلیناسیون در این ناحیه مطابق با گزارشات قبلی انجام شد [۲۸-۳۰]. هم‌چنین تعدادی از گزارشات، ایجاد فرآیندهای التهابی و استرس اکسیداتیو را در آسیب‌های موضعی ناشی از القاء مدل لیزولستین نشان داده‌اند [۳۶-۴۰]. در مدل موضعی دمیلیناسیون با لیزولستین تقریباً سه روز بعد از تزریق دمیلیناسیون القا می‌گردد [۳۴]. در مطالعه حاضر ما مشاهده کردیم که القای مدل دمیلیناسیون با لیزولستین در روز ۱۲ بعد از تزریق موجب شروع فرآیندهای التهابی و افزایش فعالیت سلول‌های گلیال در نواحی دمیلینه می‌شود.

گزارشات وسیعی در سال‌های گذشته بر روی ترکیبات مشتق از انواع ادویه‌جات نشان داده است که، این ترکیبات با مهار مسیر التهابی می‌توانند از وقوع بیماری‌های تحلیل‌برنده عصبی از جمله MS پیشگیری کنند [۴۱، ۴۲]. پیرین دارای اثرات تعدیل‌کننده ایمنی، آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و ضد آپوپتوز در بسیاری از بیماری‌های تحلیل‌برنده عصبی می‌باشد [۲۱، ۲۰]. اثرات محافظت عصبی پیرین در بیماری‌های تحلیل‌برنده عصبی در گزارشات متعددی نشان داده شده است. در سال

مکانیسم‌های احتمالی شامل؛ بررسی سطح بیان سایتوکاین‌های ضد التهابی و مکانیسم ترمیم میلین پرداختیم.

التهاب و سمیت عصبی آن به عنوان ویژگی اصلی پاتوژن MS شناخته شده است [۴۷]. فعال شدن گلیال یا گلیوز مشخصه بارز در چندین بیماری تحلیل برنده عصبی از جمله MS می‌باشد [۴۸]. مطالعات متعددی فعال شدن گلیال را پس از تزریق لیزولسیتین نشان می‌دهد و آستروسیت‌های فعال یا میکروگلیاها سایتوکاین‌های التهابی‌های را در نواحی آسیب دیده آزاد می‌کنند [۵۰، ۴۹]. در راستای این گزارشات، داده‌های ما افزایش قابل توجه آستروسیت‌های فعال شده در نواحی دمیلینه و کاهش گلیال‌های فعال شده در هیپوکامپ حیوانات تحت پیش‌درمانی با پیرین را تایید کرد. علاوه بر این مطابق گزارشات قبلی، ما نیز نشان دادیم که بیان ژن سایتوکاین‌های التهابی از جمله NF-kB ، $\text{TNF-}\alpha$ و $\text{IL-1}\beta$ به طور قابل توجهی در مناطق دمیلیناسیون افزایش یافته است [۵۰، ۳۹، ۱۸]. هم‌چنین با بررسی داده‌های این مطالعه دریافتیم که، پیش‌درمانی با پیرین توانست بیان ژن‌های NF-kB ، $\text{TNF-}\alpha$ و $\text{IL-1}\beta$ را پس از القاء لیزولسیتین تعدیل کند. در راستای داده‌های ما، اثر ضد التهابی پیرین در مدل‌های تجربی بیماری‌های مختلف گزارش شده است [۵۲، ۵۱]. در سال ۲۰۱۳، مطالعه‌ای توسط DaCruz و همکاران نشان داد که، پیرین تولید فاکتورهای التهابی مانند $\text{TNF-}\alpha$ و $\text{IL-1}\beta$ را در مدل تشنج ناشی از پیلوکاریپین سرکوب می‌کند [۵۳]. علاوه بر این، گروهی نشان داده‌اند که درمان با پیرین بیان $\text{TNF-}\alpha$ ، $\text{IL-1}\beta$ را در مدل حیوانی پارکینسون کاهش می‌دهد [۵۱]. هم‌چنین بیان شده است که پیرین، یک مهارکننده قوی برای NF-kB به‌عنوان یک فاکتور رونویسی کلیدی مورد نیاز برای القاء تعداد ژن‌های التهابی مانند IL-12 ، $\text{IL-1}\beta$ ، $\text{TNF-}\alpha$ ، IL-6 ، و سیکلوکسیژناز-۲ می‌باشد [۵۴]. با در کنار هم قرار دادن این اطلاعات چنین به نظر می‌رسد که، ممکن است مکانیسم اثر ضد التهابی و تقویت‌کننده پیرین مرتبط با مهار فاکتور NF-kB باشد. با این وجود، چگونگی این مکانیسم اثر پیرین هنوز هم به‌طور دقیق مشخص نیست.

از طرف دیگر، ما نشان دادیم که میزان بیان سایتوکاین‌های ضد التهابی مانند IL-10 و FOXP3 در گروه پیش‌درمان با پیرین به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. FOXP3 یک فاکتور رونویسی که می‌تواند سایتوکاین‌های ضد التهابی مانند IL-10 را تنظیم کند [۵۵] و عملکرد NF-kB را سرکوب کند [۵۶]. تحقیقات قبلی نشان داده‌اند که پلی‌مورفیسم ژن NF-kB ممکن است در پاتوژن تعدادی از بیماری‌های خودایمنی نقش داشته باشد [۵۷]. IL-10 یک سایتوکاین ضد التهابی است که

سلول‌های Th1 و ماکروفاژهای التهابی را مهار می‌کند [۵۸]. در مطالعه Salmaggi و همکاران در سال ۱۹۹۶، گزارش شده است که بیان IL-10 در مرحله عود کاهش چشم‌گیری داشت [۵۹] و در مرحله بهبودی بیماران MS افزایش یافته است [۶۰]. IL-10 هم‌چنین می‌تواند فعالیت NF-kB را مهار کند [۶۱]. بنابراین پیرین نقش دفاعی خود را از طریق ایجاد تعادل میان سایتوکاین‌های پیش‌التهابی و ضدالتهابی در شرایط دمیلیناسیون ایفا می‌کند.

در قسمت بعدی این مطالعه به بررسی اثرات پیرین بر میزان بیان BDNF به‌عنوان یک فاکتور رشد مشتق از مغز و NGF به‌عنوان فاکتور رشد مشتق از نورون با استفاده از تکنیک مولکولی qPCR پرداختیم. داده‌های ما نشان داد که، پیش‌درمانی با پیرین سطح بیان BDNF و NGF را به‌طور معنی‌داری افزایش داده است. BDNF به‌عنوان عضوی از خانواده نوروتروفیک نقش اساسی را در روند ترمیم میلین ایفا می‌کند [۶۲]. مجموعه‌ای از شواهد نشان می‌دهد که BDNF با القاء سلول‌های پیش‌ساز الیگودندروسیت، تکثیر، مهاجرت و تمایز آن‌ها در مکان‌های ضایعه نقشی ضروری را در فرآیند ترمیم میلین بر عهده دارد [۶۳، ۶۴]. هم‌چنین BDNF یک عامل مهم برای بازسازی میلین در مدل‌های تجربی مختلف از دمیلیناسیون مرکزی است [۶۵، ۶۲]. علاوه گزارشات متعددی نشان داده‌اند که سطح BDNF و NGF در بیماران MS کم‌تر از افراد سالم است [۶۷، ۶۶]. BDNF می‌تواند بیان پروتئین‌های ساختاری کلیدی میلین، مانند MBP را تنظیم کند [۶۴]. هم‌چنین مدل‌های حیوانی EAE در مطالعات متعددی به‌طور مداوم نقش مفید NGF را در تنظیم رمیلیناسیون و تمامیت ساختاری میلین پشتیبانی می‌کنند [۶۸، ۶۲]. نتایج ما نیز با مطالعات قبلی مطابق بود. در مطالعه بافت‌شناسی با رنگ‌آمیزی اختصاصی میلین نشان دادیم که پیش‌درمانی با پیرین به‌طور قابل توجهی وسعت نواحی دمیلینه را کاهش داده و شدت رنگ میلین را در مدل موضعی دمیلیناسیون افزایش داده است. یافته‌های ما نشان می‌دهد که ارتباطی احتمالی در اثر محافظت عصبی (ترمیم میلین) پیرین از طریق افزایش فاکتورهای نوروتروفیک در شرایط دمیلیناسیون وجود دارد.

پیرین با مهار آستروسیت‌های فعال، بیان سایتوکاین‌های التهابی را کاهش و سایتوکاین‌های ضد التهابی را افزایش می‌دهد. پیرین هم‌چنین بیان فاکتورهای رشد BDNF و NGF را در مغز افزایش می‌دهد در نتیجه پیرین با تعدیل سیستم ایمنی و افزایش فاکتورهای نوروتروفیک موجب بهبود فرایند ترمیم میلین در مدل موضعی دمیلیناسیون در هیپوکامپ می‌شود. بنابراین می‌تواند کاندید مناسبی به‌عنوان درمان مکمل در

- [16] Dubois-Dalcq M, Ffrench-Constant C, Franklin RJ. Enhancing central nervous system remyelination in multiple sclerosis. *Neuron* 2005; 48: 9-12.
- [17] Chitnis T, Imitola J, Khoury SJ. Therapeutic strategies to prevent neurodegeneration and promote regeneration in multiple sclerosis. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2005; 5: 11-26.
- [18] Mohajeri M, Sadeghzadeh 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: 156-167.
- [19] Gorgani L, Mohammadi M, Najafpour GD, Nikzad M. Sequential microwave-ultrasound-assisted extraction for isolation of piperine from black pepper (*Piper nigrum* L.). *Food Bioproc Technol* 2017; 10: 2199-2207.
- [20] Meghwal M, Goswami TK. Piper nigrum and piperine: an update. *Phytother Res* 2013; 27: 1121-1130.
- [21] Kakarala M, Dubey SK, Tarnowski M, Cheng C, Liyanage S, Strawder T, et al. Ultra-low flow liquid chromatography assay with ultraviolet (UV) detection for piperine quantitation in human plasma. *J Agric Food Chem* 2010; 58: 6594-6599.
- [22] Ali Y, Alam MS, Hamid H, Husain A, Bano S, Dhulap A, et al. Design, synthesis and biological evaluation of piperic acid triazolyl derivatives as potent anti-inflammatory agents. *Eur J Med Chem* 2015; 92: 490-500.
- [23] Doucette CD, Greenshields AL, Liwski RS, Hoskin DW. Piperine blocks interleukin-2-driven cell cycle progression in CTLL-2 T lymphocytes by inhibiting multiple signal transduction pathways. *Toxicol Lett* 2015; 234: 1-12.
- [24] Levine JM, Reynolds R. Activation and proliferation of endogenous oligodendrocyte precursor cells during ethidium bromide-induced demyelination. *Exp Neurol* 1999; 160: 333-347.
- [25] Nait-Oumesmar B, Decker L, Lachapelle F, Avellana-Adalid V, Bachelin C, Baron-Van Evercooren A. Progenitor cells of the adult mouse subventricular zone proliferate, migrate and differentiate into oligodendrocytes after demyelination. *Eur J Neurosci* 1999; 11: 4357-4366.
- [26] Stangel M, Hartung HP. Remyelinating strategies for the treatment of multiple sclerosis. *Prog Neurobiol* 2002; 68: 76-361.
- [27] Denic A, Johnson AJ, Bieber AJ, Warrington AE, Rodriguez M, Pirko I. The relevance of animal models in multiple sclerosis research. *Pathophysiology* 2011; 18: 21-29.
- [28] Mousavi Majd A, Ebrahim Tabar F, Afghani A, Ashrafpour S, Dehghan S, Gol M, et al. Inhibition of GABA A receptor improved spatial memory impairment in the local model of demyelination in rat hippocampus. *Behav Brain Res* 2018; 336: 111-121.
- [29] Goudarzvand M, Javan M, Mirnajafi-Zadeh J, Mozafari S, Tiraihi T. Vitamins E and D3 attenuate demyelination and potentiate remyelination processes of hippocampal formation of rats following local injection of ethidium bromide. *Cell Mol Neurobiol* 2010; 30: 289-299.
- [30] Khezri S, Dasht Bozorgi N, Rahmani F. The effect of caffeine on the myelin repair following experimental demyelination induction in the adult rat hippocampus. *J Cell Mol Res* 2016; 11: 15-24. (Persian).
- [31] Chonpathompikunlert P, Wattanathorn J, Muchimapura S. Piperine, the main alkaloid of Thai black pepper, protects against neurodegeneration and cognitive impairment in animal model of cognitive deficit like condition of Alzheimer's disease. *Food Chem Toxicol* 2010; 48: 798-802.
- [32] Bae GS, Kim MS, Jung WS, Seo SW, Yun SW, Kim SG, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by piperine. *Eur Pharmacol* 2010; 642: 62-154.
- [33] Paxinos G, Koutcherov Y, Halliday GM, Watson C, Wang H. Atlas of the developing mouse brain: At e17. 5, po, and: Academic press 2007.
- [34] Pourabdolhossein F, Mozafari S, Morvan-Dubois G, Mirnajafi-Zadeh J, Lopez-Juarez A, Pierre-Simons J, et al. Nogo receptor inhibition enhances functional recovery following lysolecithin-induced demyelination in mouse optic chiasm. *PLoS One* 2014; 9: e106378.
- [35] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science (New York, NY)* 2003; 299: 1057-1061.
- [36] Deloire-Grassin MS, Brochet B, Quesson B, Delalande C, Dousset V, Canioni P, et al. In vivo evaluation of remyelination in

بیماری MS باشد. استفاده از فرم نانوپلیمریزه پیرین در مقایسه با فرم ساده آن به جهت تسهیل جذب و فراهمی زیستی دارو به مراتب مناسب تر می باشد که با توجه به دامنه محدود امکانات، استفاده از فرم نانوپلیمریزه پیرین در این طرح پژوهشی میسر نبود. بنابراین استفاده از فرم نانوپلیمریزه پیرین جهت تأیید و بررسی بیشتر اثرات پیش درمانی پیرین و فهم دقیق تر مکانیسم عملکرد آن برای طرح های پژوهشی آینده پیشنهاد می گردد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت ستاد توسعه علوم و فناوری های شناختی، معاونت تحقیقات و فناوری اطلاعات دانشگاه علوم پزشکی بابل و دانشگاه دامغان انجام شد.

منابع

- [1] Lassmann H. Review: the architecture of inflammatory demyelinating lesions: implications for studies on pathogenesis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2011; 37: 698-710.
- [2] Dutta R, Chomyk AM, Chang A, Ribaldo MV, Deckard SA, Doud MK, et al. Hippocampal demyelination and memory dysfunction are associated with increased levels of the neuronal microRNA miR-124 and reduced AMPA receptors. *Annal Neurol* 2013; 73:45-637 .
- [3] Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2000; 343: 938-952.
- [4] Pak F, Nafariyeh T, Asghari N, Shokrollahy M, Kokhaei P. Immunopathology of multiple sclerosis. *Koomesh* 2013; 14: 117-129. (Persian).
- [5] Miljkovic D, Spasojevic I. Multiple sclerosis: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2013; 19: 2286-2334.
- [6] Belbasis L, Bellou V, Evangelou E, Ioannidis JP, Tzoulaki I. Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Lancet Neurol* 2015; 14: 263-273.
- [7] Kakalacheva K, Munz C, Lunemann JD. Viral triggers of multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1812: 132-140.
- [8] Oreja-Guevara C, Ramos-Cejudo J, Aroeira LS, Chamorro B, Diez-Tejedor E. TH1/TH2 Cytokine profile in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with Glatiramer acetate or Natalizumab. *BMC Neurol* 2012; 12: 95.
- [9] Hedegaard CJ, Krakauer M, Bendtzen K, Lund H, Sellevjerg F, Nielsen CH. T helper cell type 1 (Th1), Th2 and Th17 responses to myelin basic protein and disease activity in multiple sclerosis. *Immunology* 2008; 125: 161-169.
- [10] Lewin GR, Barde YA. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci* 1996; 19: 289-317.
- [11] Lee BH, Kim YK. The roles of BDNF in the pathophysiology of major depression and in antidepressant treatment. *Psychiatry Investig* 2010; 7: 231-235.
- [12] Djalali S, Holtje M, Grosse G, Rothe T, Stroth T, Grosse J, et al. Effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on glial cells and serotonergic neurons during development. *J Neurochemistry* 2005; 92: 27-616.
- [13] Lykissas MG, Batistatou AK, Charalabopoulos KA, Beris AE. The role of neurotrophins in axonal growth, guidance, and regeneration. *Curr Neurovasc Res* 2007; 4: 143-151.
- [14] Acosta CM, Cortes C, MacPhee H, Namaka MP. Exploring the role of nerve growth factor in multiple sclerosis: implications in myelin repair. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2013; 12: 1242-1256.
- [15] Maillart E. Treatment of progressive multiple sclerosis: Challenges and promising perspectives. *Rev Neurol (Paris)* 2018; 174: 441-448.

- interleukin 1beta-stimulated fibroblast-like synoviocytes and in rat arthritis models. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: R49.
- [53] Bi Y, Qu PC, Wang QS, Zheng L, Liu HL, Luo R, et al. Neuroprotective effects of alkaloids from *Piper longum* in a MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease. *Pharm Biol* 2015; 53: 1516-1524.
- [54] Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-kappaB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* 2017; 2: 17023.
- [55] Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 2001; 27: 68-73.
- [56] Kim CH. FOXP3 and its role in the immune system. *Adv Exp Med Biol* 2009; 665: 17-29.
- [57] Oda JM, Hirata BK, Guembarovski RL, Watanabe MA. Genetic polymorphism in FOXP3 gene: imbalance in regulatory T-cell role and development of human diseases. *J Genetics* 2013; 92: 163-171.
- [58] Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunology (Baltimore, Md: 1950)* 2008; 180: 5771-5777.
- [59] Salmaggi A, Dufour A, Eoli M, Corsini E, La Mantia L, Massa G, et al. Low serum interleukin-10 levels in multiple sclerosis: further evidence for decreased systemic immunosuppression? *J Neurology* 1996; 243: 13-17.
- [60] Correale J, Gilmore W, McMillan M, Li S, McCarthy K, Le T, et al. Patterns of cytokine secretion by autoreactive proteolipid protein-specific T cell clones during the course of multiple sclerosis. *J Immunology (Baltimore, Md: 1950)* 1995; 154: 2959-2968.
- [61] Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 170-181.
- [62] Linker R, Gold R, Luhder F. Function of neurotrophic factors beyond the nervous system: inflammation and autoimmune demyelination. *Crit Rev Immunol* 2009; 29: 43-68.
- [63] Van't Veer A, Du Y, Fischer TZ, Boetig DR, Wood MR, Dreyfus CF. Brain-derived neurotrophic factor effects on oligodendrocyte progenitors of the basal forebrain are mediated through trkB and the MAP kinase pathway. *J Neurosci Res* 2009; 87: 69-78.
- [64] VonDran MW, Singh H, Honeywell JZ, Dreyfus CF. Levels of BDNF impact oligodendrocyte lineage cells following a cuprizone lesion. *J Neurosci* 2011; 31: 14182-14190.
- [65] Fletcher JL, Wood RJ, Nguyen J, Norman EML, Jun CMK, Prawdiuk AR, et al. Targeting TrkB with a Brain-Derived Neurotrophic Factor Mimetic Promotes Myelin Repair in the Brain. *J Neurosci* 2018; 38: 7088-7099.
- [66] Tongiorgi E, Sartori A, Baj G, Bratina A, Di Cola F, Zorzon M, et al. Altered serum content of brain-derived neurotrophic factor isoforms in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2012; 320: 161-165.
- [67] Kalinowska-Lyszczarz A, Losy J. The role of neurotrophins in multiple sclerosis-pathological and clinical implications. *Int J Mol Sci* 2012; 13: 13713-13725.
- [68] Lindsay RM. Nerve growth factors (NGF, BDNF) enhance axonal regeneration but are not required for survival of adult sensory neurons. *J Neurosci* 1988; 8: 405-2394.
- rat brain by magnetization transfer imaging. *J Neurol Sci* 2000; 178: 10-16.
- [37] Plemel JR, Michaels NJ, Weishaupt N, Caprariello AV, Keough MB, Rogers JA, et al. Mechanisms of lysophosphatidylcholine-induced demyelination: A primary lipid disrupting myelinopathy. *Glia* 2018; 66: 327-347.
- [38] Yazdi A, Baharvand H, Javan M. Enhanced remyelination following lysolecithin-induced demyelination in mice under treatment with fingolimod (FTY720). *Neuroscience* 2015; 311: 34-44.
- [39] Roshanbakhsh H, Elahdadi Salmani M, Dehghan S, Nazari A, Javan M, Pourabdolhossein F. Piperine ameliorated memory impairment and myelin damage in lysolecithin induced hippocampal demyelination. *Life Sci* 2020; 253: 117671.
- [40] Amirifalah Z, Mokhtari-Dizaji M, Javan M. Visual evoked potential frequency content: Effect of lysolecithin induced demyelination in rat optic chiasm. *Koomesh* 2018; 20: 105-114. (Persian).
- [41] Shaterpour M, Shaki F, Ghasemi M, Jafari-Sabet M, Ziar A, Ataee R. The protective effect of curcumin against lithium-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmac Biomed Res* 2017; 3: 33-38.
- [42] Qureshi GA, Parvez SH. Oxidative stress and neurodegenerative disorders: Elsevier 2007.
- [43] Vaibhav K, Shrivastava P, Javed H, Khan A, Ahmed ME, Tabassum R, et al. Piperine suppresses cerebral ischemia-reperfusion-induced inflammation through the repression of COX-2, NOS-2, and NF-kappaB in middle cerebral artery occlusion rat model. *Mol Cell Biochem* 2012; 367: 73-84.
- [44] Ying X, Yu K, Chen X, Chen H, Hong J, Cheng S, et al. Piperine inhibits LPS induced expression of inflammatory mediators in RAW 264.7 cells. *Cell Immunol* 2013; 285: 49-54.
- [45] Singh S, Jamwal S, Kumar P. Piperine enhances the protective effect of curcumin against 3-NP induced neurotoxicity: possible neurotransmitters modulation mechanism. *Neurochem Res* 2015; 40: 1758-1766.
- [46] Sabina EP, Nagar S, Rasool M. A role of piperine on monosodium urate crystal-induced inflammation—an experimental model of gouty arthritis. *Inflammation* 2011; 34: 184-192.
- [47] Lassmann H, Raine CS, Antel J, Prineas JW. Immunopathology of multiple sclerosis: report on an international meeting held at the Institute of Neurology of the University of Vienna. *J Neuroimmunology* 1998; 86: 213-217.
- [48] Holley J, Gveric D, Newcombe J, Cuzner ML, Gutowski NJ. Astrocyte characterization in the multiple sclerosis glial scar. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2003; 29: 434-444.
- [49] Miron VE, Boyd A, Zhao J-W, Yuen TJ, Ruckh JM, Shadrach JL, et al. M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nat Neurosci* 2013; 16: 1211-1218.
- [50] Ousman SS, David S. Lysophosphatidylcholine induces rapid recruitment and activation of macrophages in the adult mouse spinal cord. *Glia* 2000; 30: 92-104.
- [51] Shrivastava P, Vaibhav K, Tabassum R, Khan A, Ishrat T, Khan MM, et al. Anti-apoptotic and anti-inflammatory effect of Piperine on 6-OHDA induced Parkinson's rat model. *J Nutr Biochem* 2013; 24: 680-687.
- [52] Bang JS, Oh DH, Choi HM, Sur BJ, Lim SJ, Kim JY, et al. Anti-inflammatory and antiarthritic effects of piperine in human

Piperine pre-treatment has immunomodulatory effects in hippocampal local model of demyelination

Hannaneh Roshanbakhsh (M.Sc)¹, Mahmoud Elahdadi Salmani (Ph.D)¹, Simin Namvar Aghdash (Ph.D)², Seyed Raheleh Ahmadian (M.Sc)³, Fereshteh Pourabdolhossein (Ph.D)^{*4}

1- Faculty of Biology, Damghan University, Damghan, Iran

2- Department of Biology, Azarbaijan Shahid Madani University Tabriz, Iran

3- Student Research Committee, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

4- Cellular and Molecular Biology Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

* Corresponding author. +98 11 32199592

pourabdolhossein@gmail.com

Received: 4 Apr 2020; Accepted: 27 Jul 2020

Introduction: Inflammatory processes has an important role in the Multiple Sclerosis (MS)'s pathophysiology. Therefore, hampering the inflammatory factors could be an effective strategy in MS treatment. Piperine (the main alkaloid of black piper) has immunomodulatory and anti-inflammatory properties. In this study the pre-treatment effects of piperine on the gene expression level of inflammatory and anti-inflammatory cytokines, growth factors and myelin repair was investigated.

Materials and Methods: Adult male Wistar rats (200–250 g) in 4 experimental groups (1: Control, 2: LPC, 3: LPC+vehicle, 4: LPC+PP 5) were studied (n=8). The pre-treatment with piperine (5 mg/kg) started 2 weeks before demyelination induction by bilateral injection of lysolecithin into the CA1 regions of the hippocampus, until the end of experiment. Myelin repair process was analyzed with myelin specific staining. The evaluation of astrocyte activation was done by immunohistochemistry and the gene expression analysis for IL-1 β , TNF- α , NF-kB, FOXP3, IL-10, BDNF and NGF in the hippocampal tissue was done by Real-time PCR technique.

Results: Pre-treatment with piperine significantly decreased the extent of demyelination and increased myelin optical density. Moreover, glial activation and expression level of inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α , NF-kB) were significantly decreased in the pre-treatment groups with piperine and the level of anti-inflammatory cytokines (FOXP3, IL-10) increased in the hippocampal tissue. The increased expression level of BDNF and NGF was also observed in the piperine pre-treated group.

Conclusion: Piperine improved myelin repair process through reduction of inflammatory cytokines, glial activation and enhancement of anti-inflammatory cytokines and growth factors.

Keywords: Piperine, Myelin Sheath, Multiple Sclerosis, Hippocampus.