

بررسی اثر عصاره الکلی برگ کرفس کوهی (*Kellussia odoratissima*) و ویتامین B12 بر میزان شاخص‌های التهابی در موش صحرایی مبتلا به انسفالومیلیت آلرژیک تجربی

اکبر کریمی¹، مجید گورویی²

1- استادیار گروه زیست شناسی دانشگاه پیام نور، تهران، ایران. karimiakbar38@yahoo.com

2- گروه زیست شناسی دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: 93/12/2 تاریخ پذیرش: 94/1/15

چکیده

زمینه و هدف: مالتیپل اسکلروزیس (MS) بیماری خود ایمنی و التهابی در سیستم عصبی مرکزی است. کرفس کوهی دارای خواص ضد التهابی و ویتامین B12 تنظیم کننده سیستم ایمنی است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات عصاره الکلی برگ کرفس کوهی و B12 بر روی آنزیم‌های لیزوزومی و شاخص بافتی در موش صحرایی مبتلا به انسفالومیلیت آلرژیک تجربی (EAE) است. روش کار: در این مطالعه از 50 رت ماده لوئیس (180-200 گرم) استفاده و در 40 سر از آن‌ها EAE القاء شد. عصاره الکلی برگ کرفس کوهی (30mg/kg) و ویتامین B12 (5mg/kg) از طریق درون صفاقی به مدت 10 روز جهت درمان استفاده گردید. سطوح آنزیم‌های لیزوزومی و آنزیم‌های شاخص بافتی با روش‌های بیوشیمیایی مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی‌های آماری با استفاده از ANOVA مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: درمان رت‌های مبتلا به EAE با عصاره الکلی برگ کرفس کوهی و B12 به کاهش معنی‌داری در شرایط بد کلینیکی، سطح آنزیم‌های لیزوزومی و آنزیم‌های شاخص بافتی منتهی شد ($p \leq 0/05$).

نتیجه‌گیری: تیمار توام کرفس کوهی و ویتامین B12 شاخص‌های التهابی را کاهش و دارای خواص ضد التهابی می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: کرفس کوهی، ویتامین B12، انسفالومیلیت آلرژیک، رت.

مقدمه

علمی *Kellussia odoratissima* یکی از گونه‌های آن می‌باشد و تنها در ایران رویش می‌کند (15). در طب سنتی برای اندام‌های هوایی این گیاه خواص ضد درد، ضد التهاب، درمان روماتیسم و تصفیه خون قائل هستند (16، 17). بررسی‌ها نشان می‌دهد که عصاره تام کرفس کوهی دارای موادی هم‌چون 7، 3، 4 تری هیدروکسی فلاونول، کافئیک اسید و فتالید می‌باشد که مواد یاد شده می‌توانند خاصیت بالقوه و آنتی اکسیدانی مناسبی به کرفس کوهی بدهد (22). هم‌چنین به دلیل دارا بودن ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها، این گیاه دارای

بیماری MS از بیماری‌های التهابی است که در آن سلول‌های فعال شده ایمنی با حمله به سیستم عصبی مرکزی (مغز و نخاع) باعث بروز بیماری می‌شوند. درمان بیماری MS به دلیل پیچیدگی آن یکی از چالش‌های مهم در دنیای پزشکی است (5). انسفالومیلیت آلرژیک تجربی (EAE) مدل حیوانی با ارزشی در کارهای تحقیقاتی برای بررسی بیماری MS می‌باشد و آن را می‌توان با تزریق بافت مغز یا نخاع از یک گونه جانوری به گونه دیگر ایجاد نمود (21). خانواده چتریان شامل 275 جنس و 285 گونه می‌باشند که کرفس کوهی با نام

در نهایت 250 میکرولیتر از ترکیب به هر رت ماده نژاد لویس (200-180 گرم) به صورت زیرجلدی تزریق شد. موش‌ها در مرکز حیوان‌خانه دانشگاه پیام نور مرکز اصفهان در شرایط استاندارد (12 ساعت تاریکی و 12 ساعت روشنایی، دسترسی آزادانه به آب، غذا، دما، رطوبت مناسب) نگهداری گردید. بعد از گذشت 10 روز علائم القاء بیماری در موش‌ها دیده شد.

روش عصاره‌گیری

برگ کرفس کوهی از منطقه کوه‌رنگ استان چهارمحال و بختیاری تهیه و بعد از جدا کردن قسمت‌های زائد، فرآیند شستشو، خشک و پودر کردن روی آن‌ها اعمال شد. پودر حاصله با نسبت یک به دو با الکل شیرین 70٪ مخلوط گردید (22) و به مدت 48 ساعت در دمای اتاق قرار گرفته، سپس با قیف بوختر صاف و در ادامه به نسبت یک به یک به آن حلال اضافه و به مدت 24 ساعت در دمای 50 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از خشک شدن، عصاره‌های تراشیده توزین و از 500 گرم کرفس کوهی اولیه در نهایت 35 گرم پودر عصاره به دست آمد. پس از آن غلظت‌های مورد نظر تهیه و تا زمان استفاده در روز آزمایش در یخچال نگهداری شدند (22).

دارو درمانی

پس از القاء بیماری در 40 رت، آن‌ها به صورت تصادفی در 4 گروه قرار داده شدند. به همراه گروه شاهد پنج گروه ده تایی از رت‌های ماده لویس به قرار زیر ایجاد شد:

گروه اول (شاهد): که القاء بیماری در آن‌ها انجام نشد.
گروه دوم (کنترل): بیماری در آن‌ها القا و روزانه با نرمال سالین به صورت درون صفاقی تیمار شدند.
گروه سوم (ویتامین B12): بیماری در آن‌ها القا و به میزان 5 mg/kg به صورت درون صفاقی تیمار شدند (13).

خاصیت مهار رادیکال‌های آزاد و اثرات آنتی‌اکسیدانی است که با آلفا توکوفرول قابل مقایسه می‌باشد. در مطالعات مختلف اثرات ضد التهابی، آرام‌بخش، فیبرینولیتیک، کاهشنده اسید معده، تقویت کننده حافظه در کرفس کوهی ثابت شده است، در ضمن این گیاه دارای خواص محافظت از کبد و ضد سرطانی نیز است (6). ویتامین B12 که به کوبالامین معروف است، یک ترکیب ارگانیک فلزی است که اتم کبالت درون یک حلقه کورین قرار گرفته و ساختار شبه پورفیرین هم (Heme) را ایجاد می‌کند (13). اختلالات عصبی ناشی از کمبود ویتامین B12 دارای نشانه‌هایی مثل میلین زدایی و مرگ آکسونی می‌باشد. بررسی‌ها نشان داده است که خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی B12 نتیجه‌ای از یک سری اثرات مستقیم و غیر مستقیم شامل تحریک فعالیت متیونین سنتتاز و تعدیل مولکول‌های پیام‌رسان می‌باشد (4). Brich و همکارانش در سال 2009 گزارش کردند که مشتقات ویتامین B12 پاسخ‌های استرس اکسیداتیو را تعدیل نموده و این مشتقات می‌تواند به عنوان مکمل در پاسخ‌های سلولی به التهاب مورد استفاده قرار گیرد (4). با توجه به نقش احتمالی B12 در تعدیل فرآیندهای التهابی و نقش آن در احیای میلین در این مطالعه از آن به همراه عصاره کرفس کوهی که خاصیت ضد التهابی دارد در جهت بررسی کاهش اثرات بیماری رت‌های مبتلا به انسفالومیلیت آلرژیک تجربی استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی جهت ایجاد مدلی از بیماری MS در حیوانات از روش Shinder استفاده شد (21). برای این منظور پس از بیهوش کردن خوکچه‌های هندی نخاع آن‌ها خارج و یک گرم از نخاع با یک سی سی نرمال سالین ترکیب و هموژنه گردید. ترکیب ایجاد شده به نسبت یک به یک با ادجوانت کامل فرونت مخلوط و

از روز بعد از القاء بیماری توسط فردی که از روش و مقدار درمان بی اطلاع بود، استفاده شد تا میزان شدت علائم بیماری مطابق با جدول 1 را برای هر رت اندازه-گیری نماید. بعد از آن از امتیازات بدست آمده میانگین گرفته و برای هر گروه در هر روز یک میانگین لحاظ شد. این امر تا 14 روز بعد از القاء بیماری به طول انجامید.

گروه چهارم: گروه کرفس، بیماری در آن‌ها القاء و با مقدار 30 mg/kg عصاره الکلی برگ کرفس کوهی به-صورت درون صفاتی تیمار شدند(9).

گروه پنجم: گروه ترکیبی، بیماری در آن‌ها القاء و با ترکیبی از عصاره الکلی برگ کرفس کوهی و ویتامین B12 به صورت درون صفاتی تیمار شدند. به دلیل آن که بروز علائم بیماری حداقل 10 روز به طول می انجامد تیمارها نیز به مدت 10 روز تزریق گردید.

بررسی شرایط کلینیکی

جدول 1- علائم و نشانه های کلینیکی و امتیازات متناسب با آنان(21).

امتیاز	علائم و نشانه ها
0	بدون نشانه و علامت
1	دم فاقد کشیدگی طبیعی
2	فلج دم
3	فلج جزئی در اندام حرکتی عقبی
4	فلج کامل پاها و فلج جزئی دست‌ها
5	فلج کامل پاها و فلج کامل دست‌ها
6	مرگ و میر

ادامه میزان سیالیک اسید به روش Aminof مورد ارزیابی قرار گرفت(24).

بررسی آنزیم‌های شاخص بافتی

میزان آلکالین فسفاتاز، آسپارات ترانس آمیناز(AsT) و آلانین ترانس آمیناز(ALT) با روش King اندازه گیری شد(12).

اندازه‌گیری میزان تومور نکروزیز فاکتور آلفا(TNF- α)

پس از جداسازی سرم‌ها میزان TNF- α با روش الایزا و با استفاده از کیت مخصوص تعیین TNF- α ساخت شرکت (Abcam) و مطابق با دستورالعمل کیت به شماره ab460700 اندازه گیری شد(2).

تحلیل آماری

نتایج بر اساس میانگین و انحراف معیار بیان و جهت مقایسه بین گروه‌ها و تفاوت معنی‌دار از روش ANOVA 2 طرفه و LSD استفاده و $P < 0/05$ به‌عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

سنجش آنزیم‌های لیزوزومی

15 روز بعد از القاء بیماری، حیوانات با ترکیبی از زایلین و کتامین بیهوش و نمونه خون با ایجاد سوراخ در قلب تهیه گردید. در ادامه جهت تعیین اسید فسفاتاز از روش King و نیز برای تعیین میزان گلوکوروئیداز از روش Kawai استفاده شد(10، 12، 1).

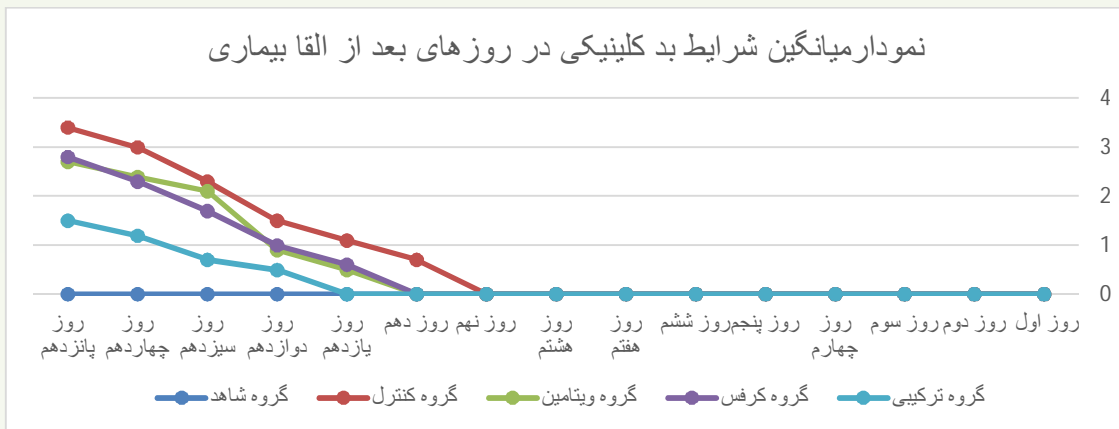
اندازه‌گیری میزان گلیکوپروتئین‌ها

برای بررسی گلیکوپروتئین‌ها، حدود 100 میلی گرم از هر کدام از بافت‌های کبد و طحال در روز پانزدهم بعد از القاء بیماری برداشته و در محلول هگزان تثبیت گردید. در ادامه نمونه‌ها به لوله های اپندورف منتقل و یک میلی‌لیتر از HCL 2 نرمال برای هیدرولیز بافتی اضافه شد. پس از انجام هیدرولیز pH محلول‌ها با سود مناسب خنثی و محلول رویی برای بررسی میزان گلیکوپروتئین-ها(هگزوآمین)، با روش Wanger محاسبه شد(22)، در

نتایج

همان‌طور که ملاحظه می‌شود این میزان میانگین شرایط بد کلینیکی در گروه دوم (القاء شده و درمان شده با نرمال سالین) افزایش و در گروه پنجم (گروه درمان ترکیبی) نسبت به گروه اول، کاهش معنی‌داری پیدا کرده است ($P < 0/05$) (نمودار 1). پس از پایان آزمایش سطوح آنزیم‌های لیزوزومی در خون، کبد و طحال

گروه‌ها بررسی شد. میزان اسید فسفاتاز و گلوکوکورتیکوئیداز در گروه شاهد افزایش یافته بود و این در حالی است که در گروه‌های درمانی میزان آن‌ها کاهش یافته بود، به طوری که در گروه ترکیبی نسبت به گروه کنترل میزان آن‌ها کاهش معنی‌داری پیدا کرده بود ($p \leq 0/05$) (جدول 2).



نمودار 1- اثر تیمارهای عصاره الکل برگ کرفس و B12 بر شرایط بد کلینیکی در روزهای بعد از القا بیماری

میانگین شدت بیماری در گروه کنترل در روز دهم مطابق با امتیازات کسب شده توسط جدول 1 برابر با 0/5 بود، در صورتی که در گروه ترکیبی میانگین یاد شده در روز دوازدهم به دست آمد، از طرف دیگر حداکثر میانگین شدت بیماری در گروه کنترل 2/9 بوده در حالی که این میزان در گروه ترکیبی کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد ($p \leq 0/05$).

جدول 2- اثر تیمارهای عصاره الکل برگ کرفس و B12 بر میزان آنزیم‌های لیزوزومی

پارامتر	گروه شاهد	گروه کنترل	گروه ویتامین	گروه کرفس	گروه ترکیبی
اسید فسفاتاز پلاکت‌ها	0/12±0/01	0/91±0/01	0/11±0/02	0/12±0/05	0/13±0/01*
بتاگلوکورتیکوئیداز پلاسما	1/76±0/09	6/25±0/6	5/35±0/65	5/1±0/7	3/23±0/10*
اسید فسفاتاز کبد	2±0/01	4/1±0/07	3/2±0/11	3/3±0/1	2/55±0/11*
بتاگلوکورتیکوئیداز کبد	25±0/071	38/7±1/37	37/6±0/1	36/2±1/72	30±0/87*
اسید فسفاتاز طحال	2/66±0/07	4/3±0/08	4/2±0/2	3/6±0/06	3/15±0/11*
بتاگلوکورتیکوئیداز طحال	28±0/81	44/5±0/95	40±2,1	39±2/3	32/5±0/95*

میزان آنزیم‌های لیزوزومی خون، کبد و طحال در گروه ترکیبی نسبت به گروه‌های کنترل، ویتامین و کرفس کوهی کاهش معنی‌داری نشان می‌دهد ($p \leq 0/05$).

* نشان دهنده کاهش سطوح آنزیم‌های لیزوزومی در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد ($p \leq 0/05$).

طوری که این کاهش در گروه پنجم یعنی گروهی که هم کرفس کوهی و هم ویتامین B12 را دریافت کرده بودند معنی‌دار بود ($P < 0/05$).

جدول (3) میزان هگزوزآمین و اسید سیالیک را در کبد و طحال گروه‌های مختلف نشان می‌دهد. میزان این مواد در گروه‌های تحت درمان کاهش یافته است. به-

و طحال گروه تیمار شده با کرفس کوهی و ویتامین B12 نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافته است ($P < 0/05$).

جدول 4 میزان آنزیم‌های شاخص بافتی آلکالین فسفاتاز (ALP)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) را نشان می‌دهد. همان طور که ملاحظه می‌گردد میزان آنزیم‌ها در کبد، پلاسما

جدول 3- میانگین اثر تیمارهای عصاره الکی برگ کرفس و B12 بر میزان هگزوز آمین و اسید سیالیک کبد و طحال

پارامتر	گروه شاهد	گروه کنترل	گروه ویتامین	گروه کرفس	گروه ترکیبی
هگزوز آمین کبد	0/18±0/06	0/44±0/02	0/43±0/03	0/40±0/02	0/23±0/04*
سیالیک اسید کبد	30±2	44/1±3/5	42±1/5	39/5±2/5	35±2/1*
هگزوز آمین طحال	0/20±0/04	0/30±0/02	0/29±0/03	0/28±0/04	0/25±0/03*
سیالیک اسید طحال	23±1/64	33/8±2/3	33/1±1/75	32±2	26±2/5*

* نشان دهنده کاهش معنی دار سطوح هگزوز آمین و اسید سیالیک در کبد و طحال گروه تیمار ترکیبی کرفس کوهی و ویتامین B12 در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد ($p < 0/05$).

جدول 4- میانگین اثر تیمارهای عصاره الکی برگ کرفس و B12 بر میزان آنزیم‌های شاخص بافتی

پارامتر	گروه شاهد	گروه کنترل	گروه ویتامین	گروه کرفس	گروه ترکیبی
آلانین ترانس آمیناز خون	0/6±0/06	1/2±0/09	1/3±0/08	0/9±0/07	0/67±0/08*
آسپاراتات ترانس آمیناز خون	0/43±0/05	1/1±0/08	1/5±0/09	1±0/05	0/51±0/04*
الکالین فسفاتاز خون	2/1±0/20	5/2±0/6	3/7±0/7	3/6±0/6	2/95±0/3*
آلانین ترانس آمیناز کبد	0/1±0/05	0/27±0/03	0/23±0/06	0/23±0/08	0/18±0/04*
آسپاراتات ترانس آمیناز کبد	0/15±0/06	0/29±0/04	0/28±0/05	0/22±0/02	0/17±0/08*
الکالین فسفاتاز کبد	1/1±0/09	3/12±0/13	3±0/1	2/5±0/09	1/7±0/2*
آلانین ترانس آمیناز طحال	0/11±0/01	0/36±0/03	0/31±0/04	0/28±0/05	0/24±0/05*
آسپاراتات ترانس آمیناز طحال	0/17±0/06	0/44±0/02	0/45±0/02	0/40±0/03	0/35±0/04*
الکالین فسفاتاز طحال	0/44±0/03	0/99±0/05	0/8±0/06	0/7±0/04	0/58±0/06*

* نشان دهنده کاهش مقدار آنزیم‌های شاخص بافتی گروه درمان ترکیبی در مقایسه با گروه کنترل است ($p < 0/05$).

ویتامین B12 نسبت به گروه کنترل (القاء شده و درمان شده با نرمال سالین) کاهش معنی داری را نشان می‌دهد ($P < 0/05$).

جدول 5 میزان تومور نکروزیز فاکتور آلفا (TNF- α) در سرم رت‌ها در گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد. میزان TNF- α در گروه درمان شده با کرفس کوهی و

جدول 5- میانگین اثر تیمارهای عصاره الکی برگ کرفس و B12 بر میزان تومور نکروزیز فاکتور آلفا

پارامتر	گروه شاهد	گروه کنترل	گروه ویتامین	گروه کرفس	گروه ترکیبی
تومور نکروزیز فاکتور آلفا (pg/ml)	423±0/8	760±0/09	640±0/08	630±0/07	560±0/08*

* نشان دهنده کاهش معنی دار میزان تومور نکروزیز فاکتور آلفا در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد ($p < 0/05$).

ارزیابی قرار می‌گیرد، مشابه شرایط یاد شده می‌باشد، هرچه شدت بیماری بیشتر شود میزان بروز اختلالات حرکتی هم نمود بیشتری پیدا می‌کند (21، 8). در این مطالعه هم افزایش میزان میانگین شرایط بد کلینیکی در گروه دریافت کننده نرمال سالین و کاهش میانگین شرایط

بحث و نتیجه گیری

افزایش میانگین شرایط بد کلینیکی در مدل‌های القاء شده نتیجه ای از نفوذ گرانولوسیت‌ها و مونوسیت‌ها به سیستم عصبی مرکزی می‌باشد. یکی از موارد مهمی که در تحقیقات بر روی مدل‌های حیوانی بیماری MS مورد

منطقه کوه‌رنگ دارای فتالدهیدهایی از قبیل Z-Ligustilid می‌باشد (14، 13). Wong و همکارانش در سال 2012 مشخص نمودند که Z-Ligustilid می‌تواند از بیان آنزیم Cox2 پروستاگلاندین E₂ در طی التهاب جلوگیری نماید. در ضمن بررسی آن‌ها نشان داد که فعالیت ضدالتهابی Z-Ligustilid به خاطر ممانعت از مسیرهای NF_K و MAPK در ماکروفاژها می‌باشد (9). TNF- α توسط سلول‌های خودایمنی ترشح شده و مستقیماً سد خونی مغزی را تخریب می‌کند و عاملی در جهت میلین‌زدایی محسوب می‌شود (14، 3). با توجه به نقش TNF- α در گسترش بیماری و هدف درمانی آن در این مطالعه میزان آن بررسی شد. B12 دارای تاثیرات تنظیم‌کنندگی ایمنی می‌باشد و این تاثیرات شامل تعدیل فعالیت سیتوکین‌هایی مثل TNF- α می‌باشد (16، 13).

علاوه بر تاثیرات ضدالتهابی ترکیبات کرفس کوهی می‌توان به نقش و اهمیت ویتامین B12 اشاره کرد. ویتامین B12 دارای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی شاخصی در جایگاه‌های فارماکولوژی می‌باشد و موجب حفاظت-های سلولی مهم علیه استرس‌های اکسیداتیو می‌شود (4). ترکیب کرفس کوهی و ویتامین B12 می‌تواند باعث کاهش آنزیم‌های لیزرومی، آنزیم‌های شاخص بافتی؛ TNF- α و شرایط بد کلینیکی در رت‌های مبتلا به انسفالومیلیت آلرژیک تجربی شوند (18) و می‌توان با کاربرد آن‌ها کاهش شرایط کلینیکی بد در بیماران MS و حتی بهبود آن‌ها را انتظار داشت.

تشکر و قدردانی

این مطالعه بخشی از طرح پژوهشی دانشگاه پیام نور استان اصفهان می‌باشد. بدین وسیله نویسندگان مقاله از همکاری مسئولین محترم دانشگاه پیام نور اصفهان کمال تشکر را دارند.

یاد شده در گروه‌های درمانی خصوصاً گروه تیمار شده با کرفس کوهی و ویتامین B12 مشاهده گردید. بررسی‌ها نشان داده است که در طی التهاب فعالیت آنزیم‌های لیزوزومی افزایش می‌یابد (20، 25). در این مطالعه افزایش آنزیم‌های یاد شده در گروه دریافت‌کننده نرمال سالین مشاهده گردید. این آنزیم‌ها از ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها آزاد می‌شوند و در ادامه با شروع بیان میانجی‌های التهابی از متیل پروستاگلاندین‌ها در توسعه اثرات ناشی از التهاب نقش آفرینی می‌کنند (16). کاهش آزادسازی آنزیم‌های یاد شده می‌تواند دلیل مناسبی برای خواص محافظتی درمانی باشد. در این مطالعه کاهش آنزیم‌های یاد شده در گروه‌های آزمایشی مخصوصاً گروه درمان ترکیبی کرفس کوهی و ویتامین مشاهده گردید. گلیکوپروتئین‌ها ترکیبات شکل‌دهنده بافت همبند هستند؛ در ضمن دارای خواص آنتی‌ژنی هم می‌باشند. بررسی‌ها نشان داده‌اند که متابولیسم گلیکوپروتئین‌ها در مدل‌های حیوانی بیماری-های خود ایمنی افزایش می‌یابد (23). این عوامل در تخریب ساختارهای ماکرومولکولی در بافت همبند دخالت دارند و میزان‌شان در فرآیندهای التهابی افزایش می‌یابد (11، 7). با توجه به نقش و جایگاه عوامل یاد شده در فرآیندهای التهابی نتایج حاصله از این پژوهش با تحقیقات قبلی مطابقت دارد. از آنجایی که آسیب بافتی با اندازه‌گیری فعالیت آمینوترانسفرازها در سرم و کبد مورد ارزیابی قرار می‌گیرد، نقش کبد در بیماری‌های خود ایمنی و التهابی ثابت شده است (19)، در این مطالعه سطوح آلکالین فسفاتاز و آمینوترانسفرازها مورد ارزیابی قرار گرفت و مشاهده شد که ترکیب کرفس کوهی و ویتامین B12 از بیان فعالیت آلکالین فسفاتاز و آمینوترانسفراز جلوگیری به عمل می‌آورد و این کاهش می‌تواند نتیجه‌ای از اثرات محافظتی و تعدیل‌کننده ایمنی کرفس کوهی و ویتامین B12 باشد. کرفس کوهی

1. Agha, M.A. (1995). Lipid peroxidation and lysosomal integrity in different inflammatory models in rats: The effects of indomethacin and naftazone. *Agents and Actions*, 32; 279–285.
2. Aminoff, D. (1961). Methods for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. *The Biochemical Journal*, 81; 384–392.
3. Bielekova, B., Martin, R. (2004). Development of biomarkers in multiple sclerosis. *Brain*, 127; 1463- 1478.
4. Birch, C.S., Brasch, N.E., MsCaddin, A., Williams, JH.H. (2009). A novel role for vitamin B12; Cobalamins are intracellular antioxidant in vitro. *Biology and Medicine*, 47; 184-188.
5. Blakemore, W.F. (2007). Regeneration review repair in MS: the view of experimental pathology. *J. Neurological. Sci.*, 125; 1-4.
6. Etebari, M., Sajjadi, SA., Jafarian-Dehkordi, A., (2012). Antigenotoxic effects of methanolic and aqueous extracts of *Kellussia odoratissima* mozaffarian against damage induced by methyl methanesulfonate. *Journal of Isfahan Medical School*, 30(215); 2061-2070.
7. Chung, JW., Choi –Eun, R.J., Soo, K. (2012). Anti-inflammatory effect of (Z) –ligustilide through suppression of mitogen- activated protein kinase and nuclear factor –k B activation pathways. *Archives of Pharmacol Research*, 35(4); 723-732.
8. Ferguson, C., Sarlieve, L.I, Vincendon, G. (1990). Multiple sclerosis; review of main experimental data and pathogenic hypotheses. *Rev. Med. Intern.*, 11; 201- 208.
9. Hajhashemi, V., Ghanadi, A., Soltani, L. (2002). Effect of anti-inflammatory and analgesic of *Kellussia*. *Research in Medical Sciences*, 7; 121-125.
10. Kawai, Y., Anno, K. (1971). Muco poly saccharide-degrading enzymes from the liver of the squid, *Ommastrephes sloani* pacificus I. Hyaluronidase. *Biochim. Biophys. Acta.*, 242; 428-436.
11. Kesava Reddy, G., Dhar, S. (1991). Metabolism of glycosaminoglycans in tissues of adjuvant arthritic rat. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 106(2); 117-126.
12. King, E. J. (1965). *Practical clinical enzymology*, ed. by Van D., Nostrand Company Ltd., London.
13. Mastronardi, F.G., Min, W., Wang, H., Winer, S., Dosch, M., Boggs, J.M. (2004). Attenuation of experimental autoimmune encephalomyelitis and non immune demyelination by IFN-beta plus vitamin B12: treatment to modify notch-1/sonic hedgehog balance. *J. Immunol.*, 172; 6418-26.
14. Miller, J.W. (2002). Vitamin B12 deficiency, tumor necrosis factor-alpha, and epidermal growth factor: a novel function for vitamin B12?. *Nutr. Rev.*, 60; 142-4.
15. Mozaffarian, V. (2003). Two new genera of iranian Umbelliferae. *Bot. Zhurn.*, 88-94.
16. Perry L M. (1982). *Medicinal plants of East and South-East Asia*. London. MIT Press; 413.
17. Pitt, D., Nagel Meier, I. E., Wilson, H. C., Raine, C. (2003). Glutamate uptake by oligodendrocytes: Implications forexcitotoxicity in MS. *Neurology*, 61; 1113-1120.
18. Rabbani, M., Sajjadi, I., Sadeghi, M. (2011). Chemical composition of the essential oil from *Kellussia odoratissima* Mozaff. and the evaluation of its sedative and anxiolytic effects in mice. *CLINICS*, 66(5); 843-848.
19. Rainsford, KD. (1982). Adjuvant polyarthritis in rats: Is this a satisfactory model for screening anti-arthritic drugs?. *Agents and Actions*, 12; 452–458.
20. Rasool, M., Latha, L., Varalakshmi, P. (2000). Effect of *Withania somnifera* on lysosomal acid hydrolases in adjuvant-induced arthritis in rats. *Pharm. Pharmacol. Commun.*, 6; 187-190.
21. Schneider, C., Shuetz, G., Zollner, T.M. (2009). Acute neuro inflammation in Lewis rats. A model for acute multiple sclerosis relapses. *J. of Neuroimmunol*, 213; 84 – 90.
22. Shahrani, M., Pilevarian, A., Kheiri, S., Asgari, A. (2008). Effect of *Kelusia* on blood lipids in mice. *J. of University of Medical Sciences Shahre Kord*, 50-56.
23. Vijayalakshmi, T., Muthulakshmi, V., Sachdanandam, P. (1997). Effect of milk extract of *Semecarpus anacardium* nuts on glycohydrolases and lysosomal stability in adjuvant arthritis in rats. *J. Ethnopharmacol* , 58(1); 1-8.
24. Wagner, W. D. (1997). More sensitive assay discriminating galactosamine and glycosamine in mixtures. *Anal. Biochem.*, 94; 394–397.
25. Weissmann, G. (1972). Lysosomal mechanisms of tissue injury in arthritis. *N. Engl. J. Med.*, 286(3); 141–147.



