

مقاله تحقیقی

اثر کارواکرول بر بیان ژن‌های *TGF-β* و *IL-10*, *FOX-P3*, *IL-4* در نخاع موش‌های مالتیپل اسکلروزیس

مهديه احمدی^۱، اکرم عیدی^۱، حسن احمدوند^{۲*}، مجتبی خاکساریان^۳، فتاح ستوده نژاد نعمت الهی^۱

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست شناسی، تهران، ایران

۲. گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران

۳. گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران

*مسئول مکاتبات: آدرس الکترونیکی: Hassan_a46@yahoo.com

محل انجام تحقیق: مرکز تحقیقات گیاهان دارویی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۴/۳۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۳/۲۵

چکیده

مالتیپل اسکلروزیس شایع‌ترین بیماری نورولوژیکی است که با التهاب و تخریب آکسون‌ها در سیستم عصبی مرکزی مشخص می‌شود. کارواکرول ترکیب فیتواستروژنی ارزشمندی است و نتایج بسیاری در مورد اثربخشی آن در زمینه کاهش التهاب و حفاظت از نورون‌ها به دست آمده است. هدف از این مطالعه بررسی اثر کارواکرول بر بیان ژن‌های *IL-4*, *foxp3*, *IL-10* و *TGF-β* در نخاع موش‌های صحرایی مدل EAE (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis) است. به عنوان مدل حیوانی مالتیپل اسکلروزیس است. EAE در موش‌های صحرایی ماده نژاد لوپس القاء شد. موش‌ها به سه گروه کنترل، مدل EAE و گروه EAE تحت تیمار با کارواکرول دسته‌بندی شدند. کارواکرول به صورت روزانه و داخل صفاقی از روز ۱۲ تا ۲۹ بعد از ایمنی‌زایی تزریق شد. نمونه‌برداری از بافت نخاع انجام گرفته و RNA استخراج گردید و تغییرات بیان ژن‌های *IL-10*, *foxp3*, *IL-4* و *TGF-β* به وسیله real time-PCR بررسی شد. نتایج نشان داد القاء مدل آزمایشگاهی مالتیپل اسکلروزیس در موش‌ها باعث کاهش بیان ژن‌های ضدالتهابی *IL-1*, *IL-4* و *TGF-β* در بافت نخاع شد و تیمار موش‌های مدل EAE با کارواکرول باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن *IL-10* شد ($P < 0.0001$) و در بیان ژن‌های *IL-4* و *TGF-β* تاثیر مثبتی مشاهده نشد. همچنین، میزان بیان ژن *foxp3* در گروه مدل، دارای افزایش چشمگیری بود ($P < 0.0001$) که تیمار با کارواکرول این مقدار را کاهش داد. با اثرگذاری کارواکرول بر افزایش بیان ژن *IL-10*، کاهش التهاب موضعی و افزایش پاکسازی نخاله‌های حاصل از آن، محیط تهاجمی که برای نورون‌ها ایجاد شده است را به یک محیط امن تبدیل می‌کند و ریمیلیناسیون به راه می‌افتد.

واژه‌های کلیدی: کارواکرول، مالتیپل اسکلروزیس، التهاب، موش صحرایی

مقدمه

رادیکال‌های آزاد دارد و مهم‌ترین ترکیب گیاهان مختلف از جمله *Origanum vulgare* است. کارواکرول اثرات داروشناختی و بیولوژیکی مختلفی دارد؛ از جمله: ویژگی-های آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضدتوموری و آنتی-میکروبیال. کارواکرول در بیماری‌هایی که در معرض گاز خردل قرار گرفته بودند، باعث کاهش *EGF*, *VEGF*،

با توجه به نقش مهم ترکیبات پلی‌فنلیک در بیماری‌های مخرب نورون‌ها، برخی از ترکیبات مستخرج از گیاهان دارویی در طب سنتی برای درمان بیماری‌های التهابی کاربرد فراوان داشته‌اند. کارواکرول یک فنل مونوترپنوئید است که اثرات آنتی‌اکسیدانی ویژه‌ای بر علیه

دوباره میلینه شدن در آن‌ها نسبت به جنس نر کارایی بیش‌تری دارد. هم‌چنین مغز ماده‌ها محتوی ماده سفید کم‌تری است. چگالی الیگودندروسیت‌ها در Corpus callosum و Formix و طناب نخاعی جوانگان نر ۲۰ تا ۴۰ درصد بیش‌تر از ماده‌ها است و این تفاوت‌های آناتومیکی منجر به حساس شدن بیش‌تر مغز جنس ماده به دمی‌لیناسیون و مالتیپل اسکلروزیس می‌شود (۱۰). از این‌رو در القاء مدل‌های مرتبط با مالتیپل اسکلروزیس غالباً از موش‌های ماده استفاده می‌گردد.

تاکنون مطالعات زیادی در رابطه با اثر کارواکرول در بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس یا در مدل EAE انجام نشده است. در سال ۲۰۱۹ و با بررسی اثر کارواکرول در مدل EAE و با کشت سلول‌های طحال، مشخص شد که کارواکرول می‌تواند باعث کاهش اسکوربندی کلینیکی، کاهش $IL-17$ ، $IFN-\gamma$ و $IL-6$ و افزایش $TGF-\beta$ و $IL-10$ شود و موش‌های تحت تیمار کاهش وزن کم‌تری را تجربه کردند (۹).

هدف از این مطالعه، بررسی اثر کارواکرول بر بیان ژن‌های ضدالتهابی $TGF-\beta$ ، $IL-4$ ، $IL-10$ ، $foxp3$ در نخاع موش‌های صحرایی نژاد لوپس می‌باشد.

مواد و روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی

۸ تا ۱۰ موش لوپس ماده (دارو پخش، ایران) با وزن ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم در هر گروه در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. در هر قفس ۴ تا ۶ سررت و با شرایط نوری ۱۲ ساعت تاریکی/۱۲ ساعت نور در اتاق‌های ایزوله با دمای 24 ± 2 و به دور از آلودگی نگه‌داری شدند. حیوانات به آب و غذا دسترسی آزادانه داشتند. این شرایط با کد IR.LUMS.REC.1396.309 مورد تایید کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی در دانشگاه علوم پزشکی لرستان قرار گرفت.

القاء مدل EAE و درمان آن

ایجاد مدل طبق روش Beeton و همکاران انجام شد (۱۱). در این روش هموژنای نخاع خوکچه هندی (انستیتو پاستور، ایران) با ترکیب نخاع و آب مقطر تهیه شده و به نسبت یک به یک با ادجوان فروند کامل (Sigma، آمریکا) مخلوط شد تا امولسیون یکنواختی حاصل شود. برای القاء

$TNF-\alpha$ و $MCP-1$ می‌شود (۱). در سمیت کبدی که به-وسیله D-galactosamine ایجاد شد، کارواکرول بیان mRNA و پروتئینی $TNF-\alpha$ ، $IL-6$ ، $iNOS$ ، $COX-2$ و $K\beta$ را کاهش می‌دهد (۲). اثرات محافظت از نورون کارواکرول در برخی از بیماری‌های نورولوژیکی مانند مدل‌های آزمایشگاهی focal cerebral ischemia، Parkinson disease و epilepsy نیز به اثبات رسیده است (۳، ۶). در مدل پارکینسون در موش‌های مورد مطالعه، تیمار با کارواکرول، نواقص حافظه‌ای را بهبود بخشیده و میزان Caspase-3 را کاهش می‌دهد (۴، ۷). کارواکرول در cerebral ischemic model باعث بهبود توانایی‌های یادگیری و حافظه‌ای موش‌ها شده و در بافت مغزی ایسکمیک موش‌های تحت درمان، سطح بیومارکرهای lipid peroxide و مرگ سلولی کاهش یافت. از سوی دیگر، کارواکرول باعث مهار ferroptosis شد و این عمل با افزایش بیان گلوکوتائون پراکسیداز-۴ (GFX-4) صورت گرفت (۸).

ام‌اس بیماری خودایمن و پیچیده سیستم عصبی مرکزی است که با التهاب، تغییر عملکرد آکسونی و دمی‌لیناسیون شناخته می‌شود و در افراد جوان مهم‌ترین دلیل ناتوانی‌های غیرتروماتیک است.

^۱EAE رایج‌ترین مدل آزمایشگاهی برای بیماری التهابی و دمی‌لینه کننده ام‌اس است. EAE حالتی پیچیده است که در آن میانکنش میان انواعی از مکانیسم‌های آسیب‌رسان به نورون و سیستم ایمنی، منجر به شباهت زیاد به ویژگی‌های کلیدی بیماری‌زای مالتیپل اسکلروزیس می‌گردد. این ویژگی‌ها شامل التهاب، دمی‌لیناسیون، حذف آکسونی و گلیوزیس می‌باشد. مکانیسم‌های تنظیمی التهاب و رمی‌لیناسیون نیز در EAE اتفاق می‌افتد. بنابراین به‌عنوان یک مدل برای این فرایندها عمل کند. EAE، داروشناختی پیچیده‌ای دارد و بسیاری از داروها که رایج هستند و یا قرار است در آینده‌ای نزدیک در بیماران مالتیپل اسکلروزیس استفاده شود در مدل EAE تست شده و تایید می‌شود (۹). مطالعات نشان‌دهنده این است که غلاف میلین در جوانگان نر ضخیم‌تر و هم‌چنین بیان پروتئینی آن‌ها بیش‌تر و چگالی بالاتری دارند در حالی که در جنس ماده الیگودندروسیت‌ها سرعت باز چرخش بیش‌تری دارد و

^۱ - Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

cDNA با استفاده از کیت YTA (شرکت یکتا تجهیز آزما، ایران) و بر طبق پروتکل مربوطه و طی مراحل زیر صورت گرفت:

به $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ RNA کل، $1 \mu\text{l}$ Oligo dT($50 \mu\text{M}$) و DEPC water افزوده و به مدت ۵ دقیقه در دمای 70°C - نگاهداری شد. در مرحله بعد $4 \mu\text{l}$ بافر 5X، $1 \mu\text{l}$ مخلوط 10 mM dNTP، $0.5 \mu\text{l}$ مهارکننده RNase ($40 \text{ u}/\mu\text{l}$) و $1 \mu\text{l}$ آنزیم ترانس کریپتاز معکوس ($200 \text{ u}/\mu\text{l}$) به مخلوط واکنش افزوده شد و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای 42°C درجه انکوبه شدند. پس از اتمام این زمان، برای متوقف نمودن فعالیت آنزیم، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای 70°C قرار داده شدند.

پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه با استفاده از بانک داده‌های NCBI و نرم‌افزار oligoAnalyzer طراحی و سپس این پرایمرها با استفاده از blast از جهت اختصاصی بودن برای ژن مربوطه چک شدند. توالی نوکلئوتیدی پرایمرها در جدول ۱ درج گردیده است. واکنش Real-Time PCR با استفاده از مواد زیر انجام شد:

$10 \mu\text{l}$ کیت Master Mix 2X (YTA، یکتا تجهیز آزما، ایران) که حاوی cybergreen است، $0.5 \mu\text{l}$ از هر دو پرایمر و $3 \mu\text{l}$ از cDNA و $6 \mu\text{l}$ آب دو بار تقطیر. واکنش مورد نظر در دستگاه CORBETT و نرم‌افزار Rotor-Gene Q ساخت شرکت Qiagen انجام شد. ژن GAPDH به عنوان ژن خانه‌دار برای نرمالیزه کردن آنالیز بیان ژن استفاده شد. واکنش‌ها به صورت سه تایی و مطابق برنامه زمانی جدول ۲ انجام شد.

آنالیز آماری

نتایج ریل تایم توسط نرم‌افزار REST آنالیز شد و معنی‌داری برای $p \leq 0.05$ در نظر گرفته شد. جهت آنالیز داده‌ها از $\Delta\Delta\text{CT}$ استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا سیکل آستانه (CT) برای هر نمونه را به دست آورده و سپس با استفاده از CT مربوط به ژن کنترل داخلی (GAPDH) همان نمونه نرمال شد (ΔCT). سپس اعداد به دست آمده در هر گروه با گروه کنترل مقایسه گردید ($\Delta\Delta\text{CT}$) و در ادامه مقادیر $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ برای هر یک از نمونه‌ها محاسبه و تغییرات بیان ژنی به دست آمد. نمودارها توسط نرم‌افزار GraphPad-Prism رسم شدند.

مدل در روز صفر به هر یک از حیوانات گروه مدل، 0.5 سی‌سی از امولسیون در ناحیه قانده دم تزریق شد. پس از ۲ ساعت و در ادامه ۴۸ ساعت، در ناحیه داخل صفاقی 200 نانوگرم از پرتوزیس توکسین (شرکت Sigma، آمریکا) در 0.7 میلی‌لیتر آب مقطر به حیوانات تزریق شد. بعد از ایمنی‌زایی، حیوانات به صورت روزانه وزن می‌شدند و نشانه‌های کلینیکی بیماری در آن‌ها مورد بررسی قرار می‌گرفت. امتیازبندی بیماری به صورت زیر بود:

۰- بدون نشانه کلینیکی، ۱- فلج کامل دم ۲- اختلال در راه رفتن با پاهای عقبی، ۳- فلج پای عقبی، ۴- فلج پاهای عقبی، ۵- فلج کامل دست و پاها، ۶- در حال مرگ یا مرگ.

موش‌هایی که دارای درجه‌بندی یکسانی بودند در گروه‌های یکسان قرار گرفته و به مدت ۱۷ روز تحت تیمار قرار گرفتند. در ادامه کار موش‌های تحت تیمار روزانه از نظر علائم بالینی بررسی شده و درجه‌بندی ثبت می‌شد. پس از مشاهده نشانه‌های کلینیکی بیماری، حیوانات به گروه‌های زیر تقسیم شدند:

۱- گروه کنترل که روزانه و به مدت ۱۷ روز PBS دریافت کردند.
 ۲- گروه مدل یا EAE که هیچ تیماری را دریافت نکردند.
 ۳- گروه درمانی که روزانه و به مدت ۱۷ روز پس از مشاهده نشانه‌های بیماری 25 میلی‌گرم/کیلوگرم کارواکول (12) 98% (شرکت مرک، آلمان) دریافت کردند.

نمونه‌برداری و بررسی بیان ژن

در روز ۲۹ موش‌های مورد مطالعه ابتدا با تزریق کتامین/زایلازین به صورت عمیق بی‌هوش شدند و تحت شرایط استریل و RNase free نخاع حیوان استخراج شده و به میکروتیوپ استریل منتقل شد. نمونه‌ها پس از انجماد سریع در نیتروژن مایع در فریزر با دمای 80°C - نگاهداری شدند. RNA با استفاده از محلول تراپزول (سیگما-آلدریج) و طبق پروتکل شرکت از 100 میلی‌گرم بافت نخاع استخراج شد. خلوص و غلظت RNA استخراج شده، هم از طریق دستگاه اسپکتروفوتومتر (خوانش جذب در طول موج‌های 260 و 280 نانومتر) و هم از طریق الکتروفورز در داخل ژل آگاروز یک درصد مورد سنجش قرار گرفت. سنتز

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در Real-Time PCR

Product length	Accession ID	Sequence (5'→3')	Gene symbol
138	NM_201270.1	F:GTACCGGGAACGGTATCCAC R:TGGTGTTCCTTGTTCGCCGTA	IL-4
135	NM_006256731.2	F:AGAGTTTCTCAAGCACTGCCAAGC R:TGCATAGCTCCCAGCTTCTCCTTT	FoxP3
174	NM_012854.2	F:CACTGCTATGTTGCCTGCTC R:TGTCCAGCTGGTCCTTCTT	IL-10
135	NM_021578.2	F:GGCGGTGCTCGCTTTGTA R:ATTGCGTTGTTGCGGTCC	TGF-β
121	NM_017008.4	F:AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG R:CATACTCAGCACCAGCATCACC	GAPDH

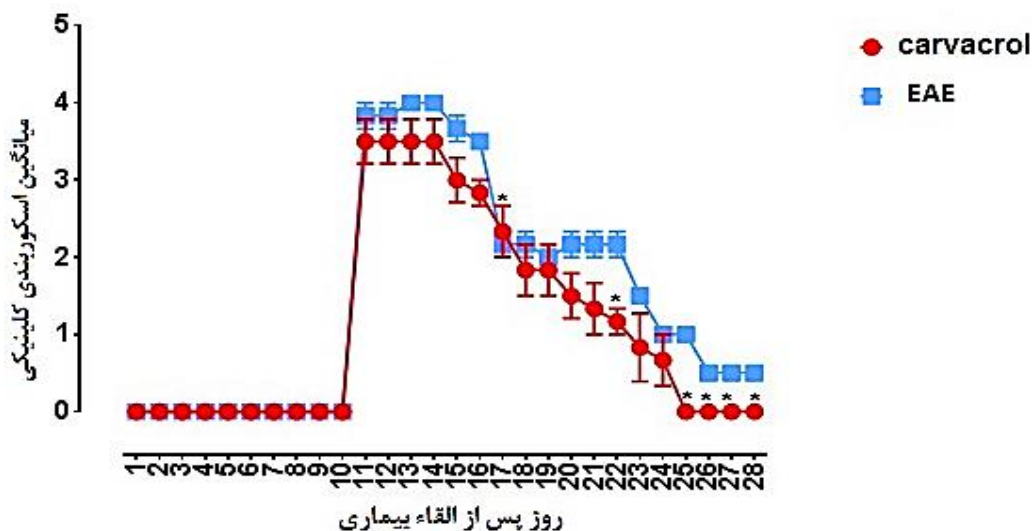
امتیازبندی حیوانات مبتلا، بسته به شدت علائم از شماره صفر تا ۵ نمره گذاری شد. تزریق روزانه کارواکرول در طی روزهای ۱۲ تا ۲۹ به میزان زیادی باعث بهبود حیوانات شد. نتایج نشان داد که تیمار حیوانات با کارواکرول باعث کاهش شدت EAE در موش‌ها شده بود ($P < 0.001$) (شکل ۱). در مقایسه با گروه بیمار، گروه‌های کارواکرول شدت کمتری از بیماری را در بازه زمانی تیمار تجربه کردند و منجر به بهبود کامل تمامی حیوانات در روز ۲۳ شد. در این گروه بازگشت نشانه‌های بیماری یا عود آن به میزان زیادی کاهش یافت.

جدول ۲- برنامه زمانی واکنش Real-Time PCR

3min at 95°C		Initial denaturation
40 cycles	15 second at 95°C	Denaturation
	30 seconds at 60°C	Annealing
	30 second at 60°C	Extension

نتایج

علائم بیماری مالتیپل اسکلروزیس حدود ۱۱ تا ۱۴ روز پس از تزریق امولسیون در موش‌ها ظاهر شد.



شکل ۱- نمودار نشان‌دهنده میانگین روزانه شدت بیماری EAE در موش‌های گروه‌های مختلف است. در گروه تحت تیمار با کارواکرول عود بیماری مشاهده نشد و اسکوربندی روند کاهشی داشت. دایره‌های قرمز و آبی میزان اسکور در هر روز و * اختلاف معنی‌دار با گروه EAE ($P < 0.001$)

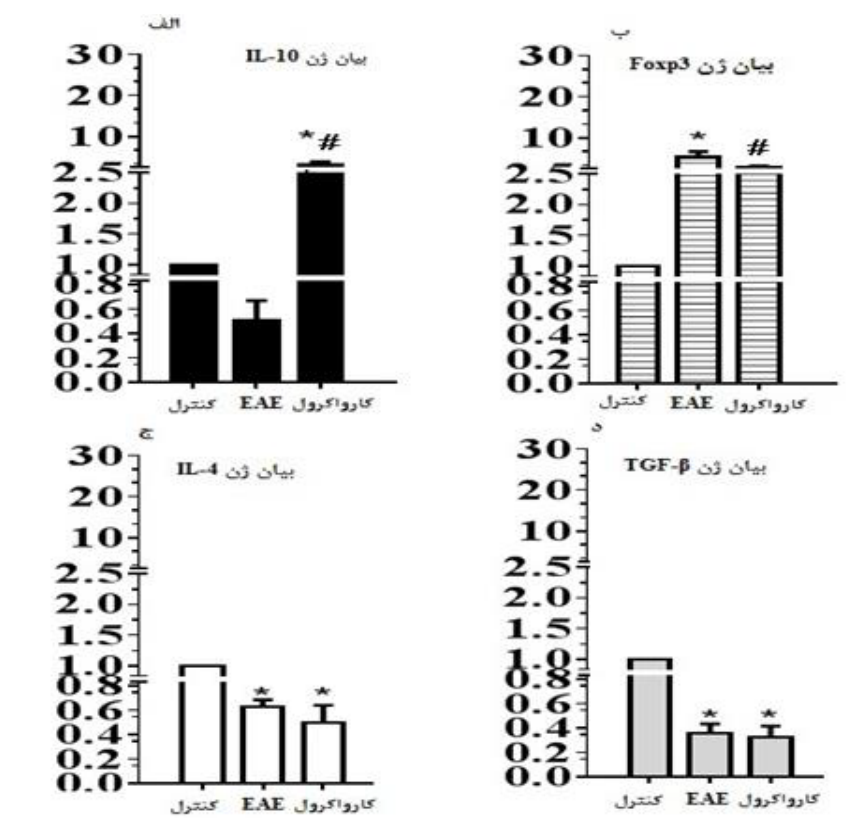
این مقدار در گروه تحت تیمار با کارواکرول، نسبت به گروه EAE دارای کاهش بود. هر چند این میزان نسبت به گروه کنترل هم‌چنان در سطح بالاتری قرار داشت (حدود ۲/۶ برابر). بررسی‌ها بر روی بیان $TGF-\beta 1$ در گروه‌های مورد

بررسی ژن‌های ضدالتهابی $IL-10$, $FOX-P3$, $IL-4$, $TGF-\beta$

در این مطالعه، بیان $FOX-P3$ در گروه EAE نسبت به موش‌های سالم، دارای افزایشی حدود ۵/۳ برابری بود و

میزان بیان این ژن را به میزان بسیار زیادی افزایش دهد تا جایی که این افزایش بیان حتی از گروه کنترل نیز بالاتر بود ($P < 0.0001$). بررسی‌های در این مطالعه نشان داد که بیان ژن ضدالتهابی *IL-4* با القاء EAE کاهش یافت ($P < 0.0001$). میزان بیان mRNA این ژن در گروه تحت درمان با کارواکرول باز هم کاهش یافت و این میزان کاهش حتی از گروه EAE نیز بیش‌تر بود ($P < 0.0001$).

مطالعه نشان داد که پس از القاء بیماری، *TGF-β* در گروه EAE به میزان معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0.0001$). تیمار با کارواکرول تاثیر چندانی در بیان *TGF-β* نداشت و میان گروه تحت تیمار و گروه EAE تفاوت قابل توجه وجود نداشت. در این مطالعه میزان بیان mRNA مربوط به ژن *IL-10* در گروه EAE، ۵۰ درصد کم‌تر از میزان بیان آن در گروه کنترل بود ($P < 0.05$) و تیمار با کارواکرول توانست



شکل ۲ - نمودارها نشان‌دهنده تغییرات میزان بیان ژن‌های ضدالتهابی *IL-10*، *Foxp3*، *IL-4* و *TGF-β* در اثر تیمار با کارواکرول است. الف- پروتئین *IL-10* در گروه EAE نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ($P < 0.05$). کارواکرول توانست بیان *IL-10* را به میزان بالایی افزایش دهد ($P < 0.0001$). ب- در گروه EAE افزایش بیان برای ژن *Foxp3* وجود دارد. تیمار با کارواکرول باعث کاهش بیان این ژن شد و این کاهش با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری نداشت. ج- همان‌طور که در نمودار مشاهده می‌شود کاهش میزان *IL-4* در گروه EAE نسبت به گروه کنترل معنی‌دار است ($P < 0.0001$). گروه کارواکرول میزان تولید *IL-4* را نسبت به گروه بیمار کمی کاهش داده است که البته معنی‌دار نیست. د- در مورد *TGF-β* در هر دو گروه EAE و کارواکرول شاهد کاهش بیان بودیم به نحوی که اختلاف هر دو گروه با کنترل معنی‌دار بود ($P < 0.0001$) و اختلاف میان گروه EAE و کارواکرول معنی‌دار نبود.

برای درمان بیماری التهابی ام‌اس است. *IL-10* سایتوکاین تنظیم‌کننده سیستم ایمنی است که باعث مهار سایتوکاین‌هایی مانند *IL-12*، *IFN-γ* و *TNF* می‌شود و

بحث

به‌علت اثربخشی کارواکرول بر برخی از بیماری‌های التهابی و نورودژنراتیو مغزی، این ترکیب گزینه مناسبی

مطالعه اخیر و در اثر تیمار حیوانات بیمار با کارواکرول بیان Foxp3 دارای روند کاهشی بود.

TGF-β باعث مهار فرایندهای سیتولیتیک، مهار تمایز سلول‌های T helper 1 (TH1) و توقف عملکرد سلول‌های T می‌شود و همچنین باعث مهار ورود لنفوسیت‌های T به CNS می‌شود و چون دیمیلیناسیون با ارتشاح لنفوسیت‌های Th1 به CNS شروع می‌شود، بنابراین *TGF* می‌تواند از این طریق مانع دیمیلیناسیون شود. کمبود *TGF-β* و *FOXP3* منجر به بیماری خودایمن شدید می‌شود، درحالی‌که افزایش بیان هر یک از این فاکتورها باعث حفاظت موش‌ها از بیماری خودایمن و به-ویژه ام‌اس شده است (۱۹).

IL-4 یک سایتوکاین تنظیمی ایمنی است که التهاب را مهار می‌کند. منبع سلولی *IL-4* سیستم عصبی مرکزی انواعی از سلول‌ها از جمله میکروگلیا و آستروسیت‌ها هستند. به دلیل این‌که تولید *IL-4* در CNS طبیعی قابل تشخیص نیست، آستروسیت‌ها احتمالاً در طی فرایند التهابی EAE باعث تولید *IL-4* می‌شوند. با وجود این‌که عملکرد دقیق سلول‌های میکروگلیایی در بیماری‌های تخریب‌کننده نورون هنوز به درستی شناخته نشده است، اما اخیراً نشان داده شده است که میکروگلیاهای تحت تیمار با *IL-4* که به CSF موش‌های مبتلا به EAE تزریق می‌شوند، باعث مهار نشانه‌های کلینیکی شده و اولیگودنروژنز را در نخاع پیش می‌برند (۲۰).

در مورد ژن‌های ضدالتهابی، کارواکرول تاثیر مثبت آن‌چنانی از خود نشان نداد و در میان تمامی فاکتورها، کارواکرول تنها بر روی *IL-10* اثرگذار بود و باعث افزایش آن شد. درحالی‌که سه فاکتور دیگر روند کاهشی داشت.

Kianmehr و همکارانش در سال ۲۰۱۵ به بررسی اثر کارواکرول بر بیان ژن سایتوکاین‌های *IL-4*، *TGF-β* و *FOXP3* در سلول‌های طحال که به وسیله اوبومین التهابی شده بودند، پرداختند. نتایج نهایی آن‌ها نشان داد که کارواکرول باعث کاهش بیان *IL-4*، *TGF-β* و *FOXP3* شد (۲۱) که با مطالعات اخیر همخوانی داشت. با فاصله اندکی از این مطالعه Gholijani در بررسی اثر کارواکرول بر مو-ش‌های التهابی به وسیله اوبومین، نشان داد که *IL-10* و *TGF* دارای روند افزایشی است (۱۷). با توجه به این‌که نمودار اسکوربندی تغییرات مثبتی را در کاهش اسکور بیماری در موش‌های تحت تیمار با کارواکرول نشان داد و

فرایندهای التهابی را کاهش می‌دهد. تزریق سیستمیک *IL-10* باعث محافظت حیوانات از آسیب نوروئی در نخاع صدمه دیده می‌شود. یکی از مکانیسم‌هایی که *IL-10* از طریق آن اعمال نفوذ می‌کند، کاهش بیان سایتوکاین‌های پیش التهابی است که باعث کاهش سمیت سلولی در سلول‌های سیستم عصبی مرکزی می‌شود. این موضوع در اولیگودنروسیت‌های کشت شده به خوبی اثبات شده است (۱۳).

Silava lima و همکارانش با استفاده از CFA باعث ایجاد التهاب در موش‌ها شدند و با اثر دهی کارواکرول بر آن‌ها افزایش بیان *IL-10* اثبات شد، اما اثری بر روی *TNF-α* مشاهده نشد (۱۴). Yong و همکارانش در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که *IL-10* به میزان زیادی توانایی سلول‌های بنیادی عصبی را برای مهار پاسخ‌های خودایمن در نقاط التهابی و محیطی CNS افزایش می‌دهند و بنابراین آسیب بیش‌تر میلین را کاهش می‌دهند.

IL-10 توانایی سلول‌های بنیادی عصبی را برای تمایز به نورون‌ها و اولیگودنروسیت‌ها و به‌میزان کم‌تری آستروسیت‌ها افزایش می‌دهد. بنابراین این سایتوکاین توانایی به راه انداختن ریمیلیناسیون و کاهش آستروگلیوزیس را دارد. این دو فاکتورهای مهمی در بیماری‌زایی ام‌اس هستند (۱۵). این سایتوکاین از طریق کاهش التهاب محلی و افزایش پاکسازی نخاله‌های حاصل از آن، محیط تهاجمی را که برای نورون‌ها ایجاد شده است را به یک محیط امن تبدیل می‌کند و ریمیلیناسیون اندوژنوس و جمعیت‌زایی نوروئی / اولیگودنروسیتی را به راه می‌اندازند (۱۶). نتایج این مطالعه نیز با داده‌های مطالعات بالا هم‌سو بوده و نتایج حاصل از Real-Time PCR نشان داد، در اثر تیمار حیوانات گروه EAE با کارواکرول، بیان *IL-10* نسبت به گروه EAE که کارواکرول دریافت نکرده بودند، به‌میزان بسیار بالایی افزایش یافت.

Foxp3 به‌عنوان یک فاکتور نسخه‌برداری در تکثیر و عملکرد سلول‌های T تنظیم‌کننده حیاتی هستند (۱۷). بیماران مبتلا به MS در سطح بیان پروتئین فاکتور نسخه برداری *FOXP3* در سلول‌های T تنظیمی دارای ناهنجاری-هایی هستند، سطوح *FOXP3* کاهش یافته، باعث نقص در تنظیم ایمنی به‌وسیله سلول‌های T تنظیمی می‌شود که ممکن است در ایجاد ام‌اس دخالت داشته باشند (۱۸). در

این مطالعه نشان‌دهنده اثر فاکتور ضدالتهای *IL-10* در روند بهبود بیماری می‌باشد، اما قطعاً *IL-10* به تنهایی این کاهش را ایجاد نکرده است و با توجه به چند فاکتوری بودن بیماری مالتیپل اسکلروزیس، باید در مطالعات آینده، منتظر مشاهده اثرات کارواکول بر بیان سایر ژن‌های دخیل در ایجاد این بیماری بود.

تقدیر و تشکر

این مطالعه در قالب طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی لرستان انجام شد. نگارندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب قدردانی خود را از همکاری بی‌دریغ مرکز تحقیقات هپاتیت علوم پزشکی لرستان اعلام کنند.

در روزهای پایانی نشانه‌های کلینیکی به‌طور کلی از بین رفته بود و عود بیماری وجود نداشت، می‌توان استنباط کرد که افزایش بیان *IL-10* دارای اثرات بسیار خوبی بر این روند بوده است. اما نباید فراموش کرد در ایجاد بیماری مالتیپل اسکلروزیس فاکتورهای متعددی هم‌چون ژن‌های التهابی و استرس اکسیداتیو نقش دارند که کارواکول ممکن است بر روی آن‌ها تاثیرگذار بوده باشد و با همکاری *IL-10* روند کاهش اسکوربندی را ایجاد کرده باشند.

به‌طور خلاصه می‌توان گفت ایجاد مدل EAE در موش‌های صحرایی لویس باعث کاهش فاکتورهای ضدالتهای مورد مطالعه شد. تیمار با کارواکول منجر به افزایش بیان ژن *IL-10* شد و تاثیر مثبتی بر روی ژن‌های *TGF-β*، *IL-4* و *FOXP3* نداشت. هر چند کاهش اسکوربندی کلینیکی در گروه تحت درمان با کارواکول، در

منابع مورد استفاده

1. Khazdaira, M. R., 2019. The effect of carvacrol on inflammatory mediators and respiratory symptoms in veterans exposed to sulfur mustard, a randomized, placebocontrolled trial. *Respiratory Medicine* 150: 21-29.
2. Xiao, Y., Li, B., Liu, J., Ma, X., 2018. Carvacrol ameliorates inflammatory response in interleukin 1 β -stimulated human chondrocytes. *Molecular Medicine Reports* 17(3): 3987-3992.
3. Yu, H., Zhang, Z. L., Chen, J., Pei, A., Hua, F., Qian, X., 2012. Carvacrol, a food-additive, provides neuroprotection on focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *PloS one*. 7(3): e33584.
4. Haddadi, H., Rajaei, Z., Alaei, H., Shahidani, S., 2018. Chronic treatment with carvacrol improves passive avoidance memory in a rat model of Parkinson's disease. *Arquivos de neuro psiquiatria* 76(2): 71-77.
5. Baluchnejadmojarad, T., Hassanshahi, J., Roghani, M., Mansouri, M., Raoufi, S., 2014. Protective effect of carvacrol in 6-hydroxy dopamine hemiparkinsonian rat model. *Journal of Basic and Clinical Pathophysiology* 2: 29-34.
6. Baluchnejadmojarad, T., Roghani, M., 2016. The protective effect of carvacrol on kainic acid induced model of temporal lobe epilepsy in male rat. *Journal of Basic and Clinical Pathophysiology* 4(2): 11-16.
7. Dati, L., Ulrich, H., Real, C., Feng, Z., Sun, H., Britto, L., 2017. Carvacrol promotes neuro protection in the mouse hemiparkinsonian model. *Neuroscience* 356: 176-181.
8. Guan, X., Li, X., Yang, X., Yan, J., Shi, P., Ba, L., 2019. The neuroprotective effects of carvacrol on ischemia/ reperfusion-induced hippocampal neuronal impairment by ferroptosis mitigation. *Life Sciences* 235: 116795.
9. Yoshida, H., Kimura, A., Fukaya, T., Sekiya, T., Morita, R., Shichita, T., 2012. Low dose CP 690,550 (tofacitinib), a pan-JAK inhibitor, accelerates the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis by potentiating Th17 differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 418(2): 234-240.
10. Cerghet, M., Skoff, R. P., Bessert, D., Zhang, Z., Mullins, C., Ghandour, M. S., 2006. Proliferation and death of oligodendrocytes and myelin proteins are differentially regulated in male and female rodents. *Journal of Neuroscience* 26(5): 1439-47.
11. Beeton, C., Garcia, A., Chandy, K. G., 2007. Induction and clinical scoring of chronicrelapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* 5: e224.
12. Gholami, M., Rajaei, Z., Malek, M., 2019. Effects of carvacrol on spatial learning performances, hippocampal interleukin-1 β level and oxidative stress markers in lipopolysaccharide-treated rats. *Physiology and Pharmacology* 23(4): 286-295.
13. Molina-Holgado, E., Vela, J. M., Arévalo-Martín, A., Guaza, C., 2001. LPS/IFN γ cytotoxicity in oligodendroglial cells: role of nitric oxide and protection by the anti-inflammatory cytokine IL-10. *European Journal of Neuroscience* 13(3): 493-502.
14. da Silva Lima, M., Quintans-Júnior, L. J., de Santana, W. A., Kaneto, C. M., Soares, M. B. P., Villarreal, C. F., 2013. Anti-inflammatory effects of carvacrol: evidence for a key role of interleukin-10. *European Journal of Pharmacology* 699(1-3): 112-7.

15. Oksenberg, J. R., Seboun, E., Hauser, S. L., 1996. Genetics of demyelinating diseases. *Brain Pathology* 6(3): 289-302.
16. Yang, J., Jiang, Z., Fitzgerald, D. C., M, Yu, S., Li, H., 2009. Adult neural stem cells expressing IL-10 confer potent immunomodulation and remyelination in experimental autoimmune encephalitis. *The Journal of Clinical Investigation*. 119(12): 3678-3691.
17. Gholijani, N., Amirghofran, Z., 2016. Effects of thymol and carvacrol on T-helper cell subset cytokines and their main transcription factors in ovalbumin-immunized mice. *Journal of Immunotoxicology* 13(5): 729-737.
18. Huan, J., Culbertson, N., Spencer, L., Bartholomew, R., Burrows, G. G., Chou, Y. K., 2005. Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients. *Journal of Neuroscience Research* 81(1): 45-52.
19. Ponomarev, E. D., Maresz, K., Tan, Y., Dittel, B. N., 2007. CNS-derived interleukin-4 is essential for the regulation of autoimmune inflammation and induces a state of alternative activation in microglial cells. *Journal of Neuroscience* 27(40): 10714-10721.
20. Mirshafiey, A., Mohsenzadegan, M., 2009. TGF- β as a promising option in the treatment of multiple sclerosis. *Neuropharmacology* 56(6-7): 929-36.
21. Kianmehr, M., Rezaei, A., Boskabady, M. H., 2016. Effect of carvacrol on various cytokines genes expression in splenocytes of asthmatic mice. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 19(4): 402.
22. Khazdaira, M. R., 2019. The effect of carvacrol on inflammatory mediators and respiratory symptoms in veterans exposed to sulfur mustard, a randomized, placebocontrolled trial. *Respiratory Medicine* 150: 21-29.
23. Xiao, Y., Li, B., Liu, J., Ma, X., 2018. Carvacrol ameliorates inflammatory response in interleukin 1 β -stimulated human chondrocytes. *Molecular Medicine Reports* 17(3): 3987-3992.
24. Yu, H., Zhang, Z. L., Chen, J., Pei, A., Hua, F., Qian, X., 2012. Carvacrol, a food-additive, provides neuroprotection on focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *PloS one* 7(3): e33584.
25. Haddadi, H., Rajaei, Z., Alaei, H., Shahidani, S., 2018. Chronic treatment with carvacrol improves passive avoidance memory in a rat model of Parkinson's disease. *Arquivos de Neuro Psiquiatria* 76(2): 71-77.
26. Baluchnejadmojarad, T., Hassanshahi, J., Roghani, M., Mansouri, M., Raoufi, S., 2014. Protective effect of carvacrol in 6-hydroxy dopamine hemiparkinsonian rat model. *Journal of Basic and Clinical Pathophysiology* 2(2): 29-34.
27. Baluchnejadmojarad, T., Roghani, M., 2016. The protective effect of carvacrol on kainic acid induced model of temporal lobe epilepsy in male rat. *Journal of Basic and Clinical Pathophysiology* 4(2): 11-16.
28. Dati, L., Ulrich, H., Real, C., Feng, Z., Sun, H., Britto, L., 2017. Carvacrol promotes neuro protection in the mouse hemiparkinsonian model. *Neuroscience* 356: 176-181.
29. Guan, X., Li, X., Yang, X., Yan, J., Shi, P., Ba, L., 2019. The neuroprotective effects of carvacrol on ischemia/ reperfusion-induced hippocampal neuronal impairment by ferroptosis mitigation. *Life Sciences* 235: 116795.
30. Yoshida, H., Kimura, A., Fukaya, T., Sekiya, T., Morita, R., Shichita, T., 2012. Low dose CP 690,550 (tofacitinib), a pan-JAK inhibitor, accelerates the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis by potentiating Th17 differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 418(2): 234-240.
31. Beeton, C., Garcia, A., Chandy, K. G., 2007. Induction and clinical scoring of chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* 5: e224.
32. Molina-Holgado, E., Vela, J. M., Arévalo-Martín, A., Guaza, C., 2001. LPS/IFN- γ cytotoxicity in oligodendroglial cells: role of nitric oxide and protection by the anti-inflammatory cytokine IL-10. *European Journal of Neuroscience* 13(3): 493-502.
33. Da Silva Lima, M., Quintans-Júnior, L. J., de Santana, W. A., Kaneto, C. M., Soares, M. B. P., Villarreal, C. F., 2013. Anti-inflammatory effects of carvacrol: evidence for a key role of interleukin-10. *European Journal of Pharmacology* 699(1-3): 112-117.
34. Oksenberg, J. R., Seboun, E., Hauser, S. L., 1996. Genetics of demyelinating diseases. *Brain Pathology* 6(3): 289-302.
35. Yang, J., Jiang, Z., Fitzgerald, D.C., Ma, C., Yu, S., Li, H., 2009. Adult neural stem cells expressing IL-10 confer potent immunomodulation and remyelination in experimental autoimmune encephalitis. *The Journal of Clinical Investigation* 119(12): 3678-3691.
36. Gholijani, N., Amirghofran, Z., 2016. Effects of thymol and carvacrol on T-helper cell subset cytokines and their main transcription factors in ovalbumin-immunized mice. *Journal of Immunotoxicology* 13(5): 729-37.
37. Huan, J., Culbertson, N., Spencer, L., Bartholomew, R., Burrows, G. G., Chou, Y. K., 2005. Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients. *Journal of Neuroscience Research* 81(1): 45-52.
38. Ponomarev, E. D., Maresz, K., Tan, Y., Dittel, B. N., 2007. CNS-derived interleukin-4 is essential for the regulation of autoimmune inflammation and induces a state of alternative activation in microglial cells. *Journal of Neuroscience*. 27(40): 10714-10721.

39. Mirshafiey, A., Mohsenzadegan, M., 2009. TGF- β as a promising option in the treatment of multiple sclerosis. *Neuropharmacology* 56(6-7): 929-936.
40. Kianmehr, M., Rezaei, A., Boskabady, M. H., 2016. Effect of carvacrol on various cytokines

genes expression in splenocytes of asthmatic mice. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 19(4): 402.