

## The Effects of Hypiran on the Oxidative Stress in the Animal Model of Multiple Sclerosis

Abdollahpourasl M.<sup>1</sup> MSc, Khezri Sh.\* PhD, Abtahi Froushani SM.<sup>2</sup> PhD, Cheraghi O.<sup>3</sup> MSc

\*Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran.

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran.

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

<sup>3</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

### Abstract

**Aims:** Hypiran is a commercial hydro-alcoholic extract of *Hypericum perforatum*. Its anti-inflammatory and immune modulatory benefits have been reported in several documents. This study was conducted to investigate the beneficial potential of Hypiran in the treatment of ameliorating experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).

**Materials & Methods:** In this experimental study, EAE was induced by guinea pig spinal cord homogenate and complete Freund's adjuvant in 30 male Wistar rats (6-8 weeks old, weighing 100± 20 g). Hypiran administration (110 mg/kg-P.O.-daily) was initiated at day 12 post-immunization, when the rats developed a disability score. The brains and blood samples were collected on the day 36 and used for MDA, FRAP, NO and MPO experiments.

**Findings:** Hypiran-therapy led to a better situation in EAE rats. The lipid peroxidation level (MDA assay) was significantly increased in brain tissues of the EAE rat compared to that of the normal control one ( $P<0.001$ ). Treatment with hypiran could significantly reduce the MDA levels in brain tissues of the EAE rats compared to that of the EAE rats without treatment. Moreover, Serum analysis showed that hypiran could significantly decline the nitric oxide levels as well as myeloperoxidase activity of the EAE rats compared to that of the EAE rats without treatment. Moreover, docking server analysis indicated that the hypiran could inhibit the MAO enzyme.

**Conclusion:** It seems that hypiran may be as a promising strategy to be treatment of Multiple Sclerosis patients.

### Keywords:

Multiple Sclerosis [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68009103>];

Hypiran [No items found.];

Oxidative stress [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68018384>];

---

\* Corresponding Author

Tel: +98(44)31942122

Fax: +98(44)32753172

Address: Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran.

sh.khezri@urmia.ac.ir

Received: 02 Dec 2017

Accepted: 22 May 2018

ePublished: 23 Jul 2018

## اثرات هایپیران بر آسیب‌های اکسیداتیو در مدل حیوانی مالتیپل اسکلروزیس

مینا عبدالله پوراصل MSc

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

شیوا خضری \* PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

سید میثم ابطی فروشانی PhD

گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

امید چراغی MSc

گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

### چکیده

**اهداف:** هایپیران یک عصاره هیدرو الکلی تجاری از گیاه علف چای است. فواید ضدالتهابی و تعدیل‌کننده ایمنی این گیاه در مطالعات قبلی به‌خوبی نشان داده‌شده است. این مطالعه به‌منظور بررسی اثرات احتمالی سودمند هایپیران در تخفیف علائم آنسفالومیلیت خود ایمنی تجربی یا EAE (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis) انجام شده است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، EAE به‌وسیله هموزن بافت نخاع خوکیه هندی و ادجوانت کامل فرونت در ۳۰ رأس موش صحرایی نر نژاد ویستار که دارای میانگین سنی ۸-۶ هفته و میانگین وزنی ۱۰۰±۲۰ گرم بودند جهت القای مدل بیماری استفاده شد. تجویز هایپیران (۱۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خوراک به‌صورت روزانه) از روز ۱۲ بعد از ایمن‌سازی زمانی که موش‌های صحرایی اولین نشانه علائم درمانگاهی را نشان دادند آغاز شد. نمونه‌های مغز و خون از حیوانات در روز ۳۶ اخذ شده و جهت آزمایشات MDA، FRAP، NO و MPO مورد استفاده قرار گرفت.

**یافته‌ها:** نتایج ما نشان می‌دهد تیمار با هایپیران منجر به بروز نتایج مناسبی در گروه EAE تیمار با هایپیران شده است. سنجش برخی از آنتی‌اکسیدانها مثل سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی و سنجش سطح نیتریک اکسید به‌طور معنی‌داری در بافت مغزی موش‌های القا شده با EAE در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته است و تیمار با هایپیران میزان MDA و نیتریک اکسید را در بافت مغزی موش‌های EAE که تحت تیمار با هایپیران قرار گرفته اند کاهش داده است. همسو با سایر یافته‌های ما آنالیزهای سرمی نشان می‌دهد که هایپیران به‌طور بالقوه ای باعث پس رفت علائم التهابی مثل فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز در گروه موش‌های EAE تیمار شده با هایپیران می‌شود همچنین آنالیز نتایج سرور داکینگ نشان می‌دهد که هایپیران توانایی مهار آنزیم MAO را دارد.

**نتیجه‌گیری:** هایپیران می‌تواند به‌عنوان یک استراتژی سودمند برای درمان افراد مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس استفاده شود. **کلیدواژه‌ها:** مالتیپل اسکلروزیس، هایپیران، استرس اکسیداتیو.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۳/۰۱

\*نویسنده مسئول: sh.khezri@urmia.ac.ir

### مقدمه

مالتیپل اسکلروزیس (MS) یک بیماری خود التهابی و پیشرونده سیستم اعصاب مرکزی است [1]. این بیماری به دلیل ماهیت شدیداً ناتوان‌کننده خود و همچنین به دلیل آنکه افراد را در بهترین زمان بازدهی خود برای جامعه (محدوده ۳۰ سال) گرفتار می‌نماید، دارای اثرات عمیق اجتماعی و اقتصادی است [2]. با توجه به این‌که حمله ایمنولوژیک توسط لنفوسیت‌های T به بافت میلین مغزی عامل اصلی در ایجاد بیماری پنداشته می‌شود،

اکثر درمان‌های رایج امروزی مبتنی بر استفاده از ترکیبات ایمنونوساپرسیو از قبیل کورتون‌ها و همچنین ترکیبات ایمنونومودولاتور از قبیل اینترفرون بتا و گلاتیمراستات است. با این حال بسیاری از بیماران به‌طور مناسب به درمان‌ها جواب نداده و در نهایت وارد سیر پیشرونده و غیرقابل‌کنترل بیماری خواهند شد [3]. در نتیجه یافتن ترکیبات جدید جهت افزودن به رژیم‌های درمانی قبلی منطقی به نظر می‌رسد. خوشبختانه مدل تجربی بیماری MS یا آنسفالومیلیت تجربی خود ایمنی (EAE) فرصت مناسبی را جهت ارزیابی داروهای جدید فراهم آورده است [4]. با توجه به ماهیت التهابی بیماری استفاده از عوامل ضدالتهاب که در عین حال اثرات دیگری نیز از قبیل اثرات محافظت‌کننده نورونی و آنتی‌اکسیدان دارا می‌باشند، با اثرات جانبی کم ممکن است که در امر درمان بیماری کمک‌کننده باشد [5]. در این بین امروزه توجه زیادی به ترکیبات دارویی با منشاء گیاهی نیز شده است [6].

از محدود گیاهان دارویی که استفاده از آن توسط سازمان غذا و دارو ایالات‌متحده آمریکا تأیید شده است، گیاه گل راعی یا علف چای بانام علمی *Hypericum perforatum* است [7]. این گیاه از گذشته‌های دور نیز در طب سنتی ایرانی جهت درمان برخی از اختلالات التهابی، پوستی، دردهای عضلانی و همچنین کمک به درمان افسردگی استفاده شده است [8]. به‌طور جالب توجهی نشان داده‌شده است که در افراد مبتلا به افسردگی سطح سایتوکاين‌های التهابی از قبیل IL-6 در بافت عصبی افزایش می‌یابد [9]. در همین راستا نیز نشان داده‌شده است که عصاره علف چای در شرایط *In vivo* قادر به تعدیل و کاهش سایتوکاين‌های التهابی از قبیل IL-1، IL-6، IL-6 و اینترفرون گاما است [10]. اثرات ضدالتهابی علف چای ناشی از نقش مهمی آن بر بیان ژن‌های پیش ساز التهاب مانند سیکلو‌اکسیژناز ۲ (Cox2) و سنتز قابل تکرار نیتریک اکساید است [11] که امروزه بررسی میزان نیتریک اکساید به‌عنوان یکی از مهم‌ترین شاخص‌های استرس اکسایشی در اثر فعالیت آنزیم نیتریک اکسید سنتاز مطرح است. همچنین در مورد شاخص‌های التهابی آنزیم میلوپراکسیداز از یکی از اعضای خانواده‌های آنزیمی مهم پراکسیداز است. این آنزیم از طریق کاتالیز نمودن واکنش انفجار تنفسی با کمک هیدروژن پراکسید باعث تولید حد واسط‌های اکسیدکننده زیادی می‌شود که باعث آسیب‌های اکسیداتیو به سلول‌ها و بافت‌ها می‌شود. این آنزیم باعث پراکسیداسیون لیپوپروتئین‌های با دانسیته پائین (LDL)، تغییرات اکسیداتیو در لیپوپروتئین‌های با دانسیته بالا (HDL) و حتی آپوپتوز سلول‌های آندوتلیوم می‌شود. از جمله پروتئین‌هایی که در این بیماری مورد توجه زیادی است مونوآمین اکسیدازها می‌باشد. مونوآمین اکسیدازها گروهی از آنزیمها در جدار میتوکندری هستند که مونوآمین‌هایی مانند سروتونین، اپی‌نفرین، دوپامین و مونو آمین‌های دیگر را اکسید می‌کنند.

تعداد  $10^9$  عدد باکتری بوردتلا پاراپروتوسیس (تهیه شده از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، IBRC-M ۱۰۷۱۰) در حجم ۳۰۰ میکرولیتر بافر فسفات به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. روند بیماری (شدت ناتوانی حرکتی) در هر موش صحرایی موجود در گروه‌ها، به صورت روزانه مورد ارزیابی قرار گرفت. از مقیاس زیر جهت ارزیابی شدت بیماری استفاده گردید: صفر: عدم بروز بیماری، یک: اختلال در حرکت دم، دو: فلج شدن دم، سه: فلجی دو پا، چهار: فلجی چهار دست و پا، پنج: مرگ [13].

در این مطالعه موش‌های صحرایی به طور کاملاً تصادفی به سه گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند:

پس از گذشت زمان مشخص برای تطبیق موش‌های صحرایی با محیط نگهداری، مدل تجربی بیماری MS (EAE) در ۲۰ رأس موش صحرایی ویستار القاء شد. موش‌ها پس از القاء بیماری به ۲ گروه ۱۰ راسی با شرایط سنی و وزنی یکسان تقسیم شدند. ۱۰ موش به مدت ۲۴ روز پس از بروز علائم EAE (روز ۱۲ پس از القاء) تحت درمان قرار گرفتند. در این گروه عصاره هایپیران به میزان  $110 \text{ mg/kg}$  به صورت خوراکی (گاواژ) دریافت کردند. ۱۰ رأس دیگر از موش‌های صحرایی مبتلا نیز به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شدند. این موش‌های صحرایی در حجمی مشابه با گروه قبلی پس از بروز علائم در همه موش‌های صحرایی این گروه (۱۲ روز پس از القای بیماری) تحت درمان با دارونما (سالین) قرار گرفتند. همچنین ۱۰ رأس موش صحرایی نر نژاد ویستار از نظر سن، جنس و وزن مشابه با دو گروه قبلی بودند که به عنوان گروه سالم غیر بیمار در نظر گرفته شدند. این موش‌های صحرایی فرایند ایجاد بیماری را بدون آنتی ژن (هموژن بافت نخاع خوکچه‌هندی) طی کرده و هم‌زمان با آن‌ها تحت درمان با دارونما قرار گرفتند.

در روز ۳۶ پس از آغاز مطالعه، جهت بررسی آزمایشات بیوشیمیایی حیوانات به صورت عمیق بیهوش شدند و سپس هر حیوان روی تشتک تشریح، فیکس گردید. پس از کالبدشکافی و نمایان شدن قلب حیوان، با استفاده از سرنگ‌های ۵ سی‌سی خون‌گیری انجام گرفت؛ خون گرفته شده در لوله‌های مخصوص آزمایشگاه ریخته شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت؛ سپس سرم نمونه‌های خون جهت اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی به کمک سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه با  $3500$  دور در دقیقه جداسازی و تا زمان انجام آزمایش در فریزر  $-20$  درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. سپس سر موش با کمک قیچی مخصوص جدا شد و مغز از جمجمه خارج گردید. نیمکره راست مغز جهت مطالعات بافتی در محلول فرمالین ۱۰٪ قرار گرفت و نیمکره چپ مغز جهت مطالعات بیوشیمیایی به فریزر  $-80$  درجه سانتی‌گراد منتقل شد. در روز آزمایش بافت‌های مغز در بافر فسفات صفر درجه سانتی‌گراد با  $\text{pH} = 7/4$  و با غلظت نمونه ۱۰ درصد وزنی - حجمی با هموژنیزاسون دستی هموژنیزه گردیدند. سپس محلول‌های حاصل با

مونوآمین اکسیدازها در مغز میانجی‌های عصبی مونوآمین را تخریب می‌کنند، از آنجایی که کاهش سطح این مواد یکی از عوامل افسردگی شمرده می‌شود، مهار عملکرد آن‌ها می‌تواند بسیار حائز اهمیت باشد. در بدن انسان دو نوع آنزیم مونوآمین اکسیداز وجود دارد MAO-A و MAO-B که هر دو نوع این آنزیمها در نورونها و آستروگلیاها یافت می‌شوند. گیاه علف چای محتوی چندین ترکیب با فعالیت بیولوژیکی مانند هایپرسیپین، سودوهایپرسیپین، فلاونوئیدها، پروسیانیدهای اولیگوپیریک و هایپرفورین است. هایپرفورین از جمله ترکیبات اصلی گیاه علف چای بوده که دارای اثرات آنتی باکتریال علیه باکتری‌های گرم مثبت است همچنین این ترکیب دارای خواص درمانی در کنترل اعتیاد به الکل است [12]. هایپرسیپین و سودوهایپرسیپین نیز دارای اثرات ضد باکتری و ضد ویروسی بوده و همچنین خواص کاهنده چربی خون است. هایپیران از عصاره هیدرو الکلی گیاه علف چای تهیه شده است که هر میلی‌لیتر آن حاوی  $0/25$  میلی‌گرم هایپرسیپین می‌باشد [10].

همان‌طور که ذکر شد، در مطالعات گذشته به اثرات ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی گیاه علف چای اشاره شده است. به صورت آشکار پاسخ‌های التهابی و عملکرد ایمنی به صورت کامل در هم‌تنیده شده است [10]. با توجه به ماهیت التهابی بیماری مالتیپل اسکلروزیس و نقش مهم آسیب‌های اکسیداتیو در ایجاد و گسترش بیماری، این تحقیق به منظور ارزیابی اثرات مفید احتمالی گیاه علف چای در مدل حیوانی اسکلروز متعدد از طریق تنظیم آسیب‌های اکسیداتیو، طرح‌ریزی شده است.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی از ۳۰ رأس موش صحرایی بالغ نر نژاد ویستار که دارای میانگین سنی ۸-۶ هفته و میانگین وزنی  $100 \pm 20$  گرم بودند جهت القای مدل بیماری استفاده شد. موش‌های صحرایی مورد آزمایش در حیوان خانه دانشکده علوم دانشگاه ارومیه در سیکل ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی (از ۷ صبح تا ۷ شب)، آب و غذای آزاد، و دمای بهینه  $22 \pm 2$  نگهداری شدند. در ضمن کلیه مراحل این تحقیق در کمیته اخلاق در پژوهش دانشکده علوم از نظر رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی با کد ۳۷۰-۲۰۰۰ مورد تأیید قرار گرفته است.

برای القای EAE در گروه‌های مورد مطالعه از هموژن بافت نخاع خوکچه هندی به نسبت ۱ به ۱ با ادجوانت فروند کامل (CFA: Compound Freund's Adjuvant) که محتوی  $10 \text{ mg/kg}$  فرم غیرفعال شده مایکوباکتریوم به حالت امولسیون بود استفاده شد. برای القاء، موش‌های صحرایی به طور عمیق با اتر بیهوش شده و  $400 \mu\text{l}$  مخلوط آنتی ژن و ادجوانت مزبور به صورت زیر جلدی در ناحیه پشت و  $100$  میلی‌لیتر در ناحیه بالشتک هر موش با سوزن  $25 \text{ G}$  تزریق گردید. بعد از گذشت ۴۸ ساعت و در روز ایمن‌سازی

هر چاهک متوقف می‌شود. در نهایت جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط الیزا قرائت گردید [18].

برای ارزیابی قدرت اینترکشن فعال‌ترین فرم عصاره علف چای یعنی هایپیران از روش داکینگ مولکولی این ترکیب با پروتئین منوآمین اکسیداز A استفاده شد. بدین منظور از سرورهای سیستم Docking server (https://www.dockingserver.com/web) برای پیش‌گویی انرژی اتصال و ثابت مهار استفاده گردید که در آن شارژ جزئی Gasteiger به اتم‌های لیگاند افزوده شده و اتم‌های هیدروژن غیر قطبی همراه پیوندهای چرخشی تعیین گردیدند. برای محاسبات تکمیلی بر روی مدل لیگاند Hypercin نیز اتم هیدروژن ضروری و پارامترهای حلال با کمک نرم‌افزار AutoDock اضافه گردیدند [19].

برای ساختار سه‌بعدی پروتئین از فایل PDB به شماره 2BXR:ID که مربوط به آنزیم منوآمین اکسیداز A بوده و دارای همولوژی ۱۰۰ درصد بود استفاده شد. همچنین تمام مراحل شامل تعریف Box با ابعاد تعریف شده و ساخت فایل PDBQT به شکل آنلاین در این سرور انجام گردید. تمامی مراحل آزمایش سه بار تکرار است و داده‌های به‌دست‌آمده به‌صورت Mean  $\pm$  SD بیان گردیده‌اند. جهت مقایسه دو داده نقطه‌ای از آزمون غیر پارامتری-Mann Whitney U و جهت مقایسه چندین داده از آزمون Kurskall wallis با آزمون تعقیبی (Bonferroni) استفاده گردید. و در تمام بررسی‌ها حداقل سطح معنی‌دار آزمون‌ها  $p < 0.05$  (با یک ستاره در نمودارها) در نظر گرفته شد و سطح معنی‌داری  $p < 0.01$  با دو ستاره و  $p < 0.001$  با سه ستاره نمایش داده شده است.

### یافته‌ها

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده میانگین شدت ناتوانی در طول دوره درمان در موش‌های صحرایی مبتلا و تحت درمان با هایپیران ( $0.7 \pm 2.1$  درصد) نسبت به گروه مبتلا ولی بدون درمان ( $2.3 \pm 3.1$ ) کمتر است ( $p < 0.001$ ). میانگین حداکثر شدت بیماری نیز در گروه موش‌های صحرایی مبتلا و تحت درمان ( $0.35 \pm 2.93$ ) در مقایسه با موش‌های صحرایی مبتلا ولی بدون درمان ( $0.26 \pm 3.04$ ) کمتر بود ( $p < 0.01$ ). یافته‌ها نشان داد که میانگین ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌های تام در گروه‌های تیمار و القا شده به شکل محسوسی تغییر نداشته است، به‌طوری‌که میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام در گروه کنترل برابر  $0.5 \mu\text{M} \pm$ ، در گروه القا برابر با  $0.4 \mu\text{M} \pm 0.41$  و در گروه تیمار با هایپیران برابر با  $0.4 \mu\text{M} \pm 0.77$  است.

حضور گروه‌های متیلن در زنجیره اسیدهای چرب لیپیدهای غشایی باعث می‌شود که این پیوندهای دوگانه مستعد واکنش‌پذیری بالا باشند. مالون دی‌آلدئید به‌عنوان شاخص‌ترین محصول پراکسیداسیون لیپیدی در سنجش میزان آسیب به لیپیدهای سلولی بسیار بااهمیت است

دور g ۱۰۰۰ سانتریفیوژ (Sigma Laboratory Centrifuge, Germany, 37520-D) شده و مایع رویی جهت سنجش میزان تولید محصولات پراکسیداسیون لیپیدها و فعالیت آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت.

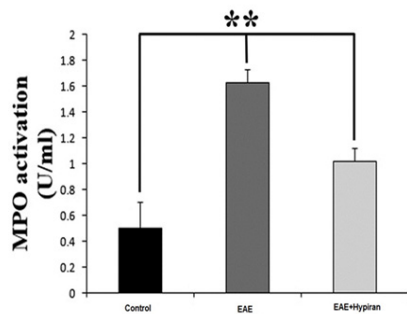
درجه پراکسیداسیون لیپیدها بر مبنای میزان تشکیل مالون دی‌آلدئید (MDA) تعیین می‌شود. در واقع مالون دی‌آلدئید محصول نهایی پراکسیداسیون اسیدهای چرب است و می‌تواند با تیوباربیتوریک اسید وارد واکنش شود و تولید کمپلس رنگی نماید. اساس روش، اندازه‌گیری شدت جذب رنگ ایجاد شده است [14]. بدین منظور ۳۰۰ میکرولیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰٪ حجمی - حجمی به ۱۵۰ میکرولیتر از نمونه اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ گردید. ۳۰۰ میکرولیتر از محلول رویی به لوله آزمایش منتقل و با ۳۰۰ میکرولیتر از تیوباربیتوریک اسید ۰.۷٪ در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد برای ۲۵ دقیقه انکوبه شد. پنج دقیقه بعد از خنک شدن محلول، رنگ صورتی ناشی از واکنش مالون دی‌آلدئید با تیوباربیتوریک اسید ظاهر و میزان جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۵ نانومتر در مقابل بلانک ارزیابی گردید. میزان مالون دی‌آلدئید به کمک ضریب جذبی مالون دی‌آلدئید محاسبه و به‌صورت nmol/g tissue بیان شد [15].

برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی از شیوه FRAP Ferric Reducing Ability of Plasma استفاده شد. در ابتدا با استفاده از اسیدکلریدریک ۴۰ mM، محلول ۱۰ mM تری پریدیل-تریازین (TPTZ) (شرکت Sigma - آمریکا) تهیه شد. سپس با مخلوط کردن بافر استات، محلول کلریدریک آهن و محلول TPTZ، معرف FRAP تهیه شد. سه میلی‌لیتر از معرف به نمونه‌ها افزوده شد و نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و سپس جذب نوری آن‌ها در ۵۹۳ نانومتر ارزیابی گردید [16].

میزان تولید نیتریک اکسید توسط روش رنگ سنجی گریس (Griess) و استفاده از منحنی استاندارد نیتريت سدیم تعیین گردید. به‌طور خلاصه، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه به‌صورت سه تکرار در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد. نمونه بلانک و استاندارد نیز که در کیت مربوطه وجود داشت به تعداد سه تکرار در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد. در نهایت جذب نوری نمونه در طول موج ۵۳۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا قرائت گردید [17].

برای سنجش آنزیم میلوپروکسیداز موجود در سوپرناتانت حاصل از هموژنیزاسیون بافت مغز با ۰.۵، ۳، ۳۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرو لیتر از نمونه با ۸۰ میکرو لیتر از H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ۰.۷٪ و ۱۱۰ میکرو لیتر از محلول TMB (۲/۹mM TMB در ۱۴/۵٪ DMSO و mM ۱۵۰ بافر سدیم فسفات با pH=۵/۴) مخلوط می‌شود. سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌شود. واکنش با افزودن ۵۰ میکرولیتر از H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ۲M به

هم در گروه تیمار با هایپیران مقادیر موردنظر به شکل معنی‌داری (در سطح  $p < 0.001$ ) تغییر یافته است به طوری که مقدار آن در گروه القایی با EAE از سطح  $0.5 \pm 0.2$  در گروه کنترل به  $0.3 \pm 0.1$  رسیده است همچنین این مقادیر در گروه تیمار با هایپیران به مقدار  $0.1 \pm 0.1$  رسیده است (نمودار ۳).



نمودار ۳) تغییرات سطح آنزیم میلوپراکسیداز سرمی در بین گروه‌های مورد مطالعه. بین همه گروه‌ها در سطح  $p < 0.001$  اختلاف معنی‌داری وجود داشت. \* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0.05$ .

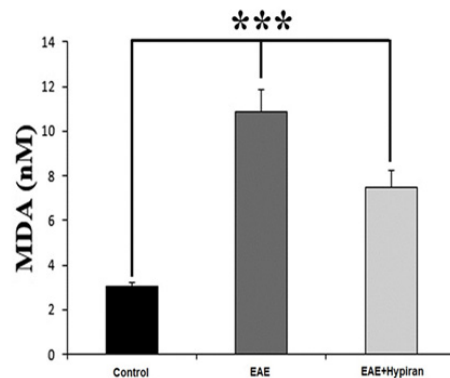
برخی ترکیبات با مهار کردن مونوآمین اکسیداز آنزیمی که انتقال‌دهنده‌های عصبی را تخریب می‌کند، سطح سروتونین، اپی نفرین، دوپامین و مونوآمین‌های دیگر را در مغز بالا می‌برند. از آنجایی که کاهش سطح این مواد یکی از عوامل افسردگی شمرده می‌شود، افزایش عملکرد آن‌ها به کنترل افسردگی و برخی مشکلات روانی دیگر می‌انجامد (جدول ۱).

جدول ۱) مقادیر انرژی اتصال و ثابت مهار پیش‌بینی‌شده و سایر پارامترهای اینترکشن

$\Delta G$ binding	Estimated Ki	vdW+ Hbond+ desolv energy	Electrostatic energy	Total intermolecular energy	Frequency	Interact. Surface
-7/50	3/18	-8/07	-0/01	-8/08	%10	612/162
kcal/mol	$\mu M$	kcal/mol	kcal/mol	kcal/mol		

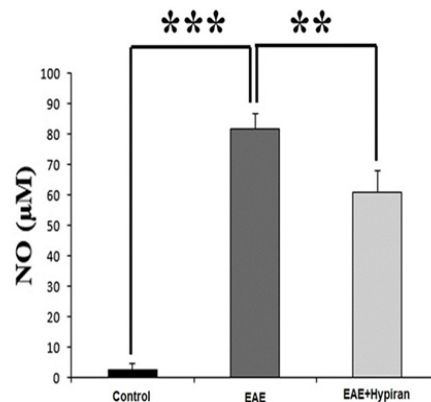
در شکل ۱ ساختار و نحوه اتصال هایپیرسین به مونوآمین اکسیداز A به‌طور کلی توسط نرم‌افزار Pymol نشان داده شده است. بررسی اینترکشن ترکیب هایپیران با مونوآمین اکسیداز A از طریق سرورهای داکینگ نشان داد که این اتصال کاملاً اختصاصی بوده و با  $\Delta G$  برابر با  $-7.5$  کیلوکالری بر مول و با ثابت مهار تخمینی  $K_i$   $3/18$  میکرومولار نشان می‌دهد که انرژی اتصال بالایی بین هایپیرسین و مونوآمین اکسیداز A وجود دارد. همچنین اسید آمینه‌های آرژنین ۲۹۷ و تره اونین ۱۵۶ از طریق اینترکشن‌های قطبی و اسیدآمینه‌های پرولین ۴۱۲ و ۴۱۳ و ایزولوسین ۴۱۵ از طریق اینترکشن‌های هیدروفوب نقش اساسی را در اینترکشن این آنزیم با هایپیران ایفا می‌کنند. بررسی‌های دقیق‌تر اینترکشن‌های اتمی در جداول ۱ و ۲ آمده است.

به طوری که این ترکیب را به‌عنوان فراوان‌ترین محصول اکسیدان لیپیدی معرفی می‌کنند. اندازه‌گیری میزان این ترکیب در گروه‌های تیمار و شاهد نشان می‌دهد که در هر سه گروه اختلاف معنی‌داری  $p < 0.001$  با گروه‌های القایی EAE وجود دارد، به طوری که مقادیر مالون دی آلدئید در گروه القایی EAE نسبت به گروه تیمار و شاهد بیشتر بوده  $10.83 \pm 1$  nM و در گروه‌های کنترل و تیمار به ترتیب برابر با  $3.02 \pm 0.9$  nM و  $7.46 \pm 0.75$  nM است (نمودار ۱).



نمودار ۱) ارزیابی سطح مالون دی آلدئید در بافت مغز در بین گروه‌های مورد مطالعه. بین همه گروه‌ها در سطح  $p < 0.001$  اختلاف معنی‌داری وجود داشت. \* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0.05$ .

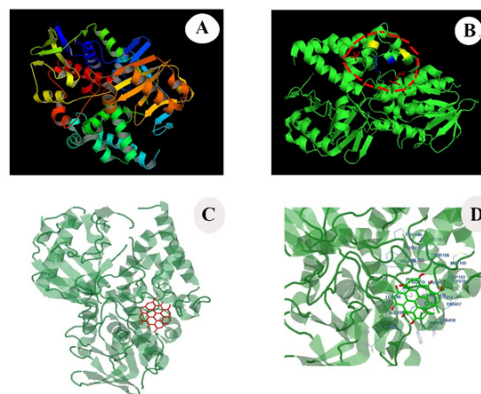
اندازه‌گیری میزان نیتریک اکسید در گروه کنترل و مقایسه آن با گروه القایی با EAE حاکی از افزایش معنی‌دار مقدار نیتریک اکسید در سطح معنی‌داری  $p < 0.001$  است. همچنین این مقدار در اثر تیمار با ترکیب هایپیران کاهش قابل توجهی داشته و مقدار آن به سطح معنی‌داری  $7 \pm 6$  (در مقایسه با مقدار  $81 \pm 4$  در گروه القایی با EAE رسیده است) (نمودار ۲).



نمودار ۲) تغییرات سطح نیتریک اکساید سرمی در بین گروه‌های مورد مطالعه. \* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0.05$  و \* \* \* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0.001$  است.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز در گروه‌های مورد مطالعه نشان داده است که هم در گروه القایی و

که IL17 عامل اصلی فعال ماتریکس متالوپروتئینازها است [23]. از طرفی نوتروفیل‌ها نیز عامل اصلی تولید ماتریکس متالوپروتئینازها هستند. کاهش عملکردهای مخرب نوتروفیل‌ها در مواردی التهابی توسط علف چای در گذشته نشان داده شده است [24]. سنجش فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز (MPO) و آنزیم نیتریک اکساید (NO) به عنوان شاخص قدرتمندی بر میزان تولید یا توان تولید رادیکالهای آزاد اکسیژن و نیترژن توسط سلول‌های التهابی است [25]. به نحو جالب توجهی نشان داده شده که لنفوسیت‌های T با تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی IL17 و اینترفرون گاما علاوه بر آن که موجب شکست سد خونی مغزی می‌گردد موجب فعال شدن سلول‌های نوتروفیل‌ها، مونوسیت‌ها و میگروگلیا جهت تولید واسطه‌های فعال اکسیژن و نیترژن می‌شوند [26]. همچنین به خوبی مشخص شده که نوتروفیل‌های خونی محیطی در افراد مبتلابه MS و همچنین حیوانات مبتلابه EAE سطح بالاتری از فعالیت آنزیم‌های MPO و NO را دارا می‌باشند [27]. این نوتروفیل‌های از پیش فعال شده نقش مهمی در شکست سد خونی مغزی و راه‌اندازی فرایند التهاب عصبی بازی می‌کنند [28,29]. در همین راستا به خوبی نتایج ما نشان داد که سطح فعالیت آنزیم MPO و همچنین NO در سرم خونی حیوانات تیمار شده با هایپیران به نحو قابل توجهی نسبت به گروه EAE کاهش یافته است که این نتایج با نتایج مطالعه قبلی که در راستای کاهش سایتوکاین‌های التهابی بوده است هم خوانی دارد [30]. برخلاف بسیاری از بیماری‌های دیگر که استرس اکسیداتیو یک نقش ثانویه در ایجاد و گسترش بیماری بازی می‌کند، بیماری EAE یا مالتیپل اسکلروزیس به طور کاملاً مستقیم در نتیجه گسترش آسیب‌های اکسیداتیو و نیتروژن‌ها به پیش می‌رود [31]. نازروگو و همکاران نشان داده‌اند که هایپریکوم پرفوراتوم موجب تغییر سطح آنزیم‌های اکسیداتیو در افراد مبتلابه MS می‌شود [24]. بر طبق بررسی‌های انجام شده با پیشرفت بیماری سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان از قبیل گلوکوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دسموتاز متناسب با شدت بیماری در گویچه‌های قرمز مبتلایان به MS و موش‌های صحرایی مبتلابه EAE کاهش می‌یابد [32]. گونه‌های فعال اکسیژن و نیترژن که در بافت عصبی در نتیجه تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی IL17 و اینترفرون گاما القاء می‌گردند باعث آسیب به غلاف میلین و همچنین سلول‌های نورونی می‌شوند همچنین گونه‌های فعال اکسیژن و نیترژن منجر به مهار آنزیم سیتوکروم اکسیداز C زنجیره تنفسی و اختلال در زنجیره انتقال الکترونی و مرگ‌میر نورون‌ها می‌گردد [33]. نیتریک اکسید همچنین به صورت غیرمستقیم نیز با القای آزاد شدن گلوتامات توسط سلول‌های میکروگلیال و ماکروفاژها موجب آسیب نورون‌ها در اثر تحریک بیش از حد آن‌ها خواهد شد [34]. در گذشته نیز محققان



شکل ۱ (A) مربوط به ساختار آنزیم منوآمین اکسیداز A، شکل (B) مربوط به ناحیه اتصالی هایپیران به منوآمین اکسیداز A و شکل (C,D) مربوط به نحوه قرارگیری هایپیران در جایگاه اینترکشن و اسید آمینه‌های اطراف آن را نشان می‌دهد.

جدول ۲ نوع اینترکشن اسید آمینه‌های مهم در آنزیم منوآمین اکسیداز A

Polar	Hydrophobic	Other
(-0/803) ARG297	(-3/0149) PRO413	(-0/4281) LYS154
(-0/6472) THR156	(-1/3801) PRO412	(-0/3457) GLN418
	(-0/9529) ILE415	

## بحث

در مطالعات گذشته نشان داده شده است که گیاه علف چای دارای ماهیت ضدالتهابی قوی بوده و از طریق کاهش بیان ژن‌های مرتبط با تولید فرایندهای ضدالتهابی از قبیل سیکلو اکسیژناز ۲ (Cox2) و نیتریک اکساید القایی (iNOS) عملکرد خود را ایفا می‌نماید. همچنین نشان داده شده است که در بیماری مالتیپل اسکلروزیس و مدل تجربی آن (EAE) به دلیل تشکیل و گسترش کلون‌های لنفوسیتی گروه Th1 و Th17 که دارای ماهیت شدیداً التهابی است این مدل ایجاد می‌گردد [21,20]. در همین راستا تحقیق بطحی و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان داده که تجویز عصاره هیدروالکلی علف چای به موش‌های ایمن شده با گویچه‌های سرخ گوسفندی منجر به کاهش قابل توجه IL17 و اینترفرون گاما در کشت سلول‌های طحالی آن‌ها شده است [10]. بنابراین قسمتی از نتایجی که در این تحقیق حاصل شده است ممکن است به دلیل اثرات کاهنده عصاره هایپیران بر تولید سایتوکاین‌های التهابی IL17 و اینترفرون گاما باشد. هانگ و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان داده‌اند که هایپریکوم موجب مهار ماتریکس متالوپروتئیناز می‌شوند. ماتریکس متالوپروتئیناز که در پانوز بیماری MS و EAE از طریق شکست سد خونی-مغزی در پانوز بیماری بازی می‌کند [22]. بنابراین قسمتی از اثرات مفید گیاه علف چای در کاهش شدت بیماری که در این تحقیق مشاهده نمودیم، نیز ممکن است به خاطر تغییر در عملکرد ماتریکس متالوپروتئینازها، بوده است. به نحو جالب توجهی نشان داده شده است

بر اساس یافته‌های ما نیز به نظر نمی‌رسد که تست FRAP حساسیت کافی جهت سنجش اثرات آنتی‌اکسیدانی منتسب به عصاره‌های پیریکوم داشته باشد. مطالعات گذشته به خوبی ثابت کرده است که پتانسیل آنتی‌اکسیدانی یک ماده آنتی‌اکسیدان برعلیه رادیکال‌های آزاد، ضرورتاً با توانایی احیای آن ماده در احیای آهن فریک به آهن فرو در تست FRAP برابر نیست، بنابراین تست MDA در استنتاج یافته‌ها از قابلیت و توانایی بیشتری برخوردار است [43]. در مطالعه انجام شده مشاهده نمودیم که علیرغم عدم تغییر معنی‌داری در تست FRAP، میزان پراکسیداسیون لیپیدها در گروه مبتلایان به EAE و درمان شده با هایپیران نسبت به گروه مبتلایان EAE و بدون درمان به‌طور معنی‌داری ( $p < 0.001$ ) کاهش یافته بود که کلیه این نتایج متناسب و همخوان با نتایج به‌دست آمده از تست‌های MDA، MPO و NO است.

همچنین در گذشته نشان داده شده است که عوامل مهارکننده آنزیم MAO قادر به مهار قابل توجه علائم بیماری EAE است به‌طوری‌که موسکراو و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان داده‌اند که مصرف Phenelzine به‌عنوان یک مهارکننده کلاسیک آنزیم MAO منجر به مهار قابل توجه علائم بیماری EAE در موش C57BL/6 شده است [44]. نتایج مطالعه تحلیلی ما نیز حاکی از مهار قابل توجه آنزیم MAO توسط عصاره‌های پیریکوم بوده است. به‌عنوان یک نتیجه کلی به نظری می‌رسد که هایپیران از طریق کاهش تولید فعالیت آنزیم MPO، کاهش سطح NO و کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدها به کاهش شدت بیماری در موش‌های صحرایی مبتلا کمک می‌کند.

از آنجایی‌که در پاتوژنز بیماری مالتیپل اسکلروزیس سایتوکاین‌ها نقش مهمی بر عهده دارند، پیشنهاد می‌شود که در تحقیقات آینده حتماً به بررسی این موارد نیز پرداخته شود. در ثانی باید در نظر داشت هر مدل تحقیقاتی نسبت به بیماری واقعی در انسان دارای محدودیت‌های خاص خود می‌باشد بنابراین در رابطه با کارهای آزمایشگاهی بهتر است که از سایر مدل‌های EAE نیز قبل از مطالعه بر روی انسان استفاده شود.

### نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد که هایپیران توانسته است که از طریق کاهش استرس اکسیداتیو موجبات تخفیف علائم بیماری آسفالومیلیت تجربی خود ایمن در موش‌های صحرایی را فراهم دارد. بنابراین این احتمال وجود دارد که هایپیران در بیماران مبتلا به مالتیپل اسکلروزیس نیز مفید واقع شود. هرچند که مطالعه حاضر یک مطالعه مقدماتی بوده و لازم است که در آینده تحقیقات بیشتر صورت گیرد.

**تشکر و قدردانی:** بدین‌وسیله از کمک‌های مادی و معنوی معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه تشکر و قدردانی

مختلف نقش NO را در ایجاد بیماری MS از طریق مشاهده واحدهای نیترونیروزین در پلاک‌های مغزی بیماران مبتلا به MS به‌خوبی اثبات کرده‌اند [35]. از دست رفتن میلین در نتیجه حمله ایمنولوژیک منجر به از بین رفتن هدایت جهشی نورون‌ها می‌گردد در این شرایط نورون‌ها جهت برگرداندن قابلیت هدایت عصبی خود اقدام به باز توزیع کانال‌های سدیمی در طول آکسون می‌کنند [36]. این مسئله منجر به ایجاد فشار مضاعفی بر سلول از جهت نیاز به انرژی می‌کند زیرا سلول جهت فرار از سربار سدیمی مجبور به استفاده از پمپ‌های  $Na^+/K^+$  ATPase خواهد بود. از طرفی به دلیل آسیب‌های اکسیداتیو و نیتروژاتیو که موجب تحلیل فعالیت میتوکندری و قابلیت تولید ATP شده است در این شرایط سلول جهت فرار از سربار سدیم از مبادله گر  $Na/Ca$  استفاده می‌کند که این خود نیز در نهایت منجر به سربار کلسیم در سلول و راه افتادن فرایند آپوپتوزیس و مرگ سلولی خواهد شد [37, 38]. بنابراین استفاده کردن از عوامل آنتی‌اکسیدان در زمینه کمک به درمان بیماران MS منطقی به نظر می‌رسد. همان‌طور که ذکر شد ترکیبات عصاره‌های پیریکوم علاوه بر آن که دارای اثرات ضدالتهابی مستقیم (از طریق مهار سیکلو اکسیژناز و iNOS) هستند دارای اثرات شناخته‌شده آنتی‌اکسیدانی نیز می‌باشند که کمتر در مورد داروهای متداول درمان MS از قبیل گلوکوکورتیکوئیدها یا اینترفرون‌های بتا مورد توجه قرار گرفته است [20]. همچنین در گذشته نشان داده شده است که بین پلی‌مورفیسم ژن Myeloperoxidase (MPO) و بیماری MS ارتباط معنی‌داری وجود دارد به‌طوری‌که مطالعات در جمعیت افراد بریتانیایی و زنان آمریکایی و سوئدی به‌خوبی رابطه معنی‌دار و مستقیمی بین سطح فعالیت این آنزیم در خون و استعداد ابتلا به بیماری MS مشخص شده است [39, 40]. مطالعات انجام شده در جمعیت بیماران ژاپنی نشان داده است که بین تغییرات سطح آنزیم MPO در خون و رخ داد عود و فروکشی بیماری ارتباط مستقیمی وجود دارد به‌طوری‌که قبل از عود بیماری شاهد افزایش فعالیت آنزیم MPO بوده و قبل از فروکشی نیز سطح فعالیت این آنزیم در مبتلایان کاهش می‌یابد [41]. در همین راستا نیز مطالعه ما به‌خوبی نشان داد که هایپیران قادر به مهار فعالیت این آنزیم در گروه مبتلا و تحت درمان است. همچنین مطالعه مظفری و همکاران در سال ۲۰۱۱ به‌خوبی نشان داده که عصاره *Hypericum perforatum* قادر به کاهش سطح فعالیت آنزیم MPO در موش‌های صحرایی مبتلا به کویت اولسراتیو بوده است [30]. در تست MDA میزان پراکسیداسیون لیپیدهای موجود، اندازه‌گیری می‌شود که خود شاخصی از میزان آسیب‌های اکسیداتیو بوده است [42]. در تست FRAP ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی سنجیده می‌شود [16]. با این حال در تست FRAP اثرات آنتی‌اکسیدانی بسیاری از ترکیبات از قبیل آلبومین، بتاکاروتن و مواد حاوی گروه تیول سنجیده نمی‌گردد.

therapy induces metastatic melanoma cell death. *PloS one*. 2014;9(7):e103762.

8- Russo E, Scicchitano F, Whalley BJ, Mazzitello C, Ciriaco M, Esposito S. Hypericum perforatum: pharmacokinetic, mechanism of action, tolerability, and clinical drug–drug interactions. *Phytotherapy Research*. 2014;28(5):643-55.

9- Anderson G, Kubera M, Duda W, Lasoń W, Berk M, Maes M. Increased IL-6 trans-signaling in depression: focus on the tryptophan catabolite pathway, melatonin and neuroprogression. *Pharmacological Reports*. 2013;65(6):1647-54.

10- Froushani SMA, Gouvarchin Galee Esmaili H, Khamisabadi M, Lotfallahzade B. Immunomodulatory effects of hydroalcoholic extract of Hypericum perforatum. *AJP*. 2015;5(1):62.

11- Herold A, Cremer L, Călugaru A, Tamaş V, Ionescu F, Manea S, et al. Hydroalcoholic plant extracts with anti-inflammatory activity. *RAMI*. 2003;62(1-2):117-29.

12- Öztürk N, Kıyan HT. 233-Evaluation of biological activities of hypericum perforatum L. and Hypericum Calycinum L. Extracts. *Free Radic Biol Med*. 2016;100:S107.

13- Chen GQ, Chen YY, Wang XS, Wu SZ, Yang HM, Xu HQ, et al. Chronic caffeine treatment attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis induced by guinea pig spinal cord homogenates in Wistar rats. *Brain Research*. 2010;1309:116-25.

14- Cheraghi O, Dehghan G, Mahdavi M, Rahbarghazi R, Rezaabakhsh A, Charoudeh Nozad H, et al. Potent anti-angiogenic and cytotoxic effect of conferone on human colorectal adenocarcinoma HT-29 cells. *Phytomedicine*. 2016;23(4):398-405.

15- Rabiei Z, Rafieian-Kopaei M, Heidarian E, Saghaei E, Mokhtari Sh. Effects of zizyphus jujube extract on memory and learning impairment induced by bilateral electric lesions of the nucleus Basalis of Meynert in rat. *Neurochemical Res*. 2014;39(2):353-60.

16- Katalinic V, Modun D, Music I, Boban M. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2, 2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. *CBP Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2005;140(1):47-52.

17- Rezaabakhsh A, Nabat E, Yousefi M, Montazersaheb S, Cheraghi O, Mehdizadeh A, et al. Endothelial cells' biophysical, biochemical, and chromosomal aberrancies in high-glucose condition within the diabetic range. *Cell Biochem*

می‌شود.

**تأییدیه اخلاقی:** پروتکل تحقیق بر اساس قوانین بین‌المللی در مورد حمایت از حیوانات آزمایشگاهی، تنظیم و به تأیید کمیته اخلاق دانشگاه رسید.

**تعارض منافع:** هیچ‌گونه تعارض منافی توسط نویسندگان بیان نشده است.

**سهم نویسندگان:** مینا عبدالله پوراصل (نویسنده اول)، پژوهشگر اصلی (۳۰٪); شیوا خضری (نویسنده دوم)، روش‌شناس / تحلیلگر آماری (۳۰٪); سید میثم ابطی فروشانی (نویسنده سوم)، نگارنده مقدمه / نگارنده بحث (۳۰٪); امید چراغی (نویسنده چهارم) بررسی اینترکشن (۱۰٪).

**منابع مالی:** این مطالعه حاصل پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد خانم مینا عبدالله پوراصل مصوب دانشگاه ارومیه با راهنمایی خانم دکتر شیوا خضری و دکتر سید میثم ابطی فروشانی است.

### منابع

- 1- Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Thompson AJ, Wolinsky JS, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis The 2013 revisions. *Neurology*. 2014;83(3):278-86.
- 2- Krupp LB, Tardieu M, Amato MP, Banwell B, Chitnis T, Dale RC, et al. International pediatric multiple sclerosis study group criteria for pediatric multiple sclerosis and immune-mediated central nervous system demyelinating disorders: revisions to the 2007 definitions. *MSJ*. 2013;19(10):1261-7.
- 3- Wingerchuk DM, Carter JL. Multiple sclerosis: current and emerging disease-modifying therapies and treatment strategies. In *mayo clinic proceedings*. Elsevier. 2014;89(2):225-40
- 4- Liu Y, Holdbrooks AT, De Sarno P, Rowse AL, Yanagisawa LL, McFarland BC, et al. Therapeutic efficacy of suppressing the Jak/STAT pathway in multiple models of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The JI*. 2014;192(1):59-72.
- 5- Pryce G, Riddall DR, Selwood DL, Giovannoni G, Baker D. Neuroprotection in experimental autoimmune encephalomyelitis and progressive multiple sclerosis by cannabis-based cannabinoids. *JNIP*. 2015;10(2):281-92.
- 6- Liu Y, Holdbrooks AT, Meares GP, Buckley JA, Benveniste EN, Qin H. Preferential recruitment of neutrophils into the cerebellum and brainstem contributes to the atypical experimental autoimmune encephalomyelitis phenotype. *The JI*. 2015;195(3):841-52.
- 7- Kleemann B, Loos B, Scriba TJ, Lang D, Davids LM. St John's Wort (Hypericum perforatum L.) photomedicine: Hypericin-photodynamic



- JT, Friese MA. Neutrophils amplify autoimmune central nervous system infiltrates by maturing local APCs. *The JI*. 2013;191(9):4531-9.
- 30- Mozaffari S, Esmaily H, Rahimi R, Baeri M, Sanei Y, Asadi-Shahmirzadi A, et al. Effects of hypericum perforatum extract on rat irritable bowel syndrome. *Pharmacognosy Mag*. 2011;7(27):213.
- 31- Ljubisavljevic S, Stojanovic I, Pavlovic D, Sokolovic D, Stevanovic I. Aminoguanidine and N-acetyl-cysteine suppress oxidative and nitrosative stress in EAE rat brains. *Redox Report*. 2011;16(4):166-72.
- 32- Zargari M, Allameh A, Sanati MH, Tiraihi T, Lavasani Sh, Emadyan O. Relationship between the clinical scoring and demyelination in central nervous system with total antioxidant capacity of plasma during experimental autoimmune encephalomyelitis development in mice. *Neurosci Lett*. 2007;412(1):24-8.
- 33- Shi R, Page J, Tully M. Molecular mechanisms of acrolein-mediated myelin destruction in CNS trauma and disease. *Free Radic Res*. 2015;49(7):888-95.
- 34- Mao P, Reddy PH. Is multiple sclerosis a mitochondrial disease? *BBA*. 2010;1802(1):66-79.
- 35- Calabrese V, Scapagnini G, Ravagna A, Bella R, Foresti R, Bates TE, et al. Nitric oxide synthase is present in the cerebrospinal fluid of patients with active multiple sclerosis and is associated with increases in cerebrospinal fluid protein nitrotyrosine and S-nitrosothiols and with changes in glutathione levels. *JNR*. 2002;70(4):580-7.
- 36- Waxman SG. Axonal conduction and injury in multiple sclerosis: the role of sodium channels. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(12):932-41.
- 37- Van Der Walt A, Butzkueven H, Kolbe S, Marriott M, Alexandrou E, Gresle M, et al. Neuroprotection in multiple sclerosis: a therapeutic challenge for the next decade. *Pharmacol Ther*. 2010;126(1):82-93.
- 38- Stys PK, Waxman SG, Ransom BR. Ionic mechanisms of anoxic injury in mammalian CNS white matter: role of Na<sup>+</sup> channels and Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger. *J Neurosci*. 1992;12(2):430-9.
- 39- Chataway J, Sawcer S, Feakes R, Coraddu F, Broadley S, Jones HB, et al. A screen of candidates from peaks of linkage: evidence for the involvement of myeloperoxidase in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 1999;98(2):208-13.
- 40- Zakrzewska-Pniewska B, Styczynska M, Podlecka A, Samocka R, Peplonska B, Barcikowska M, et al. Association of apolipoprotein E and
- Funct. 2017;35(2):83-97.
- 18- Love D, Barrett T, Hawkins C. Role of the myeloperoxidase oxidant hypothiocyanous acid (HOSCN) in the adaptation of cells to oxidative stress during inflammation. *Free Radic Biol Med*. 2017;108:S30.
- 19- Bikadi Z, Hazai E. Application of the PM6 semi-empirical method to modeling proteins enhances docking accuracy of AutoDock. *J Cheminformatics*. 2009;1(1):15.
- 20- Huang N, Rizshsky L, Hauck CC, Nikolau BJ, Murphy PA, Birt DF. The inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage inflammation by 4 compounds in *Hypericum perforatum* extract is partially dependent on the activation of SOCS3. *Phytochemistry*. 2012;76:106-16.
- 21- Kraus B, Wolff H, Elstner EF, Heilmann J. Hyperforin is a modulator of inducible nitric oxide synthase and phagocytosis in microglia and macrophages. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2010;381(6):541-53.
- 22- Huang HS, Liaw ET. Extraction optimization of flavonoids from *hypericum formosanum* and matrix metalloproteinase-1 inhibitory activity. *Molecules*. 2017;22(12):2172.
- 23- Froushani SMA, Delirez N, Hobbenaghi R, Mosayebi G. Synergistic effects of atorvastatin and all-trans retinoic acid in ameliorating animal model of multiple sclerosis. *Immunol Invest*. 2014;43(1):54-68.
- 24- Naziroglu M, Kutluhan S, Övey İS, Aykur M, Yurekli VA. Modulation of oxidative stress, apoptosis, and calcium entry in leukocytes of patients with multiple sclerosis by *Hypericum perforatum*. *Nutr Neurosci*. 2014;17(5):214-21.
- 25- Sayre LM, Perry G, Smith MA. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol*. 2008;21(1):172-88.
- 26- Gowing E, Gendron S, Broux B, Lecuyer MA, Bourbonniere L, Larouche S, et al. Integrin alpha8 is a novel mediator of T lymphocyte migration across the CNS barriers. *SAGE Publications*. 2016; 1352-4585.
- 27- Wojkowska DW, Szpakowski P, Ksiazek-Winiarek D, Leszczynski M, Glabinski A. Interactions between neutrophils, Th17 cells, and chemokines during the initiation of experimental model of multiple sclerosis. *Mediators of inflammation*. 2014; 0962-9351.
- 28- Minagar A, Alexander JS. Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *MSJ*. 2003;9(6):540-9.
- 29- Steinbach K, Piedavent M, Bauer S, Neumann

in brain tissue from patients with Alzheimer's disease. *Gerontology*. 2000;46(4):179-84.

43- Esteghamati A, Zarban A, Doosti M. Evaluation of antioxidant status and oxidative stress markers in type II diabetes mellitus. *IJEM*. 2001;3(4): 239-45.

44- Musgrave T, Benson C, Wong G, Browne I, Tenorio G, Rauw G, et al. The MAO inhibitor phenelzine improves functional outcomes in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Brain behav Immun*. 2011;25(8):77-1688.

myeloperoxidase genotypes to clinical course of familial and sporadic multiple sclerosis. *MSJ*. 2004;10(3):266-71.

41- Minohara M, Matsuoka T, Li W, Osoegawa M, Ishizu T, Ohyagi Y, et al. Upregulation of myeloperoxidase in patients with opticospinal multiple sclerosis: positive correlation with disease severity. *J Neuroimmunol*. 2006;178(1):156-60.

42- Miranda MD, DeBruin VMS, Vale MR, Viana GSB. Lipid peroxidation and nitrite plus nitrate levels