

دراسة فعالية العلاج بالأوزون في التصلب المتعدد المستحدث

بالكوبريزون عند الهامستر السوري الذهبي

دانية شحادة*، محمد مؤيد بلال**، علاء كيالي***

*طالبة دراسات عليا (ماجستير)، قسم علم الحياة الحيوانية، كلية العلوم، جامعة حلب

**مدرس، قسم علم الحياة الحيوانية، كلية العلوم، جامعة حلب

***أستاذ، قسم الأشعة، كلية الطب، جامعة حلب

الملخص

العلاج بالأوزون الطبي تقنية علاجية ناشئة تكتسب أهمية متزايدة في علاج الاضطرابات المناعية والعصبية كالتصلب المتعدد الذي يتميز بإزالة لغمد النخاعين في سوية الجهاز العصبي المركزي بوساطة مناعية.

تم إجراء الدراسة على 25 فرداً من ذكور الهامستر البالغين، قسمت الأفراد إلى خمس مجموعات (الشاهد، إصابة حادة، إصابة حادة معالجة، إصابة مزمنة، إصابة مزمنة معالجة) تضمنت كل مجموعة 5 أفراد، تم إعطاء الأوزون ثلاث مرات في الأسبوع ولمدة شهر عن طريق نفخ المستقيم بتركيز 25 ميكروجرام/مل في الأسبوعين الأول والثاني وبتركيز 50 ميكروجرام/مل في الأسبوعين الثالث والرابع، تم دراسة تأثير العلاج بالأوزون على مؤشر الوزن وإجراء تعداد كلي والتفصيلي لخلايا الدم البيضاء وتقييم المقدرة الحركية ومراقبة المشاكل البصرية بين المجموعات. أظهرت النتائج دور الأوزون في استعادة وزن الجسم وانخفاض متوسط التعداد الكلي لخلايا الدم البيضاء إلى قيم قريبة من الشاهد وكذلك خفض نسبة العدلات كما أبدت المجموعات المعالجة تحسن في العجز الحركي من خلال اختبار الشريط الأفقي ومراقبة النشاط الحركي وتأخير تراكم الإعاقة الدائمة.

الكلمات المفتاحية: التصلب المتعدد، الكوبريزون، غمد النخاعين، خلايا الدم البيضاء، العلاج بالأوزون.

ورد البحث للمجلة بتاريخ 2023/9/13

قبل للنشر بتاريخ 2024/2/1

1- المقدمة وأهداف البحث:

1-1- المقدمة والدراسة المرجعية:

يتميز التصلب المتعدد على أنه مرض التهابي مناعي ذاتي مزمن في سوية الجهاز العصبي المركزي يتصف بإزالة غمد النخاعين [1].

في معظم الحالات يبدأ المرض بهجمات متكررة من الخلل الوظيفي العصبي والتي قد تستمر لأسابيع أو شهور مع تعافي لاحق بدرجة متغيرة، وقد يتظاهر في حالات أخرى بتدهور عصبي تدريجي بطيء حيث تؤدي الظروف المجهدة إلى تفاقم الأعراض وتقدم الإعاقة [2].

يتسبب مرض التصلب المتعدد في العديد من الأعراض السريرية التي تختلف من شخص لآخر حسب مكان الأذية تتدرج هذه الأعراض من الشائعة إلى الأقل شيوعاً ثم إلى النادرة ومن أبرز هذه الاعراض:

التعب، الضعف، انخفاض التوازن، مشاكل المشي، المشاكل البصرية وفقدان الرؤيا، آلام عصبية وخلل في المثانة والأمعاء [3].

إن التفاعلات الالتهابية التي تؤثر على مكونات غمد النخاعين في الجهاز العصبي المركزي تعد السبب الرئيسي للمرض حيث تشارك مجموعة متنوعة من الخلايا المناعية في العملية الالتهابية مثل الخلايا البيضاء والخلايا الضامة والتغصنية جنباً إلى جنب مع السيتوكينات الالتهابية والخلايا البطانية [4]، فبعد عبور الحاجز الدماغي الدموي BBB فإن الخلايا الالتهابية من خلال توليد السيتوكينات الالتهابية سوف تتلف غمد النخاعين والخلايا قليلة التغصن [5].

كما أظهرت العديد من الدراسات إمكانية الكشف عن إزالة غمد النخاعين عند حيوانات التجربة باستخدام تقانة التصوير بالرنين المغناطيسي الـ MRI، حيث أن الحيوانات التي تتعرض للتسمم الفموي بالكوبريزون تم إزالة غمد النخاعين لديها في مناطق عدة من الدماغ في سوية الجهاز العصبي المركزي مثل (الجسم الثقني والمهاد والسويقتان المخيتان والمخيخ) [6]. كما يمكن استخدام هذه التقانة لمتابعة تطور المرض ومراقبة تأثير العلاجات.

حيث تم استخدام عقاقير مختلفة في العلاجات السريرية للحد من الحالة الالتهابية ومن تكرار النوبات كالمثبطات المناعية المختلفة وإبطاء تراكم الإعاقة حيث يتم التعامل مع الهجمات الحادة بالستيروئيدات بالإضافة للأدوية المعدلة والتي يتم تطويرها بشكل دائم ليتم الحصول على علاج أكثر فعالية [7].

الأوزون جزيء غازي طبيعي عديم اللون عالي التفاعل يتكون من ثلاث ذرات أوكسجين يتشكل عندما يتعرض الأوكسجين لتفريع كهربائي أو لأشعة فوق بنفسجية UV في طبقات الجو المختلفة [8]، تم اقتراح الإمكانات العلاجية الطبية للأوزون منذ عام 1896م بعد إن قام العالم نيكولا تيسلا بتصميم أول جهاز مولد O₃ الطبي، فقد تم استخدام هذه التقنية بنجاح خلال الحرب العالمية الأولى كمطهر لعلاج الالتهابات والجروح [9]، كما أثبت أيضاً فعاليته في علاج العديد من الأمراض كأمراض نقص التروية الدموية الدماغية والقلبية وأمراض المناعة الذاتية كالتهاب المفاصل الروماتيدي [10]. يستخدم الأوزون على نطاق واسع كخيار علاجي مساعد في العديد من الحالات المرضية التي تتميز بعمليات التهابية مزمنة وفرط في نشاط المناعة

ومع مرور الوقت تم تطوير طرق علاجية آمنة للعلاج بالأوزون حيث

تضمنت نوعين: [11]

1. المعالجة الجهازية (المعالجة الكبرى والنفخ عبر المستقيم والمعالجة الصغرى).

2. المعالجة الموضعية (الحقن موضعي وحقبة الأوزون).

1-2- أهمية وأهداف البحث:

نظراً لما للأوزون من تأثير محتمل في علاج الاضطرابات التوكسية العصبية ودوراً مضاداً للالتهاب.

لذا توجهت دراستنا إلى تقييم آثار هذا العلاج على مرض التصلب المتعدد وتحديد فعاليته من خلال التجارب السريرية الحيوانية والحد من تطور الإعاقة المرضية.

هدفت هذه الدراسة إلى:

- دراسة الدور العلاجي للأوزون على الأعراض السريرية عند حيوانات الهامستر السوري الذهبي المصابة بالتصلب المتعدد.
- دراسة تأثير الأوزون على التعداد الكلي والتفصيلي لخلايا الدم البيضاء عند الحيوانات المصابة بالتصلب المتعدد.

2- مواد البحث وطرقه:

2-1- مواد البحث:

- حيوانات التجربة: أجريت التجارب على 25 فرد من ذكور الهامستر السوري البالغين.
- المواد والأدوات:
 - معلق الكوبريزون بتركيز 0,2%
 - ماصات باستور لسحب عينات الدم
 - أنابيب لجمع عينات الدم EDAT
 - محاقن إنسولين
 - قسطرة شرجية دقيقة
 - جهاز تحليل الدم CBC.
 - جهاز المولد للأوزون الطبي (Bozon-N)

2-2- طرق البحث:

تقسيم حيوانات التجربة: تم تقسيم الأفراد إلى خمس مجموعات:

- المجموعة 1 (شاهدة).
- مجموعة 2 (إصابة حادة مجرعة بالكوبريزون لمدة 6 أسابيع).
- مجموعة 3 (إصابة مزمنة مجرعة بالكوبريزون لمدة 12 أسبوع).
- مجموعة 4 (إصابة حادة معالجة بالأوزون).
- مجموعة 5 (إصابة مزمنة معالجة بالأوزون).

وزن الجسم:

تم وزن الأفراد قبل وبعد العلاج بالأوزون وإجراء المقارنة بين المجموعات.

المعالجة بالأوزون الطبي:

تم إعطاء الحيوانات المصابة (المزمنة - الحادة) الأوزون عن طريق نفخ المستقيم RICTA وذلك لمدة أربعة أسابيع وبمعدل ثلاث جرعات في الأسبوع.

حيث تلقت الحيوانات في الأسبوعين الأول والثاني غاز الأوزون بتركيز 25 ميكروجرام/ مل وبتركيز 50 ميكروجرام / مل في الأسبوعين الثالث والرابع [12].

حساب العدد الإجمالي والتفاضلي لخلايا الدم البيضاء:

تم سحب عينات الدم من الجيب الحجاجي من أفراد المجموعات الخمس وذلك باستخدام ماصة باستور ووضعها في أنابيب تحوي مانع تخثر (EDTA) وقراءتها باستخدام جهاز تحليل الدم CBC.

مراقبة الأعراض السريرية:

يتم مراقبة ظهور الأعراض الشائعة على الحيوانات خلال فترة التجربة والنتيجة عن أذية غمد النخاعين في الجهاز العصبي المركزي [13] ومقارنتها بين المجموعات المصابة الغير معالجة والمجموعة المعالجة بالأوزون.

من أهمها الأضرار البصرية إضافة إلى الأعراض الحركية والتوازنية والتي يتم تقييمها باستخدام اختبار الشريط الأفقي والذي يتضمن وضع حيوانات التجربة على سلك معلق يرتفع عن سطح أفقي مسافة متر تقريبا ومراقبة مقدرة الحيوانات على التمسك ومقاومة السقوط ويتم ذلك بقياس الزمن بين كل سقوط وآخر. إضافة لتجربة المتاهة لتقييم النشاط الحركي والتوازني للأفراد.

3 - النتائج والمناقشة:**3-1- نتائج تأثير الأوزون على وزن جسم الحيوانات:**

لوحظ ازدياد أوزان الحيوانات في كلا مجموعتي علاج الإصابة الحادة والمزمنة فكان متوسط الزيادة بمعدل (10.5 - 15.9) غ على التوالي كما في الجدول رقم (1) وذلك يدل على دور الأوزون في عكس تأثير الكوبريزون على مؤشر الوزن

بحيث أنه يعمل الأخير على تناقص الوزن وهذا ما أكدته الدراسة [14]، بينما يعمل الأوزون على استعادة الوزن الطبيعي وذلك ما يؤكد على دوره في تنظيم عمليات التمثيل الغذائي وزيادة سرعة النمو وهذا ما أكدته الدراسة [15] كما له دور في إصلاح الخلل الوظيفي للجسيمات الكوندرية المستحث بالكوبريزون.

جدول (1) يوضح أوزان الحيوانات قبل وبعد العلاج

مجموعة إصابة		
مزمنة	حادة	متوسط وزن جسم الحيوانات
80.1	69.5	قبل بدء العلاج (غرام)
91.0	85.4	بعد انتهاء العلاج (غرام)
10.9	15.9	الزيادة في الوزن (غرام)

3-2- نتائج تأثير الأوزون على التعداد الكلي والتفصيلي لخلايا الدم البيضاء:

تمت مقارنة أعداد خلايا الدم البيضاء الإجمالي والتفصيلي بين المجموعات المختلفة وتم إدراج النتائج كما هو موضح بالجدول رقم (2) حيث وجد ارتفاع للعدد الكلي للخلايا البيضاء WBC خلال الإصابة الحادة بمتوسط (7.82) وبمتوسط (9.85) في الإصابة المزمنة وهذا الارتفاع في أعداد الخلايا البيضاء يعود لحدوث التهابات في جسم العائل.

أما بالنسبة لأنواع خلايا الدم البيضاء وجد عند كل من الإصابة الحادة والمزمنة ارتفاع كبير في أعداد كلاً من الخلايا البيضاء المعتدلة NEU وحيدة النواة MON والأساسية BAS وهذا يتوافق مع دراسة أجريت في اليابان [16] ويعود ذلك إلى تحريض المناعة الفطرية في مرض التصلب المتعدد، كما أن الكوبريزون يعمل على تنشيط الخلايا المناعية وتنشيط المناعة الفطرية [17] وهذا ما يفسر توافق هذه النتيجة في كل من مرضى التصلب ونموذج الكوبريزون.

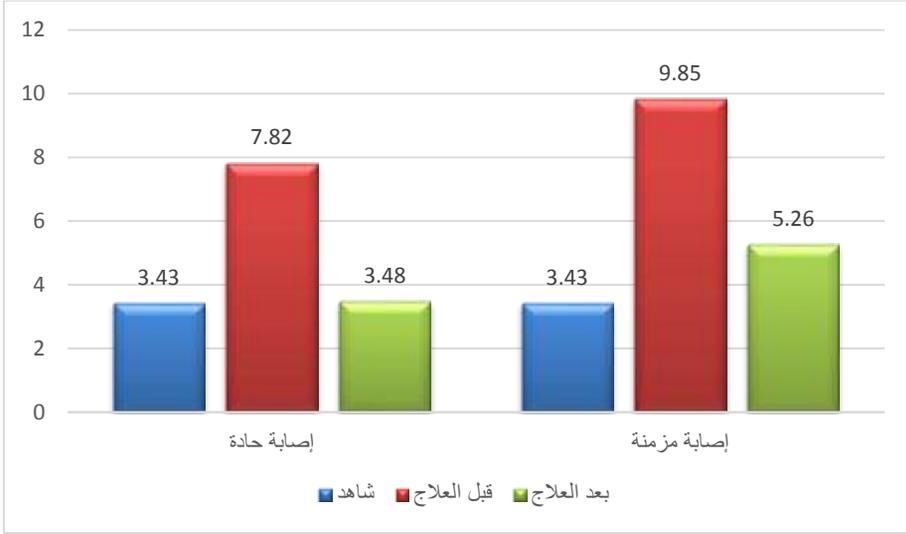
كما وجد ارتفاع بسيط في تعداد للخلايا البيضاء اللمفاوية مما لوحظ ارتفاع نسبة العدلات على اللمفاويات حيث توافقت هذه النتيجة مع [18].

بعد المعالجة بالأوزون لوحظ انخفاض في تعداد الخلايا البيضاء الكلي والتفصيلي وذلك يدل على دوره كمضاد التهاب وتأثيره على المناعة الفطرية وعمله

كمضاد التهاب وهذا ما أكدته بعض الأبحاث [17,19] من خلال التغيرات التي يحدثها الأوزون في تنشيط السيتوكينات المضادة للالتهابات وتنشيط الخلايا الليمفاوية التائية التنظيمية، حيث يعمل على كل من المناعة الفطرية والمكتسبة. حيث أن قمع الجهاز المناعي الفطري في مرض التصلب العصبي المتعدد قد يكون خياراً علاجياً محتملاً

جدول (2) يوضح التعداد الكلي والتفصيلي لخلايا الدم البيضاء في مجموعات التجربة

إصابة مزمنة معالج	إصابة مزمنة	إصابة حادة معالج	إصابة حادة	الشاهد	الاختبارات الدموية
5.26	9.85	3.48	7.82	3.43	تعداد المجموع العام للخلايا البيضاء WBC $10^3/\text{ul}$
2.25	6.36	0.92	4.62	0.70	تعداد الخلايا البيضاء المعتدلة NEU $10^3/\text{ul}$
2.73	3.02	2.37	2.82	2.44	تعداد الخلايا البيضاء الليمفاوية LYM $10^3/\text{ul}$
0.25	0.33	0.19	0.27	0.17	تعداد الخلايا البيضاء الأحادية MON $10^3/\text{ul}$
0.00	0.04	0.00	0.02	0.02	تعداد الخلايا البيضاء الحامضية EOS $10^3/\text{ul}$
0.03	0.1	0.00	0.09	0.07	تعداد الخلايا البيضاء الأساسية BAS $10^3/\text{ul}$



مخطط (1) يوضح العدد الكلي لخلايا الدم البيضاء في حيوانات مجموعات التجربة

3-3- الأعراض السريرية عند حيوانات الهامستر المعالجة بالأوزون:

أظهرت الحيوانات المعالجة بالأوزون غياب الأضرار البصرية والتهابية التي تصيب العين حيث أبدت الحيوانات مظهراً طبيعياً للعين بالمقارنة مع مجموعة الإصابة غير المعالجة التي أظهرت مجموعة من الأعراض (وذمة التهابية خلف كرة العين، التهاب الأنسجة المحيطة بالعين، مشاكل في العضلات المحركة لكرة العين متمثلة في جحوظ العينين) الشكل رقم (1).



الشكل رقم (1) يوضح حالة العين قبل العلاج وبعده

كما لوحظ على الحيوانات المعالجة تحسن في المقدرة الحركية من خلال حركة الحيوانات داخل الاقفاص والمقدرة على سحب الأطراف على سطح مائل في

كلا مجموعتي العلاج للإصابة الحادة والمزمنة مما يشير إلى دور الأوزون في تأخير العجز الحركي الذي يحدثه الكوبريزون والمحاكية لأعراض التصلب المتعدد. حيث أكدت نتائجنا على زيادة متوسط زمن تواتر السقوط في تجربة الشريط الأفقي ولم يتم تسجيل أي حالة نفوق في مجموعة الإصابة المزمنة المعالجة. وهذا ما توافق مع دراسة [20] حيث يعد الأوزون علاجاً صالحاً للتغيرات الفيزيولوجية المرضية والأعراض في مرض التصلب المتعدد حيث يمكن أن يحدث تحسناً كبيراً في جودة ومتوسط العمر المتوقع ويحسن النتائج السريرية.

4- الاستنتاجات:

- تشير هذه النتائج إلى تأثيرات الأوزون المضادة للالتهاب.
- أثبت الأوزون فعاليته في خفض مستويات المؤشرات الالتهابية العامة وتراكم الإعاقات السريرية المستحدثة بالكوبريزون عند حيوانات الهامستر.
- كانت هذه النتائج محفزة لتطبيق العلاج بالأوزون في الاضطرابات العصبية المناعية الذاتية كالتصلب المتعدد.

5- المقترحات والتوصيات:

- إجراء دراسة نسيجية تظهر التغيرات الحاصلة على غمد النخاعين في سوية الجهاز العصبي المركزي.
- دراسة مؤشرات التهابية أكثر نوعية مشاركة في المسار الالتهابي لمرض التصلب المتعدد.

المراجع

1. COMPSTON A AND COLES A., 2008- **Multiple sclerosis**. *Lancet* (London, England), **372(9648)**, 1502–1517.
2. FILIPPI M, BAR-OR A, PIEHL F, PREZIOSA P, SOLARI A, VUKUSIC S AND ROCCA M A., 2018- **Multiple sclerosis**. *Nat. Rev. Dis. Primers* **4(1)**, 43. LUBLIN, F. D., REINGOLD, S. C., COHEN, J. A., CUTTER, G. R., SØRENSEN, P. S., THOMPSON, A. J., ... & POLMAN, C. H. (2014). DEFINING THE CLINICAL COURSE OF MULTIPLE SCLEROSIS: THE 2013 REVISIONS. *NEUROLOGY*, *83(3)*, 278-286.
3. BEN- ZACHARIA, A. B. (2011). **Therapeutics for multiple sclerosis symptoms**. *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine*, **78(2)**, 176-191.
4. HOLMØY T., LØKEN-AMSRUD, K. I., BAKKE, S. J., BEISKE, A. G., BJERVE, K. S., HOVDAL, H., LILLEÅS, F., MIDGARD, R., PEDERSEN, T., SALTYTE BENTH, J., TORKILDSEN, O., WERGELAND, S., MYHR, K. M., MICHELSEN, A. E., AUKRUST, P., & UELAND, T. 2013- **Inflammation markers in multiple sclerosis: CXCL16 reflects and may also predict disease activity**. *PLOS ONE*, **8(9)**, E75021.
5. Aksungar, F. B., Topkaya, A. E., Yildiz, Z., Sahin, S., & Turk, U. (2008). **Coagulation status and biochemical and inflammatory markers in multiple sclerosis**. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, **15(4)**, 393–397.
6. TORKILDSEN Ø, BRUNBORG L A, MYHR K M AND BØ L. (2008) .**The cuprizone model for demyelination**. *Acta neurologica scandinavica*, **117**, 72-76.
7. ZAHID, M., BUSMAIL, A., PENUMETCHA, S. S., AHLUWALIA, S., IRFAN, R., KHAN, S. A., ROHIT REDDY, S., VASQUEZ LOPEZ, M. E., & MOHAMMED, L. (2021). **Tumor Necrosis Factor Alpha Blockade and Multiple Sclerosis: Exploring New Avenues**. *Cureus*, **13(10)**, E18847.
8. CENCI, A., MACCHIA, I., LA SORSA, V., SBARIGIA, C., DI DONNA, V., & PIETRAFORTE, D. (2022). **Mechanisms of Action of Ozone Therapy in Emerging Viral Diseases: Immunomodulatory Effects and Therapeutic Advantages With Reference to SARS-CoV-2**. *Frontiers in microbiology*, **13**, 871645.

9. MANDHARE, M. N., JAGDALE, D. M., GAIKWAD, P. L., GANDHI, P. S., & KADAM, V. J. (2012). **Miracle of ozone therapy as an alternative medicine.** *Int J Pharm Chem Biol Sci*, **2(1)**, 63-71.
10. BOCCI, VELIO & ZANARDI, IACOPO & TRAVAGLI, VALTER. (2011). **Has oxygen-ozonotherapy a future in medicine.** *Journal of Experimental and Integrative Medicine*. **1**, 5.
11. Sagai, M., & Bocci, V. (2011). **Mechanisms of Action Involved in Ozone Therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress?** *Medical gas research*, **1**, 29.
12. SALEM, N. A., ASSAF, N., ISMAIL, M. F., KHADRAWY, Y. A., & SAMY, M. (2016). **Ozone Therapy in Ethidium Bromide-Induced Demyelination in Rats: Possible Protective Effect.** *Cellular and molecular neurobiology*, **36(6)**, 943–954.
13. LUBRICH C, GIESLER P AND KIPP M. (2022). **Motor Behavioral Deficits in the Cuprizone Model: Validity of the Rotarod Test Paradigm.** *International Journal of Molecular Sciences*, **23(19)**, 11342.
14. LEOPOLD, P., SCHMITZ, C., & KIPP, M. (2019). **Animal Weight Is an Important Variable for Reliable Cuprizone-Induced Demyelination.** *JOURNAL OF MOLECULAR NEUROSCIENCE : MN*, **68(4)**, 522–528.
15. RISTOW, M. (2014). **Unraveling the truth about antioxidants: mitohormesis explains ROS-induced health benefits.** *NAT. MED.* **20**, 709–711.
16. AKAISHI, T., MISU, T., FUJIHARA, K., NAKAYA, N., NAKAMURA, T., KOGURE, M., HATANAKA, R., ITABASHI, F., KANNO, I., TAKAHASHI, T., KURODA, H., FUJIMORI, J., TAKAI, Y., NISHIYAMA, S., KANEKO, K., ISHII, T., AOKI, M., NAKASHIMA, I., & HOZAWA, A. (2021). **White blood cell count profiles in multiple sclerosis during attacks before the initiation of acute and chronic treatments.** *SCIENTIFIC REPORTS*, **11(1)**, 22357.
17. ZHAN J, MANN T, JOOST S, BEHRANGI N, FRANK M AND KIPP M., 2020 - **The cuprizone model: dos and do nots.** *Cells*, **9(4)**, 843.
18. CENCI, A., MACCHIA, I., LA SORSA, V., SBARIGIA, C., DI DONNA, V., & PIETRAFORTE, D. (2022). **Mechanisms of Action of Ozone Therapy in Emerging Viral Diseases: Immunomodulatory Effects and Therapeutic Advantages With Reference to SARS-CoV-2.** *Frontiers in microbiology*, **13**, 871645.

19. WEI, A., FENG, H., JIA, X. M., TANG, H., LIAO, Y. Y., & LI, B. R. (2018). **Ozone therapy ameliorates inflammation and endometrial injury in rats with pelvic inflammatory disease.** *Biomedicine & pharmacotherapy*, **107**, 1418–1425.
20. SIMONETTI V., LIBONI W., MOLINARI F. (2014). **Why Ozone Therapy in Multiple Sclerosis?.** *Revista Española de Ozonoterapia*, **4(1)**, 51-68.