● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ نوزدهم، شمارهٔ ۶، ص ۵۳۰-۵۲۰، ۱۳۹۱

مقالهٔ پژوهشی

بررسی اثرات سرم بیماران مولتیپل اسکلروزیس و اینترفرون بتا ۱– ب بر آپوپتوز و تولید نیتریک اکساید سلول‌های اندوتلیال

شقایق حق‌جوی جوانمرد*[۲،۱]، نسیم داناَ[۳]، محمد سعادت‌نیا[۴]، امیر هادی مغزی[۵]، ویدا همایونی[۶]، مسعود اعتمادی‌فر[۴]، علیرضا میناگر[۷]، هاجر ناجی اصفهانی[۳]

خلاصه

مقدمه: مولتیپل اسکلروزیس (Multiple Sclerosis یا MS) از دسته بیماری‌های خود ایمن مزمن سیستم عصبی مرکزی با اتیولوژی ناشناخته است. در این مطالعه آپوپتوز و تولید نیتریک اکساید سلول‌های اندوتلیال تیمار شده با سرم بیماران مبتلا به MS و پاسخ به درمان با IFN beta-1b (Interferon beta-1b) مورد بررسی قرار گرفت.

روش: سلول‌های اندوتلیال بند ناف انسان با نمونه سرم بیماران مبتلا به MS در فاز هـای عودکننـده و بهبودیابنـده و افراد سالم تیمار شدند. میزان نیتریک اکساید تولید شده در سـوپرناتانت محـیط کـشت بـه روش گـریس و میـزان آپوپتـوز سـلول‌هـای انـدوتلیال را بـه کمـک فلوسـایتومتری بـا رنـگ‌آمیـزی انکـسین V و PI (Annexin V and Propidium iodide) تعیین شدند. تأثیر اینترفرون بتا ۱- ب بر آپوپتوز و میزان تولید نیتریک اکساید توسط سلول‌های اندوتلیال در سه دوز مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در مقایسه با افراد سالم، تنها میزان آپوپتوز سلول‌های اندوتلیال تیمار شده با سرم بیماران در فاز عودکننده افزایش یافت، P<۰/۰۰۱، درحالی‌که بین آپوپتوز سلول‌های اندوتلیال تیمار شده با سرم بیماران در فاز بهبود و شاهد سالم تفاوت معنی‌داری وجود نداشت،آپوپتوز سلول‌های اندوتلیال تیمار شده با سرم بیماران گروه عود با دوز ۱۰ واحد در میلی‌لیتر IFN-beta-1b کاهش معنی‌دار یافت، P<۰/۰۵ . همین دوز منجر به افزایش معنی‌دار تولید نیتریک اکساید نیز شد P<۰/۰۵.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر پیشنهادکننده این احتمال است که آسیب و آپوپتوز سلول‌های اندوتلیال مکانیسم مؤثری در اتیولوژی MS است و پیشگیری از آن با تیمار IFN beta-1b، مکانیسم احتمالی اثر درمانی IFN beta-1b در درمان MS را تبیین می‌کند.

واژه‌های کلیدی: مولتیپل اسکلروزیس، اینترفرون بتا۱–ب،آپوپتوز سلول‌های آندوتلیال، نیتریک اکساید

۱- دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ۲- مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ۳- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ۴- دانشیار، گروه داخلی اعصاب، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ۵- دانشجوی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ۶- دانشجوی دکتری ایمونولوژی، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ۷- استاد، گروه اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی ایالت لوئیزیانا، آمریکا

* نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک: sh_haghjoo@med.mui.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۶/۲۷ دریافت مقاله اصلاح شده : ۱۳۹۱/۲/۲۱ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۴/۲۸

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

مولتیپل اسکلروزیس (Multiple Sclerosis یا MS) بیماری مزمن، التهابی و خود ایمنی سیستم عصبی مرکزی است که با تخریب میلین در مغز و نخاع مشخص می‌شود و به طور معمول بین سنین ۲۰ تا ۴۰ سال بروز می‌کند (۵-۱).

علت بروز بیماری هنوز به درستی شناخته نشده است و در مورد آن نظرات مختلفی مطرح است. مطالعات نشان داده‌اند که عوامل محیطی، ایمونولوژیک و ژنتیکی نقش مهمی در بروز MS دارند (۶).

بیماری MS دارای چهار الگوی مشخص است که عبارتند از: عودکننده-بهبودیابنده، پیش‌رونده اولیه، پیش‌رونده ثانویه، پیش‌رونده-عودکننده. اکثر بیماران از نوع عودکننده-بهبودیابنده هستند (۸،۷). عود MS منعکس کننده اپیزودهای التهابی است که در صورتی که منتهی به گلیوز و تخریب نورونی شود می‌تواند سبب ایجاد ناتوانی‌های پیش‌رونده بشود (۹).

با وجود این که وقایع اولیه در پاتوفیزیولوژی MS ناشناخته باقی مانده‌اند، اما این طور در نظر گرفته شده است که برهم‌کنش بین عوامل محیطی و ژنتیکی نقش مهمی در پاتوفیزیولوژی MS دارد (۹-۷).

مبنای مولکولی عود و بهبود MS (relapses and remissions) در نوع عودکننده-بهبودیابنده هنوز مشخص نیست. این باور وجود دارد که در پاتوژنز MS هر دو سیستم ایمنی و پاسخ سلول‌های اندوتلیال درگیر هستند (۱۰، ۹). یکی از چندین مدل پیشنهادی برای پاتوفیزیولوژی MS وجود منشأ عروقی در شروع بیماری است (۱۰). این تئوری پیشنهاد می‌کند که آسیب سد خونی-مغزی (Blood brain barrier: BBB) ثانویه به آسیب سلول‌های اندوتلیال مغز به عنوان یک رویداد اولیه بحرانی ایجاد می‌شود و به سلول‌های ایمنی اجازه مهاجرت از اندوتلیال به سیستم عصبی مرکزی را می‌دهد. سپس آسیب‌های دمیلینه‌کننده ناشی از واکنش های خود ایمنی در اطراف مویرگ‌ها شکل می‌گیرند (۱۲، ۱۱).

یکپارچگی BBB برای هموستاز و عملکرد طبیعی سیستم عصبی مرکزی ضروری است. مطالعات In vitro مشخص کرده‌اند که بسیاری از محرک‌ها می‌توانند در سلول‌های اندوتلیال، آپوپتوز را القا کنند.

مطالعات قبلی نشان داده‌اند که آپوپتوز سلول‌های اندوتلیال مغز یکی از اجزای مهم و اساسی آسیب عروق سیستم عصبی مرکزی است که تواند منجر به نقصان سد، نفوذ سلول ایمنی به این سیستم، التهاب و ایجاد لخته شود (۱۲، ۱۱). سلول‌های اندوتلیال اولین لایه‌ای هستند که سلول های ایمنی باید برای ورود به بافت عصبی از آن‌ها یا اتصالات بین آن‌ها عبور کنند. نقش مستقیم سلول‌های اندوتلیال در پاتوفیزیولوژی MS تاکنون بررسی نشده است، هر چند شواهدی وجود دارد که در مراحل اولیه MS، بر هم‌کنش لنفوسیت‌های +DC4 و +CD8 و سیتوکین‌ها با سلول‌های اندوتلیال نقش دارد (۱۴، ۱۳، ۱). وجود ضایعات پاتولوژیک MS در نواحی اطراف شکل‌گیری رگی، مدرک غیر مستقیم دیگری بر درگیری عروق و شکستن BBB در روند این بیماری است (۱۵).

گرچه هنوز درمان قطعی برای بیماری MS پیدا نشده است اما روش های متعددی برای کاهش سرعت پیشرفت بیماری و همین طور فروکش سریع تر هر حمله و کاستن از ناتوانی‌ها و علایم آزاردهنده وجود دارد. تجویز اینترفرون بتا از جمله درمان هایی است که سرعت پیشرفت بیماری را کم می‌کند (۱۶).

در این مطالعه، نقش آپوپتوز سلول اندوتلیال در پاتوفیزیولوژی MS بررسی شد. اگر چه آپوپتوز سلول‌های اندوتلیال در بسیاری از اختلالات التهابی و وابسته به سیستم ایمنی مشاهده شده است این اولین مطالعه‌ای است که آپوپتوز سلول‌های اندوتلیال را به عنوان پایه‌ای از پاتوژنز

Archive of SID

www.SID.ir

MS و پاسخ به درمان با IFN beta-1b (Interferon beta-1b) مورد بررسی قرار داده است.

روش بررسی

افراد مورد مطالعه

در این تحقیق افرادی که به تازگی (کمتر از ۳ ماه) بر اساس شاخص مک دونالد مبتلا به MS نوع عود کننده- بهبودیابنده تشخیص داده شده بودند، وارد مطالعه شدند و به دو گروه تقسیم شدند. در گروه اول بیماران دچار علایم فعال بالینی بیماری و حداقل یک آسیب در MRI مغز با گادولینیوم و در گروه دوم بیمارانی که در فاز بهبود بیماری بودند و هیچ‌گونه سیگنال افزایش یافته‌ای در MRI مغز نداشتند، قرار گرفتند.

۱۰ داوطلب سالم که از نظر سن و جنس با دو گروه دیگر هماهنگ بودند و سابقه هیچ گونه بیماری یا علایم مغزی نداشتند، به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شدند.

از همه افراد مورد مطالعه نمونه خون سیاهرگی در حالت ناشتا گرفته شد و بدون هیچ افزودنی به لوله های سرمی ۱۰ میلی‌لیتری استریل اضافه شد. بعد از سانتریفوژ، سرم جدا شد و در تیمار سلول‌های اندوتلیال به کار گرفته شد.

روش‌های آزمایشگاهی

۱-کشت سلول

سلول های اندوتلیال بند ناف انسان (HUVECs) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد و در محیط کشت DMEM که با فاکتور رشد سلول‌های اندوتلیال، جنتامایسین و آمفوتریسین B و ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FCS) تکمیل شده بود، برای بررسی آپوپتوز سلول‌ها در پلیت‌های ۶ خانه کشت داده شدند.

۲۴ ساعت قبل از فلوسایتومتری، محیط کشت کامل شامل سرم جنین گاوی از پلیت خارج شد. سلول ها یک بار با محیط کشت پایه اندوتلیال (بدون FCS و دیگر افزودنی ها) و یک بار با PBS استریل برای ۲ دقیقه شستشو داده شدند. سپس به محیط کشت ۱۰ درصد از نمونه سرم افراد گروه شاهد و یا یکی از دو گروه مبتلا به بیماری و غلظت مشخصی از IFN beta-1b (Interferon beta-1b) (Betaseron) اضافه شده و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گشت. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون سلول‌ها به وسیله فلوسایتومتری بررسی شدند.

سلول‌ها در گروه‌های زیر تیمار شدند:

(۱) سلول‌های اندوتلیال تیمار شده با سرم افراد سالم

(۲) سلول های اندوتلیال تیمار شده با سرم بیماران مبتلا به MS در فاز عودکننده

(۳) سلول های اندوتلیال تیمار شده با سرم بیماران مبتلا به MS در فاز بهبود وضعیت بالینی

(۴) سلول های اندوتلیال تیمار شده با سرم بیماران مبتلا به MS در فاز عودکننده و IFN-beta-1b (با غلظت های ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ واحد در میلی‌لیتر)

۲- بررسی آپوپتوز

برای انجام فلوسایتومتری برای هر نمونه تعداد ۱۰۵ سلول پس از یک بار شستشو با PBS با استفاده از کیت بررسی آپوپتوز (R&D systems,USA) و annexin–PI (Annexin V and Propidium iodide) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده رنگ آمیزی شد. برای این کار $10^5/200$ میکرولیتر از سلول‌ها با ۱ میکرولیتر annexin V-fluorescein isothiocyanate و ۰/۵ میکرو لیتر propidium iodide (با غلظت ۱۰ میلی گرم در میلی‌لیتر) در بایندینگ بافر (۱۰ میکرومول HEPES، pH = ۷/۴، ۱۵۰ میلی‌مول NaCl، ۱/۸ میلی‌مول $CaCl_2$، ۵ میلی‌مول KCl و ۱ میلی‌مول $MgCl_2$) به مدت نیم ساعت انکوبه شدند و پس از شستشو با PBS با دستگاه فلوسایتومتر (FACScan, Becton–Dickinson) آنالیز شدند.

Archive of SID
www.SID.ir

سلول‌های آپوپتوز شده به عنوان سلول‌های annexin-V+/PI– تعیین شدند و داده‌ها به وسیله نرم‌افزار CellQuest آنالیز شدند (شکل ۱).

۳- اندازه‌گیری نیتریک اکساید (Nitric Oxide یا NO):

نیتریت و نیترات، متابولیت های مهم NO موجود در کشت سوپرناتانت با استفاده از Griess reaction (Parameter TM, total NO Assay kit, R&D Systems, USA) اندازه‌گیری شدند. به‌طور خلاصه در این آزمایش در ابتدا ۵۰ میکرولیتر از نمونه‌ها به چاهک‌های ۹۶ خانه‌ای (96-well enzymatic assay plate) منتقل شدند. سپس ۵۰ میکرولیتر از NADH و Nitrate Reductase رقیق شده به چاهک‌ها اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه و در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. در انتهای این مرحله کلیه نیترات‌ها در نمونه ها به نیتریت تبدیل می‌شوند. سپس ۵۰ میکرولیتر از محلول‌های سولفانیل آمید و NED (N-(1-naphthyl) Ethylenediamine) به چاهک‌ها اضافه شد و پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای محیط، با دستگاه پلیت‌خوان ELISA و اعمال منحنی استاندارد میزان کل NO در سوپرناتانت محیط کشت هر نمونه اندازه‌گیری شد.

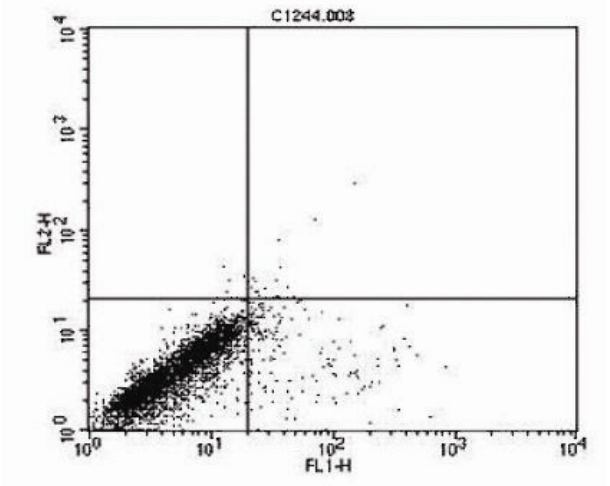
٤- تحلیل آماری

تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. برای تجزیه و تحلیل آماری نمونه‌ها از آزمون‌های Kruskal-Wallis و Mann-Whitney استفاده شده و سطح معناداری P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

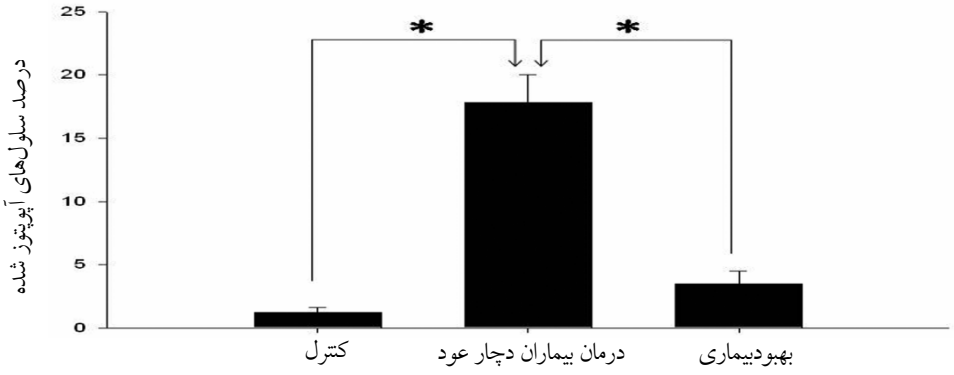
۱۰ نفر از بیماران مبتلا به MS در طی فاز عود (میانگین سنی ۲/۵ ± ۳۴/۱ سال و نسبت زن به مرد: ۷/۳) و ۱۰ بیمار در فاز بهبود (میانگین سنی ۲/۹ ± ۳۳/۴ سال و نسبت زن به مرد: ۷/۳) و ۱۰ نفر داوطلب سالم به عنوان شاهد در این مطالعه شرکت داشتند. سلول‌های HUVEC تیمارشده با سرم بیماران در فاز عود، آپوپتوز بسیار قوی‌تری نسبت به گروه‌های دیگر از جمله سلول‌های تیمار شده با سرم بیماران در فاز بهبود و گروه سالم داشت، P<۰/۰۰۱ (شکل ۲). تفاوت معنی‌داری در میزان آپوپتوز سلول‌های اندوتلیال بند ناف تیمار شده با سرم بیماران با MS در فاز بهبود وضعیت بالینی و سرم افراد داوطلب سالم وجود نداشت، P<۰/۰۵ . افزودن اینترفرون بتا فقط در زمانی که از اینترفرون با دوز ۱۰ واحد در میلی‌لیتر استفاده شده بود و نه در دوزهای بالاتر، القای آپوپتوز توسط سرم بیماران در فاز عود بیماری را مهار کرد (شکل ۳).

میزان غلظت نیتریت به طور معنی‌داری نشان‌دهنده افزایش متابولیت‌های محلول نیتریک اکساید در محیط کشت سلول‌های اندوتلیال تیمار شده با IFN beta-1b بود، P<۰/۰۵ ، در حالی‌که تفاوت معنی‌داری بین دیگر دوزهای اینترفرون با سرم بیماران وجود نداشت (شکل ۴).

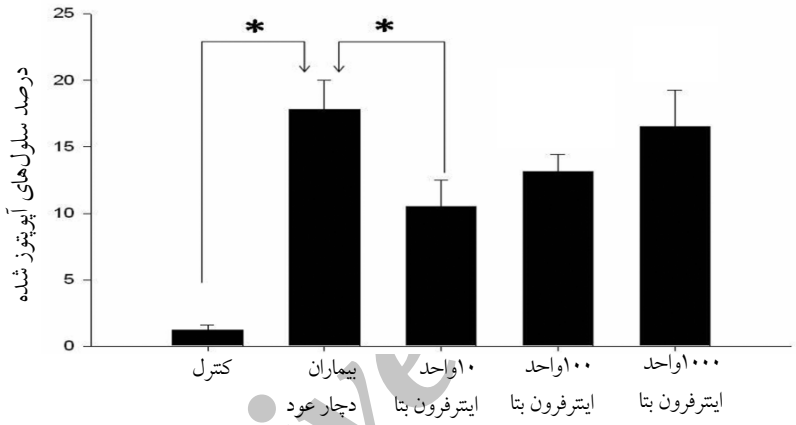


شکل ۱. *سنجش آپوپتوز به وسیله انجام فلوسایتومتری با مارکرهای Annexin V/PI*

www.SID.ir



شکل ۲. *سرعت آپوپتوز HUVECs بعد از این که برای ۲٤ ساعت در معرض محیط کشت حاوی ۱۰ درصد از سرم بیماران مبتلا به MS یا گروه شاهد قرار گرفتند. داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده‌اند. *: P<۰/۰۰۱*



شکل ۳. *میزان مهار آپوپتوز القا شده توسط سرم بیماران مبتلا به MS دچار عود، افراد شاهد و MS دچار عود همراه با IFN beta-1b (با غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ واحد در میلی‌لیتر). *: P<۰/۰۵*

شکل ٤. *تأثیر ایترفرون بتا بر آپوپتوز سلول‌های اندوتلیال تیمار شده با سرم بیماران مبتلا به MS (درمان نشده در فاز عودکننده) و IFN beta-1b (با غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ واحد در میلی‌لیتر) و نمونه افراد سالم. غلظت نیتیرت در محیط کشت بعد از ۲٤ ساعت اندازه‌گیری شد. *: P<۰/۰۵*

www.SID.ir

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که میزان آپوپتوز سلول‌های اندوتلیال انسان به طور معنی‌داری به دنبال انکوباسیون این سلول‌ها با سرم بیماران مبتلا به MS در فاز عود (و نه بیماران در مرحله بهبودی) در مقایسه با افراد سالم افزایش یافته است. یک یافته مهم این مطالعه این است که اثرات در غیاب سلول های ایمنی مشاهده شده‌اند. این یافته پیشنهاد می‌کند که عوامل پایدار ترشح شده در گردش خون در طی MS می‌توانند به طور مستقل از اثرات میانجیگری شده با سلول‌های ایمنی، بر شبکه عروقی مغز اثر بگذارند. در این مطالعه اثرات پیش-آپوپتوزی سرم بیماران مبتلا به MS در حالت عود به طور معنی‌داری به وسیله انکوباسیون همراه با IFN beta-1b به میزان ۱۰ واحد در میلی‌لیتر و نه در دوزهای بالاتر کاهش یافت. اثر محافظت‌کنندگی IFN beta-1b با افزایش تولید نیتریک اکساید در غلظت‌های کم IFN beta-1b همبسته بود.

شکستن BBB و اجازه نفوذ لکوسیت‌های فعال شده به داخل سیستم عصبی مرکزی از اولین وقایع در سیستم عصبی مرکزی در بیماری MS است. این رخداد نتیجه برهم‌کنش‌های التهابی بین سلول‌های ایمنی با سلول‌های اندوتلیال عروق مغزی است که با آستروسیت‌ها، نورون‌ها و اولیگودندروسیت‌ها همراه هستند (۱۷،۱۶). اثرات مستقیم سیتوکین‌ها و کموکاین‌ها بر به هم خوردن اتصالات اندوتلیال و به همان نسبت، آسیب میانجیگری‌شده توسط لوکوسیت‌های وابسته به سیتوکین‌ها و کموکاین‌ها از طریق ماتریکس متالوپروتئینازها نشان داده شده است (۱۹، ۱۸). در سیستم عصبی مرکزی، سلول‌های پردازشگر آنتی‌ژن و لنفوسیت‌های T کمک‌کننده نوع ۱ (Th1)، مقادیر زیادی از سیتوکین‌های پیش التهابی، به خصوص اینترفرون گاما، فاکتور نکروز دهنده‌ی توموری نوع آلفا (TNF-alpha) و اینترلوکین ۱-بتا (IL-1-beta) به داخل گردش خون ترشح می‌کنند، که به تنهایی یا با مشارکت یکدیگر برای شکستن BBB از طریق مکانیسم هایی مانند شکستن اتصالات بین سلولی BBB، افزایش مهاجرت لوکوسیت‌ها از اندوتلیال و افزایش بیان MHC کلاس دو (Major histocompatibility complex) عمل می‌کنند (۱۷). آسیب ناشی از اثر مستقیم لوکوسیت‌ها غیر وابسته به سیتوکین‌ها و کموکاین‌ها در بیماران مبتلا به MS پیش از این شرح داده شده است (۲۲-۱۷) .با این وجود مطالعات اندکی هستند که اثر سیتوکین‌ها و کموکاین‌ها بر سلول‌های اندوتلیال را در این بیماران بررسی کرده باشند. در این مطالعه افزایش آپوپتوز سلول‌های اندوتلیال بند ناف انسان به دنبال انکوباسیون این سلول‌ها با سرم بیماران مبتلا به MS مورد بررسی قرار گرفته و نشان داده شد که عوامل موجود در سرم این بیماران برای سلول‌های اندوتلیال پروآپوپتوتیک هستند. نکته قابل توجه در این مطالعه وقوع رویدادها در غیاب لوکوسیت‌ها و عوامل موجود در سرم بیماران بود که می‌تواند آسیب اندوتلیال را مستقل از عملکرد لوکوسیت‌ها پیش ببرد. بنابراین هر چند آسیب بافتی وابسته به لوکوسیت پدیده‌ای است که به خوبی شرح داده شده است، ممکن است عوامل پروآپوپتوتیک موجود در سرم نیز آپوپتوز سلول اندوتلیال را در MS فعال تشدید یا واسطه‌گری کنند. بیش از ۳۰ عامل بالقوه القاکننده آپوپتوز سلول اندوتلیال شامل نوروهورمون‌ها، سیتوکین‌ها، ژن‌ها و پیام‌رسان‌های ثانویه شناسایی شده‌اند. بنابراین شناسایی واسطه های فعال پروآپوتوتیک در MS ممکن است منجر به شناخت راهکارهای تشخیصی و درمانی جدید در این بیماری شود (۲۵-۲۲).

با وجود ناشناخته ماندن مکانیسم‌های اصلی عملکرد، اینترفرون بتا همچنان به عنوان اولین راه برای درمان مبتلایان به MS در نظر گرفته می‌شود. اینترفرون بتا از طریق مهار FLIP (Fas-associated death domain-like interleukin-1beta-converting enzyme inhibitory protein) و پروتئین آنتی‌آپوپتوتیک، موجب افزایش آپوپتوز

Archive of SID

www.SID.ir

سلول‌های T می‌شود. به علاوه نشان داده شده است که اینترفرون بتا می‌تواند نفوذپذیری BBB نسبت به سلول‌های ایمنی و پروتئین‌ها را کاهش دهد. این اثر از طریق مهار تولید MMP توسط سلول های T، به هم ریختن اتصالات داخل اندوتلیالی، ماتریکس ساب‌اندوتلیال، جلوگیری از عبور سلول‌های T فعال شده به سیستم عصبی مرکزی دچار التهاب (۲۸-۲۶)، ترشح مولکول‌های چسبان سلولی عروقی (vascular cell adhesion molecule یا VCAM-1) محلول که با سلول‌های T فعال شده باند می‌شوند و مانع از ورود آن‌ها به داخل سیستم عصبی مرکزی می‌شود، صورت می‌گیرد (۳۲-۲۷).

در مطالعه حاضر شواهدی مبنی بر اثرات مستقیم پایدارکننده IFN beta-1b بر اندوتلیوم به دست آمد. این مسئله نشان می‌دهد که IFN beta-1b ممکن است با کاهش دادن آپوپتوز اندوتلیال، یکپارچگی BBB را حفظ کند. مطالعات قبلی in vivo برخی از خصوصیات آنتی‌آپوپتوتیک اینترفرون بتا را نشان داده‌اند (۳۵-۳۳). اینترفرون بتا قادر است سلول‌های B و T خود ایمن را از طریق کاهش پروتئین‌های آپوپتوتیک، حذف کند. با این وجود اطلاعات in vitro کمی در خصوص اثرات آنتی‌آپوتوتیک اینترفرون بتا وجود دارد. این مطالعه برای نخستین بار نشان داد که IFN beta-1b در in vitro به طور مستقیم میزان آپوپتوز اندوتلیال را تقلیل می‌دهد.

در مطالعه حاضر، اثرات IFN beta-1b در کاهش آپوپتوز محدود و وابسته به دوز نشان داده شد. در مطالعات in vivo قبلی نیز اثرات وابسته به دوز IFN beta-1b نشان داده شده بود (۳۶، ۳۲، ۳۱). نتایج مطالعه حاضر حاکی از آن است که IFN beta-1b به مقدار ۱۰ واحد در میلی‌لیتر در کاهش آپوپتوز بسیار مؤثرتر از دوزهای بالاتر است. عدم تأثیر دوزهای بالاتر ممکن است به دلیل تاکی‌فیلاکسی باشد. تاکی‌فیلاکسی، یک پاسخ بیولوژیک است که با کاهش میزان حساسیت زیستی در رسپتور از طریق چندین مکانیسم، شامل افزایش تغییر و تبدیل رسپتور، کاهش سنتز رسپتور، پروتئولیز و حساسیت‌زدایی رسپتور جهت کاهش پیام‌رسانی مشخص می‌شود (۴۰-۳۷).

در این مطالعه همبستگی مثبت معناداری میان کاهش آپوپتوز و افزایش متابولیت‌های نیتریک‌اکساید مشاهده شد. در مطالعات قبلی نشان داده شده است که نیتریک اکساید قادر به مهار آپوپتوز در تعدادی از انواع سلولی از جمله سلول های اندوتلیال است (۴۴-۴۱). نیتریک اکساید می‌تواند آپوپتوز را از طریق کاهش تنفس میتوکندریایی، مهار منافذ عبوری نفوذپذیر از طریق cGMP/PKG و به وسیله افزایش پتانسیل غشای میتوکندری، مهار کند (۴۵،۴۶).

به طور خلاصه یافته‌های این پژوهش نشان داد که سرم بیماران مبتلا به MS در فاز عود موجب القای آپوپتوز در سلول های اندوتلیال می‌شود. به علاوه یافته های این پژوهش مکانیسم جدیدی از نقش درمانی IFN beta-1b را در پایداری BBB که به وسیله کاهش آپوپتوز اندوتلیال ایجاد می‌شود، پیشنهاد نمود. مطالعات بیشتری برای تعیین مکانیسم‌های اثر نقش محافظتی IFN beta-1b، نیاز است.

نتایج این مطالعه نشان داد که اختلال در یکپارچگی BBB در پی آپوپتوز سلول‌های اندوتلیال، یک مکانیسم بالقوه مؤثر در اتیولوژی MS و جلوگیری از ایجاد آن یک مکانیسم جدید احتمالی از اثرات درمانی IFN beta-1b در درمان MS است.

سپاسگزاری

این طرح در قالب طرح تحقیقاتی شماره ۲۹۰۱۵۳ در مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام گرفته است.

Archive of SID
www.SID.ir

References

1. Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* 2006; 354(9): 942-55.
2. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* 2008; 372(9648): 1502-17.
3. Kurtzke JF. Epidemiologic contributions to multiple sclerosis: an overview. *Neurology* 1980; 30(7 Pt 2): 61-79.
4. Poser CM. The epidemiology of multiple sclerosis: a general overview. *Ann Neurol* 1994; 36(Suppl 2): S180-S193.
5. Etemadifar M, Maghzi AH, Hoseinzadeh A. Comparing side effects of cinnovex with avonex in relapsing remitting multiple sclerosis patients. *J Isfahan Med Sch* 2009; 27(93): 93-100.
6. Miller E. Multiple sclerosis. *Adv Exp Med Biol* 2012; 724: 222-38.
7. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2000; 343(13): 938-52.
8. Hemmer B, Archelos JJ, Hartung HP. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci* 2002; 3(4): 291-301.
9. Korn T. Pathophysiology of multiple sclerosis. *J Neurol* 2008; 522(Suppl 6): 2-6.
10. Minagar A, Jy W, Jimenez JJ, Alexander JS. Multiple sclerosis as a vascular disease. *Neurol Res* 2006; 28(3): 230-5.
11. Ramagopalan SV, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G. Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. *Lancet Neurol* 2010; 9(7): 727-39.
12. Alexander JS, Zivadinov R, Maghzi AH, Ganta VC, Harris MK, Minagar A. Multiple sclerosis and cerebral endothelial dysfunction: Mechanisms. *Pathophysiology* 2011; 18(1): 3-12.
13. Friese MA, Fugger L. Pathogenic CD8(+) T cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2009; 66(2): 132-41.
14. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 683-747.
15. Love S. Demyelinating diseases. *J Clin Pathol* 2006; 59(11): 1151-9.
16. Haghjooy JS, Saadatnia MM, Homayouni V, V, Nikoogoftar MM, Maghzi AH, Etemadifar M, et al. Interferon-beta-1b protects against multiple sclerosis-induced endothelial cells apoptosis. *Front Biosci (Elite Ed)* 2012; 4: 1368-74.
17. McQuaid S, Cunnea P, McMahon J, Fitzgerald U. The effects of blood-brain barrier disruption on glial cell function in multiple sclerosis. *Biochem Soc Trans* 2009; 37(Pt 1): 329-31.
18. Minagar A, Ostanin D, Long AC, Jennings M, Kelley RE, Sasaki M, et al. Serum from patients with multiple sclerosis downregulates occludin and VE-cadherin expression in cultured endothelial cells. *Mult Scler* 2003; 9(3): 235-8.
19. Jimenez J, Jy W, Mauro LM, Horstman LL, Ahn ER, Ahn YS, et al. Elevated endothelial microparticle-monocyte complexes induced by multiple sclerosis plasma and the inhibitory effects of interferon-beta 1b on release of endothelial microparticles, formation and transendothelial migration of monocyte-endothelial microparticle complexes. *Mult Scler* 2005; 11(3): 310-5.
20. Jy W, Minagar A, Jimenez JJ, Sheremata WA, Mauro LM, Horstman LL, et al. Endothelial microparticles (EMP) bind and

Archive of SID

www.SID.ir

activate monocytes: elevated EMP-monocyte conjugates in multiple sclerosis. *Front Biosci* 2004; 9: 3137-44.

21. Minagar A, Jy W, Jimenez JJ, Sheremata WA, Mauro LM, Mao WW, et al. Elevated plasma endothelial microparticles in multiple sclerosis. *Neurology* 2001; 56(10): 1319-24.
22. Sheremata WA, Jy W, Delgado S, Minagar A, McLarty J, Ahn Y. Interferon-beta1a reduces plasma CD31+ endothelial microparticles (CD31+EMP) in multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* 2006; 3: 23.
23. Osborne BA, Schwartz LM. Essential genes that regulate apoptosis. *Trends Cell Biol* 1994; 4(11): 394-9.
24. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88(3): 355-65.
25. Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere JL, Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J* 1995; 9(13): 1277-87.
26. Stuve O, Dooley NP, Uhm JH, Antel JP, Francis GS, Williams G, et al. Interferon beta-1b decreases the migration of T lymphocytes in vitro: effects on matrix metalloproteinase-9. *Ann Neurol* 1996; 40(6): 853-63.
27. Leppert D, Waubant E, Burk MR, Oksenberg JR, Hauser SL. Interferon beta-1b inhibits gelatinase secretion and in vitro migration of human T cells: a possible mechanism for treatment efficacy in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1996; 40(6): 846-52.
28. Stone LA, Frank JA, Albert PS, Bash C, Smith ME, Maloni H, et al. The effect of interferon-beta on blood-brain barrier disruptions demonstrated by contrast-enhanced magnetic resonance imaging in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1995; 37(5): 611-9.
29. Kraus J, Ling AK, Hamm S, Voigt K, Oschmann P, Engelhardt B. Interferon-beta stabilizes barrier characteristics of brain endothelial cells in vitro. *Ann Neurol* 2004; 56(2): 192-205.
30. Graber J, Zhan M, Ford D, Kursch F, Francis G, Bever C, et al. Interferon-beta-1a induces increases in vascular cell adhesion molecule: implications for its mode of action in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2005; 161(1-2): 169-76.
31. Calabresi PA, Tranquill LR, Dambrosia JM, Stone LA, Maloni H, Bash CN, et al. Increases in soluble VCAM-1 correlate with a decrease in MRI lesions in multiple sclerosis treated with interferon beta-1b. *Ann Neurol* 1997; 41(5): 669-74.
32. Clanet M, Radue EW, Kappos L, Hartung HP, Hohlfeld R, Sandberg-Wollheim M, et al. A randomized, double-blind, dose-comparison study of weekly interferon beta-1a in relapsing MS. *Neurology* 2002; 59(10): 1507-17.
33. Yong VW, Chabot S, Stuve O, Williams G. Interferon beta in the treatment of multiple sclerosis: mechanisms of action. *Neurology* 1998; 51(3): 682-9.
34. Noronha A, Toscas A, Jensen MA. Interferon beta decreases T cell activation and interferon gamma production in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1993; 46(1-2): 145-53.
35. Reder AT, Velichko S, Yamaguchi KD, Hamamcioglu K, Ku K, Beekman J, et al. IFN-beta1b induces transient and variable gene expression in relapsing-remitting multiple sclerosis patients independent of neutralizing antibodies or changes in IFN receptor RNA expression. *J Interferon Cytokine Res* 2008; 28(5): 317-31.

Archive of SID

www.SID.ir

36. Clanet M, Kappos L, Hartung HP, Hohlfeld R. Interferon beta-1a in relapsing multiple sclerosis: four-year extension of the European IFNbeta-1a Dose-Comparison Study. *Mult Scler* 2004; 10(2): 139-44.

37. Owczarek CM, Hwang SY, Holland KA, Gulluyan LM, Tavaria M, Weaver B, et al. Cloning and characterization of soluble and transmembrane isoforms of a novel component of the murine type I interferon receptor, IFNAR 2. *J Biol Chem* 1997; 272(38): 23865-70.

38. Kiessling LL, Gordon EJ. Transforming the cell surface through proteolysis. *Chem Biol* 1998; 5(3): R49-R62.

39. Oliver B, Mayorga C ,Fernandez V, Leyva L, Leon A, Luque G, et al. Interferon receptor expression in multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 2007; 183(1-2): 225-31.

40. Gilli F, Valentino P, Caldano M, Granieri L, Capobianco M, Malucchi S, et al. Expression and regulation of IFNalpha/beta receptor in IFNbeta-treated patients with multiple sclerosis. *Neurology* 2008; 71(24): 1940-7.

41. Sandberg-Wollheim M, Bever C, Carter J, Farkkila M, Hurwitz B, Lapierre Y, et al. Comparative tolerance of IFN beta-1a regimens in patients with relapsing multiple sclerosis. The EVIDENCE study. *J Neurol* 2005; 252(1): 8-13.

42. Karussis D, Biermann LD, Bohlega S, Boiko A, Chofflon M, Fazekas F, et al. A recommended treatment algorithm in relapsing multiple sclerosis: report of an international consensus meeting. *Eur J Neurol* 2006; 13(1): 61-71.

43. Dimmeler S, Haendeler J, Nehls M, Zeiher AM. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J Exp Med* 1997; 185(4): 601-7.

44. Kang-Decker N, Cao S, Chatterjee S, Yao J, Egan LJ, Semela D, et al. Nitric oxide promotes endothelial cell survival signaling through S-nitrosylation and activation of dynamin-2. *J Cell Sci* 2007; 120(Pt 3): 492-501.

45. Erusalimsky JD, Moncada S. Nitric oxide and mitochondrial signaling: from physiology to pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27(12): 2524-31.

46. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997; 275(5303): 1132-6.

Archive of SID

www.SID.ir

Effect of the Sera of Patients with Multiple Sclerosis on Apoptosis and Nitric Oxide Production of Endothelial Cells

Haghjooy Javanmard Sh., Ph.D.[1,2*], Dana N., M.Sc.[3], Saadatnia M., M.D.[4], Maghzi A.H.[5], Homayouni V., M.Sc.[6], Etemadifar M., M.D.[4], Minagar A., M.D.[7], Naji Esfahani H., M.Sc.[3]

1. Associate Professor, Physiology Dep., School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2. Physiology Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3. Master of Physiology, Physiology Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan
4. Associate Professor, Department of Neurology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
5. Student of Medicine, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
6. Master of Immunology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
7. Professor, Department of Neurology, Louisiana State University Health Sciences Center, Shreveport, LA, USA

* Corresponding author; Email: sh_haghjoo@med.mui.ac.ir

(Received: 17 Sep. 2011 Accepted: 18 July 2012)

Abstract

Background & Aims: Multiple sclerosis (MS) is one of the chronic autoimmune diseases of the central nervous system with unknown etiology. The present study aimed to investigate the apoptosis and nitric oxide (NO) production of endothelial cells treated with serum of patients with MS and response to interferon beta (IFN-β) therapy.

Methods: Human umbilical vein endothelial cells were treated with sera from patients with active MS (in relapse), MS in remission, or sera from healthy volunteers (each n = 10). Nitric oxide (NO) levels were determined in culture supernatants by Greiss method and endothelial cell apoptosis was assessed by annexin V-propidium iodide staining. Effects of IFN-beta-1b on endothelial cell apoptosis and NO production were tested at increasing doses (10, 100, and 1000 U/ml).

Results: Compared with healthy people, only apoptosis of endothelial cells treated with serum of patients with relapsing phase increased, $P<0.01$; while there was no significant difference between apoptosis of endothelial cells treated with serum of patients in remission phase and healthy controls. Apoptosis of endothelial cells treated with sera of patients in relapse was decreased by IFN-beta-1b at 10 U/ml, $P<0.05$. The same dose also led to a significant increase in nitric oxide production.

Conclusion: The results suggest that endothelial cells injury and apoptosis may play a role in MS etiology and represents a potential therapeutic mechanism of action for IFN-beta-1b in MS therapy.

Keywords: Multiple sclerosis, Interferon beta-1b (IFN-beta-1b), Endothelial cell apoptosis, Nitric oxide

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2012; 19(6): 520-530

Archive of SID

www.SID.ir