

تأثیر سیمواستاتین در درمان بیماری آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی از طریق تعدیل پاسخ ایمنی

قاسم مسیبی: گروه ایمنی شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک: نویسنده رابط
E-mail : gmosayebi@yahoo.com

علی قضاوی: گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک
سعید بابایی: گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک
ابوالحسن سخایی: گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک
کیوان قسامی: گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک
محمد علی پایانی: گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک

دریافت: ۸۸/۷/۳۰، پذیرش: ۸۹/۵/۶

چکیده

زمینه و اهداف: در این مطالعه اثر سیمواستاتین در درمان آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی به عنوان مدل حیوانی مولتیپل اسکلروزیس مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: موشهای نر نژاد C57BL/6 به دو گروه تقسیم شدند. آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی با تجویز زیرجلدی پپتید MOG₃₅₋₅₅ همراه با ادجوانت کامل فروند در هر دو گروه ایجاد شد. درمان با سیمواستاتین (۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم- هر روز به صورت خوراکی) از سه روز قبل از تجویز آنتی ژن تا ۲۵ روز پس از ایجاد بیماری شروع شد. به گروه کنترل بافر فسفات، همانند جدول زمانی گروه درمان شده، داده شد. میزان انفیلتراسیون سلولی به مغز، تکثیر سلولی، میزان IFN- γ و IL-10 تولید شده در کشت سلولهای تک هسته ای طحال و روند تغییرات بیماری مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که شیوع و شدت علائم بیماری، میزان انفیلتراسیون سلولی به مغز و پاسخ تکثیری در موشهای تحت درمان با سیمواستاتین در مقایسه با گروه کنترل به صورت معنی داری کمتر است ($P=0/01$). سطح تولید IFN- γ در موشهای درمان شده با سیمواستاتین با گروه کنترل تفاوت نداشت، اما غلظت IL-10 به طور معنی داری در گروه درمان شده بیشتر از گروه کنترل بود ($P=0/008$).

نتیجه گیری: نتایج مشخص ساخت که درمان با سیمواستاتین با کاهش تکثیر سلولی، کاهش انفیلتراسیون سلولی به مغز و القای پاسخ TH2 (تولید IL-10) باعث کاهش شدت بیماری می‌شود. لذا استفاده از این دارو ممکن است در درمان بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس سودمند باشد.

کلید واژه‌ها: آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی، مولتیپل اسکلروزیس، سیمواستاتین، ارتشاح لکوسیته، سیتوکاین

مقدمه

پاتوژنز بیماری دخالت دارند. استفاده از داروهای که بتواند باعث مهار یا تعدیل پاسخ ایمنی شود، در کاهش علائم بیماری موثر می‌باشند.

سیمواستاتین از دسته داروهایی است که با مهار آنزیم ۳-هیدروکسی-۳-متیل گلووتاریل کوآنزیم A ردوکتاز از بیوسنتز

بیماری آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی (EAE)^۱ مدل حیوانی بیماری مولتیپل اسکلروزیس است (۱). در بیماری مولتیپل اسکلروزیس به دلایل نامشخصی سیستم ایمنی علیه برخی از اجزاء پروتئینی سلولهای عصبی از جمله میلین تحریک شده و منجر به ضایعات بافتی می‌گردد (۲). مکانیسم‌های متعددی در

1. EAE; experimental autoimmune encephalomyelitis

مرحله صفر و ۴۸ ساعت بعد از ایمونیزاسیون به صورت داخل صفاقی تجویز شد. روند بیماری و تغییرات وزن موشها روزانه مورد بررسی قرار گرفت و شدت بیماری از صفر (عدم ابتلا به بیماری)، یک (اختلال در حرکت دم)، دو (فلج شدن دم)، سه (اختلال در راه رفتن)، چهار (فلجی یک پا)، پنج (فلجی هر دو پا)، شش (فلجی کامل دست و پا) تا هفت (مرگ) درجه بندی شد (۱۲، ۱۳).

درمان موشهای مبتلا به EAE با سیموآستاتین

جهت بررسی تاثیر سیموآستاتین بر روند بیماری EAE، از موشهای نر نژاد C57BL/6 (۶-۸ هفته‌ای) استفاده شد. ۱۶ سر موش سه روز قبل از تزریق آنتی ژن به منظور ایجاد بیماری به صورت تصادفی به ۲ گروه (در هر گروه ۸ سر) تقسیم شدند و به صورت زیر تا روز بیست و پنجم پس از ایجاد EAE، تحت درمان قرار گرفتند.

گروه مطالعه: موشهای مبتلا به EAE که روزانه ۱ میلی گرم سیموآستاتین (برحسب کیلوگرم وزن بدن) به صورت خوراکی دریافت کردند (پودر سیموآستاتین در آب مقطر به صورت سوسپانسیون یکنواخت حل گردید و غلظت مناسب دارو بر اساس وزن حیوان در حجم ۱۰۰ میکرولیتر، گواژ شد).

گروه شاهد: موشهای مبتلا به EAE که به همان روش و بدون سیموآستاتین، آب مقطر دریافت کردند.

انتخاب دوز مصرفی بر اساس حداقل دوز مورد استفاده با عوارض جانبی کم و مطالعه قبلی بود (۱۰).

بررسی ارتشاح لکوسیتی به مغز

پس از گذشت بیست و پنج روز از زمان ایجاد EAE، مغز حیوانات خارج و در محلول فرمالین بافر خشی ۱۰ درصد قرار گرفت. پس از ۴۸ ساعت، با برش سائیتال، مغز به دو قسمت تقسیم شد. نیمکره چپ هر موش مجدداً در فیکساتور گذاشته شد. سپس نمونه‌ها در داخل دستگاه Tissue Processor (مدل DS2000/H) قرار داده شده تا پاساژ بافتی صورت گیرد. پس از پاساژ بلوک‌های پارافینی تهیه شد.

نمونه‌های بافتی در جهت طولی، به طوری که محل برش سائیتال به طرف پایین باشد، داخل بلوک قرار گرفتند. با استفاده از میکروتوم (مدل ۴۰۵۵) از نمونه‌ها، برشهای با ضخامت ۵ میکرون تهیه گردید. برشها به صورت تصادفی سیستماتیک انتخاب شدند. برای هر نمونه ۱۲ برش و در هر گروه مجموعاً ۱۰۰ برش تهیه شد. نمونه‌ها با روش هماتوکسیلین-ئوزین رنگ آمیزی شدند و از نظر تعداد محل‌های ارتشاح و شدت ارتشاح لکوسیتی با استفاده از میکروسکوپ (Nikon-Model labphot-2) مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی پاسخ تکثیری و سنجش سایتوکاین

بعد از نخاعی نمودن موشها با رعایت شرایط استریل، طحال آنها برداشته شد. بافتها بطور مجزا در ۵ میلی لیتر محیط کشت RPMI-1640 (Gibco) حاوی ۱۰ درصد FCS (Gibco) با قیچی

کلسترویل جلوگیری می‌کند (۳). این دارو در بیماریهای قلبی-عروقی و بیماریهایی که با سطح کلسترویل بالا همراه است مفید می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهد که در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس به دلیل افزایش لیپید پراکسیداسیون سطح کلسترویل افزایش می‌یابد و مصرف استاتین‌ها در کاهش کلسترویل در این بیماران موثر است (۴). علاوه بر کاهش سطح کلسترویل، گزارشات محدودی نیز مطرح است که استاتین‌ها به عنوان یک ایمونومدولاتور عمل کرده و در درمان مولتیپل اسکلروزیس موثر می‌باشند. بررسی‌های اولیه نشان می‌دهد که سیموآستاتین باعث کاهش ضایعات مغزی و کاهش علائم بیماری در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس می‌شود (۵، ۶).

برخی مطالعات انجام شده نیز بر روی مدل حیوانی این بیماری (آنفالومیلیت خود ایمن تجربی) نیز نشان از تاثیر استاتین‌ها در کاهش شدت بیماری دارد (۷-۹). در مطالعه انجام شده قبلی، نتایج نشان داد که مصرف خوراکی سیموآستاتین به موشهای مبتلا به EAE با افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی سرم، باعث کاهش شدت علائم بیماری می‌شود (۱۰). همچنین گزارشی وجود دارد که نشان می‌دهد سیموآستاتین باعث کاهش ترشح اینترفرون گاما (IFN- γ)^۲ در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس می‌شود (۱۱). با توجه به اینکه در پاتوژنز بیماری مولتیپل اسکلروزیس مکانیسم‌های متعددی از قبیل شکسته شدن سد خونی-مغزی و ارتشاح سلولهای التهابی به مغز، افزایش رادیکالهای آزاد، افزایش ترشح فاکتورهای التهاب و تحریک پاسخهای ایمنی سلولی (TH1) نقش دارند، لازم است اثر سیموآستاتین از جنبه‌های مختلف مورد بررسی قرار گیرد. بر این اساس در این مطالعه اثر سیموآستاتین بر ارتشاح لکوسیتی به مغز، پاسخ تکثیری و پروفایل سیتوکاینی در موشهای مبتلا به EAE مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

جامعه مورد مطالعه: موشهای نر خالص (inbred) نژاد C57BL/6 با سن ۶-۸ هفته، که از مرکز تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی تهیه شدند. این تحقیق با تایید شورای اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی انجام شد و کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات رعایت گردید.

نوع مطالعه: این مطالعه از نوع مداخله‌ای-تجربی است که به صورت موردی/شاهدی انجام شده است.

القا EAE: مقدار ۲۰۰ میکروگرم پپتید MOG35-55 با توالی (M-E-V-G-W-Y-R-S-P-F-S-R-V-V-H-L-Y-R-N-G-K) و درجه خلوص بیشتر از ۹۵٪ (شرکت فارما، روسیه)، در ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سالین و ۱۰۰ میکرولیتر ادجوانت کامل فروند (سیگما)، مخلوط و به صورت زیرجلدی در ناحیه پشت به هر موش C57BL/6 تزریق گردید. مقدار ۴۰۰ نانوگرم سم سیاه سرفه (سیگما) در حجم ۴۰۰-۳۰۰ میکرولیتر بافر فسفات در

روند بیماری در هر گروه و مقایسه روز شروع بیماری و شدت بیماری مشخص گردید که بین روز شروع بیماری و میانگین حداکثر شدت بیماری در بین گروه های درمان شده با گروه درمان نشده تفاوت معنی داری وجود دارد. روز شروع بیماری در موش های مبتلا به EAE درمان نشده ۱۱ روز پس از زمان ایجاد EAE بود در حالی که در موش های تحت درمان با سیمواستاتین ۱۵ روز پس از القا EAE بود. شیوع و میانگین حداکثر شدت بیماری در موش های تحت درمان با سیمواستاتین بطور معنی داری کمتر از موش های مبتلا به EAE درمان نشده بود ($P=0/01$) (جدول-۱).

بررسی میزان ارتشاح لکوسیته و تکثیر سلولی

بررسی برشهای مغزی از نظر میزان ارتشاح لکوسیته نشان داد که میانگین تعداد مکانهای ارتشاح سلولی در موشهای مبتلا به EAE درمان نشده (4 ± 1) پلاک در هر برش) در مقایسه با گروه تحت درمان با سیمواستاتین (2 ± 1) پلاک در هر برش بیشتر می باشد (شکل-۱). همچنین با شمارش تقریبی سلولهای ارتشاح یافته در محل های ارتشاح مشخص گردید که میانگین تعداد سلولها در محل ارتشاح در گروه مبتلا به EAE درمان شده (670 ± 180) سلول در هر برش) در مقایسه با گروه درمان نشده (1000 ± 200) سلول در هر برش) کمتر است ($P=0/01$).

نتایج بررسی تکثیر سلولهای تک هسته ای جدا شده از طحال گروههای مورد مطالعه نشان می دهد که میزان تکثیر در موشهای تحت درمان با سیمواستاتین در مقایسه با گروه درمان نشده کمتر است (نمودار-۲).

اندازه گیری IL-10 و IFN- γ در مایع رویی کشت سلول

میزان تولید IFN- γ و IL-10 در مایع رویی کشت سلولهای تک هسته ای موشهای مبتلا به EAE درمان نشده و درمان شده با سیمواستاتین که در حضور و عدم حضور پپتید MOG35-55 کشت داده شده بودند، با روش الایزا اندازه گیری شد (جدول-۲). نتایج نشان داد که میانگین غلظت IFN- γ در موشهای مبتلا به EAE درمان شده با سیمواستاتین (990 ± 74 پیکوگرم در میلی لیتر) در مقایسه با موشهای درمان نشده (980 ± 42 پیکوگرم در میلی لیتر) تفاوت ندارد. میانگین غلظت IL-10 در موشهای درمان شده با سیمواستاتین در مقایسه با گروه درمان نشده به طور معنی داری بیشتر است ($P=0/008$).

جراحی تیزی کاملاً خرد گردیده و از یک طوری سیمی با منافذی به قطر ۰/۱ میلی متر عبور داده شد تا قطعات بافتی هضم نشده جدا گردد. سوسپانسیون سلولی به آرامی بر روی محیط گرادیان فایکول برده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۶۰۰ g و دمای ۴°C سانتیفریوژ گردید. در این مرحله سلولهای تک هسته ای در روی محیط گرادیان باقی می ماند و سایر سلولها از جمله گلبولهای قرمز رسوب می کنند. سلولهای تک هسته ای، با دقت توسط پیپت پاستور برداشته شد و دو بار با بافر فسفات سالین شستشو و سانتیفریوژ گردید. پلت سلولی در محیط کشت کامل حاوی ۱۰ درصد FCS بصورت سوسپانسیون حاوی 2×10^6 cell/ml در آمد. به منظور سنجش سایتوکاین ها، این سلولها در پلیت های کشت ۲۴ خانه ای در حضور و عدم حضور پپتید MOG35-55 با غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر به مدت ۹۶ ساعت در انکوباتور با ۵ درصد CO_2 کشت داده شد. بعد از ۹۶ ساعت کشت سلولهای تک هسته ای در حضور و عدم حضور آنتی ژن، مایع رویی جهت سنجش سایتوکاینهای IL-10 و IFN- γ جمع آوری شد. جهت سنجش IL-10 و IFN- γ به ترتیب از کیت IL-10 (R&D system; cat No. M1000) و کیت IFN- γ (R&D system; cat No. MIF00) استفاده شد. بر اساس دستور العمل شرکت سازنده کیت غلظت سایتوکاین ها اندازه گیری شد.

همچنین جهت بررسی پاسخ تکثیری، سوسپانسیون سلولی در حجم ۱۰۰ میکرولیتر در پلیت ۹۶ خانه ای و در حضور و عدم حضور پپتید MOG35-55 با غلظت ۲۰ میکروگرم کشت داده شد و بعد از ۷۲ ساعت میزان تکثیر سلولی به روش MTT^۱ (دی متیل تیازول-دی فیل تترازولیم بروماید) اندازه گیری شد.

آنالیز آماری: جهت مقایسه میانگینها از آزمون مان ویتنی-

یو (Mann Whitney-U) استفاده شد. از آزمون طرح اندازه گیریهای مکرر و آزمون فریدمن جهت بررسی تغییرات شدت بیماری در هر گروه در روزهای مختلف استفاده گردید. P کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی دار تلقی گردید. تمامی موارد تجزیه و تحلیل آماری دادهها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS.15 انجام پذیرفت.

یافته ها

روند بیماری با بررسی تغییرات حرکتی حیوان و بر اساس درجه شدت بیماری روزانه ثبت گردید (نمودار-۱). با بررسی

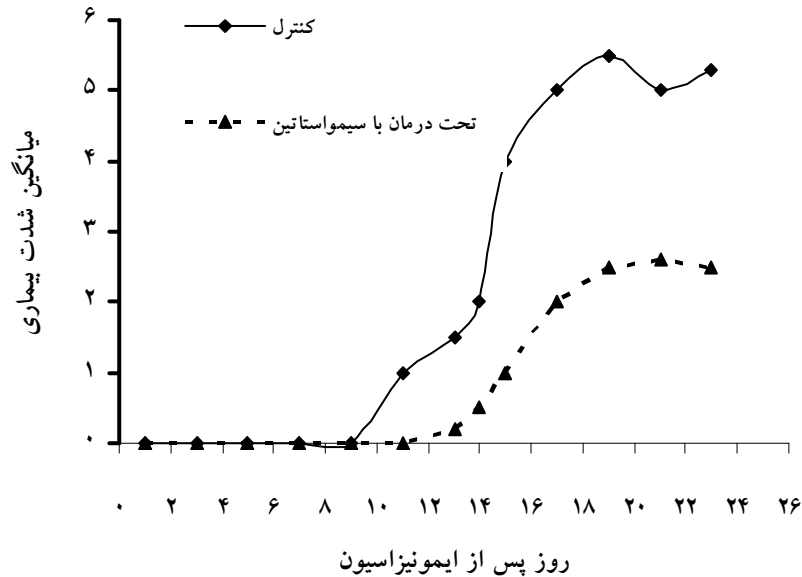
جدول ۱: مقایسه روز شروع، شیوع و حداکثر شدت بیماری در موشهای مبتلا به EAE

گروه های مورد مطالعه	تعداد	میانگین روز شروع بیماری	میانگین حداکثر شدت بیماری (در روز ۱۵)	درصد شیوع بیماری (در روز ۱۵)
گروه کنترل (درمان نشده)	۸	۱۱±۱	۵±۱	۱۰۰
گروه تحت درمان با سیمواستاتین	۸	۱۵±۱	۲/۶±۰/۵	۶۲

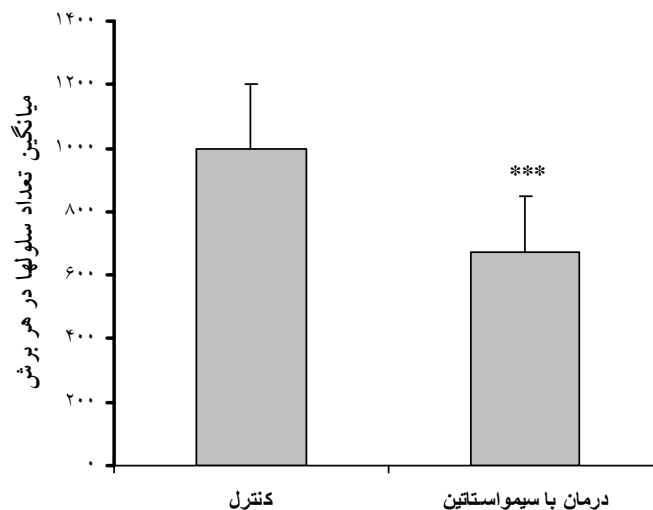
جدول ۲: مقایسه میانگین غلظت IFN- γ و IL-10 در موشهای مبتلا به آنفالومیلیت خود ایمن تجربی درمان نشده و درمان شده با سیمواستاتین

IFN- γ (pg/ml)		IL-10 (pg/ml)		سیتوکاین ها	گروهها
در غیاب MOG35-55	در حضور MOG35-55	در غیاب MOG35-55	در حضور MOG35-55		
۱۲±۴/۶	۹۸۰±۴۵	۲۰±۶	۶۰±۲۵		گروه کنترل
۱۸±۸	۹۹۰±۷۴	۲۳±۶/۷	*۱۶۰±۲۹		گروه درمان شده با سیمواستاتین

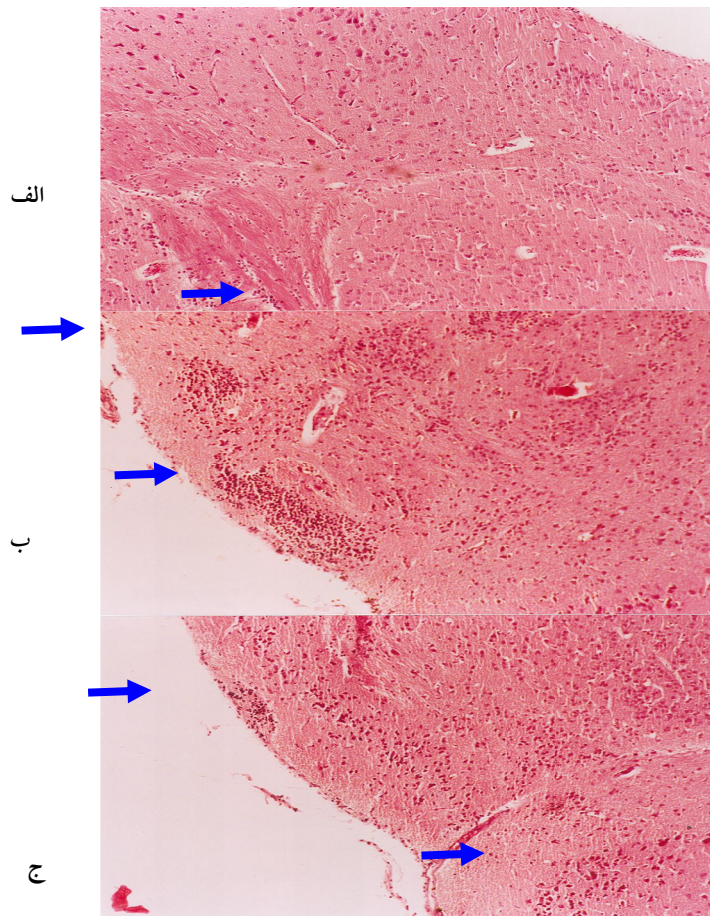
P=۰/۰۰۸:*



نمودار ۱: مقایسه میانگین شدت بیماری در موشهای مبتلا به آنفالومیلیت خود ایمن تجربی درمان نشده (کنترل) و تحت درمان با سیمواستاتین



نمودار ۲: مقایسه تکثیر سلولی در موشهای مبتلا به آنفالومیلیت خود ایمن تجربی درمان نشده (کنترل) و تحت درمان با سیمواستاتین. * اختلاف با P=۰/۰۱ معنی دار است



شکل-۱: مقایسه شدت انفیلتراسیون سلولی در مغز موش نرمال (الف) با موش مبتلا به آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی درمان نشده (ب) و درمان شده با سیمواستاتین (ج)

بحث

مکانیسم تاثیر سیمواستاتین در کاهش ضایعات مغزی مشخص نیست. این احتمال مطرح است که سیمواستاتین به عنوان یک آنتی اکسیدان عمل کرده و با کاهش سطح رادیکال های آزاد سبب کاهش صدمات مغزی شود (۱۶، ۱۷). نتایج مطالعه قبلی ما نشان داد که سیمواستاتین باعث افزایش قدرت آنتی اکسیدانی در موشهای مبتلا به EAE شده و باعث کاهش شدت بیماری می شود. با مطالعه اثر استاتین بر موش های مبتلا به ضایعات ایسکمیک مغزی نشان داده شد که این دارو از طریق کاهش استرس اکسیداتیو باعث کاهش ضایعات ایسکمیک مغزی می شود (۱۸).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سیمواستاتین تاثیری بر سطح $IFN-\gamma$ در موشهای مبتلا به آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی ندارد. سلولهای TH1 با تولید $IFN-\gamma$ نقش مهمی در ایمونوپاتوژنز مولتیپل اسکلروزیس و مدل حیوانی آن ایفا می کند (۱۹). بررسی ها نشان می دهد که استفاده از $Anti-IFN-\gamma$ می تواند در درمان بیماریهای خود ایمن وابسته به TH1 موثر باشد (۲۰). گزارشات حاکی از افزایش سطح این سیتوکاین در بیماران مبتلا به مولتیپل

بیماری مولتیپل اسکلروزیس و آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی (مدل حیوانی مولتیپل اسکلروزیس) از دسته بیماریهای التهابی هستند که با ارتشاح لکوسیتهی به بافت مغز و نخاع همراه است. سلولهای ارتشاح یافته به بافت مغزی موجب ایجاد واکنشهای التهابی در بافت مغزی شده و سبب تخریب میلین می شوند. شدت ضایعات به میزان ارتشاح سلولی بستگی دارد (۱۴).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تجویز سیمواستاتین به موشهای مبتلا به آنسفالومیلیت خود ایمن تجربی باعث کاهش ارتشاح لکوسیتهی به مغز، کاهش تعداد پلاک های مغزی و کاهش شدت علائم کلینیکی و تاخیر در شروع بیماری می گردد.

در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس و مدل حیوانی آن، میزان پر اکسیداسیون لیپیدها افزایش می یابد و ممکن است بر نفوذپذیری سد خونی-مغزی موثر باشد (۱۵). سیمواستاتین با مهار لیپید پراکسیداسیون در بهبودی بیماران مبتلا به MS موثر است. در هر صورت این دارو ممکن است با مهار لیپید پراکسیداسیون باعث کاهش ضایعات مغزی شود.

تجویز سیمواستاتین در فاز حاد بیماری ischemic stroke تاثیری بر سطح سیتوکاین‌های التهابی از جمله IL-10 ندارد (۲۸). در بررسی با تجویز سیمواستاتین به موشهای فاقد ژن gld.apoE مشخص گردید که این دارو باعث افزایش IL-10 می‌شود (۲۹). تجویز سیمواستاتین به بیماران بعد از عمل جراحی قلب موجب افزایش سطح IL-10 می‌شود (۳۰). در هر حال این تناقض در نتایج ممکن است به دلیل تفاوت در جامعه مورد مطالعه، نوع بیماری و یا مراحل بیماری باشد که لازم است در این خصوص مطالعات بیشتری انجام پذیرد.

نتیجه گیری

در مجموع سیمواستاتین با کاهش انفیلاتراسیون سلولی به مغز، کاهش تکثیر سلولی و افزایش تولید IL-10 سبب تعدیل پاسخ ایمنی سلولی در موشهای مبتلا به EAE و تاخیر در شروع بیماری و کاهش شدت بیماری می‌گردد.

تقدیر و تشکر

این گزارش حاصل طرح تحقیقاتی مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک می‌باشد که در مرکز تحقیقات پزشکی - مولکولی دانشگاه علوم پزشکی اراک انجام گردید. بدینوسیله از زحمات همه همکاران محترم آن معاونت و شورای محترم پژوهشی تشکر و قدردانی می‌نمایم.

References:

- Gold R, Hartung HP, Toyka KV. Animal models for autoimmune demyelinating disorders of the nervous system. *Mol Med Today* 2000; **6**(2): 88-91.
- Sorensen PS. Multiple sclerosis: pathophysiology revisited. *Lancet Neurol* 2005; **4**(1): 9-10.
- Greenwood J, Mason JC. Statins and the vascular endothelial inflammatory response. *Trends Immunol* 2007; **28**(2): 88-98.
- Goldman MD, Cohen JA. Statins to treat multiple sclerosis: friend or foe? *Neurology* 2008; **71**(18): 1386-1387.
- Sena A, Pedrosa R, Morais MG. Beneficial effect of statins in multiple sclerosis: is it dose-dependent? *Atherosclerosis* 2007; **191**(2): 462.
- Ifergan I, Wosik K, Cayrol R, Kebir H, Auger C, Bernard M, et al. Statins reduce human blood-brain barrier permeability and restrict leukocyte migration: relevance to multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2006; **60**(1): 45-55.
- Paintlia AS, Paintlia MK, Singh I, Singh AK. Combined medication of lovastatin with rolipram suppresses severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Exp Neurol* 2008; **214**(2): 168-180.
- Luccarini I, Ballerini C, Biagioli T, Biamonte F, Bellucci A, Rosi MC, et al. Combined treatment with atorvastatin and minocycline suppresses severity of EAE. *Exp Neurol* 2008; **211**(1): 214-226.
- Paintlia AS, Paintlia MK, Singh I, Skoff RB, Singh AK. Combination therapy of lovastatin and rolipram provides neuroprotection and promotes neurorepair in inflammatory demyelination model of multiple sclerosis. *Glia* 2009; **57**(2): 182-193.
- Mosayebi G, Ghazavi A, Ghasami K, Payani MA. Effect of simvastatin on evolution of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences* 2008; **17**(61): 45-53.
- Peng X, Jin J, Giri S, Montes M, Sujkowski D, Tang Y, et al. Immunomodulatory effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductase inhibitors, potential therapy for relapsing remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2006; **178**(1): 130-139.
- Costa O, Divoux D, Ischenko A, Tron F, Fontaine M. Optimization of an animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis

اسکلروزیس و آنسفالمیلیت خود ایمن تجربی است (۲۱). همچنین در موشهای مبتلا به EAE فاقد CXCR3، افزایش سطح IFN- γ باعث تشدید بیماری می‌شود (۲۲). IFN- γ با افزایش ارتشاح لکوسیتی به مغز، فعال کردن ماکروفاژها و افزایش تولید نیتريت اکساید در تشدید بیماری موثر است. از طرفی، گزارشاتی نیز وجود دارد که نشان می‌دهد IFN- γ در جلوگیری از EAE نقش دارد (۲۳). بنابراین وجود IFN- γ برای جلوگیری از بیماری ضروری است. احتمالاً غلظت کمتر یا بیشتر از حد فیزیولوژیک IFN- γ ، می‌تواند باعث تشدید بیماری گردد.

همچنین با بررسی سطح IL-10 مشخص گردید که میزان IL-10 در موشهای که تحت درمان با سیمواستاتین بودند، در مقایسه با گروه درمان نشده بیشتر است. IL-10 سیتوکاینی است که توسط سلولهای TH2 تولید می‌شود و در تنظیم پاسخهای ایمنی نقش دارد. این سیتوکاین می‌تواند باعث مهار پاسخهای TH1 گردد. سیمواستاتین ممکن است با افزایش تولید IL-10، باعث تعدیل پاسخ ایمنی و کاهش شدت بیماری شود (۲۴).

در خصوص تاثیر سیمواستاتین بر میزان IL-10 نظرات کاملاً متفاوتی وجود دارد. اخیراً گزارش شده که تاثیر سیمواستاتین بر سلولهای تک هسته ای خون محیطی بیماران مبتلا به MS باعث کاهش ۳۰ درصدی تولید IL-10 می‌شود (۲۵). مطالعه دیگر نشان داده شد که تولید IL-10 در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید تحت درمان با سیمواستاتین افزایش می‌یابد (۲۶). تجویز سیمواستاتین به رت نژاد ویستار مبتلا به پانکراتیک سبب کاهش سطح IL-10 می‌شود (۲۷). در بررسی دیگری نشان داده شد که

- achieved with a multiple MOG (35-55) peptide in C57BL/6/J strain of mice. *J Autoimmun* 2003; **20**(1): 51-61.
13. Mosayebi G, Moazzeni SM, Sanati MH. Effect of sex on susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis induced with MOG35-55 peptide in C57BL/6 mice. *Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences* 2006; **27**(4): 95-100.
 14. Lucchinetti CF, Parisi J, Bruck W. The pathology of multiple sclerosis. *Neurol Clin* 2005; **23**(1): 77-105.
 15. Ferretti G, Bacchetti T, Principi F, Di Ludovico F, Viti B, Angeleri VA, et al. Increased levels of lipid hydroperoxides in plasma of patients with multiple sclerosis: a relationship with paraoxonase activity. *Mult Scler* 2005; **11**(6): 677-682.
 16. Bauersachs J, Hiss K, Fraccarollo D, Laufs U, Ruetten H. Simvastatin improves left ventricular function after myocardial infarction in hypercholesterolemic rabbits by anti-inflammatory effects. *Cardiovasc Res* 2006; **72**(3): 438-446.
 17. Zamvil SS, Steinman L: Cholesterol-lowering statins possess anti-inflammatory activity that might be useful for treatment of MS. *Neurology* 2002; **59**: 970-971.
 18. Hayashi T, Hamakawa K, Nagotani S, Jin G, Li F, Deguchi K, et al. HMG CoA reductase inhibitors reduce ischemic brain injury of Wistar rats through decreasing oxidative stress on neurons. *Brain Res* 2005; **1037**(1-2): 52-58.
 19. Mana P, Linares D, Fordham S, Staykova M, Willenborg D. Deleterious role of IFN γ in a toxic model of central nervous system demyelination. *Am J Pathol* 2006; **168**(5): 1464-1477.
 20. Wensky AK, Furtado GC, Marcondes MC, Chen S, Manfra D, Lira SA, et al. IFN- γ determines distinct clinical outcomes in autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2005; **174**(3): 1416-1423.
 21. Sepulcre J, Sanchez-Ibarrola A, Moreno C, De Castro P. Association between peripheral IFN- γ producing CD8 $^{+}$ T-cells and disability score in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Cytokine* 2005; **32**(2): 111-116.
 22. Liu L, Huang D, Matsui M, He TT, Hu T, Demartino J, et al. Severe disease, unaltered leukocyte migration, and reduced IFN- γ production in CXCR3 $^{-/-}$ mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2006; **176**(7): 4399-4409.
 23. Krakowski M, Owens T. Interferon- γ confers resistance to experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 1996; **26**(7): 1641-1646.
 24. O'Neill EJ, Day MJ, Wraith DC. IL-10 is essential for disease protection following intranasal peptide administration in the C57BL/6 model of EAE. *J Neuroimmunol* 2006; **178**(1-2): 1-8.
 25. Desai F, Ramanathan M, Fink CS, Wilding GE, Weinstock-Guttman B, Awad AB. Comparison of the immunomodulatory effects of the plant sterol beta-sitosterol to simvastatin in peripheral blood cells from multiple sclerosis patients. *Int Immunopharmacol* 2009; **9**(1):153-157.
 26. Shirinsky IV, Zheltova OI, Solovyova NY, Kozlov VA, Shirinsky VS. Changes in disease activity, cytokine production, and proliferation of peripheral blood mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis after simvastatin treatment. *Scand J Rheumatol* 2009; **38**(1): 23-27.
 27. Almeida JL, Sampietre SN, Mendonca Coelho AM, Trindade Molan NA, Machado MC, Monteiro da Cunha JE, et al. Statin pretreatment in experimental acute pancreatitis. *Jop* 2008; **9**(4): 431-439.
 28. Montaner J, Chacon P, Krupinski J, Rubio F, Millan M, Molina CA, et al. Simvastatin in the acute phase of ischemic stroke: a safety and efficacy pilot trial. *Eur J Neurol* 2008; **15**(1): 82-90.
 29. Aprahamian T, Bonegio R, Rizzo J, Perlman H, Lefer DJ, Rifkin IR, et al. Simvastatin treatment ameliorates autoimmune disease associated with accelerated atherosclerosis in a murine lupus model. *J Immunol* 2006; **177**(5): 3028-3034.
 30. Liakopoulos OJ, Dorge H, Schmitto JD, Nagorsnik U, Grabedunkel J, Schoendube FA. Effects of preoperative statin therapy on cytokines after cardiac surgery. *Thorac Cardiovasc Surg* 2006; **54**(4): 250-254