Archive

ORIGINAL ARTICLE

Increase in CD4$^+$Foxp3$^+$ Regulatory T cells and Amelioration of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice Treated with IL-27

Samad Nazemi[1],
Rahim Golmohammadi[2],
Mohsen Naeemipour[3],
Mohammad-Shafi Mojadadi[4]

[1] Associate Professor, Department of Physiology, Cellular and Molecular Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran
[2] Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, Cellular and Molecular Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Medical Biotechnology, Cellular and Molecular Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Immunology, Leishmaniasis Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran

(Received December 15, 2019 Accepted September 22, 2019)

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:21 +0330 on Wednesday January 22nd 2020

Abstract

Background and purpose: In multiple sclerosis (MS) and its murine model, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), chronic inflammation damages the myelin of central nervous system. Recently, interleukin-27 (IL-27) has been recognized as a feasible choice for treatment of autoimmune diseases such as MS due to its anti-inflammatory properties. However, the underlying mechanisms have not yet been specified clearly. The present study, investigated the immunomdulatory effects of IL-27 in C57BL/6 mice with EAE.

Materials and methods: In this experimental study, two groups of EAE mice (test and control groups) received intraperitoneal injection of P240-mIL-27 (200 µg) and P240 plasmid (200 µg), respectively. The disease severity was evaluated daily for 30 days. At the end of the treatment period, the mice were sacrificed and the levels of IL-17, IFN-γ, IL-6, and IL-10 were measured in splenocytes culture media using ELISA method. Also, the percentage of CD4+Foxp3+ regulatory T cells (Treg) in spleen cells was analyzed using flow cytometry.

Results: Severity of EAE significantly decreased in test group (P240-mIL27), compared to that of the control group. In test group, the levels of IL-17, IFN-γ, and IL-6 were significantly lower ($P<0.001$), while IL-10 levels were significantly higher compared to those of the control group ($P<0.001$). Moreover, the percentage of Treg cells in test group was significantly higher than that of the control mice ($P<0.001$).

Conclusion: IL-27 can be a suitable choice in treatment of inflammatory diseases such as MS via increasing Treg cells and IL-10, and suppression of inflammatory cytokines.

Keywords: IL-27, experimental autoimmune encephalomyelitis, Multiple sclerosis, IL-17, IFN-γ, IL-6, IL-10, regulatory T cells

J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 29 (179): 18-27 (Persian).

*** Corresponding Author: Mohammad-Shafi Mojadadi -** Leishmaniasis Research Center, Sabzevar University of Medical Sciences, Sabzevar, Iran (E-mail: mojadadim@medsab.ac.ir)

www.SID.ir

Archive of SID

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و نهم شماره 179 آذر سال 1398 (27-18)

افزایش جمعیت لنفوسیت‌های T تنظیمی $CD4^+FOXP3^+$ و بهبود موش‌های مبتلا به بیماری انسفالومیلیت تحت درمان با IL-27

صمد ناظمی[1]
رحیم گل‌محمدی[2]
محسن نعیمی‌پور[3]
محمدشفیع مجددی[4]

چکیده

سابقه و هدف: در بیماری مولتیپل‌اسکلروزیس (MS) و مدل موشی آن، انسفالومیلیت خودایمن تجربی (EAE)، التهاب مزمن سبب تخریب میلین سیستم عصبی مرکزی می‌شود. اخیرا اینترلوکین -27 (IL-27) به‌علت داشتن خواص ضد التهابی به عنوان گزینه احتمالی درمان بیماری‌های خودایمن از جمله MS مطرح شده است، اما مکانیسم عمل این سایتوکاین به خوبی مشخص نیست. در این مطالعه، اثرات ایمونومدولاتوری IL-27 در مدل EAE در موش‌های C57BL/6 بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، به دو گروه از موش‌های EAE، گروه آزمایش و گروه کنترل، به ترتیب مقدار 200µg پلاسمید کدکننده IL-27 موشی (P240-mIL27) و پلاسمید P240 در دو نوبت تزریق شد. شدت علائم بالینی در موش‌ها روزانه به‌مدت 30 روز ثبت شد. در پایان تیمار، موش‌ها کشته شدند و میزان تولید سایتوکاین‌های IL-17، IFN-γ، IL-6 و IL-10 از سلول‌های طحالی با استفاده از الایزا اندازه‌گیری شد. همچنین درصد سلول‌های T تنظیمی CD4+FOXP3+ طحال با فلوسایتومتری محاسبه شد.

یافته‌ها: شدت علائم بالینی بیماری EAE در گروه آزمایش (دریافت‌کننده P240-mIL27) در مقایسه با گروه کنترل (دریافت‌کننده P240) به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت. علاوه‌براین، مقدار سایتوکاین‌های IFN-γ، IL-17 و IL-6 در گروه آزمایش به‌طور معنی‌داری کم‌تر از گروه کنترل، و میزان IL-10 به‌طورقابل ملاحظه‌ای بیش‌تر از گروه کنترل بود. همچنین جمعیت لنفوسیت‌های T تنظیمی CD4+FOXP3+ در طحال موش‌های گروه آزمایش به‌طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر از گروه کنترل بود.

استنتاج: IL-27 از طریق افزایش لنفوسیت‌های T تنظیمی CD4+FOXP3+ و IL-10، و همچنین تضعیف تولید سایتوکاین‌های التهابی IFN-γ و IL-17 و IL-6 می‌تواند گزینه بالقوه مناسبی در درمان و یا بهبود علائم بیماری‌های التهابی نظیر MS باشد.

واژه های کلیدی: اینترلوکین -27، انسفالومیلیت خودایمن تجربی، مولتیپل اسکلروزیس، اینترفرون-گاما، اینترلوکین -17، اینترلوکین -6، اینترلوکین -10، لنفوسیت‌های T تنظیمی

مقدمه

بیماری مولتیپل اسکلروزیس (MS:Multiple sclerosis) یک بیماری مزمن التهابی سیستم عصبی مرکزی می‌باشد و پس از تروما، دومین عامل معلولیت نورولوژیکی در بین جوانان به‌شمار می‌آید. آمار مبتلایان به MS در

مولف مسئول: محمدشفیع مجددی: مرکز تحقیقات لیشمانیوز، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران E-mail: mojadadim@medsab.ac.ir
1. دانشیار، گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران
2. دانشیار، گروه علوم تشریح، مرکز مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران
3. استادیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران
4. استادیار، گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات لیشمانیوز، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، سبزوار، ایران
تاریخ دریافت: 1397/9/24 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1397/10/30 تاریخ تصویب: 1398/6/31

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:21 +0330 on Wednesday January 22nd 2020

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:21 +0330 on Wednesday January 22nd 2020

جهان، حدود دو میلیون و پانصد هزار نفر گزارش شده است(1). مهم‌ترین مشخصه MS آسیب الیگودندروسیت‌ها و مرگ این سلول‌ها می‌باشد که پیامد آن، از بین رفتن میلین و ایجاد ضایعات پراکنده در سیستم عصبی مرکزی می‌باشد. پیامد از بین رفتن میلین، اختلال در هدایت عصبی می‌باشد. اختلال در هدایت عصبی، نقایص نورولوژیکی مختلفی را سبب می‌شود که از آن جمله می‌توان به اختلالات بینایی، خستگی، مشکلات راه رفتن، نقایص شناختی و اختلالات حسی اشاره کرد(1). اگرچه علت اصلی بیماری MS هنوز کاملاً مشخص نشده است، با این حال عقیده عمومی بر این است که پاسخ‌های ایمنی در افرادی که از نظر ژنتیکی مستعد می‌باشند، تحت تاثیر یک‌سری محرک‌های محیطی آغاز شده و سبب آسیب رساندن به میلین اعصاب مرکزی می‌شود(2). به همین دلیل امروزه درموضوع درمان بیماری MS دو نوع استراتژی مطرح است. استراتژی اول تلاش جهت توقف روند بیماری از طریق سرکوب پاسخ‌های التهابی و استراتژی دوم تلاش جهت ترمیم آسیب‌های وارده و میلین‌سازی مجدد. انسفالومیلیت خودایمن تجربی (EAE) مدل حیوانی بیماری MS می‌باشد و پژوهشگران از این مدل جهت مطالعه در زمینه مکانیسم‌های دخیل در بیماری MS و همچنین کشف راه‌های جدید درمانی استفاده می‌کنند. مدل EAE (Experimental autoimmune encephalomyelitis) از طریق تزریق مخلوطی از پپتیدهای میلین نظیر MOG (Myelin oligodendrocyte glycoprotein) و ادجوانت فروند در جوندگان ایجاد می‌شود(4،3). مطالعات انجام شده بیانگر آن‌است که هر دو گروه سلول‌های Th1 و Th17 در پاتوژنز بیماری MS و EAE نقش دارند. IFN-γ تولیدشده از سلول‌های Th1 بروز مولکول‌های چسبان لکوسیتی نظیر ICAM-1 و ALCAM را بر سطح سلول‌های اندوتلیال سد خونی- مغزی افزایش داده و از این طریق سبب افزایش نفوذپذیری لکوسیت‌ها از این سد می‌شود. علاوه بر این IFN-γ از طریق افزایش بروز مولکول‌های MHC نوع یک و دو بر سطح آستروسیت‌ها و الیگودندروسیت‌ها، واکنش‌پذیری این سلول‌ها را با سلول‌های ایمنی افزایش داده و احتمالا مرگ این سلول‌ها را سبب می‌شود. به علاوه ماکروفاژها و میکروگلیاها هم تحت تاثیر IFN-γ در بیماری MS و EAE، در تخریب غلاف میلین مشارکت می‌کنند(5). مهم‌ترین سایتوکاین تولیدی از سلول‌های Th17 اینترلوکین -17 (IL-17) می‌باشد. وجود مقدار زیادی از IL-17 در پلاک‌ها و مایع مغزی- نخاعی بیماران مبتلا به MS، به خوبی نشانگر این واقعیت است که IL-17 نقش قابل توجهی در پاتوژنز بیماری MS دارد(6). در مطالعه دیگری نشان داده شده است که در موش‌های فاقد IL-17، زمان شروع علائم EAE بسیار با تاخیر اتفاق می‌افتد. علاوه بر این شدت علائم و نیز تغییرات هیستولوژیکی در این گونه موش‌ها بسیار کم‌تر از موش‌های طبیعی می‌باشد(7).

اینترلوکین -27 (IL-27) سایتوکاینی هتروداِیمر می‌باشد که از دو زیرواحد p28 و Ebi3 تشکیل یافته است. این سایتوکاین از سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن به‌خصوص سلول‌های دندرتیک و ماکروفاژها تولید می‌شود. گیرنده این سیتوکاین نیز از دو زنجیره پلی‌پپتیدی WSX-1 و gp130 تشکیل شده و بر سطح ماکروفاژها، مونوسیت‌ها، سلول‌های دندرتیک، لنفوسیت‌های B و T، سلول‌های NK، ماست سل‌ها و سلول‌های اندوتلیال بارز می‌شود(8). بر اساس مطالعات انجام شده در مدل‌های حیوانی که فاقد زیر واحد WSX-1 گیرنده IL-27 می‌باشند، گزارش شده که پاسخ‌های التهابی ناشی از سلول‌های Th1 و Th17 در این حیوانات بسیار شدید و مخرب بوده و بیماری EAE نیز در این موش‌ها در مقایسه با موش‌های طبیعی، شدت بیش‌تری داشته و این موضوع با افزایش تمایز سلول‌های Th17 ارتباط دارد(10،9). با توجه به مطالب گفته شده در بالا، IL-27 به‌علت داشتن خواص ضدالتهابی می‌تواند به‌عنوان گزینه احتمالی درمان بیمارهای

www.SID.ir

Archive of SID

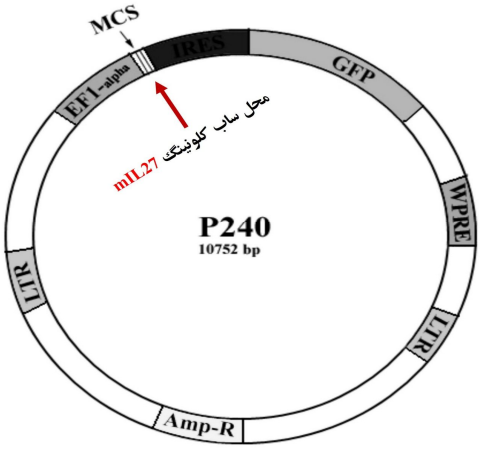
Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:21 +0330 on Wednesday January 22nd 2020

خودایمن از جمله MS مطرح باشد. بنابراین به منظور مشخص شدن مکانیسم عمل احتمالی این سایتوکاین، این مطالعه با هدف بررسی اثرات ایمونومدولاتوری IL-27 در مدل EAE در موش‌های C57BL/6 انجام شد.

مواد و روش‌ها

پلاسمید P240-mIL27

پلاسمید P240 بیان‌کننده IL-27 موشی (P240-mIL27) از طریق ساب‌کلونینگ ژن mIL-27 (شماره دسترسی PubMed: NM_145636) به طول تقریبی 1350 جفت باز) در پلاسمید P240 ساخته شد. علت انتخاب پلاسمید P240 برای این کار، وجود پروموتر بسیار قوی EF1-alpha در این پلاسمید می‌باشد که امکان بروز مداوم یک ژن را در شرایط مختلف فراهم می‌آورد (تصویر شماره 1).



تصویر شماره 1: تصویر شماتیک از پلاسمید P240

به طور خلاصه برای ساخت پلاسمید P240-mIL27، ابتدا ژن mIL-7 (متشکل از دو زیر واحد P28 و Ebi3) با استفاده از پرایمرهایی که در آن‌ها جایگاه برش دو آنزیم XmaI و BamHI (شرکت فرمنتاز) تعبیه شده بود، تکثیر شد(جدول شماره 1). سپس با برش ژن تکثیر شده mIL-27 و پلاسمید P240 با آنزیم‌های XmaI و BamHI، ژن mIL-27 در پلاسمید P240 ادغام شد. پلاسمید نوترکیب حاصل (P240-mIL27)، در باکتری E.coli سوش DH5α تکثیر و برای استفاده در موش‌ها، با استفاده از کیت EndoFree Plasmid Mega شرکت کیاژن به‌صورت عاری از اندوتوکسین خالص‌سازی شد. جهت اطمینان از تولید IL-27، پلاسمید P240-mIL27 با استفاده از روش رسوب کلسیم فسفات به‌سلول‌های 293T انتقال داده شد و پس از گذشت 72 ساعت، مقدار IL-27 در سوپرناتانت کشت سلول‌ها با استفاده از کیت الایزای اختصاصی (eBioscience) اندازه‌گیری شد(11).

جدول شماره 1: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن IL-27 موش

پرایمر F:	5’ ATTC^CCGGGGCCAACATGTCCAAGCTGC 3’
پرایمر R:	5’ ATTC^CCGGGGCCAACATGTCCAAGCTGC 3’

القای بیماری EAE و تیمار موش‌ها

در این مطالعه تجربی، کار بر روی موش‌ها مطابق "راهنمای اخلاقی پژوهش بر حیوانات آزمایشگاهی" کمیته ملی اخلاق در پژوهش‌های زیستی ایران انجام گرفت. موش‌های ماده نژاد C57BL/6 از انستیتو پاستور تهران خریداری شدند. موش‌ها در شرایط استریل و با دسترسی آزاد به غذا و آب نگه‌داری شدند. به منظور القای بیماری EAE، به هر کدام از موش‌ها 200 میکروگرم از پپتید MOG 35-55 شرکت Alexis آمریکا در ادجوانت کامل فروند (سیگما، آمریکا)، به صورت زیر جلدی تزریق شد. همچنین، در فاصله‌های زمانی صفر و 48 ساعت بعد از تزریق پپتید MOG، 500 نانوگرم سم پرتوزیس شرکت Alexis به‌صورت داخل صفاقی به موش‌ها تزریق شد(3). بعد از ظهور علائم بیماری EAE (حدود 15 روز پس از تزریق MOG)، موش‌ها در دو گروه آزمایش و کنترل (هر گروه 8 سر) قرار گرفتند. به موش‌های گروه آزمایش در روزهای 15 و 22، هر نوبت مقدار 200 میکروگرم پلاسمید P240-mIL27 در

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:21 +0330 on Wednesday January 22nd 2020

100 میکرولیتر بافرفسفات‌سالین (PBS) به‌صورت داخل عضلانی تزریق شد. موش‌های گروه کنترل در زمان‌های مذکور پلاسمید P240 دریافت کردند. موش‌ها تا زمان انجام آزمایشات الایزا و فلوسایتومتری (روز 30)، هر روز از نظر شدت علائم بالینی بررسی و بر اساس مقیاس صفر تا 5 نمره‌دهی شدند: نمره صفر: فاقد هرگونه علایم بالینی، نمره 1: افتادن دم (شل شدن دم)، نمره 2: بی‌حسی و یا فلج نسبی اندام پشتی، نمره 3: فلج کامل اندام پشتی، نمره 4: فلج کامل اندام و نمره 5: مرگ حیوان(4).

اندازه‌گیری سایتوکاین‌های IL-17، IFN-γ، IL-6 و IL-10

جهت اندازه‌گیری سایتوکاین‌ها، تعداد سه میلیون سلول طحالی از هر کدام از موش‌های گروه‌های آزمایش و کنترل در محیط RPMI-1640 حاوی 10 درصد FBS و 50 میکروگرم پپتید MOG در پلیت 24 خانه‌ای کشت داده شد. پس از 72 ساعت، محیط کشت رویی سلول‌ها جهت انجام آزمایش الایزا جمع‌آوری شد. اندازه‌گیری سایتوکاین‌های IL-17، IFN-γ، IL-6 و IL-10 با استفاده از کیت‌های الایزای شرکت eBioscience (آمریکا)، به روش ساندویچی و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. حساسیت کیت برای سایتوکاین‌های IL-17، IFN-γ، IL-6 و IL-10 به ترتیب 4، 15، 4 و 32 پیکوگرم در میلی لیتر بود.

اندازه‌گیری درصد سلول‌های T تنظیمی طحال

در روز 30، به‌منظور تعیین درصد جمعیت لنفوسیت‌های T تنظیمی $CD4+Foxp3+$، ابتدا در شرایط کاملا استریل، سوسپانسیون سلول‌های طحالی از هر کدام از موش‌های گروه‌های آزمایش و کنترل تهیه شد. سپس سلول‌ها با آنتی بادی‌های مونوکلونال ضد CD4 (کونژوگه با فلوروکروم FITC) و ضد Foxp3 (کونژوگه با فلوروکروم PE) همگی از شرکت eBioscience (آمریکا) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده رنگ‌آمیزی شدند. به‌طور خلاصه، به 500 هزار سلول طحالی داخل هر تیوب اپندورف، مقدار 0/22 میکروگرم آنتی‌بادی ضد CD4 اضافه شد. همین مقدار از آنتی‌بادی کنترل ایزوتایپ، به تیوب‌های مربوطه اضافه شد. نمونه‌ها به مدت 45 دقیقه روی یخ و در تاریکی انکوبه شدند. در ادامه، پس از شستشوی سلول‌ها، مقدار 1 میلی‌لیتر بافر فیکس‌کننده/ نفوذپذیرکننده Foxp3 به هر تیوب اضافه شد و پس از 45 دقیقه انکوباسیون و شستشو، سلول‌ها در 1 میلی‌لیتر بافر نفوذپذیرکننده به حالت سوسپانسیون درآمدند. سپس، به هر تیوب مقدار 0/5 میکروگرم از آنتی‌بادی ضد Foxp3 یا ایزوتایپ آن اضافه شد. سلول‌ها به مدت 45 دقیقه در تاریکی انکوبه شده و پس از این مدت، دو مرتبه در بافر نفوذپذیرکننده شستشو داده شدند. در پایان، سلول‌ها در 1 میلی‌لیتر بافر رنگ‌آمیزی به حالت سوسپانسیون درآمدند و در دستگاه فلوسایتومتری مدل FACS مورد آنالیز قرار گرفتند. از نرم‌افزار فلوسایتومتری Flomax (Partec, Münster, Germany) جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم نمودارهای مربوطه استفاده شد.

آنالیزهای آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه 16 انجام گرفت. برای تعیین نرمالیتی داده‌ها از آزمون آماری Shapiro-Wilk استفاده شد. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شدند. از آزمون آماری تی تست مستقل برای مقایسه نتایج حاصل از سنجش سایتوکاین‌ها و فلوسایتومتری و از آزمون من‌ویتنی جهت مقایسه نتایج نمره بالینی موش‌های دو گروه آزمایش و کنترل استفاده شد. در تمامی موارد $P<0/05$ معیار تفاوت‌های آماری در نظرگرفته شد.

یافته ها

تاثیر P240-mIL27 بر شدت بیماری EAE

موش‌های گروه‌های آزمایش و کنترل به مدت دو هفته (از روز 15 تا 30 پس از القای بیماری EAE)

www.SID.ir

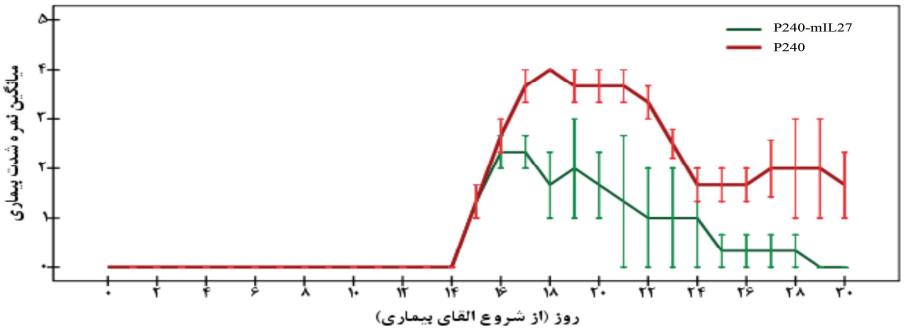
Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:21 +0330 on Wednesday January 22nd 2020

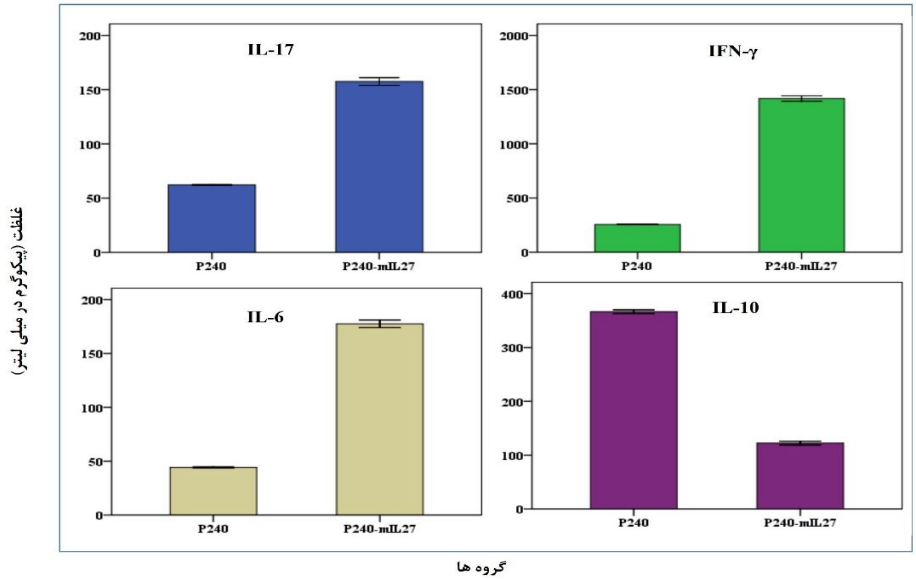
روزانه از نظر علائم بالینی مورد بررسی قرار گرفتند و نمره‌دهی شدند. همان‌طورکه در نمودار شماره 1 مشخص است، میانگین روزانه شدت علائم بیماری EAE در موش‌های دریافت‌کننده P240-mIL27 در مقایسه با گروه کنترل (دریافت کننده P240) به‌طور معنی‌داری کم‌تر است (آزمون آماری من‌ویتنی، P = 0/01).

تاثیر P240-mIL27 بر سایتوکاین‌های تولیدی از سلول‌های طحالی

به منظور بررسی تاثیر P240-mIL27 بر پاسخ‌های ایمنی موش‌های EAE، در روز سی‌ام سلول‌های طحالی هر کدام از موش‌ها در شرایط کاملا استریل جدا و پس از کشت 72 ساعته در مجاورت MOG 35-55 غلظت سایتوکاین‌های IL-17، IFN-γ، IL-6 و IL-10 با روش الایزا اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از الایزا (تصویر شماره 2) نشان داد که در موش‌های تیمار شده با P240-mIL27 میانگین غلظت سایتوکاین‌های التهابی IL-17، IFN-γ، IL-6 تولید شده از سلول‌های طحالی به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه دریافت‌کننده P240، در حالی‌که تولید سایتوکاین ضدالتهابی IL-10 بیش‌تر از گروه کنترل می‌باشد (آزمون آماری تی‌تست مستقل، در همه موارد P < 0/001).



نمودار شماره 1: میانگین نمره شدت بیماری EAE در گروه آزمایش و کنترل



تصویر شماره 2: میانگین غلظت سایتوکاین‌های تولیدی از سلول‌های طحالی در موش‌های EAE گروه‌های آزمایش و کنترل. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است.

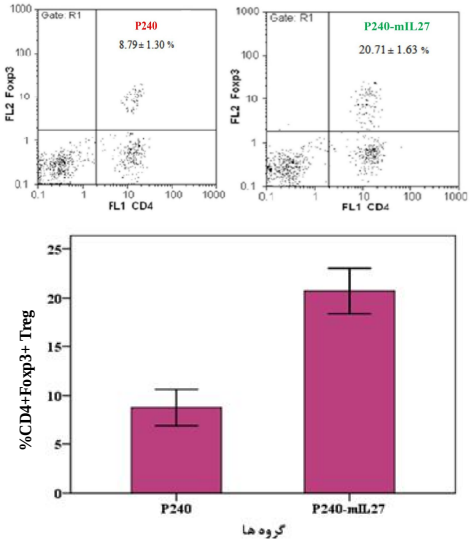
www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:21 +0330 on Wednesday January 22nd 2020

تاثیر P240-mIL27 برجمعیت لنفوسیت‌های T تنظیمی طحال

آنالیز جمعیت لنفوسیت‌های T تنظیمی CD4+Foxp3+ درطحال با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری نشان داد که در موش‌های EAE دریافت‌کننده P240-mIL27، درصد سلول‌های T تنظیمی CD4+Foxp3+ به‌طور قابل ملاحظه‌ای بیش‌تر از گروه دریافت‌کننده P240 بود (تقریبا 21 درصد در مقابل 9 درصد،آزمون آماری تی‌تست مستقل، $P < 0/001$) (تصویر شماره 3).



تصویر شماره 3: جمعیت لنفوسیت‌های T تنظیمی $CD4^+Foxp3^+$ طحالی (به درصد) در موش‌های EAE دریافت کننده P240-mIL27 و P240

بحث

در بیماری MS و مدل آزمایشگاهی آن، EAE، به طور عمده پاسخ‌های التهابی ناشی از Th1 و Th17 در سیستم عصبی مرکزی، به الیگودندروسیت‌ها آسیب وارد کرده و سبب تخریب میلین و گاهی از بین رفتن آکسون‌ها می‌شود. از این رو یکی از استراتژی‌های رایج در درمان و یا کنترل شدت علائم بالینی در مبتلایان به بیماری MS تعدیل و سرکوب پاسخ‌های التهابی آسیب‌رسان می‌باشد. اخیرا IL-27 به‌علت داشتن خواص ضدالتهابی به‌عنوان گزینه احتمالی درمان بیمارهای خودایمن ازجمله MS مطرح شده است؛ با این حال مکانیسم عمل احتمالی این سایتوکاین بخوبی مشخص نشده است. در این مطالعه اثرات ایمونومدولاتوری IL-27 در مدل EAE، مدل آزمایشگاهی بیماری MS، مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که IL-27 می‌تواند از طریق تقویت پاسخ‌های ضدالتهابی (افزایش جمعیت لنفوسیت‌های T تنظیمی $CD4^+Foxp3^+$ و افزایش تولید IL-10) و تضعیف پاسخ‌های پیش‌التهابی (کاهش تولید سایتوکاین‌های التهابی IL-17، IFN-γ و IL-6) سبب کاهش شدت علائم بیماری EAE در موش‌ها شود. در بیماری MS و EAE، لنفوسیت‌های Th اختصاصی با گذشتن از سد خونی - مغزی وارد سیستم عصبی مرکزی شده و نقش اصلی در پاتوژنز بیماری دارند. لنفوسیت‌های Th بسته به نوعشان، سایتوکاین‌های مختلفی تولید می‌کنند. سلول‌های Th1 و Th17 به طور عمده سایتوکاین‌های التهابی IFN-γ، IL-17 و IL-6 تولید می‌کنند؛ در حالی‌که لنفوسیت‌های Th2 و Thی تنظیمی، سایتوکاین‌های ضدالتهابی IL-10 و TGF-β ترشح می‌کنند. بنابراین تغییر پاسخ‌های ایمنی به سمت Th1 و Th17 می‌تواند مسئول آسیب‌های ایجادشده به میلین و آکسون‌ها در بیماری MS و EAE باشد(12). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که یکی از مکانیسم‌های احتمالی IL-27 بر بهبود علائم EAE، از طریق افزایش جمعیت لنفوسیت‌های T تنظیمی $CD4^+Foxp3^+$ می‌باشد. در تایید این نتیجه می‌توان گفت که ویژگی مشترک همه لنفوسیت‌های T تنظیمی $CD4^+$، بروز فاکتور نسخه‌برداری Foxp3 می‌باشد(5). این سلول‌ها نقش مهمی در کنترل پاسخ‌های خودایمنی و التهاب دارند و پس از فعال شدن می‌توانند از طریق مکانیسم‌های اتصال سلول به سلول و یا از طریق تولید سایتوکاین‌های ضدالتهابی IL-10 و TGF-β، عملکرد انواع مختلف سلول‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی را تنظیم نمایند. مطالعات مختلفی در زمینه نقش لنفوسیت‌های T تنظیمی در MS و EAE انجام گرفته است. به‌عنوان مثال، در مطالعه‌ای آلوده کردن موش‌ها با

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:21 +0330 on Wednesday January 22nd 2020

آدنو وکتور ویروسی بیان‌کننده پروتئین MOG توانست از طریق القای جمعیت لنفوسیت‌های T تنظیمی CD4Foxp3، به‌طور قابل ملاحظه‌ای باعث کاهش شدت بیماری EAE شود(13). همچنین، در فرم راجعه- بهبودیابنده بیماری EAE، تخلیه بدن حیوان از وجود سلول‌های T تنظیمی، علاوه بر این که باعث وخامت حال حیوان شد، سبب شد که آن حیوان، دیگر وارد مرحله بهبودی بیماری نشود(14). گروهی دیگر از مطالعات که تاییدکننده نقش مثبت لنفوسیت‌های T تنظیمی در EAE و MS می‌باشد مربوط می‌شود به مطالعاتی که در آن‌ها استفاده از رژیم‌های درمانی مختلف، از طریق افزایش جمعیت لنفوسیت‌های T تنظیمی، سبب بهبود بیماری EAE و MS شده است. به عنوان مثال، تجویز متابولیت‌های حاصل از تاثیر آنزیم ایندول آمین داکسی‌ژناز (IDO: Indoleamine dioxygenase) بر تریپتوفان به موش‌های EAE، باعث افزایش جمعیت لنفوسیت‌های T تنظیمی، مهار لنفوسیت‌های Th1 و Th17 و بهبودی بیماری شده است(15). در مطالعه ای دیگر، مکمل ویتامین A توانسته است از طریق افزایش جمعیت لنفوسیت‌های T تنظیمی و کاهش جمعیت لنفوسیت‌های Th17 سبب بهبودی EAE شود(16). مطالعات نشان داده‌اند IL-27 نقش بسیار مهمی در عملکرد سلول‌های T تنظیمی دارد. به این ترتیب که IL-27 بروز مولکولی به نام *Lag3* را بر سطح لنفوسیت‌های T تنظیمی Foxp3 افزایش می‌دهد. مولکول پروتئینی Lag3، نقش بسیار مهمی در عملکرد تنظیمی و سرکوب‌کنندگی لنفوسیت‌های T تنظیمی دارد(17). به همین خاطر است که شدت بیماری EAE در موش‌هایی که در آن‌ها ژن گیرنده IL-27 (IL-27R) حذف شده است بسیار بیش‌تر از موش‌های طبیعی بوده و ارتشاح سلول‌های تولید کننده IFN-γ (Th1) و IL-17 (Th17) به سیستم مرکزی عصبی نیز بیشتر است(18). بنابراین با توجه به نقش تعیین کننده لنفوسیت‌های T تنظیمی در کنترل بیماری EAE، می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که در مطالعه حاضر حداقل بخشی از اثرات درمانی سایتوکاین IL-27 از طریق القای افزایش جمعیت سلول‌های T تنظیمی صورت گرفته است. در بخشی دیگر از این مطالعه، نتایج نشان داد که IL-27 می تواند باعث کاهش قابل ملاحظه تولید سایتوکاین‌های التهابی IL-17، IFN-γ و IL-6 از سلول‌های طحالی موش‌های EAE شود؛ در حالی‌که تولید سایتوکاین ضدالتهابی IL-10 را به میزان چشم‌گیری افزایش می‌دهد. اهمیت این تغییرات سایتوکاینی در تخفیف شدت علائم EAE در این است که سایتوکاین‌های IL-17، IFN-γ و IL-6 به عنوان سایتوکاین‌هایی شناخته می‌شوند که با وخامت EAE و MS ارتباط مستقیم دارند؛ حال آنکه IL-10 می تواند از وخامت EAE و MS کم کند. به عنوان مثال گزارش شده است که درموش‌های حذف ژن شده IL-17، القای EAE با تاخیر صورت گرفته و وخامت بیماری نیز بسیار کم است(7). علاوه بر این IL-17 را می‌توان در پلاک‌های مغزی و مایع مغزی- نخاعی بیماران مبتلا به MS مشاهده کرد(19). همسو با مطالعه حاضر، گزارش شده است که تزریق زیرجلدی IL-27 به مدت یک هفته به موش‌های EAE، توانست باعث کاهش جمعیت سلول‌های تولیدکننده IL-17 و کاهش جمعیت سلول‌های ایمنی ارتشاح یافته به بافت عصبی شود(20). IL-6 به‌عنوان یک سایتوکاین پیش‌التهابی نقش مهمی در شکل‌گیری لنفوسیت‌های Th17 دارد. این سایتوکاین از طریق فعال کردن فاکتور نسخه‌برداری STAT3 در سلول‌های Th بکر، باعث تمایز آن‌ها به سلول‌های Th17 می‌شود(21). انتقال سلول‌های Th17 به موش‌های EAE باعث التهاب شدید در سیستم عصبی مرکزی این موش‌ها می‌شود(22). بر این اساس می‌توان نتیجه‌گیری کرد که درمطالعه حاضر، کاهش تولید IL-6 متعاقب تزریق IL-27، سبب کاهش شکل‌گیری سلول‌های تولیدکننده IL-17 شده و تا حدودی از این طریق توانسته است سبب بهبود علائم EAE در موش‌ها شود. IL-10 یکی از سایتوکاین‌های مهم با اثرات ضدالتهابی می‌باشد و به

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:21 +0330 on Wednesday January 22nd 2020

طور عمده از لنفوسیت‌های T تنظیمی تولید می‌شود. لنفوسیت‌های T تنظیمی می‌توانند از طریق تولید IL-10، لنفوسیت‌های Th1 و Th17 اجرایی را سرکوب نمایند(23). گزارش شده است در موش‌های فاقد IL-10، پاسخ‌های التهابی لنفوسیت‌های Th اجرایی بیش‌تر بوده و به تبع آن، وخامت بیماری EAE نیز شدیدتر است(24). همچنین IL-10 تولید شده از لنفوسیت‌های T تنظیمی می‌تواند سلول‌های Th17 را به سمت فنوتیپ تنظیمی سوق داده و منجر به کاهش پاسخ‌های التهابی در بیماری‌هایی نظیر EAE شود(25). بنابراین می‌توان گفت که در این مطالعه یکی دیگر از اثرات مثبت IL-27 در موش‌های EAE، افزایش تولید IL-10 و به تبع آن سرکوب پاسخ‌های Th1 و Th17 انسفالیتوژنیک می‌باشد.

در پایان می‌توان چنین نتیجه گیری کرد که IL-27 می‌تواند از طریق تقویت پاسخ‌های ضدالتهابی (افزایش جمعیت لنفوسیت‌های T تنظیمی $CD4^+Foxp3^+$ و افزایش تولید IL-10) و تضعیف پاسخ‌های پیش التهابی (کاهش تولید سایتوکاین‌های IL-17، IFN-γ و IL-6) سبب کاهش شدت علائم بیماری EAE در موش‌ها شود.

سپاسگزاری

از آقای دکتر یوسف قیصری به جهت هدیه دادن پلاسمید تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Vidal-Jordana A, Montalban X. Multiple sclerosis: epidemiologic, clinical, and therapeutic aspects. Neuroimaging Clin N Am 2017; 27(2): 195-204.
2. Yadav SK, Mindur JE, Ito K, Dhib-Jalbut S. Advances in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. Curr Opin Neurol 2015; 28(3): 206-219.
3. Mojadadi MS, Mohammadzadeh M, Golmohammadi R, Mahmoodabadi N. Therapeutic Potential of Syngeneic Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells in Established form of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. J Mazandaran Univ Med Sci. 2014; 24(113): 55-64 (Persian).
4. Mojadadi MS, Golmohammadi R, Khanahmad H, Gholami O. Evaluating the Effect of IL-27-Transfected Mesenchymal Stem Cells on Certain Histological and Immunological Parameters ina Mouse Model of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. J Isfahan Med Sch 2013; 31(249): 1270-1284.
5. Rodriguez M. Effectors of demyelination and remyelination in the CNS: implications for multiple sclerosis. Brain Pathol 2007; 17(2): 219-229.
6. Khaibullin T, Ivanova V, Martynova E, Cherepnev G, Khabirov F, Granatov E, et al. Elevated levels of proinflammatory cytokines in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. Front Immunol 2017; 8: 531.
7. Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T ,Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. JImmunol 2006; 177(1): 566-573.
8. Yoshida H, Yoshiyuki M. Regulation of immune responses by interleukin 27. Immunol Rev 2008; 226(1): 234-247.
9. Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. Curr Opin Immunol 2007; 19(6): 652-657.
10. Stumhofer JS, Laurence A, Wilson EH, Huang E, Tato CM, Johnson LM ,et al. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17–producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. Nat Immunol 2006; 7(9): 937-945.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:21 +0330 on Wednesday January 22nd 2020

11. Mojadadi MS, Ebtekar M, Golkar M, Khanahmad H. Effectof interleukin–27 on recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. KAUMS J (FEYZ) 2012; 16(3): 219-228.
12. Keeler GD, Kumar S, Palaschak B, Silverberg EL, Markusic DM, Jones NT, et al. Gene therapy-induced antigen-specific Tregs inhibit neuro-inflammation and reverse diseasein a mouse model of multiple sclerosis. Mol Ther 2018; 26(1): 173-183.
13. Gärtner D, Hoff H, Gimsa U, Burmester G-R, Brunner-Weinzierl MC. CD25 regulatory T cells determine secondary but not primary remission in EAE: impact on long-term disease progression. JNeuroimmunol 2006; 172(1-2): 73-84.
14. Yan Y, Zhang GX, Gran B, Fallarino F, Yu S, Li H, et al. IDO upregulates regulatory T cells via tryptophan catabolite and suppresses encephalitogenic T cell responses in experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol 2010; 185(10): 5953-5961.
15. Abdolahi M, Yavari P, Honarvar NM, Bitarafan S, Mahmoudi M, Saboor-Yaraghi AA. Molecular mechanisms of the action of vitamin A in Th17/Treg axis in multiple sclerosis. JMol Neurosci 2015; 57(4): 605-613.
16. Do JS, Visperas A, Sanogo YO, Bechtel JJ, Dvorina N, Kim S, et al. An IL-27/Lag3 axis enhances Foxp3+ regulatory T cell–suppressive function and therapeutic efficacy. Mucosal Immunol 2016; 9(1): 137-145.
17. Do J, Kim D ,Kim S, Valentin-Torres A, Dvorina N, Jang E, et al. Treg-specific IL-27Ralpha deletion uncovers a key role for IL-27 in Treg function to control autoimmunity. Proc Natl Acad Sci U S A 2017; 114(38): 10190-1015.
18. Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A , Schadt E, Garren H, et al. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. Nat Med 2002; 8(5): 500-508.
19. Fitzgerald DC, Ciric B, Touil T, Harle H, Grammatikopolou J, Sarma JD, et al. Suppressive effect of IL-27 on encephalitogenic Th17 cells and the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol 2007; 179(5): 3268-3275.
20. Zhao M, Tan Y, Peng Q, Huang C, Guo Y, Liang G, et al. IL-6/STAT3 pathway induced deficiency of RFX1 contributes to Th17-dependent autoimmune diseases via epigenetic regulation. Nat Commun 2018; 9(1): 583.
21. Nagashima H, Ishii N, So T. Regulation of Interleukin-6 Receptor Signaling by TNF Receptor-Associated Factor 2 and 5 During Differentiation of Inflammatory CD4+ T Cells. Front Immunol 2018; 9: 1986.
22. Danikowski K, Jayaraman S, Prabhakar B. Regulatory T cells in multiple sclerosis and myasthenia gravis. J Neuroinflamm 2017; 14(1): 117.
23. Kwilasz A, Grace P, Serbedzija P, Maier S, Watkins L. The therapeutic potential of interleukin-10 in neuroimmune diseases. Neuropharmacology 2015; 96(ptA): 55-69.
24. Guo B. IL-10 modulates Th17 pathogenicity during autoimmune diseases. J Clin Cell Immunol 2016; 7(2): 400.

www.SID.ir