گوارش/ دوره ۱۸، شماره ۱/ بهار ۱۳۹۲/ ۱۵-۷

مقاله پژوهشی

# تولید اختصاصی اینترلوکین IL-10 توسط سلولهای T تنظیمی $CD4^+,CD25^+$ در بیماران آلوده به فرم مزمن HCV

طیبه هاشمپور[۱]، طراوت بامداد[۲]، جواد آراسته[۳]، رحمان امام زاده[۴]، ریحانه اسدی[۱]، شاهین مرات[۵]

[۱] پژوهشگر، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۲] دانشیار، ویروس شناسی پزشکی، گروه ویروس شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
[۳] استادیار، ایمنی شناسی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز، تهران، ایران
[۴] استادیار، بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
[۵] استاد، مرکز تحقیقات بیماریهای گوارش و کبد، بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

## چکیده

**زمینه و هدف:**
تاکنون دلایل واضحی برای عدم وجود پاسخ موثر ضد ویروسی در بیماران آلوده به شکل مزمن هپاتیت C[1] (HCV) وجود ندارد. گرچه به نظر می رسد که ناهنجاریهای متعددی در ایمنی ذاتی و اکتسابی باعث مزمن شدن این ویروس می شود، اما تولید سیتوکین های اختصاصی این ویروس همانند IL-10 ممکن است در پیشرفت بیماری به سمت فاز مزمن موثر باشد. تولید IL-10 توسط جمعیتی از سلول های T که فعالیت تنظیمی دارند (Tregs) می تواند یکی از راهکارهای ویروس جهت منحرف کردن پاسخ ضد ویروسی باشد. در این مطالعه برای اولین بار شبیه سازی از شرایط فیزیولوژیک افراد بیمار صورت گرفته است تا بدین ترتیب نقش آنتی ژن core در افزایش فرکانس تولید IL-10 در Tregs بررسی شود.

**روش بررسی:**
جهت بررسی اثر HCV-core بر روی تولید IL-10 ، سلول های تک هسته ای خون محیطی (PBMCs) ۱۶ بیمار که به شکل مزمن HCV آلوده بودند و نیز ۶ نفر به عنوان کنترل مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور PBMCs از گروه های مختلف جدا شد و در محیط کشت توسط آنتی ژن core و در کنار آنتی بادی های کمک محرک تحریک شد. سپس با استفاده از روش فلوسایتومتری سه رنگی دستی، فرکانس سلولهای $CD4^+,CD25^+$ مولد IL-10 ارزیابی شد.

**یافته ها:**
در این مطالعه نشان داده شده است که به دنبال انکوباسیون PBMCs با آنتی ژن HCV-core، جمعیت سلول های T تنظیمی $CD4^+,CD25^+,IL\text{-}10^+$ در افراد آلوده به HCV افزایش داشته است اما در گروه کنترل افزایش مشاهده نشده است.

**نتیجه گیری:**
نتایج این مطالعه از این فرضیه که در هنگام عفونت HCV، سلول های T تنظیمی اختصاصی $CD4^+,CD25^+,IL\text{-}10^+$ می توانند موجب تحمل پاسخ ایمنی شوند، حمایت می کند. به نظر می رسد که در طراحی کاندیدهای واکسن علیه HCV نباید از اپی توپهائی که تولید IL-10 را باعث می شوند، استفاده کرد.

**کلید واژه:** سلول های T تنظیمی ، عفونت ویروس هپاتیت C، آنتی ژن core

*گوارش/ دوره ۱۸، شماره۱/ بهار ۱۳۹۲/ ۱۵-۷*

1. Hepatitis C Virus

**نویسنده مسئول:** شاهین مرآت
تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، مرکز تحقیقات گوارش و کبد
تلفن:۰۲۱-۸۲۴۱۵۳۰۰
نمابر:۰۲۱-۸۲۴۱۵۴۰۰
پست الکترونیک: merat@ams.ac.ir

تاریخ دریافت : ۹۱/۹/۶
تاریخ اصلاح نهایی : ۹۱/۱۲/۳
تاریخ پذیرش : ۹۱/۱۲/۵

## زمینه و هدف:

ویروس هپاتیت C ( Hepatitis C virus,HCV ) از جمله مهم ترین عوامل بیماری های عفونی کبدی در انسان است.(۱) درگیری کبد و اختلالات حاصل از این ویروس به صور مختلف چون هپاتیت حاد و مزمن بروز می نماید.(۲و۳) مکانیسمی که منجر به مزمن شدن HCV می شود هنوز شناخته نشده است. تصور می شود که پاسخ ایمنی ایجاد شده بر ضد HCV ، به قدری ضعیف باشد که قادر به پاکسازی تمامی سلول های کبدی آلوده نباشد. در تعدادی از گزارش ها آمده است که


www.SID.ir

از جمله عوامل مزمن شدن این عفونت، می تواند عدم وجود تحریک کافی برای شروع پاسخ ایمنی باشد که ممکن است به دلایل مختلفی چون کافی و مناسب نبودن میزان آنتی ژن و سیگنال های کمک محرک، نوع سلول APC و پروفایل سیتوکینی سلول های T در فاز حاد عفونت باشد .(۴) بر خلاف سیتوکین های وابسته به Th1، تعدادی از سیتوکین ها مانع از ریشه کنی HCV می شوند که از جمله این سیتوکین ها می توان به IL-10 اشاره کرد.(۵) به طور کلی IL-10 یک سیتوکین تنظیم کننده سیستم ایمنی است که در موش و انسان توسط سلول های مختلفی از جمله منوسیت ها، ماکروفاژها، سلولهای B، سلولهای $T\ CD4^+$ و T CD8 تولید می شود .(۸-۶) نشان داده شده است که IL-10 می تواند به طور مستقیم از تولید سیتوکین توسط سلول های T در vitro جلوگیری کند. (۹) علاوه بر این که می تواند مانع از بلوغ سلول های دندریتیک شود ، بدین ترتیب فعال کردن سلول های T و سایر سلول ها توسط APC به طور موثر صورت نمی گیرد. هم چنین این سیتوکین موجب بلوکه شدن تولید سیتوکین های پیش التهابی (Pro-inflammatory)، کمک محرک ها، بیان MHC II و نیز تولید کموکین می شود.(۱۰) در تعدادی از مطالعات، افزایش سیستماتیک IL-10 در افراد آلوده به HCV گزارش شده است.(۱۱و۱۲) در مطالعات مختلفی تولید IL-10 توسط سلول های تک هسته ای خون محیطی (PBMCs) در افراده آلوده به HCV بررسی شده است که در اکثر آنها افزایش تولید IL-10 اتفاق افتاده است.(۱۴و۱۳) به طور کلی در عفونت HCV ، یکی از آنتی ژن هایی که موجب تولید IL-10 می شود پروتئین core است.(۱۵و۱۶). در مطالعه ای مشخص شده است که تولید IL-10 بدنبال تحریک PBMCs توسط core در افرادی که در فاز مزمن هستند نسبت به افرادی که ریشه کنی ویروس در آنها خود به خود صورت گرفته است بیشتر بوده است.(۱۷) بنابراین احتمال می رود که پروتئین core ، موجب خاموش شدن پاسخ ایمنی میزبان شود. برای مثال نشان داده شده است که بیان پروتئین core در حین عفونت همزمان HCV و واکسینیا، باعث سرکوب پاسخ سلول های T سیتوتوکسیک اختصاصی واکسینیا نیز شده است.(۱۸) هم چنین این پروتئین از تولید اینترفرون گاما (IFN-γ) جلوگیری کرده است.(۲۲-۱۹) بر پایه این نتایج می توان پیشنهاد کرد که احتمالا HCV-core به عنوان یک تنظیم کننده ایمنی به نحوی عمل می کند تا عفونت HCV به سمت فاز مزمن پیش رود.(۲۳و۲۴) اما نتیجه تحقیقات در این زمینه هنوز به قطعیت نرسیده است.(۲۶و۲۵) در پژوهشی نشان داده شده است که میزان قابل توجهی از IL-10 در هنگام عفونت تولید می شود که می تواند با شکل گیری گروه های خاصی از سلول های سرکوب کننده مرتبط باشد. (۱۱) هم چنین در مطالعات اخیر نشان داده شده است که در مزمن شدن عفونت HCV جمعیتی از سلول های $T\ CD4$ با نام سلولهای T تنظیمی (Regulatory T Cells, Tregs) نقش ایفا می کنند. یکی از زیر گروه های Tregs، سلول های T تنظیمی القائی (Induced Tregs,iTregs) است.(۲۷) گزارش شده است که سلول های T تنظیمی در خون محیطی افراد آلوده به HCV به میزان زیادی IL-10 تولید می کنند و در مزمن شدن عفونت HCV نقش دارند.(۲۸و۲۹) به طور کلی جهت بکار گیری و جهت دهی های احتمالی Tregs برای اهداف بالینی نیاز است که مطالعات بیشتری صورت گیرد تا بتوان فعالیت و تکثیر این سلول ها را با توجه به هدف مورد نظر پیش برد.(۳۰) برای همین منظور شناخت پروتئین هایی از HCV که بتواند باعث القا یا تکثیر Tregs شود، می تواند به کنترل بیماری و پیشگیری از مزمن شدن آن کمک نماید. بر خلاف تحقیقات وسیعی که در این زمینه در حال انجام است، هنوز ناشناخته های زیادی در زمینه های مختلف Tregs از جمله عملکرد آن، مارکرها و روش های مطالعه این سلول وجود دارد. از آنجا که هنوز نقش آنتی ژن core در عفونت HCV کاملا مشخص نشده است، در این مطالعه تحریک PBMCs توسط پروتئین کامل core انجام و نقش این پروتئین در تولید اختصاصی IL-10 از طریق سلول های $T\ CD4^+,CD25^+$ بررسی شده است. در این مطالعه برای تشخیص جمعیتی از سلول های T تنظیمی از روش فلوسایتومتری سه رنگی و با استفاده از مارکرهای CD4، CD25 و IL-10 (۳۵- ۲۸) در میان جمعیت PBMCs استفاده شد تا بدین ترتیب بتوان به نتایج نزدیک تری به بر هم کنش شرایط طبیعی بدن با HCV دست یافت.

## روش بررسی:

### بیماران

این مطالعه بر روی ۱۶ بیمار آلوده به شکل مزمن بیماری HCV مراجعه کننده به مرکز تحقیقات گوارش و کبد بیمارستان شریعتی دانشگاه علوم پزشکی تهران و نیز ۶ نفر به عنوان گروه کنترل انجام شد. بیماران مراجعه کننده به این مرکز از جهت آنتی بادی علیه HIV و HBV توسط کیت های تجاری الیزا "ارگانم" ساخت بلژیک مورد بررسی قرار گرفتند و سابقه این عفونت در آنها مشاهده نشد. نمونه های کنترل افرادی بودند که سابقه مواجهه با این ویروس را نداشته و از سازمان انتقال خون ایران گرفته شدند.

### آنتی بادی های مورد استفاده در فلوسایتومتری

برای انجام تکنیک فلوسایتومتری، آنتی بادی های مورد نیاز و نیز ایزوتایپ های مرتبط از شرکت BD آمریکا خریداری شد (جدول ۱).

### جداسازی سلول های تک هسته ای خون محیطی

خونگیری در لوله های حاوی EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid ) از افراد تحت آزمایش صورت گرفت. به دنبال آن جداسازی PBMCs توسط روش گرادیان فایکلول انجام شد. به طور خلاصه نمونه های خونی به میزان ۱:۱ با PBS (Phosphate Buffered

Archive of SID


www.SID.ir

جدول ۱: مشخصات آنتی بادی های به کار رفته برای تشخیص سلول های T تنظیمی

| نام ترکیب | شماره کاتالوگ | نوع کونژووگه | تهیه شده از |
|---|---|---|---|
| Anti-Human-CD4 antibody | ۵۵۵۳۴۶ | FITC | BD PharMigen, CA, USA |
| Mouse IgG1 isotyoe control antibody | ۵۵۵۷۴۸ | FITC | BD PharMigen, CA, USA |
| Anti-Human CD25 antibody | ۳۳۵۸۲۴ | PE-Cy7 | BD PharMigen, CA, USA |
| Mouse IgG1 isotyoe control antibody | ۵۵۷۶۴۶ | PE-Cy7 | BD PharMigen, CA, USA |
| Anti-Human IL-10 antibody | ۵۵۹۳۳۷ | PE | BD PharMigen, CA, USA |
| Rabbit IgG1 isotyoe control antibody | ۵۵۹۳۱۸ | PE | BD PharMigen, CA, USA |

Saline) مخلوط و بر روی فایکول (لیمفوپرپ، آکسیس) با نسبت برابر برده و به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۹ g در دمای اتاق سانتریفوژ شدند. بعد از دور ریختن فاز روئی (پلاسما)، لایه PBMCs جدا و در PBS ریخته و برای مدت ۱۰ دقیقه در ۱۷ g شسته شدند. در نهایت سلول ها در محیط کشت کامل RPMI-1640 (گیبکو) حاوی گلوتامین (۲ mM)، سرم جنین گاوی (۱۰٪) (گیبکو) پنی سیلین (۵۰ U/ml) و استرپتومایسین (۵۰ µg/ml) نگهداری شدند. میزان زنده بودن سلول ها به وسیله تریپان بلو بیشتر از ۹۰٪ بدست آمد.

### بهینه سازی تشخیص سلول های $CD4^+,CD25^+,IL\text{-}10^+$ T توسط تکنیک فلوسایتومتری سه رنگی

در مرحله اول این مطالعه میزان آنتی بادی های Anti-CD4-FITC و Anti-CD25-PE-Cy-7 و Anti-IL-10-PE در آزمایش های مکرر بهینه سازی و سپس نحوه انجام رنگ آمیزی همزمان نشانگر داخل سلولی و خارج سلولی مورد ارزیابی قرار گرفت. به طور کلی بعد از جداسازی PBMCs، تعداد $10^5 \times 2$ سلول را در لوله های فلوسایتومتری قرار داده، توسط بافر شستشوی سرد (PBS حاوی ۱۰٪ سرم و ۱mM ETDA) سلول ها را شسته و با استفاده از پارافرمالدئید ۴٪ (سیگما) به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ مرحله فیکساسیون انجام شد. بعد از شستشوی سلول ها، با استفاده از رقت ۰/۱٪ تریتون ایکس ۱۰۰ (Triton X-100) (سیگما) نفوذپذیری سلول ها صورت گرفت. مرحله بعد بلاکینگ توسط سرم خرگوشی ۱۰٪ برای مدت ۱۵ دقیقه بر روی یخ انجام شد. این مرحله انتخابی است. در ادامه سلول ها با رقت مناسب از آنتی بادی ضد IL-10 به مدت ۴۵ دقیقه در تاریکی و بر روی یخ انکوبه شدند. بعد از انجام مرحله شستشو، بلاکینگ توسط سرم موشی ۱۰٪ برای مدت ۱۵ دقیقه بر روی یخ انجام شد. این مرحله نیز انتخابی است. در ادامه سلول ها با رقت مناسب از آنتی بادی های سطحی ضد CD4 و CD25 برای مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ و در تاریکی انکوبه و سپس شسته شدند و در نهایت نمونه ها در پارافرمالدهید ۲٪ سوسپانسیون و سریعا جهت آنالیز به پژوهشکده رویان ارسال شدند. ایزوتایپ های متناسب با آنتی بادی های سطحی و داخل سلولی جهت ارزیابی و حذف باندهای غیر اختصاصی و جلوگیری از نتایج کاذب استفاده شد. فلوسایتومتری با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری (بکتون دیکنسون) و توسط نرم افزارCellQuest software انجام شد. برای هر آنالیز، ده هزار سلول شمارش شد.

### تحریک اختصاصی PBMCs

جهت شناسائی سلول های T تنظیمی از مارکرهای CD4، CD25 و IL-10 استفاده شد. در این مطالعه درصد سلول های $CD4^+,CD25^+,IL\text{-}10^+$ T خون محیطی افراد سالم و بیمار اندازه گیری شد و همزمان با آن، جهت بررسی تکثیر اختصاصی سلول های این جمعیت سلولی در عفونت HCV، تعداد µl ۲۰۰/$10^5 \times 2$ از PBMCs به چاهک های ۹۶ خانه (بی دی، فارمینژن) اضافه شد. در چاهک هائی که اثر HCV-core بررسی می شد، آنتی بادی ضد CD49d(1gµ /mL) (ای بایوساینس)، آنتی بادی ضد CD28(1gµ /mL) (ای بایوساینس) و آنتی ژن core (10gµ /mL) اضافه شد. آنتی ژن core به صورت هدیه از دکتر ژان پیر (فرانسه) دریافت شد. در چاهک های کنترل منفی برای افراد بیمار و سالم، سلول ها در کنار محیط کشت در انکوباتور قرار گرفتند. به چاهک هائی که به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده بود همان تعداد PBMCs و نیز اینومایسین (Ionomycin,IO)(500ng /mL) و پی إم إی (Phorbol myristate acetate,PMA)(20ng /mL) اضافه شد. استفاده از آنتی بادی های کمک محرک، تحریک بهینه را برای سلول های T فراهم می کند.(۳۶) به تمامی چاهک ها بعد از گذشت مدت زمان ۲ ساعت، برفلدین A (Brefeldin A,BFA) به میزان 1gµ /mL اضافه شد. تمامی پلیت های کشت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و $CO_2$ دار (۵٪) به مدت ۱۶ ساعت قرار داده شد. به دنبال آن فلوسایتومتری بر روی سلول ها صورت گرفت.

### بررسی آماری

قبل از انجام هر آزمونی نرمال بودن داده ها از طریق انجام آزمون Kolmogorov-Smirnov تست شد و چون داده ها نرمال بودند از


www.SID.ir
Archive of SID

آزمون های پارامتریک استفاده شد. برای مقایسه داده های قبل و بعد در هر گروه از آزمون t زوج استفاده شد و پس از آن برای مقایسه گروه های بعد از One way ANOVA استفاده شد و برای مقایسه دو به دو از آزمون Tukey Post-hoc استفاده شد.

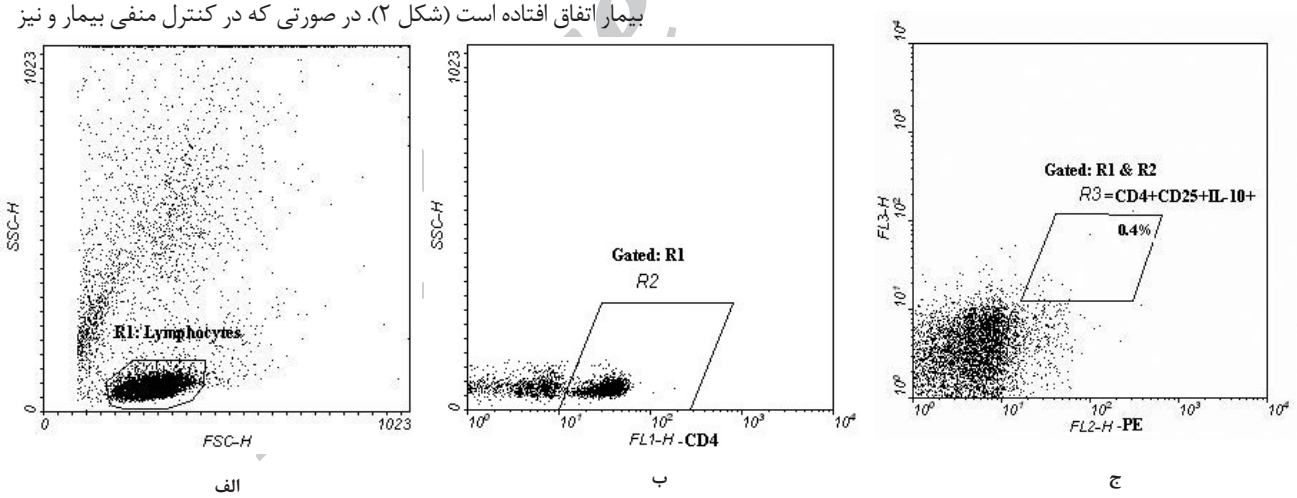
## یافته ها :

### تشخیص سلول های T $CD4^+,CD25^+,IL\text{-}10^+$

سلول های T تنظیمی، جمعیت های مختلفی را شامل می شوند که دسته ای از آنها، لنفوسیت های CD4 مثبت هستند که مارکرهای CD25 و IL-10 را بیان می کنند.(۲۸و۳۵-۳۰). بدنبال جداسازی PBMCs از نمونه خونی افراد سالم، تشخیص سلولهای Tr1 بهینه شد. برای این منظور در ابتدا رقت بهینه آنتی بادی های مختلف سطحی CD25 و CD4، توسط آزمایش های تیتراسیون مشخص شد. میزان مناسب آنتی بادی ضد CD25، 1µl از استوک (Stock) آنتی بادی بود و برای آنتی بادی ضد CD4، 1µl از استوک آنتی بادی به حجم ۲۰ µl رسانده شد و سپس به سلول ها اضافه شد. درصد متوسط سلول های CD4 مثبت و CD25 به ترتیب ۵۰ و ۲-۱ بود. در نهایت با انجام رنگ آمیزی سه رنگی با استفاده از آنتی بادی های ضد CD4 و CD25 و IL-10، درصد سلول های T تنظیمی در افراد کنترل تشخیص داده شد (شکل ۱)

این مطالعه استفاده شد. برای بررسی این که آیا آنتی ژن core می تواند باعث تولید اختصاصی IL-10 در محیط آزمایشگاه شود، PBMCs افراد آلوده و سالم به مدت ۱۶ ساعت با آنتی ژن core در کنار آنتی بادی های کمک محرک، تحریک شدند و سپس بیان همزمان مارکرهای CD4,CD25 و IL-10 توسط تکنیک فلوسایتومتری بر روی PBMCs بررسی شد. در شکل ۲ نشان داده شده است که به دنبال تحریک PBMCs، درصد سلول های $CD4^+,CD25^+,IL\text{-}10^+$ در گروه کنترل منفی(۰/۰۲٪±۰/۰۴۸٪) با مقدار قبل(۰/۰۱٪±۰/۴۰٪) از آن تفاوت معنی دار نداشته است که نشانگر آن است که محیط کشت بر تعداد این دسته از سلول ها، تاثیری نداشته است. اما در صد این سلول ها در گروه تست نسبت به قبل و کنترل منفی افزایش معنی داری (paired t-test;$p$ <۰/۰۰۱ ۰/۱۰٪±۰/۲۱٪) را نشان می دهد که می توان نتیجه گرفت که پروتئین core به صورت اختصاصی موجب افزایش سلول های مذکور شده است. هم چنین مشاهده شد که میان گروه تست و گروه کنترل مثبت (Tukey: $p$ <۰/۰۰۱، ۰/۲۰٪±۲/۴۵٪) تفاوت معنی دار وجود داشته است که می توان به این نتجه رسید که اثر دو ماده IO و PMA بیشتر از اثر پروتئین core در افزایش سلول های $CD4^+,CD25^+,IL\text{-}10^+$ بوده است.

نتیجه حاصل نشانگر این بود که افزایش درصد سلول های $CD4^+,CD25^+,IL\text{-}10^+$ T تنها به دنبال تحریک با آنتی ژن core در افراد بیمار اتفاق افتاده است (شکل ۲). در صورتی که در کنترل منفی بیمار و نیز




الف ب ج

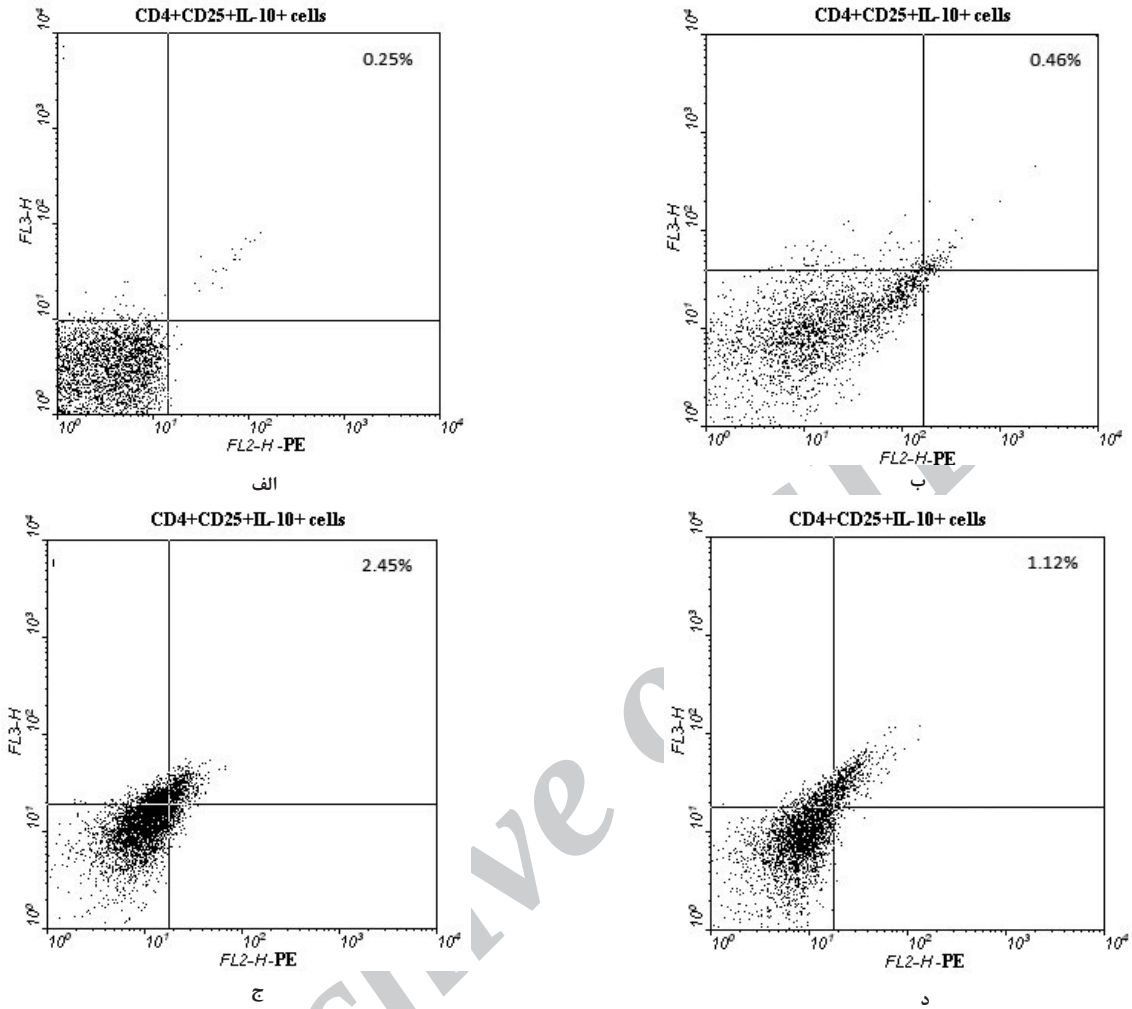
شکل ۱ : استراتژی گیت کردن سلول های PBMCs برای تشخیص سلولهای T تنظیمی $CD4^+,CD25^+,IL\text{-}10^+$: الف) در R1 جمعیتی از لنفوسیت ها بر اساس FSC و SCC گیت شده است که برای شناسائی سلولهای $CD4^+$ انتخاب شده اند. ب) R2 جمعیت لنفوستهای $CD4^+$ را نشان می دهد که از جمعیت سلول های R1 گرفته شده است. ج) در R3 فرکانس سلولهای $CD4^+,CD25^+,IL\text{-}10^+$ T در افراد سالم نشان داده شده است.

### افزایش فرکانس سلول های $CD4^+,CD25^+,IL\text{-}10^+$ T در افراد آلوده به HCV در پاسخ به آنتی ژن core

به علت این که پروتئین نوکلئوکپسید یا HCV-core یک محرک ایمنی هومورال و سلولی است (۲۴و۲۵)، بنابراین آنتی ژن core به عنوان محرک در

افراد سالم (۰/۰۱٪±۰/۰۲۵٪) افزایش سلول های این جمعیت سلولی معنی دار نبوده است (نمودار ۱). بنابراین در عفونت HCV، آنتی ژن core باعث القا اختصاصی سلول های T تنظیمی می شود.


www.SID.ir

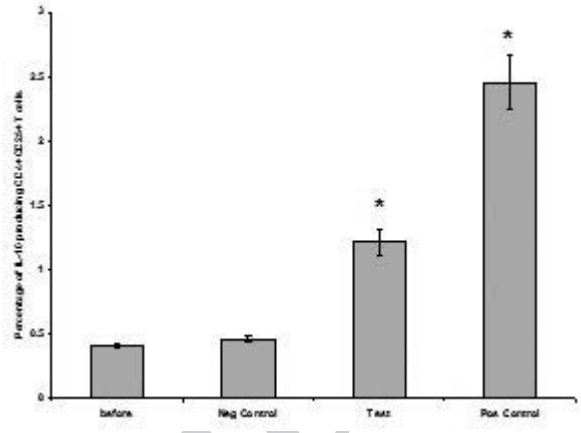



شکل ۲ : کشت PBMCs افراد آلوده و کنترل الف) تحریک سلول های افراد سالم به عنوان کنترل منفی در کنار آنتی بادی های کمک محرک anti-Cd49d ، anti-CD28 و آنتی ژن core که نتایج نشان دادافزایش سلولهای $CD4^{+},CD25^{+},IL\text{-}10^{+}$ T معنادار نبوده است. ب) کشت سلول های افراد آلوده به عنوان کنترل منفی بدون حضور آنتی ژن core که نتایج نشان داد افزایش این جمعیت سلولی معنادار نبوده است. ج) تست سلول های افراد آلوده که افزایش این سلول ها معنی دار بوده است. د) کنترل مثبت

## بحث :

به طور کلی مبنای درمان های ضدویروسی اثر مستقیم بر روی تعداد سلول های T اختصاصی ویروس است. این روش گرچه برای ریشه کنی تعدادی از عفونت ها موثر بوده اما در اکثر موارد برای ریشه کنی عفونت های ویروسی مزمن موثر نبوده است. ویروس ها با استفاده از راهکارهای مختلف از جمله سرکوب سیستم ایمنی به واسطه ایجاد نقصان در عملکرد سلول T، مانع از شناسایی خود توسط سیستم ایمنی می شوند علاوه بر این که با انحراف سیستم ایمنی به سمت تولید سیتوکین هایی چون IL-10، منجر به تضعیف عملکرد سلول T می شوند. مشخص شده است که القاء تولید IL-10 یک راهکاری است که توسط ویروس های مختلف جهت سرکوب و فرار از سیستم ایمنی ضدویروسی اعمال می شود. مشاهدات اخیر نشان داده است که خنثی کردن اثر IL-10، موجب بهبود عفونت مزمن ویروسی شده است، بنابراین درمان سایر عفونت های مزمن که با تیتر بالای IL-10 مرتبط است می تواند با خنثی کردن موقتی عملکرد IL-10 ممکن شود که در این صورت چون افت فعالیت سیستم ایمنی میزبان به صورت گذرا اتفاق می افتد، بیماری های اتوایمیون در میزبان بروز نمی کند.(۳۸و۳۹) در مطالعه ای نشان داده شده است عفونت لیشمانیا در موشهایی که IL-10 را تولید نمی کردند یا در موشهایی که IL-10 در آنها بلوکه شده، ریشه کن شده است.(۴۰) در مطالعه دیگری گزارش شده است که IL-10 در پیشرفت عفونت در موش ها به سمت فاز مزمن نقش دارد.(۴۱) در یک بررسی بالینی نشان داده شده است که وقتی IL-10 به صورت اگزوژن به افرادی که در فاز مزمن عفونت هستند تزریق شود از پاسخ اختصاصی علیه HCV جلوگیری می کند.(۳۹) علاوه بر این مشخص شده است که وجود پلی مورفیسم (nucleotide pol morphism) در ناحیه IL-10، موجب پاک سازی طبیعی HCV در بعضی از جمعیت ها می شود.(۴۲) با انجام مطالعات بالینی مختلفی که


www.SID.ir




نمودار ۱: مقایسه درصد سلول های $CD4^+,CD25^+,IL\text{-}10^+$ به دنبال تحریک با آنتی ژن core در گروه های مختلف.

**Before**: درصد سلول های $CD4^+,CD25^+,IL\text{-}10^+$ درخون محیطی افراد آلوده به HCV قبل ازکشت. **Neg Control**: درصد سلول های $CD4^+,CD25^+,IL\text{-}10^+$ به دنبال کشت PBMCs در محیط کشت. **Test**: درصد سلول های $CD4^+,CD25^+,IL\text{-}10^+$ به دنبال کشت PBMCs و تحریک آن توسط پروتئین core در محیط کشت. **Pos Control**: درصد سلول های $CD4^+,CD25^+,IL\text{-}10^+$ به دنبال کشت PBMCs و تحریک آن توسط PHA. *: $p$ نشانگر اختلاف معنی دار با گروه before با استفاده از paired t-test.

در زمینه عفونت HCV صورت گرفته است این فرضیه که سیگنالینگ IL-10 ممکن است بر روی عفونت مزمن ویروسی و عوارض ثانویه اثر داشته باشد به تائید بیشتر رسیده است. در یک پژوهش با استفاده از آنتی بادی منوکلونال ضد IL-10 موفق شدند فعالیت سلول های T افرادی که در فاز مزمن هستند را دوباره احیا کنند.(۴۳) به طور کلی دسته از سلول های T تنظیمی با تولید IL-10 موجب افزایش تولید IL-10 توسط سایر سلول ها نیز می شوند.(۴۴و۴۵) در پژوهشی نشان داده شده است که تولید IL-10 توسط Tregs می تواند منجر به تضعیف عملکرد ماکروفاژ جهت حذف انگل های داخل سلولی شود.(۴۰) بر پایه مطالعاتی که بر روی شامپانزه انجام شده است به این نتیجه رسیده اند که عفونت HCV با القاء سلولهای T فعال شده با نشانگر $CD4^+,CD25^-$ منجر به تولید تعدادی از سلول های Treg با نشانگر $CD4^+,CD25^+$ می شود.(۴۶) در مطالعه ای دیگرگزارش شده است که Tregs به صورت اختصاصی علیه IL-10، HCV تولید می کند که می تواند باعث پیشرفت بیماری به سمت فاز مزمن شود.(۴۱) به طور کلی گرچه درصدTregs تولید کننده IL-10 کم است، اما همین درصد کم می تواند یکی از مکانیسم های HCV برای فرار از سیستم ایمنی باشد که این مساله می تواند در تولید واکسن کاربرد داشته باشد.(۳۰) با توجه به این که در پاتوژنز HCV جمعیت های مختلف Treg نقش ایفا می کنند اما در مورد نحوه القاء و عملکرد Treg و نیز نقش جمعیت های مختلف Treg در ارتباط با ایمنی اختصاصی HCV اطلاعات چندانی وجود ندارد، بنابراین با پاسخ به سوالات پایه، احتمال دستیابی به دیگر راه های درمان HCV ممکن می شود.(۴۶و۴۷) به طور کلی در این مطالعه جهت شناسایی بیشتر مکانیسم های مزمن شدن HCV، به بررسی اثر آنتی ژن core بر روی PBMCs پرداخته شد. با استفاده از روش دستی که برای شناسایی سلول‌های $CD4^+,CD25^+,IL\text{-}10^+$ T استفاده شد، درصد سلول های CD4 مثبت، سلول های CD25 مثبت و $CD4^+,CD25^+,IL\text{-}10^+$ در میان PBMCs افراد سالم به ترتیب ۵۰٪، ۱/۴۵٪ و ۰/۴٪ ارزیابی شد که با گزارش های قبل مطابقت داشت.(۳۰و۴۹-۴۸) نتایج این مطالعه نشان دهنده این است که جمعیت سلول های $CD4^+,CD25^+,IL\text{-}10^+$ T به دنبال تحریک با آنتی ژن core در افراد آلوده به HCV در مقایسه با افراد سالم افزایش می یابد. این نتایج در راستای مطالعه ای است که توسط کابریرا (Cabrera) انجام شد که در آن مطالعه فرکانس سلول های $CD4^+,CD25^+,IL\text{-}10^+$ در افرادی که در فاز مزمن بیماری هستند در مقایسه با گروه کنترل، بعد ازتحریک CD4 T با core افزایش داشته است که نشان دهنده ارتباط آنتی ژن core و سلول های T تنظیمی با عفونت مزمن HCV است.(۳۰) این نتیجه در مطالعه بلاچی (Bola chi) نیز تکرار شده است. در این مطالعات تحریک سلولهای CD4 T توسط آنتی ژن های HCV، باعث القاء Tregs شده است اما اثر این آنتی ژن ها بر روی PBMCs بررسی نشده است و به این دلیل در این مطالعه اثر آنتی ژن core بر PBMCs بررسی شده است.(۲۹) به طور کلی نتایج این مطالعه نشان دهنده آن است که Tregs نسبت به آنتی ژن core اختصاصیت دارد و نیز این که احتمال می رود که آنتی ژن core با افزایش Tregs بتواند باعث مزمن شدن عفونت HCV شود. بر خلاف مطالعات دیگر که رفتار Tregs در میان سلول های CD4 T جدا سازی شده از خون محیطی ارزیابی شده است، در این بررسی از PBMCs استفاده شد تا مدل سازی دقیق تری از عفونت HCV مهیا شود. علاوه بر این با استفاده از روش مذکور، از خرید کیت های جداسازی CD4 T که بسیار گران هستند و علاوه بر زمان بر بودن مراحل انجام آزمایش، به میزان زیادی نمونه خونی هم نیاز دارد جلوگیری شد. در واقع طبیعت شناسایی آنتی ژن توسط Tregs در هنگام عفونت، یک مرحله مقدماتی جهت طراحی استراتژی های مرتبط با عملکرد Tregs در هنگام عفونت است. به نظر می رسد برای طراحی واکسن های ضد ویروسی، از اپی توپهایی که موجب تحریک شدید Tregs می شوند باید اجتناب کرد.(۳۰)

## نتیجه گیری:

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، نتیجه گیری می شود که سلول های $CD4^+,CD25^+,IL\text{-}10^+$ T در عفونت HCV برای آنتی ژن اختصاصیت دارد و نیز این که یکی از مکانیسم های مزمن شدن عفونت HCV، افزایش سلول های T تنظیمی به واسطه HCV-core است که

Archive of SID


www.SID.ir

این نتیجه می تواند در جهت دهی به اســتراتژی های پیشــگیری و درمانی HCV بسیار کمک کننده باشد.

**سپاسگزاری:**

این مقاله حاصل پروژه پایان نامه دکتری رشته ویروس شناسی پزشکی می باشــد که با حمایت مالی مرکز تحقیقات کبد و گوارش دانشــگاه علوم پزشکی تهران و نیز دانشگاه تربیت مدرس به انجام رسیده است. نویسندگان این مقاله مراتب تشکر وقدردانی خود را از دکتر علی نسیمی جهت مشاوره آماری، دکتر آلبرتو برگامینی، دکتر ژان پیر و دکتر شــهرام کردستی جهت مشاوره علمی اعلام می دارد. هم چنین از پرسنل بیمارستان شریعتی تهران و سازمان انتقال خون تهران تشکر و سپاسگزاری می نماید.

## REFERENCES

1. Love RA,Parge HE,Wickersham JA. The crystal structure of hepatitis C virus NS3 proteinase reveals a trypsin-like fold and a structural zinc binding site. *Cell* 1996;87:331-42.
2. Alter H. Natural history and clinical aspects of hepatitis C virus infection Therapies for viral hepatitis. London, United Kingdom: I*nternational Medical Press*; 1998. pp. 43–50.
3. Dhumeaux D, Doffoel M, Galmiche JP. A French consensus conference on hepatitis C; screening and treatment. *J Hepatol* 1997;27:941-4.
4. McGravey MJ, Houghton M. Structure and Molecular virology: Viral hepatitis. 3rd ed. *Blackwell Publishers* 2005: chapter 39.
5. Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* 2001;19:65–91.
6. Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993;11165–90.
7. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19683–765.
8. Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol* 2004;22929–79.
9. Malefyt WR, Yssel H, Vries JE. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J Immunol* 1993;150:4754–65.
10. Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, et al. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 1991;146:3444–51.
11. Accapezzato D, Francavilla V, Paroli M, Casciaro M, Chircu LV, Cividini A, et al. Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8+ T cell population in chronic hepatitis C virus infection. *J Clin Invest* 2004;113:963–72.
12. Woitas RP, Petersen U, Moshage D, Brackmann HH, Matz B, Sauerbruch T, et al. HCV-specific cytokine induction in monocytes of patients with different outcomes of hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2002;8:562–6.
13. Kakumu S, Okumura A, Ishikawa T, Iwata K, Yano M, Yoshioka K. Production of interleukins 10 and 12 by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in chronic hepatitis C virus (HCV) infection. *Clin Exp Immunol* 1997;108:138–43.
14. Piazzola G, Tortorella C, Fiore G, Fanelli M, Pisconti A, Antonaci SJ. Interleukin-12 p40/p70 ratio and in vivo responsiveness to IFN-alpha treatment in chronic hepatitis C. *J Interferon Cytokine Res* 2001;21:453-61.
15. Woitas RP, Petersen U, Moshage D, Brackmann HH, Matz B, Sauerbruch T, et al. HCV-specific cytokine induction in monocytes of patients with different outcomes of hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2002;8:562–6.
16. Barrett L, Gallant M, Howley C, Bowmer MI, Hirsch G, Peltekian K, et al. Enhanced IL-10 production in response to hepatitis C virus proteins by peripheral blood mononuclear cells from human immunodeficiency virus-monoinfected individuals. *BMC Immunol* 2008,9:28.
17. Martin-Blondel G, Gales A, Bernad J, Cuzin L, Delobel P, Barange K, et al. Low interleukin-10 production by monocytes of patients with a self-limiting hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2009;16:485–91.
18. Lemon SM, Walker C, Alter MJ, Yi M. Hepatitis C virus: Fields Virology. 5th ed., Lippincott Williams &Wilkins publication;2007.
19. Kittlesen DJ, Chianese-Bullock KA, Yao ZQ, Braciale TJ, Hahn YS. Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation, *J Clin Invest* 2000;106:1239–49.
20. Yao ZQ, Eisen-Vandervelde A, Ray S, Hahn YS. HCV core/gC1qR interaction arrests T cell cycle progression through stabilization of the cell cycle inhibitor p27Kip1. *Virology* 2003;314:271-82.
21. Yao ZQ, Eisen-Vandervelde A, Waggoner SN, Cale EM, Hahn YS. Direct binding of hepatitis C virus core to gC1qR on CD4+ and CD8+ T cells leads to impaired activation of Lck and Akt. *J Virol* 2004;78:6409-19.
22. Yao ZQ, Nguyen DT, Hiotellis AI, Hahn YS. Hepatitis C virus core protein inhibits human T lymphocyte responses by a complement-dependent regulatory pathway. *J Immunol* 2001;167:5264-72.
23. Eisen-Vandervelde AL, Waggoner SN, Yao ZQ, Cale EM, Hahn CS, Hahn YS. Hepatitis C virus core selectively suppresses interleukin-12 synthesis in human macrophages by interfering with AP-1 activation. *J Biol Chem* 2004;279:43479-86.
24. Large MK, Kittlesen DJ, Hahn YS. Suppression of host

Archive of SID


www.SID.ir

immune response by the core protein of hepatitis C virus: possible implications for hepatitis C virus persistence. *J Immunol* 1999;162:931-8.
25. Sun J, Bodola F, Fan X, Irshad H, Soong L, Lemon, et al. Hepatitis C virus core and envelope proteins do not suppress the host's ability to clear a hepatic viral infection. *J Virol* 2001;75:11992-8.
26. Liu ZX, Nishida H, He JW, Lai MM, Feng N, Dennert G. Hepatitis C virus genotype 1b core protein does not exert immunomodulatory effects on virus-induced cellular immunity. *J Virol* 2002;76: 990-7.
27. Manigold T, Racanelli V. T-cell regulation by CD4 regulatory T cells during hepatitis B and C virus infections: facts and controversies. *Lancet Infect Dis* 2007;7:804–13.
28. Chakraborty NG, Chattopadhyay S, Mehrotra S, Chhabra A, Mukherji B. Regulatory T cell response and tumor vaccine-induced cytotoxic T lymphocytes in human melanoma. *Hum Immunol* 2004;65:794–802.
29. Carpentiera A, Contia F, Stenarda F, Aoudjehanea L, Mirouxb C, Podevina P, et al. Increased Expression of Regulatory Tr1 Cells in Recurrent Hepatitis C after Liver Transplantation. *Am J Transplant* 2009;9:2102–12.
30. Cabrera R, Tu Z, Xu Y, Firpi RJ, Rosen HR, Liu C, et al. An Immunomodulatory Role For CD4+CD25+Regulatory T Lymphocytes in Hepatitis C Virus Infection. *Hepatology* 2004;40:1062–71.
31. Francis JN, Till SJ, Durham SR. Induction of IL-10+CD4+CD25+ T cells by grass pollen immunotherapy. *J allergy clin immunol* 2003;111:1255-61.
32. Linga EM, Calderonb M, Nguyena D, Powriec K, Durhamb SR, Robinsona DS. Allergen immunotherapy increases suppressive activity by CD4+CD25-, IL-10 producing T cells, but does not affect suppression by CD4+CD25+ T cells. *J allergy clin immunol* 2004;113:109.
33. Yu XL, Cheng YM, Shi BS, Qian FX, Wang FB, Liu XN, et al. Measles virus infection in adults induces production of IL-10 and is associated with increased CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2008;181:7356-66.
34. Chakraborty NG, Chattopadhyay S, Mehrotra S, Chhabra A, Mukherji B. Regulatory T-Cell Response and Tumor Vaccine-induced Cytotoxic T Lymphocytes in Human Melanoma. *Hum Immunol* 2004;65:794–802.
35. Jutel M, Akdis M, Budak F, Aebischer-Casaulta C, Wrzyszcz M, Blaser K, et al. IL-10 and TGF- I cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol* 2003;33:1205-14.
36. Waldrop SL, Davis KA, Maino VC, Picker LJ. Normal human CD4+memory T cells display broad heterogenicity in their activation threshold for cytokine synthesis. *J Immunol* 1998;161:5284–95.
37. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* 1992;11:3887–3895.
38. Sharpe AH, Freeman GJ. The B7–CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002;2:116–26.
39. Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7–CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol* 2004;4:336–47.
40. Nelson DR, Tu Z, Soldevila-Pico C, Abdelmalek M, Zhu H, Xu YL, et al. Long-term interleukin 10 therapy in chronic hepatitis C patients has a proviral and anti-inflammatory effect. *Hepatology* 2003;38:859–68.
41. Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. *Nature* 2002;420:502–7.
42. Oleksyk TK, Thio CL, Truelove AL, Goedert JJ, Donfield SM, Kirk GD, et al. Single nucleotide polymorphisms and haplotypes in the IL10 region associated with HCV clearance. *Genes Immun* 2005;6:347–57.
43. Clerici M, Wynn TA, Berzofsky JA, Blatt SP, Hendrix CW, Sher A, et al. Role of interleukin-10 in T helper cell dysfunction in asymptomatic individuals infected with the human immunodeficiency virus. *J Clin Invest* 1994;93:768–75.
44. Jonuleit HE, Schmitt H, Kakirman M, Stassen M, Knop J, Enk AH. Infectious tolerance: human CD25+ regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4+ T helper cells. *J Exp Med* 2002;196:255.
45. Kearley J, Barker JE, Robinson DS, Lloyd CM. Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *J Exp Med* 2005;202:1539.
46. Dolganiuc A, Szabo G. T cells with regulatory activity in hepatitis C virus infection: what we know and what we don't. *J. Leukoc Biol* 2008;84:1–6.
47. Yang XH, Yamagiwa S, Ichida T, MatsudaY, Sugahara S, Watanabe H, et al. Increase of CD4 + CD25 + regulatory T-cells in the liver of patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2006;45:254–62.
48. Li Sh, Jones KL, Woollard DJ, Dromey J, Paukovics G, Plebanski M, et al. Defining target antigens for CD25+FOXP3+IFN- - regulatory T cells in chronic hepatitis C virus infection. *Immunol Cell Biol* 2007;85:197–204.
49. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman Gj, Hafler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001;167:1245-53.

Archive of SID


www.SID.ir

Original Article

# Antigen-specific IL-10 Producing CD4$^+$,CD25$^+$ Regulatory T Cells in Chronically Infected HCV Patients

**Tayebeh Hashempoor[1], Taravat Bamdad[2], Javad Arasteh[3], Rahman Emamzadeh[4], Arghavan Haj-sheikhol-eslami[1], Reihane Asadi[1], Shahin Merat[5]**

[1] Researcher, Digestive Disease Research Center,Shariati Hospital, Tehran University of medical Sciences,Tehran, Iran
[2] Associate Professor, Department of virology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University Central Tehran Branch, Tehran, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran.
[5] Professor, Digestive Disease Research Center , Shariati Hospital,Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

SID

## ABSTRACT

***Background :***
The mechanism behind the apparent lack of effective antiviral immune response in patients with chronic hepatitis C virus (HCV) infection is poorly understood. Although multiple levels of abnormalities have been identified in innate and adaptive immunity, it is postulated that production of specific cytokines such as IL-10 may contribute to the induction and maintenance of HCV persistence. Production of IL-10 by CD4$^+$,CD25$^+$,IL-10$^+$ regulatory T cells with regulatory capacity (Tregs) appears to be one of the viral mechanisms that alter the antiviral immune response. As the first report, that attempts to mimic physiological forces that can occur during HCV infection, in this study we evaluate the ability of HCV-core antigens in increasing the frequency of CD4$^+$,CD25$^+$,IL-10$^+$ regulatory T cells.

***Materials and Methods:***
We analyzed peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from chronic HCV-infected patients (n=19) and normal controls (n=6) to determine the effect of the HCV-core antigen in the frequency of HCV-specific IL-10 production. PBMCs of different groups were isolated, cultured and stimulated with core antigen. Then, an in-house triple-stain flow cytometric method was used to investigate the frequency of CD4$^+$,CD25$^+$,IL-10 producing cells.

***Results:***
Following incubation of PBMCs with HCV-core antigen, a population of CD4$^+$,CD25$^+$,IL-10$^+$ cells (regulatory T cells) increased. However we observed no increase in Tregs in the negative controls.

***Conclusion:***
The study supports the view that specific CD4$^+$,CD25$^+$,IL-10$^+$ T cells may be implicated in host immune tolerance during an HCV infection. It is likely that HCV vaccine candidates avoid epitopes that lead to strong IL-10 production.

***Keywords:*** Regulatory T cells; Hepatitis C virus infection; HCV-core antigen

*please cite this paper as:*
Hashempoor T, Bamdad T, Arasteh J, Emamzadeh R, Haj-sheikhol-eslami A, Asadi R, Merat S. Antigen-specific IL-10 Producing CD4$^+$,CD25$^+$ Regulatory T Cells in Chronically Infected HCV Patients. *Govaresh* 2013;18:7-15.

***Corresponding author:***
Shahin Merat , MD
Digestive Disease Research Center, Shariati Hospital,
N Kargar St, Tehran 14117, Iran
Tel: + 98 21 8241 5300
Fax:+ 98 21 8241 5400
E-mail: merat@tums.ac.ir
Received: 26 Nov. 2012
Edited: 21 Feb. 2013
Accepted: 23 Feb. 2013


www.SID.ir