Archive of SID

نگرش جدید به اثرات ایمونومودلاتوری کلسی‌تریول در موش سوری

سید میثم ابطحی فروشانی*، هادی اسمعیلی گورچین قلعه و بهمن منصوری مطلق

ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه میکرب شناسی

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۴/۴/۲۹

چکیده

در سالهای اخیر توجه زیادی به نقش لنفوسیتهای Th17 و $FoxP3^{+}Treg$ در سیر پاسخهای ایمنی شده است. با وجودی که برخی از مطالعات قبلی مؤید نقش تعدیل کننده ایمنی کلسی‌تریول بوده است، ولی این اثرات عمدتاً قبل از زمان کشف رده‌های اخیر بوده است. هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات کلسی‌تریول بر پاسخهای دستگاه ایمنی متعاقب چالش با پادگن گویچه‌های سرخ گوسفند (SRBC) در مدل موشی می‌باشد. جامعه مورد مطالعه، شامل ۱۴ موشهای نر سوری بود که در دو گروه مساوی به طور تصادفی قرار گرفتند و با پادگن SRBC ایمونیزه شدند. موشهای گروه تیمار از ابتدای مطالعه به مدت دو هفته کلسی-تریول(۵µg/Kg–یک روز در میان–داخل صفاقی) دریافت نمودند. نتایج به دست آمده حاکی از افزایش معنی‌دار تیتر پادتن ضد SRBC در سرم موشهای گروه تیمار همزمان با کاهش شدت واکنش DTH در قیاس با موشهای شاهد می‌باشد. میزان قابلیت انفجار تنفسی در جمعیت سلولهای فاگوسیتیک طحال و همچنین شدت تکثیر لنفوسیتهای طحالی در این گروه از موشها در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافته بود. در عین حال کلسی‌تریول، موجب کاهش معنی‌دار در تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی IL-17 وIFN-γ همزمان با افزایش فراوانی سلولهای $FoxP3^{+}Treg$ شد. سطح سایتوکاین ضد التهابی IL-10 نیز به طور معنی‌داری افزایش یافت. بنابراین ممکن است که عمده اثرات ایمونومدولاتوری منتسب به کلسی-تریول مربوط به کاهش معنی‌دار فعالیت سلولهای Th17، همزمان با القای لنفوسیتهای $FoxP3^{+}Treg$ باشد.

واژه های کلیدی: کلسی‌تریول، ایمنی هومورال، ایمنی سلولی، پاسخ لنفوسیتی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۳۳۰۰۰۴۷۰، پست الکترونیکی: meysamabtahi@hotmail.com

مقدمه

کلسی‌تریول یکی از اعضای خانواده هورمونهای استروئیدی می‌باشد. همه اعضای خانواده هورمونهای استروئیدی در تنظیم بیان ژنها نقش دارند(۳۳). شناخته شده‌ترین عملکرد کلسی‌تریول تنظیم تعادل کلسیم در بدن، شکل‌گیری استخوان و تنظیم جذب دوباره کلسیم می‌باشد. عملکرد شکل فعال کلسی‌تریول (1,25(OH)2D3) بعد از اتصال به گیرنده خود در هسته سلول آغاز می‌گردد(۳۳ و ۳۷). یکی از منابع مهم کلسی‌تریول سنتز آن طی واکنش فتولیزی است که در پوست رخ می‌دهد(۳۵ و ۳۷) .کلسی-تریول ناشی از نور خورشید در آب و هوای شمالی و به ویژه در فصل زمستان کمتر در دسترس می‌باشد. در عین حال داشتن یک رژیم غذایی که دارای میزان بالای کلسی-تریول باشد مشکل است زیرا منابع غذایی طبیعی چندان از لحاظ کلسی‌تریول غنی نمی‌باشند(۸).

از طرفی شواهد اثبات شده‌ای مبنی بر ارتباط بین کلسی-تریول و تعادل بیماریهای خود ایمن دارد (۳۵). در جوامعی که غذاهای سرشار از کلسی‌تریول مصرف می-کنند، شیوع بیماریهای خود ایمن نیز کمتر است که این خود شاهدی بر خاصیت تعدیل ایمنی توسط کلسی‌تریول و ارتباط آن با سیستم ایمنی می‌باشد(۳۵ و ۳۷). متأسفانه شیوه زندگی امروزی که شامل فعالیت کمتر در فضای باز

www.SID.ir

Archive of SID

ورژیم غذایی با میزان کمتر کلسی‌تریول می‌باشد موجب کاهش دریافت کلسی‌تریول شده است(۳۳).

تا همین اواخر به طور گسترده‌ای پذیرفته شده بود که سلولهای Th1 مولد اینترفرون گاما (INF-γ) نقش اصلی را در پاتوژنز واکنشهای ازدیاد حسایت تأخیری (DTH) و بیماریهای خود ایمن وابسته به عضو بازی می‌کنند، در حالی که تشکیل سلولهای Th2 دارای اثرات حفاظت بخش می‌باشد (۱۹، ۲۰، ۲۳ و ۲۵). با این وجود مشخص شده است موشهای دچار نقصان در اینترفرون گاما و یا گیرنده آن، جزء P35 اینترلوکین ۱۲ و یا گیرنده اینترلوکین ۱۲، نه تنها نسبت به ایجاد بیماریهای خود ایمن مرتبط با عضو مقاوم نیستد بلکه آن را با شدت بیشتری نشان می‌دهند(۱۰ و ۲۲). این مسئله با کشف رده جدیدی از سلولهای T کمکی به نام Th17 تا حدودی حل شد (۱۱ و ۲۲). به علاوه، برخی شواهد حاکی از تنظیم متقابل سلولهای Th17 و لنفوسیتهای T کمکی تنظیمی ($T\ CD4^+\ CD25^+\ FoxP3^+$ یا $FoxP3^+Treg$) می‌باشد. دسته اخیر نقش مهمی را در ایجاد تحمل به خود، بازی می‌کند(۲۹).

همان طور که ذکر شد برخی از مطالعات قبلی مؤید نقش تعدیل کننده ایمنی کلسی‌تریول بوده است(۳۵ و ۳۷). ولی این مطالعات عمدتاً قبل از زمان کشف رده‌های Th17 و $FoxP3^+Treg$ صورت گرفته است و عمدتاً بر مبنای تغییر در تعادل سایتوکاین‌های Th1/Th2 توجیه شده است. هدف اصلی مطالعه حاضر ارزیابی اثرات کلسی‌تریول بر عملکرد پاسخهای ایمنی متعاقب چالش با پادگن گویچه های سرخ گوسفند(SRBC) با تأکید بر تغییرات احتمالی در مورد دورده لنفوسیتی Th17 و $FoxP3^+Treg$ در مدل موشی می‌باشد.

مواد و روشها

در این مطالعه تجربی که به صورت موردی/ شاهدی انجام شده است، جامعه مورد مطالعه، شامل ۱۴ موش نر سوری با محدوده سنی ۶ هفته می‌باشد که از حیوان خانه دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه شده بود. این موشها در شرایط استاندارد آب، غذا، دما و نور کافی نگهداری شدند. کلیه مراحل این تحقیق در کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه ارومیه مورد تأیید قرار گرفته است. پس از طی زمان مورد نظر جهت تطابق موشها (۲ هفته)، حیوانات به طور تصادفی در دو گروه به شرح زیر قرار گرفتند:

گروه تیمار: موشهای این گروه در روز شروع آزمایش و یک هفته بعد از آن به صورت داخل صفاقی تحت تزریق ۱×۱۰^۹ گویچه سرخ گوسفند (SRBC) در حجم ۰/۱ میلی‌لیتر قرار گرفتند. همچنین همزمان با آغاز برنامه ایمن سازی، به موشهای این گروه کلسی‌تریول (Biomol–آلمان) به میزان ۵ µg/Kg در حجم ۰/۱ میلی‌لیتر PBS حاوی ۲ درصد DMSO به صورت یک روز در میان و به شیوه داخل صفاقی تزریق شد. انتخاب دز تزریقی ویتامین در این مطالعه بر اساس مطالعات مشابهی بوده است که از این ویتامین جهت درمان بیماریهای خود ایمن در مدلهای حیوانی استفاده شده است(۷).

گروه شاهد: موشهای این گروه مشابه با گروه قبلی تحت چالش با پادگن SRBC قرار گرفتند. از روز شروع ایمونیزاسیون به این موشها به صورت یک روز در میان با ۰/۱ میلی‌لیتر PBS حاوی ۲ درصد DMSO به شیوه داخل صفاقی تزریق شد.

ارزیابی ایمنی هومورال: پنج روز پس از آخرین تزریق، موشها بیهوش شده و اقدام به خون‌گیری از قلب آنها شد. سپس تیتر پادتن تولید شده علیه SRBC به شیوه میکروهماگلوتیناسیون تعیین گردید(۱۵و ۳۸). به طور خلاصه، نمونه‌های سرمی به مدت نیم ساعت در بن ماری ۵۶ درجه سانتی گراد به منظور حذف اجزای کمپلمان قرار داده شدند. با استفاده از محلول PBS حاوی ۰/۰۵ درصد سرم آلبومین گاوی از سرم مورد آزمایش رقتهای ۱ به ۲ در چاهکهای پلیت ۹۶ خانه تهیه شد. سپس ۵۰ میرولیتر از سوسپانسیون ۱ درصد، SRBC به هر چاهک افزوده شد به

www.SID.ir

Archive of SID

طوری که حجم نهایی موجود در چاهکها به ۱۰۰ میکرولیتر رسید. پس از شیک پلیتها به مدت ۱ دقیقه، به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. در نهایت آخرین رقتی که موجب آگلوتینه شدن گویچه‌های قرمز شد به عنوان تیتر آنتی بادی گزارش گردید.

ارزیابی ایمنی سلولی اختصاصی: ۴۸ ساعت قبل از خون-گیری به کف پای چپ حیوانات 1×10^{9} SRBC در حجم ۰/۱ میلی‌لیتر تزریق شد. همزمان ۰/۱ میلی‌لیتر PBS به پای راست جانوران تزریق شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت و قبل از خون‌گیری ضخامت پای موشها به کمک کولیس (Mauser Dial Caliper-Germany) سنجیده شد میزان ایمنی سلولی طبق رابطه زیر محاسبه گردید(۱۴ و ۳۸):

$$\text{شاخص واکنش ایمنی سلولی} = \frac{\text{ضخامت پای راست} - \text{ضخامت پای چپ}}{\text{ضخامت پای راست}}$$

تهیه کشت سلولی طحال: به دنبال خون‌گیری از موشها، طحال آنها تحت شرایط استریل خارج و بعد از قطعه قطعه شدن در ۵ml محیط کشت RPMI-1640 (شرکت Sigma –آمریکا) حاوی۱۰ درصد، FBS (شرکت Gibco –آلمان) له گردید. بافت حاصل جهت تهیه سوسپانسیون سلولی از توری سیمی به قطر ۰/۲ میلی متر عبور داده شد. پس از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰g، به منظور حذف RBC ها، بر روی رسوب سلولی به دست آمده ۵ml بافر لیز کننده افزوده شد. بعد از ۵ دقیقه ضمن افزودن ۱۰ml محیط کشت بار دیگر به مدت ده دقیقه در ۲۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس رسوب سلولی در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰ درصد FBS به حالت سوسپانسون در آورده شد.

سنجش سایتوکاین‌های در سوپ رویی کشت سلولهای طحال: پس از شمارش، سوسپانسیون سلولی به تعداد 2×10^{6} cell/ml از آن تهیه شد. این سلولها در پلیتهای کشت ۲۴ خانه در حضور ۵۰µl از محلول فیتوهماگلوتینین (۱ mg/ml) (شرکت Sigma –آمریکا) به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO_2 کشت داده شدند. پس از طی این مدت مایع رویی آنها جمع آوری شد. سپس سطح سایتوکاین‌های IFN-γ ، IL-10 و IL-17 با استفاده از کیتهای الایزای مربوطه (شرکت BENDERMED – آلمان) و بر طبق دستورالعمل مندرج در دفترچه راهنمای مورد سنجش قرار گرفت.

سنجش قابلیت انفجار تنفسی در جمعیت سلولهای فاگوسیتیک طحال: سوسپانسیون سلولی به تعداد 2×10^{6} cell/ml تهیه شد. این سلولها در پلیتهای کشت ۲۴ خانه به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن انکوبه گردید، سپس خانه‌ها با محیط کشت هنکس به منظور حذف لنفوسیتها شستشو داده شدند. سلولهای باقی مانده به مدت یک ساعت با مخمر اپسونیزه انکوبه گردید. آنگاه ۱۰۰ میکرولیتر محلول زیموزان و NBT (نیترو بلو تترازولیوم) (شرکت Sigma – آمریکا) به هریک از خانه‌ها اضافه گردید و به مدت یک ساعت دیگر انکوبه گردید. در نهایت ۴۰۰ میکرولیتر N-N دی متیل فورماید به هر یک از خانه‌ها اضافه گردید و با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. ۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی از هر یک از خانه‌ها را در میکروپلیت ۹۶ خانه-ای ریخته و نتیجه با الایزا نگار در طول موج ۵۴۰nm قرائت گردید(۱۳).

بررسی میزان تکثیر سلولهای ایمنی با روش MTT : پس از طی مراحلی که در بالا توضیح داده شد، به دنبال شمارش سلولها، سوسپانسیونی حاوی 2×10^{6}cell/ml تهیه شد و ۱۰۰µl از آن در هر یک از چاهکهای پلیت ۹۶ خانه‌ای ته تخت ریخته شد. برای هر نمونه سه تکرار بدون حضور پادگن و سه تکرار در حضور ۵۰µl از محلول فیتوهماگلوتینین (۱ mg/ml) در نظر گرفته شد. به عنوان بلانک نیز در سه چاهک از محیط RPMI خالی استفاده

www.SID.ir

Archive of SID

شد. بعد از ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO2 به هر چاهک ۲۵µl محلول MTT (شرکت Sigma –آمریکا) (۵ mg/ml در PBS) افزوده شده، به مدت ۴ ساعت دیگر گرمخانه گذاری گردید. در این مدت احیای ماده MTT (۳- (۴،۵ –دی متیل تیازول ۲-ایل)-۵،۲- دی فنیل تترازولیوم بروماید) توسط سلولهای زنده و در حال تکثیر سبب تشکیل کریستالهای فورمازون گردید که با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به حالت محلول در آمد. سپس شدت رنگ در طول موج ۴۹۰nm تعیین و ایندکس تحریک بر اساس رابطه زیر محاسبه گردید(۱)):

$$\text{ایندکس تحریک} = \frac{\text{OD چاهک} - \text{OD میانگین احیای نیتروبلوتترازولیوم}}{\text{OD چاهک} - \text{OD میانگین احیای نیتروبلوتترازولیوم}}$$

ارزیابی لنفوسیتهای T کمکی تنظیمی ($FoxP3^+$Treg): به طور خلاصه، سوسپانسیونی از سلولهای طحالی حاوی $۱۰^۶$ ×۱ سلول در حجم ۱۰۰µl تهیه شد. در ابتدا غشای سلولها با بافر تراوا کننده(شرکت eBioscience – انگلستان) برای ورود پادتنهای ضد FoxP3 (شرکت eBioscience – انگلستان) به درون سلول، تراوا و تثبیت گردید. آنگاه مارکر داخل سلولی FoxP3 رنگ آمیزی شد. بعد از شستشوی رنگ اضافی، سلولها در حجم مناسبی از بافر رنگ آمیزی فلوسایتومتری (شرکت eBioscience – انگلستان) به حالت معلق درآورده شده با دستگاه فلوسیتومتریDAKO (شرکت Partec - آلمان) سنجش شد. نتایج حاصل با نرم افزار Cyflogic (ویراست ۱.۲.۱) مورد آنالیز قرار گرفت.

آنالیز آماری: به منظور مقایسه از آزمون Mann Whitney-U استفاده شد. سطح $p<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد. تمامی بررسیهای آماری با استفاده از نسخه نوزدهم نرم افزار SPSS انجام شد و برای ترسیم نمودارها از نرم افزار Excel Microsoft (۲۰۱۰) استفاده شد.

همچنین تمامی داده‌ها به صورت Mean±SD گزارش گردید.

نتایج

بر اساس نتایج به دست آمده میانگین تیتر پادتن در گروه شاهد در محدوده ۲۸/۸۷±۷/۱۸ بود، این در حالی است که در گروه تیمار با افزایش معنی‌داری در سطح ۲۰۱/۸۷±۱۱/۲۳ قرار گرفت($p<۰/۰۰۱$). اساس سنجش ایمنی سلولی اختصاصی که در این مطالعه انجام شده است بر مبنای واکنش ازدیاد حساسیت تأخیری (DTH) بود. همان‌طور که در نمودار ۱ نشان داده شده است، جانوران تیمار شده با کلسی‌تریول به طور معنی‌داری یک کاهش ۳/۲۲ برابری را در واکنش DTH نشان دادند.

با استفاده از آزمون احیایNBT توانایی و ظرفیت لکوسیتها در تولید رادیکالهای آزاد به ویژه آنیون سوپراکسیداز ارزیابی گردید. آنیون سوپراکسیداز تولید شده، ماده رنگی NBT (زرد، شفاف و محلول در آب) را احیاء نموده و به فورمازان آبی نامحلول و رسوب در داخل فاگوسیت تبدیل می‌کند. با سنجش میزان فورمازان تولیدی با روش فتومتری، عملکرد انفجار تنفسی فاگوسیتها ارزیابی گردید(۱۳). نتایج حاصل از این آزمون، کاهش قابلیت انفجار تنفسی مونوسیت/ ماکروفاژهای طحالی را نشان داد (نمودار ۲).

همچنین نتایج آزمون MTT کاهش میزان تکثیر لنفوسیتی در گروه درمانی با کلسی‌تریول در مقایسه با گروه شاهد را نشان داد(نمودار ۳).

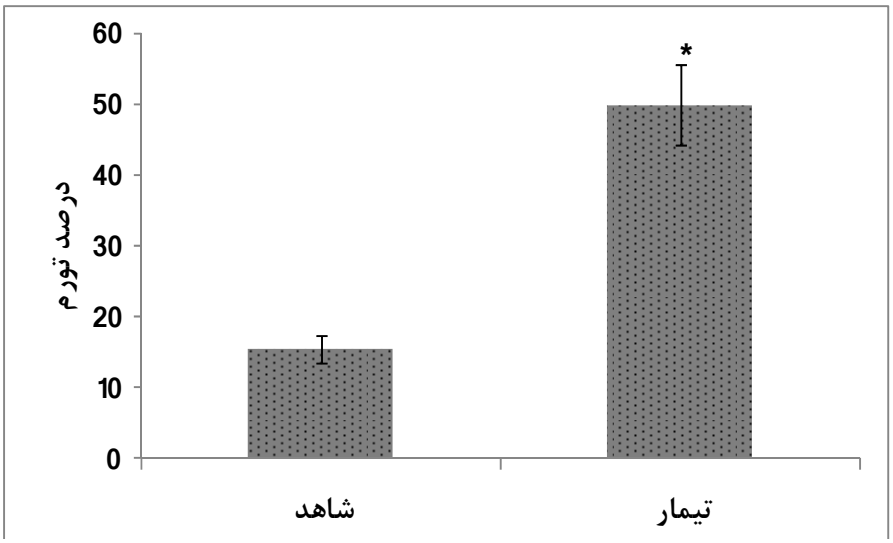
به دنبال تحریک لنفوسیتهای طحالی با فیتوهماگلوتینین در محیط کشت میزان تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی IFN-γ و IL-17 کاهش داشت و اما سطح سایتوکاین ضد التهابی IL-10 افزایش معنی داری را نشان داد (نمودار۴).

بر اساس نتایج حاصل از آنالیز داده‌های فلو سیتومتری، سطح لنفوسیتهای T کمکی تنظیمی ($FoxP3^+$ Treg) در

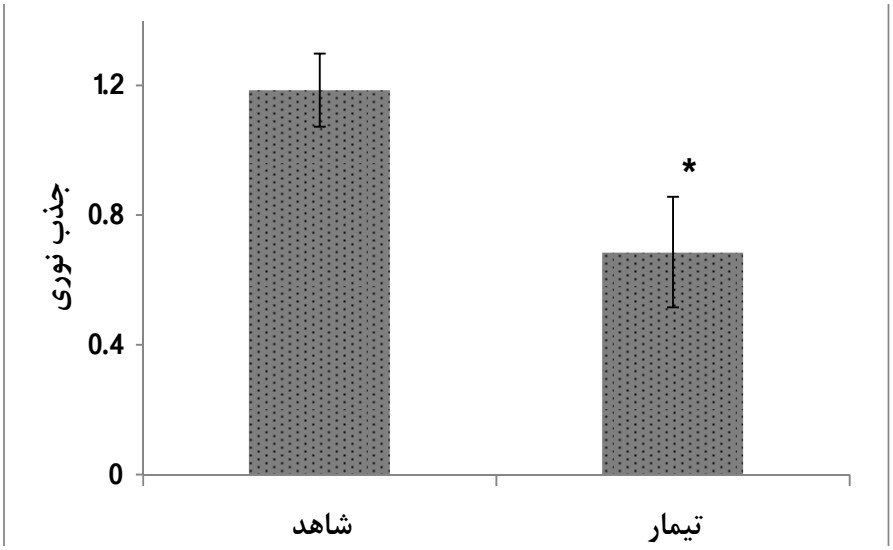
www.SID.ir

Archive of SID

گروه تحت درمان نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری پیدا کرد. در شکل۱ چگونگی فرآیند محاسبه سلولهای Treg نشان داده شده است.



نمودار۱- مقایسه میزان التهاب کف پای موشها. (*نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح ($p<$۰/۰۰۱) بین موشهای شاهد و موشهای تیمار می باشد، آزمونMann Whitney-U).



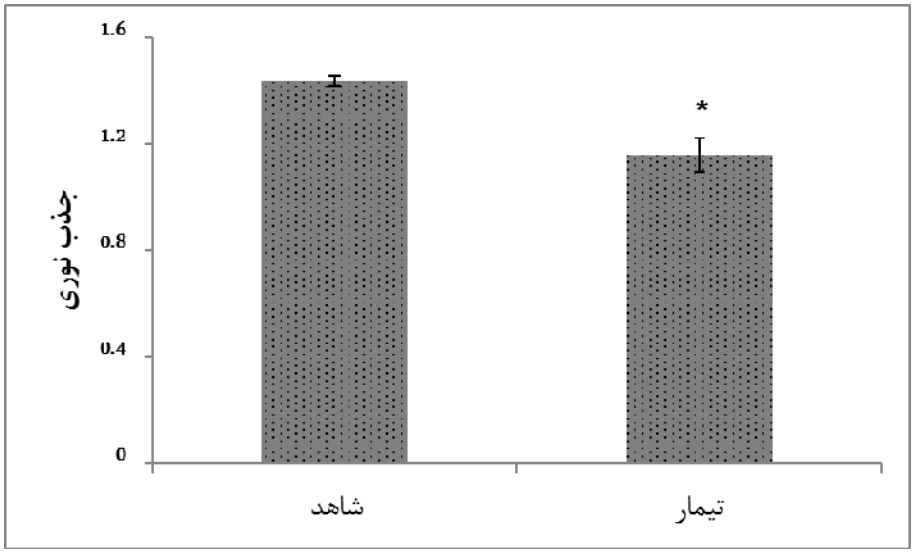
نمودار۲- مقایسه شدت انفجار تنفسی در بین سلولهای تک هسته ای طحال. (*نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح ($p<$۰/۰۰۱) بین موشهای شاهد و موشهای تیمار می باشد، آزمونMann Whitney-U).

بحث

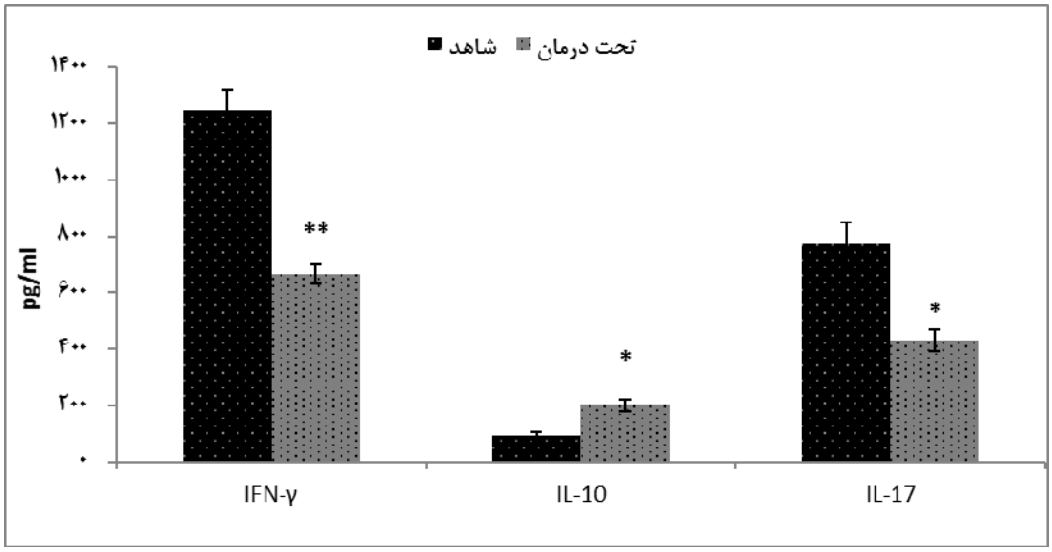
کلسی‌تریول دارای اثرات متعددی بر سیستم ایمنی بدن می باشد و گیرنده این هورمون در بسیاری ازسلولهای ایمنی شامل ماکروفاژ، سلولهای دندریتیک، لنفوسیتها و سلولهای NKبیان می‌شود(۳۴). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در کنار مهار سیستم ایمنی سلولی اکتسابی، کلسی‌تریول ظرفیت انفجار تنفسی سلولهای ماکروفاژ را به نحو قابل توجهی افزایش می‌دهد. در مطالعات قبلی نیز به کاهش قابلیت تکثیر سلولهای T (۲۸ و ۳۰) و همچنین کاهش ظرفیت بیگانه خواری فاگوسیتها (۲۱) به دنبال تیمار با کلسی‌تریول اشاره شده است.

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار۳- مقایسه تکثیر لنفوسیتهای طحال. (*نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح (p<۰/۰۵) بین موشهای شاهد و موشهای تیمار می باشد، آزمونMann Whitney-U).

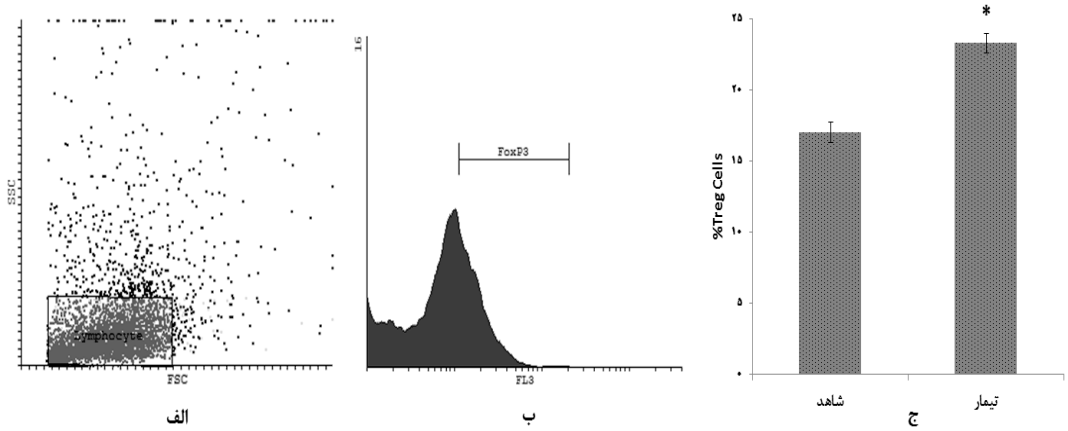


نمودار۴. مقاسیه میانگین غلظت سایتوکاین‌ها در سوپ رویی کشت سلولهای طحال .(**نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح (p<۰/۰۰۱) و *نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح (p<۰/۰۱) بین موشهای مبتلای درمان نشده (شاهد) و موشهای تحت درمان با کلسی‌تریول می‌باشد، آزمونMann Whitney-U).

سلولهای دندریتیک هدف اصلی تنظیم ایمنی به وسیله کلسی‌تریول می‌باشند؛ کمبود این ویتامین سبب اختلال در بلوغ و تمایز این سلولها شده و بیان MHC-II، مولکولهای کمک تحریکی و سایتوکاین‌های التهابی نظیرIL-12 را کاهش می‌دهد(۲) . کاهش فعال سازی سلولهای دندرتیک در کنار کاهش تولید سایتوکاین پلاریزه کننده سلولهای Th1(IL-12) خود می‌تواند توجیه کننده بخشی از اثرات ضد تکثیری و تقویت کننده ایمنی هومورال باشد که در این مطالعه مشاهده شده است. در کارهای پیشین به تغییر پاسخهای سایتوکاینی به سمت Th2 (۶ و ۳۰)، سرکوب سلولهای NK (۲۴) و iNKT (۳۶) به عنوان اثرات تنظیم کنندگی ایمنی کلسی‌تریول اشاره شده است .

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- نتایج بررسی میزان لنفوسیتهای T تنظیمی به روش فلوسیتومتری.الف) لنفوسیتها بر روی دات پلات FSC و SSC گیت شدند.ب)سپس لنفوسیتهای $T\ CD4^+\ FOXP3^+$.بر روی گیت لنفوسیتها مورد ارزیابی قرار گرفتند.ج) نشان دهنده نمودار فراوانی سلولهای $T\ CD4^+\ FOXP3^+$ در بین دو گروه شاهد و تیمار می‌باشد (* نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح ($p<$۰/۰۱) بین موشهای مبتلای درمان نشده (شاهد) و موشهای تحت درمان با کلسی‌تریول می‌باشد، آزمونMann Whitney-U).

از جمله اثرات دیگری که به دنبال تیمار با کلسی‌تریول در تحقیق حاضر مشاهده شد، مهار پاسخهای ایمنی سلولی بود. جالب توجه اینکه کمبود کلسی‌تریول سبب افزایش خطر ابتلا به باکتریهای درون سلولی نظیر *مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس* می‌شود(۹). ممکن است که کاهش قابلیت انفجار تنفسی سلولهای بیگانه خوار به دنبال کمبود کلسی-تریول که در این مطالعه مشاهده شد، خود توجیه کننده افزایش حساسیت به عفونتهای درون سلولی باشد.
اینترلوکین ۱۷ یک سایتوکاین پیش التهابی قوی بوده که بر روی طیف گسترده‌ای از سلولها از قبیل سلولهای اپیتلیال، اندوتلیال و میلوئید اثر کرده و موجب آزادسازی انواع مدیاتورهای التهابی می‌گردد (۱۷). نتایج تحقیقات کورتن و همکاران (۲۰۱۱) به خوبی ثابت کرده است که سلولهای مولد اینترلوکین ۱۷ (Th17) در سیر پاتوژنز خود ایمنی قبل از Th1 به بافت مهاجرت کرده و با ایجاد شرایط التهابی زمینه ورود سایر سلولها را از جمله سلولهای Th1 را فراهم می‌دارند (۵). اینترلوکین ۱۷ آغازگر واکنشهای ایمنی سلولی (DTH) می‌باشد (۲۲).

در حالی که سلولهای Th17 نقش اساسی در ایجاد و پیشبرد واکنشهای DTH دارا می‌باشند، سلولهای Th1 مولد IFN-γ در ایجاد ضایعات بافتی موثر می‌باشند (۲۵). القای واسطه‌های فعال اکسیژن و اکسید نیتریک در سلولهای ماکروفاژ به واسطه اینترفرون گاما (شاخص Th1) نقش مهمی را در ایجاد آسیبهایی به واسطه ایمنی سلولی ایفاء می‌نماید (۳۱). بررسیهای گذشته نیز نشان دهنده کاهش سطح این سایتوکاین به دنبال تجویز کلسی‌تریول بوده است (۱۶).

اینترلوکین ۱۰ نقش اصلی در محدود کردن و ختم پاسخهای التهابی و ممانعت از ایجاد آسیبهای بافتی را بازی می‌نماید. افزایش معنی دار سطح این سایتوکاین به همراه کاهش در سطح سایتوکاین‌های پیش التهابی از جمله عوامل کاهش فعالیت اجزای ایمنی سلولی از جمله ماکروفاژها می‌باشد (۴ و ۳۲). به طور جالب توجهی، یافته های برخی از محققین از قبیل آکتونک و همکاران (۲۰۱۱) نشان داده است که افزایش سطح IL-10 ممکن است در کنار کاهش سطح IFN-γ موجب کاهش سطح IL-17 نیز می‌شود (۳).

عامل نسخه برداری FoxP3، عامل اصلی ایجاد عملکرد تنظیمی در لنفوسیتهای کمکی می‌باشد (۱۲ و ۲۰). مشابه با نتایج مطالعه حاضر، در مطالعه‌ای که اخیراً توسط کانگ

www.SID.ir

Archive of SID

و همکاران (۲۰۱۲) در شرایط آزمایشگاهی بر روی سلولهای تک هسته‌ای خون محیطی انسان صورت گرفته است، گسترش سلولهای $FoxP3^{+}Treg$ به دنبال تیمار با کلسی‌تریول گزارش شده است (۱۸ و ۲۰).

نتایج حاضر به خوبی نشان می‌دهد که دریافت کلسی‌تریول در موشها موجب انحراف پاسخهای ایمنی اختصاصی پادگن از سمت ایمنی سلولی به سمت تقویت ایمنی هومورال بوده است. در کنار این مسئله کاهش تکثیر لنفوسیتی که در گروه درمانی با کلسی‌تریول دیده شد، ممکن است که در شرایطی از قبیل بیماریهای خود ایمن به کاهش لنفوسیتهای خود فعال شونده منتهی شود.

بنا بر عقیده نامگونگ و همکاران (۱۹۹۴) مجموعه اثرات کاهش فعالیت در فضای باز، افزایش جمعیت و رژیم غذایی که دارای مقدار کافی کلسی‌تریول نمی‌باشد، موجب ایجاد یک نوسان بزرگ در میزان کلسی‌تریول موجود در میان جمعیتهای مختلف به ویژه در میان جمعیتهایی که فصل زمستان طولانی‌تری را می‌گذرانند، شده است (۲۶ و ۲۷). با توجه به افزایش معضلات شهرنشینی و وضعیت فرهنگی کشور ایران در کنار افزایش روز افزون گزارشات بیماریهای خود ایمن از قبیل مولتیپل اسکلروز (MS) لازم است که تحقیق جامعی در ارتباط با سطح کلسی‌تریول در گروههای مختلف جامعه انجام شده و متناسب با آن اقدام به برنامه‌ریزیهای جامع شود. به نحو قابل توجهی دیده شده است که بسیاری از داروهای موثر مورد استفاده در درمان بیماریهای خود ایمن از قبیل اسکلروز متعدد، موجب کاهش سطح IL-17 می‌گردند (۵). با توجه به کاهش سطح سایتوکاین یاد شده در موشهای گروه تیمار اهمیت مطالعات بیشتر در این زمینه و تلاش برای یافتن آنالوگهای قوی‌تر از کلسی‌تریول در این زمینه مشخص می‌شود.

در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که عمده اثرات ایمونومدولاتوری منتسب به کلسی‌تریول ممکن است که مربوط به کاهش معنی‌دار فعالیت سلولهای Th17، همزمان با القای لنفوسیتهای $FoxP3^{+}Treg$ باشد. با این حال این تحقیق یک مطالعه مقدماتی بوده و لازم است که در آینده مطالعات عمیق‌تری با تأکید بر ارزیابی سایر سایتوکاین‌های سیستم ایمنی و همچنین تغییرات بیان ژنهای دخیل در عملکرد و جهت گیری پاسخهای ایمنی صورت پذیرد.

تقدیر و تشکر: نگارندگان از زحمات کارکنان آزمایشگاه ایمنی شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه کمال تقدیر و تشکر را دارند.

منابع

1. Abtahi f, S. M., Delirezh, N., Hobbenaghi, R. and Mosayebi, G. (2014). Synergistic effects of atorvastatin and all-trans retinoic acid in ameliorating animal model of multiple sclerosis. Immunol Invest 43(1):54-68.
2. Adorinl, L., penna, G., giarratana, N., roncari, A., amuchastegui, S., Daniel, K. C. and Uskokovic, M. (2004). Dendritic cells as key targets for immunomodulation by Vitamin D receptor ligands. J Steroid Biochem Mol Biol 89-90, 437-41.
3. Aktunc, E., kayhan, B., Arasli, M., Gun, B. D. and Barut, F. (2011). The effect of atorvastatin and its role on systemic cytokine network in treatment of acute experimental colitis. Immunopharm. Immunot 33, 667-75.
4. Asadullah, K., Sterry, W. and Volk, H. D. (2003). Interleukin-10 therapy--review of a new approach. Pharmacol Rev 55, 241-69.
5. BalasaA, R. (2010). T helper 17 cells in multiple scelerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. Ro J Neurol 181-188.
6. Boonstra, A., Barrat, F. J., Crain, C., Heath, V. L., Savelkoul, H. F. and Ogarra, A. (2001).1alpha,25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. J Immunol 167, 4974-80.
7. Branisteanu, D. D., Waer, M., Sobis, H., Marcelis, S., Vandeputte, M. and Bouillon, R. (1995). Prevention of murine experimental allergic encephalomyelitis: cooperative effects of

www.SID.ir

Archive of SID

cyclosporine and 1 alpha, 25-(OH)2D3. J Neuroimmunol 61, 151-60.

8. Cantorna, M. T. (2010). Mechanisms underlying the effect of vitamin D on the immune system. Proc Nutr Soc 69, 286-9.
9. Chan, T. Y. (2000). Vitamin D deficiency and susceptibility to tuberculosis. Calcif Tissue Int 66, 476-8.
10. El-behi, M., Rostami, A. and Ciric, B. (2010). Current views on the roles of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. J Neuroimmune Pharmacol 5, 189-97.
11. Fletcher, J. M., Lalor, S. J., Sweeney, C. M., TUBRIDY, N. and MILLS, K. H. (2010). T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. Clin Exp Immunol 162, 1-11.
12. Gavin, M. A., Torgerson, T. R., Houston, E., Deroos, P., Ho, W. Y., Stray-Pedersen, A., Ocheltree, E. L., Greenberg, P. D., Ochs, H. D. and Rudensky, A. Y. (2006). Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 6659-64.
13. Haq, A., Lobo, P. I., Al-Tufail, M., Rama, N. R. and Al-Sedairy, S. T. (1999). Immunomodulatory effect of Nigella sativa proteins fractionated by ion exchange chromatography. Int J Immunopharmacol 21, 283-95.
14. Hassan, Z. M. and Ebtekar, M. (2001). Modeling for immunosuppression by sulfur mustard. Int Immunopharmacol 1, 605-10.
15. Hassan, Z. M. and Ebtekar, M. (2002). Immunological consequence of sulfur mustard exposure. Immunol Lett 83, 151-2.
16. Helming, L., Bose, J., Ehrchen, J., Schiebe, S., Frahm, T., Geffers, R., Probst-KEPPER, M., BALLING, R. and LENGELING, A. (2005). 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 is a potent suppressor of interferon gamma-mediated macrophage activation. Blood 106, 4351-8.
17. Jadidi-Niaragh, F. and Mirshafiey, A. (2011). Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. Scand J Immunol 74, 1-13.
18. Jager, A., Dardalhon, V., Sobel, R. A., Bettelli, E. and Kuchroo, V. K. (2009). Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. J Immunol 183, 7169-77.
19. Jager, A. and Kuchroo, V. K. (2010). Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation. Scand J Immunol 72, 173-84.
20. Kang, S. W., Kim, S. H., Lee, N., Lee, W. W., Hwang, K. A., Shin, M. S., Lee, S. H., Kim, W. U. and Kang, I. (2012). 1,25-Dihyroxyvitamin D3 promotes FOXP3 expression via binding to vitamin D response elements in its conserved noncoding sequence region. J Immunol. 188, 5276-82.
21. Kankova, M., Luini, W., Pedrazzoni, M., Riganti, F., Sironi, M., Bottazzi, B., Mantovani, A. and Vecchi, A. (1991). Impairment of cytokine production in mice fed a vitamin D3-deficient diet. The JI 73, 466-71.
22. Kuerten, S. and Lehmann, P. V. (2011). The immune pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis: lessons learned for multiple sclerosis? J Interferon Cytokine Res 31, 907-16.
23. Lees, J. R., Iwakura, Y. and Russell, J. H. (2008). Host T cells are the main producers of IL-17 within the central nervous system during initiation of experimental autoimmune encephalomyelitis induced by adoptive transfer of Th1 cell lines. J Immunol 180, 8066-72.
24. Merino, F., Alvarez-Mon, M., De la hera, A., Ales, J. E., Bonilla, F. and Durantez, A. (1989). Regulation of natural killer cytotoxicity by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Cell Immunol 118, 328-36.
25. Murdaca, G., Colombo, B. M. and Puppo, F. (2011). The role of Th17 lymphocytes in the autoimmune and chronic inflammatory diseases. Intern Emerg Med 6, 487-95.
26. Namgung, R., Mimouni, F., Campaigne, B. N., Ho, M. L. and Tsang, R. C. (1992). Low bone mineral content in summer-born compared with winter-born infants. J Pediatr Gastroenterol Nutr 15, 285-8.
27. Namgung, R., Tsang, R. C., Specker, B. L., Sierra, R. I. and Ho, M. L. (1994). Low bone mineral content and high serum osteocalcin and 1,25-dihydroxyvitamin D in summer- versus winter-born newborn infants: an early fetal effect? J Pediatr Gastroenterol Nutr 19, 220-7.
28. Nunn, J. D., Katz, D. R., BarkerR, S., Fraher, L. J., Hewison, M., Hendy, G. N. and Oriordan, J. L. (1986). Regulation of human tonsillar T-cell

www.SID.ir

Archive of SID

proliferation by the active metabolite of vitamin D3. The JI 59, 479-84.

29. Oconnor, R. A., Taams, L. S. and Anderton, S. M. (2010). Translational mini-review series on Th17 cells: CD4 T helper cells: functional plasticity and differential sensitivity to regulatory T cell-mediated regulation. Clin Exp Immunol 159, 137-47.

30. Penna, G. and Adorini, L. (2000). 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. J Immunol 164, 2405-11.

31. Petro, T. M. (2011). Regulatory role of resveratrol on Th17 in autoimmune disease. Int Immuno pharmacol 11, 310-8.

32. Saraiva, M. and Ogarra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. Nat Rev Immunol 10, 170-81.

33. Smyk, D. S., Orfanidou, T., Invernizzi, P., Bogdanos, D. P. and Lenzi, M. (2013). Vitamin D in autoimmune liver disease. Clin Res Hepatol Gastroenterol.

34. Van Etten, E. and Mathieu, C. (2005). Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: basic concepts. J Steroid Biochem Mol Biol 97, 93-101.

35. Yang, C. Y., Leung, P. S., Adamopoulos, I. E. and Gershwin, M. E. (2013). The Implication of Vitamin D and Autoimmunity: a Comprehensive Review. Clin Rev Allergy Immunol.

36. Yu, S. and Cantorna, M. T. (2008). The vitamin D receptor is required for iNKT cell development. Proc Natl Acad Sci U S A 105, 5207-12.

37. Zella, J. B. and Deluca, H. F. (2003). Vitamin D and autoimmune diabetes. J Cell Biochem 88, 216-22.

38. Zimecki, M. and Wieczorek, Z. (2001). Differential patterns of cyclosporine A-induced inhibition of humoral and cellular immune responses to sheep erythrocytes in mice. Pol J Pharmacol 53, 495-500.

New approach to the immunomodulatory effects of calcitriol in NMRI-mouse

Abtahi Froushani S.M., Esmaeili Gouvrchin Galeh H. and Mansori Motlagh B.

Microbiology Dept., Veterinary Faculty, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran

Abstract

Recent evidence demonstrated an important role for Th-17 and FoxP3^{+}Treg lymphocytes in immunity system .Although, previous reports have determined the immunomodulatory potential of calcitriol, but this study was mostly done before the discovery of recent lymphocytes. The present study was set out to investigate the effects of calcitriol on immunity system in NRMI-mice after challenge with sheep red blood cells (SRBC). The study population was consist of 14 male mice that randomly allocated in two equal groups and immunized with SRBC. Mice in the treatment group were intraperitoneally received 5 µg/Kg calcitriol every other day from the beginning of the study and continued for 2 weeks. The results of the present study indicated a significant increase in the level of anti-SRBC antibody and simultaneously a significant decrease in the level of DTH in the treatment group compared to control group. The level of respiratory burst in phagocytic cells of splenocytes and the level of lymphocyte proliferation were significantly decreased in treatment group compared to control group. Moreover, calcitriol caused a significant reduction in the production of pro-inflammatory IL-17 as well as IFN-γ, parallel to increasing FoxP3^{+}Treg cells. Also the level of anti-inflammatory IL-10 was significantly increased. Therefore, the major immunomudlatoty effects of calciteriol may be due to a significant decrease in Th17 cells activity and concurrently a significant decrease in the expansion of FoxP3^{+}Treg lymphocytes.

Key words: Calcitriol, Humoral immunity, Cellular immunity, Lymphocyte response.

www.SID.ir