

## بررسی سلول‌های T تنظیمی بیان کننده‌ی 3 Lymphocyte-Activation Gene (LAG-3) در بیماران مبتلا به Multiple Sclerosis با اثر مداخله‌ای داروی فینگولیمود

ناهید صداقت<sup>۱</sup>، سیدحمید زرکش اصفهانی<sup>۲</sup>، فرشته آل‌صاحب‌فصول<sup>۳</sup>، مسعود اعتمادی‌فر<sup>۴</sup>،  
وجیهه استادی<sup>۵</sup>، فریبرز کیانپور<sup>۶</sup>، مجتبی اکبری<sup>۷</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** سلول‌های T تنظیمی CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> دارای نقش عمده در تعدیل پاسخ‌های ایمنی و به علاوه، ایجاد تحمل ایمنی در جلوگیری از بروز بیماری‌های خود ایمن می‌باشند. همچون بسیاری از بیماری‌های خود ایمن دیگر، پیشنهاد می‌شود که مولتیپل اسکلروزیس (MS یا Multiple sclerosis) نیز به عنوان یک بیماری سیستم عصبی مرکزی، با نقص عملکردی یا تعدادی از این قبیل سلول‌ها همراه باشد. ژن ۳ فعال‌سازی لنفوسیت (LAG-3 یا Lymphocyte-activation gene 3)، اکنون به عنوان یک نشانگر سطحی سلول‌های T تنظیمی با عملکرد تنظیم منفی سلول‌های اجرایی سیستم ایمنی، شناخته می‌شود. در این مطالعه، به بررسی میزان بیان LAG-3 بر سطح لنفوسیت‌های T تنظیمی این بیماران با به کارگیری اثر مداخله‌ای داروی فینگولیمود، پرداخته شد.

**روش‌ها:** مقدار ۱۰ میلی‌لیتر خون کامل از ۲۰ فرد مبتلا به MS قبل و بلافاصله پس از یک ماه مصرف داروی فینگولیمود و ۱۲ فرد سالم گرفته شد و سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC یا Peripheral blood mononuclear cell) از آن‌ها جدا شد. سپس، سلول‌ها با کاربرد آنتی‌بادی‌های کوئزوگه‌ی ضد نشانگرهای سطحی و داخل سلولی و با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری، ارزیابی شدند.

**یافته‌ها:** میزان بیان سلول‌های T تنظیمی CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>LAG3<sup>+</sup> پس از یک ماه مصرف داروی فینگولیمود افزایش یافت ( $P = ۰/۰۰۵$ ).

**نتیجه‌گیری:** افزایش سلول‌های T تنظیمی بیان کننده‌ی LAG-3 پس از یک ماه مصرف داروی خوراکی فینگولیمود، می‌تواند علاوه بر نقش این قبیل سلول‌ها در بهبود بیماران، جنبه‌های دیگری از اثرات فینگولیمود را نیز نمایان کند.

**واژگان کلیدی:** مولتیپل اسکلروزیس، سلول T تنظیمی، فینگولیمود، 3 Lymphocyte-activation gene (LAG-3)، تحمل ایمنی

**ارجاع:** صداقت ناهید، زرکش اصفهانی سیدحمید، آل‌صاحب‌فصول فرشته، اعتمادی‌فر مسعود، استادی وجیهه، کیانپور فریبرز، اکبری مجتبی. **بررسی سلول‌های T تنظیمی بیان کننده‌ی 3 Lymphocyte-activation gene (LAG-3) در بیماران مبتلا به Multiple sclerosis با اثر مداخله‌ای داروی فینگولیمود.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۵؛ ۳۴ (۳۸۷): ۷۰۶-۷۰۱

را درگیر می‌کند (۱). سلول‌های T فعال شده‌ی ضد آنتی‌ژن‌های میلین خودی، ممکن است از مکانیسم‌های کنترل تحمل ایمنی فرار کنند و در افراد مستعد منجر به بیماری شوند (۲). با وجود تلاش محققین برای

### مقدمه

بیماری مولتیپل اسکلروزیس (MS یا Multiple sclerosis) یک بیماری خود ایمنی با واسطه‌ی لنفوسیت‌های T است که سیستم اعصاب مرکزی

۱- دانشجوی کارشناسی‌ارشد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات ام اس و نورو ایمنولوژی اصفهان، و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استادیار، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات ام اس و نورو ایمنولوژی اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- استاد، گروه داخلی اعصاب، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات ام اس و نورو ایمنولوژی اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۵- دانشجوی دکتری، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۶- گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۷- دانشجوی دکتری، گروه اپیدمیولوژی، دانشکده‌ی بهداشت و تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

Email: s.h.zarkesh@sheffield.ac.uk

نویسنده‌ی مسؤو: سید حمید زرکش اصفهانی

خروج لنفوسیت‌های فعال از بافت‌های لنفاوی ثانویه، این دارو همچنین می‌تواند فعالیت عملکردی سلول‌های T تنظیمی را افزایش و تبدیل سلول‌های T معمول را به سلول‌های T تنظیمی در موش تحت تأثیر قرار دهد (۱۶).

بدین ترتیب، دیده می‌شود که مطالعات قبلی به بررسی هر کدام از این عوامل به تنهایی پرداخته‌اند و اثر این دارو بر سلول‌های T تنظیمی در بیماران MS کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است. با توجه به مطالب بیان شده، هدف از انجام مطالعه‌ی حاضر، مقایسه‌ی فراوانی لنفوسیت‌های T تنظیمی  $CD4^+Foxp3^+$  بیان‌کننده‌ی LAG-3 در بیماران MS قبل و بعد از درمان با داروی فینگولیمود بود.

### روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و جداسازی PBMC: جمعیت مورد مطالعه در این پژوهش مورد-شاهدی، شامل افراد مراجعه‌کننده به کلینیک MS بیمارستان الزهرا (س) دانشگاه علوم پزشکی اصفهان بودند. پس از تأیید بیماری گروه مورد توسط متخصص مغز و اعصاب، کسب رضایت و تکمیل پرسش‌نامه‌ی مربوط، در مرحله‌ی اول طرح از افراد گروه‌های مورد و شاهد، ۱۰ میلی‌لیتر خون در لوله‌ی حاوی ضد انعقاد هپارین (۰/۲-۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) دریافت گردید. نمونه‌ها بلافاصله به گروه ایمونولوژی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انتقال داده شد. سپس، سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (Peripheral blood mononuclear cells یا PBMC) به روش گردادیان چگالی با فایکول جدا گردید. هیچ یک از بیماران تحت درمان با داروهای مهار یا تعدیل‌کننده‌ی ایمنی، حداقل به مدت ۴ هفته قبل از شروع فینگولیمود نبودند. جهت جدا کردن PBMC، ابتدا خون با محلول Hanks رقیق شد. ۱۰ میلی‌لیتر از این خون رقیق شده، به ۱۰ میلی‌لیتر فایکول اضافه و سپس در دور ۷۰۰ سانتریفیوژ شد. PBMCها که در حد فاصل پلاسما و فایکول قرار گرفتند، با پیپت جدا شدند و پس از آن، PBMC دو بار در محلول نمکی متعادل Hanks شستشو داده شد.

رنگ‌آمیزی سطحی و داخل سلولی و آنالیز فلوسایتومتری: مقدار مشخصی از سلول‌ها به همراه مقداری PBS، درون لوله‌ای ریخته شد و سپس، معرف‌های حاوی شاخص سطحی Anti-CD4-FITC (Exbio) و Anti-LAG3-Prep eFluor710 (eBioscience) به لوله‌ی حاوی PBMC اضافه و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و تاریکی به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. گروهی از سلول‌ها نیز با ایزوتایپ کنترل (Immunoglobulin G1) متصل به فلوروکروم مربوط رنگ‌آمیزی شدند. بعد از رنگ‌آمیزی سطحی، سلول‌ها ابتدا به کمک بافرهای ویژه‌ی جداسازی Foxp3 از شرکت

یافتن عامل‌های سببی بیماری، هنوز بسیاری از جنبه‌های آن ناشناخته باقی مانده است (۳).

گروهی از پژوهشگران بر این باورند که لنفوسیت‌های T تنظیمی در بیماران مبتلا به MS دارای نقص می‌باشند (۴). سلول‌های T تنظیمی  $CD4^+$  که به طور اختصاصی عامل رونویسی Foxp3 را بیان می‌کنند، برای حفظ تحمل و هموستاز ایمنی ضروری هستند. این سلول‌ها، می‌توانند فعالیت، تکثیر و عملکرد اجرایی سایر لنفوسیت‌ها را در پاسخ‌های ایمنی مهار کنند. بدین ترتیب، به نظر می‌رسد کنترل تکامل، بقا و عملکرد این دسته از لنفوسیت‌ها برای کنترل مؤثر پاسخ‌های ایمنی سودمند باشد؛ به طوری که دیده شده است، حذف آن‌ها یا جهش‌هایی در ژن Foxp3، منجر به بروز بیماری‌های خود ایمن مختلف می‌گردد (۵-۶). بر همین اساس، این فرضیه که به احتمال زیاد، کاهش تعداد یا عملکرد این زیر گروه از لنفوسیت‌ها در ایجاد بیماری MS دخالت دارد، بسیار تقویت می‌گردد.

ژن ۳ فعال‌سازی لنفوسیت (Lymphocyte-activation gene 3 یا LAG-3)، یک مولکول سطحی وابسته به CD4 است که توسط لنفوسیت‌های T تنظیمی بیان می‌شود و قادر است با میل پیوندی بالاتر از CD4 به MHC II متصل گردد (۷-۸). مطالعات نشان داده است که LAG-3 برای حداکثر عملکرد سلول‌های T تنظیمی مورد نیاز است و موجب کاهش توسعه‌ی سلول‌های T فعال می‌گردد (۹). این در حالی است که آنتی‌بادی‌های ضد LAG-3 می‌توانند فعالیت مهار سلول‌های Treg را سرکوب کنند (۱۰). Zhang و همکاران، طی مطالعه‌ای اعلام کردند که پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی (Single nucleotide polymorphisms یا SNP) مربوط به ژن LAG-3 با بروز بیماری MS ارتباط دارد (۱۱). این یافته، بهترین شاهد بر این ادعا است که عملکردهای مرتبط با LAG-3 می‌تواند در ایجاد این بیماری نقش داشته باشد.

فینگولیمود، یک داروی خوراکی و اولین عضو کلاس جدید از تعدیل‌کننده‌ی Sphingosine-1-phosphate receptor 1 ( $S1P_1$ ) است که به تازگی برای درمان MS تأیید شده است (۱۲). کارآزمایی‌های بالینی متعدد بر روی این دارو انجام شد و مشخص گردید که در مقایسه با دارونما و Interferon beta 1 alpha ( $IFN\beta_{1\alpha}$ ) تزریقی، کارایی بیشتری برای بیماران MS دارد (۱۳-۱۴). فینگولیمود فسفریله، به عنوان آنالوگ Sphingosine-1-phosphate ( $S1P$ ) به گیرنده‌های  $S1P_1$  اتصال می‌یابد. اتصال فینگولیمود فسفریله به این گیرنده بر سطح لنفوسیت‌ها، منجر به داخل شدن و تجزیه‌ی آن می‌گردد و در نتیجه، خروج وابسته به  $S1P$  لنفوسیت‌ها از بافت‌های لنفاوی ثانویه به محیط، متوقف می‌شود (۱۵). در مطالعه‌ی Commodaro و همکاران، مشخص شد که علاوه بر اثر شناخته شده‌ی فینگولیمود در کاهش

بیمارستان الزهرا (س) اصفهان شامل ۱۶ نفر زن و ۴ نفر مرد، مورد مطالعه قرار گرفتند. سلول‌های T تنظیمی  $CD4^+Foxp3^+$  بیان کننده‌ی LAG-3 قبل و بعد از مصرف فینگولیمود بررسی شدند و یک نتیجه‌ی قابل انتظار، کاهش معنی‌دار در درصد کل لنفوسیت‌های خون محیطی بیماران مبتلا به MS پس از یک ماه از مصرف فینگولیمود بود ( $P = 0/004$ ). علاوه بر آن، میانگین درصد سلول‌های  $CD4^+$  بیان کننده‌ی Foxp3 در بین جمعیت‌های  $TCD4^+$  پس از گذشت یک ماه از مصرف فینگولیمود، دارای افزایش معنی‌دار در درصد سلول‌ها ( $8/63 \pm 5/35$ ) در مقایسه با میزان میانگین درصد همین سلول‌ها در حالت پایه (قبل از درمان) ( $4/80 \pm 2/33$ ) بود ( $P = 0/015$ ) (شکل ۱). به همین ترتیب، میانگین درصد لنفوسیت‌های T تنظیمی  $CD4^+Foxp3^+$  بیان کننده‌ی LAG-3 نیز پس از درمان ( $9/6 \pm 6/0$ ) دارای افزایش قابل ملاحظه‌ای نسبت به همین جمعیت در بیماران قبل از درمان بود ( $4/1 \pm 4/1$ ) ( $P = 0/005$ ). این در حالی است که هیچ اختلاف معنی‌داری بین میانگین درصد این سلول‌ها با افراد گروه شاهد مشاهده نشد ( $P = 0/615$ ) (شکل ۱).

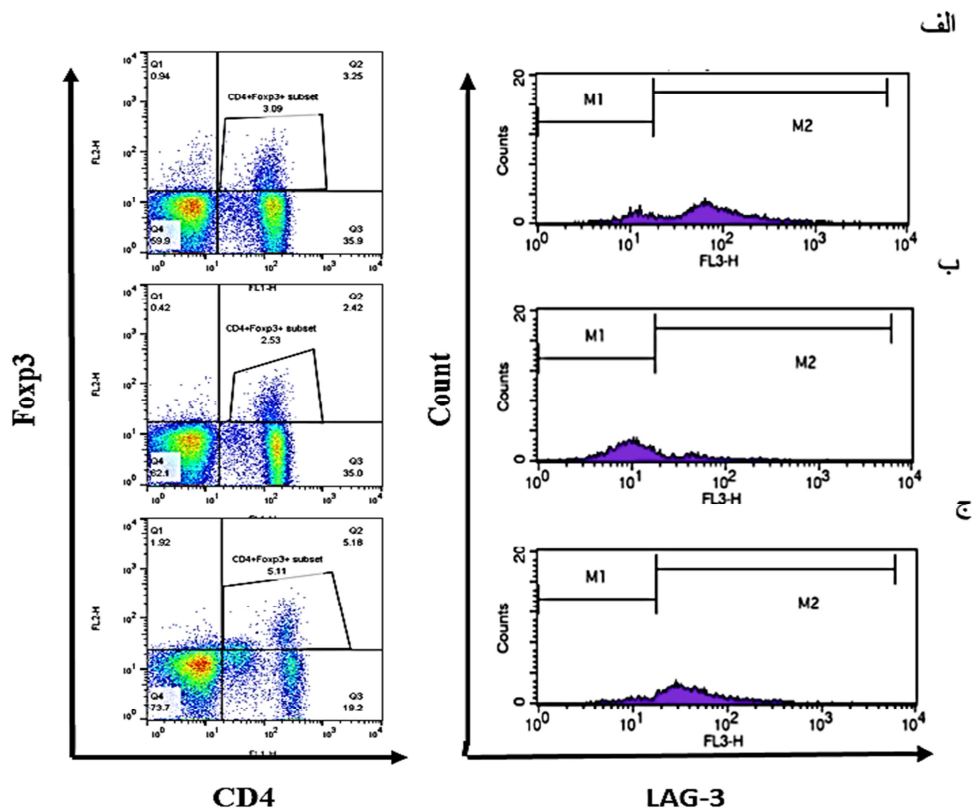
Boilegend (Fixation/Permeabilization Solution) تثبیت و نفوذپذیر شد و در این حالت، آماده‌ی رنگ‌آمیزی داخل سلولی بودند. Anti Foxp3-PE (Biolegend) به لوله‌های حاوی PBMC اضافه شد و پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، با دستگاه فلوسایتومتری FACSCalibur flow cytometre و از طریق نرم‌افزار cell Quest و نمودار نقطه‌ای درصد سلول‌های Treg ( $CD4^+,Foxp3^+$ ) بیان کننده‌ی LAG-3 محاسبه گردید.

یک ماه پس از درمان با فینگولیمود برای هر کدام از بیماران، مراحل پیش‌گفته تکرار شد.

بررسی آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه‌ی ۲۰ (version 20, SPSS Inc., Chicago, IL) و با به کارگیری آزمون‌های آماری Paired samples t و Independent samples t انجام گرفت.  $P < 0/050$  در همه‌ی سطوح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

در این پژوهش، ۲۰ فرد مبتلا به MS مراجعه کننده به کلینیک MS



شکل ۱. بررسی لنفوسیت‌های T تنظیمی  $CD4^+Foxp3^+LAG-3^+$  در بیماران Multiple sclerosis (MS) با استفاده از روش فلوسایتومتری (الف) شاهد، (ب) بیمار MS قبل از درمان با فینگولیمود (ج) بیمار MS یک ماه پس از درمان با فینگولیمود. میانگین درصد این زیر گروه از لنفوسیت‌ها، در گروه شاهد تفاوت معنی‌داری با بیماران MS نداشت. در حالی که میانگین درصد این جمعیت سلولی در بین افراد بیمار قبل و بعد از درمان با فینگولیمود تفاوت آشکاری داشت.

## بحث

در مطالعه‌ی حاضر، فراوانی لنفوسیت‌های T تنظیمی  $CD4^+Foxp3^+$  در خون محیطی بیماران مبتلا به MS یک ماه پس از مصرف داروی فینگولیمود مورد ارزیابی قرار گرفت و مشخص شد که درصد این جمعیت سلولی، دارای افزایش آشکار در بیماران درمان شده در مقایسه با همان بیماران قبل از مصرف دارو می‌باشد. این افزایش، می‌تواند به دلیل کاهش لنفوسیت‌های T فعال در گردش به دنبال مصرف فینگولیمود و در نتیجه افزایش نسبی زیر گروه‌های دیگر از جمله لنفوسیت‌های T تنظیمی باشد. همچنین، در مطالعه‌ای بر روی رت‌های مبتلا به (EAN) Experimental autoimmune neuritis تحت درمان با داروی فینگولیمود، افزایشی در سلول‌های  $Foxp3^+$  در خون مشاهده شد، در حالی که این جمعیت سلولی در گره‌های لنفی کاهش یافتند (۱۶).

بین درصد لنفوسیت‌های T تنظیمی  $CD4^+Foxp3^+$  در بیماران مبتلا به MS در مقایسه با افراد سالم، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد و احتمال می‌رود این سلول‌ها در ایفای نقش طبیعی خود به عنوان تنظیم کننده و تعدیل کننده‌ی سیستم ایمنی نقص دارند (۱۷). این سوء عملکرد، می‌تواند در ارتباط با طیف وسیعی از نشانگرها و مولکول‌های سطحی و داخل سلولی و همچنین، انواعی از سیتوکین‌ها باشد که در جریان یک پاسخ ایمنی رضایت‌بخش توسط این سلول‌ها به کار گرفته می‌شود (۱۸).

در مطالعه‌ای دیگر نیز Sato و همکاران ثابت کردند که نسبت سلول‌های  $CD4^+CD25^+CD127^{dim}$  پس از گذشت ۲ هفته از مصرف فینگولیمود در مقایسه با حالت پایه (قبل از درمان) افزایش می‌یابد و این افزایش، تا پایان هفته‌ی چهارم پایدار باقی می‌ماند (۱۹). همچنین، در مطالعه‌ای حاضر افزایش معنی‌دار در درصد لنفوسیت‌های  $CD4^+Foxp3^+$  بیان کننده‌ی LAG-3 مشاهده شد.

(۲۰). هر چند جستجو در پایگاه‌های اطلاعاتی، مطالعه‌ای را که در آن به تأثیر مستقیم فینگولیمود بر LAG-3 در بیماران MS پیردازد، نتیجه‌ای نداد، اما مطالعه‌ی Ohkura و همکاران، نشان داد که فینگولیمود به طور غالب بیان دیگر مولکول‌ها و سیتوکین‌های مرتبط با عملکردهای سلول‌های T تنظیمی نظیر CTLA4، TGF $\beta$ ، IL10 و Foxp3 را نیز افزایش می‌دهد (۵).

به طور خلاصه، در این مطالعه جمعیت سلول‌های T تنظیمی  $CD4^+Foxp3^+LAG3^+$  در بیماران MS قبل و بعد از یک ماه مصرف فینگولیمود بررسی شد و نشان داد که فراوانی این سلول‌ها پس از درمان در خون محیطی بیماران افزایش می‌یابد. به هر حال، این نکته را باید در نظر داشت که کنترل دارویی عملکرد و تکامل سلول‌های Treg با تأثیر بر Foxp3، LAG-3 یا دیگر مولکول‌های مرتبط با این سلول‌ها، به کنترل بهتر پاسخ‌های ایمنی در تابلوی بالینی منجر خواهد شد. به علاوه، بررسی‌های بیشتر سلول‌های بیان کننده‌ی LAG-3 در مایع مغزی- نخاعی این بیماران، می‌تواند کمکی عملی و کاربردی در جهت درمان بیماری باشد.

## تشکر و قدردانی

این مقاله، حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد ناهید صداقت به شماره‌ی ۳۹۲۵۶۶ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است. از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان که پشتیبانی مالی این پژوهش را به عهده گرفتند و کمال همکاری را با این پژوهش داشتند و همچنین، از شرکت داروسازی اسوه که در تأمین بخشی از هزینه‌های این مطالعه ما را یاری رساندند، تشکر و قدردانی می‌گردد. از مدیریت محترم سازمان انتقال خون اصفهان به جهت تأمین نمونه‌های شاهد و به ویژه بیماران عزیز که با اهدای خون به پیشبرد این طرح کمک کردند، سپاسگزاری می‌شود.

## References

1. Comabella M, Khoury SJ. Immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2012; 142(1): 2-8.
2. Haas J, Hug A, Viehovec A, Fritzsche B, Falk CS, Filser A, et al. Reduced suppressive effect of  $CD4^+CD25^{high}$  regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 2005; 35(11): 3343-52.
3. Etemadifar M, Abtahi SH. Multiple sclerosis in Isfahan, Iran: past, present and future. *Int J Prev Med* 2012; 3(5): 301-2.
4. Venken K, Hellings N, Liblau R, Stinissen P. Disturbed regulatory T cell homeostasis in multiple sclerosis. *Trends Mol Med* 2010; 16(2): 58-68.
5. Ohkura N, Hamaguchi M, Sakaguchi S. FOXP3+ regulatory T cells: control of FOXP3 expression by pharmacological agents. *Trends Pharmacol Sci* 2011; 32(3): 158-66.
6. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing  $CD25^+CD4^+$  regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6(4): 345-52.
7. Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 2004; 21(4): 503-13.
8. Okamura T, Fujio K, Shibuya M, Sumitomo S, Shoda H, Sakaguchi S, et al.  $CD4^+CD25^+LAG3^+$  regulatory T cells controlled by the transcription factor Egr-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(33): 13974-9.
9. Workman CJ, Wang Y, El Kasmi KC, Pardoll DM, Murray PJ, Drake CG, et al. LAG-3 regulates plasmacytoid dendritic cell homeostasis. *J Immunol*

- 2009; 182(4): 1885-91.
10. Pentcheva-Hoang T, Corse E, Allison JP. Negative regulators of T-cell activation: potential targets for therapeutic intervention in cancer, autoimmune disease, and persistent infections. *Immunol Rev* 2009; 229(1): 67-87.
  11. Zhang Z, Duvefelt K, Svensson F, Masterman T, Jonasdottir G, Salter H, et al. Two genes encoding immune-regulatory molecules (LAG3 and IL7R) confer susceptibility to multiple sclerosis. *Genes Immun* 2005; 6(2): 145-52.
  12. Portaccio E. Evidence-based assessment of potential use of fingolimod in treatment of relapsing multiple sclerosis. *Core Evid* 2011; 6: 13-21.
  13. Warnke C, Stuve O, Hartung HP, Fogdell-Hahn A, Kieseier BC. Critical appraisal of the role of fingolimod in the treatment of multiple sclerosis. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2011; 7: 519-27.
  14. Chiba K, Kataoka H, Seki N, Maeda Y, Sugahar K. Fingolimod (FTY720), the Sphingosine 1-Phosphate Receptor Modulator, as a New Therapeutic Drug in Multiple Sclerosis. *Inflamm Regen* 2011; 31(2): 167-74.
  15. Wu T, Zhang L, Xu K, Sun C, Lei T, Peng J, et al. Immunosuppressive drugs on inducing Ag-specific CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) Treg cells during immune response in vivo. *Transpl Immunol* 2012; 27(1): 30-8.
  16. Commodaro AG, Peron JP, Lopes CT, Arslanian C, Belfort R, Jr., Rizzo LV, et al. Evaluation of experimental autoimmune uveitis in mice treated with FTY720. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51(5): 2568-74.
  17. Lan RY, Ansari AA, Lian ZX, Gershwin ME. Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2005; 4(6): 351-63.
  18. Kasper LH, Haque A, Haque S. Regulatory mechanisms of the immune system in multiple sclerosis. T regulatory cells: turned on to turn off. *J Neurol* 2007; 254(1): I10-I14.
  19. Sato DK, Nakashima I, Bar-Or A, Misu T, Suzuki C, Nishiyama S, et al. Changes in Th17 and regulatory T cells after fingolimod initiation to treat multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2014; 268(1-2): 95-8.
  20. Camisaschi C, Casati C, Rini F, Perego M, De FA, Triebel F, et al. LAG-3 expression defines a subset of CD4(+)CD25(high)Foxp3(+) regulatory T cells that are expanded at tumor sites. *J Immunol* 2010; 184(11): 6545-51.

## Evaluation of Lymphocyte Activation Gene3 (LAG-3) on Regulatory T Cells in Patients with Multiple Sclerosis by Intervention Effect of Fingolimod

Nahid Sedaghat<sup>1</sup>, Sayyed Hamid Zarkesh-Esfahani<sup>2</sup>, Fereshteh Alsahebhosoul<sup>3</sup>, Masoud Etemadifar<sup>4</sup>, Vajiheh Ostadi<sup>5</sup>, Fariborz Kianpour<sup>6</sup>, Mojtaba Akbari<sup>7</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Regulatory CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells (Tregs) play an important role in the prevention of autoimmune disease. It is also suggested that in multiple sclerosis (MS), a central nervous system disease, an aberrant Treg function may play a role. Lymphocyte activation gene3 (LAG-3) as a surface marker of Treg cells with negative regulation of the immune system can effectively encounter with effector lymphocytes. In this study, we evaluated frequency of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>LAG-3<sup>+</sup> T cells before and after treatment with Fingolimod.

**Methods:** Blood samples was obtained from 20 patients with multiple sclerosis before and after 1 months of Fingolimod treatment, and from 12 age-matched healthy control subjects. Then peripheral blood mononuclear cell (PBMCs) were isolated and the frequency of Treg cells expressing LAG-3 were determined by flowcytometry.

**Findings:** The frequency of CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>LAG-3<sup>+</sup> T cells in the peripheral blood of MS patients was increased when compared to baseline (P = 0.005).

**Conclusion:** Our findings suggested that Fingolimod not only increases CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg cells, but also is able to enhance expression of LAG-3 on their surface. This is a new finding for the Fingolimod on the immune system.

**Keywords:** Multiple sclerosis, Regulatory T cell, Lymphocyte activation gene 3 (LAG-3), Fingolimod, Immune tolerance

**Citation:** Sedaghat N, Zarkesh-Esfahani SH, Alsahebhosoul F, Etemadifar M, Ostadi V, Kianpour F, et al. **Evaluation of Lymphocyte Activation Gene3 (LAG-3) on Regulatory T Cells in Patients with Multiple Sclerosis by Intervention Effect of Fingolimod.** J Isfahan Med Sch 2016; 34(387): 701-6.

1- MSc Student, Department of Immunology, School of Medicine AND Isfahan MS and Neuroimmunology Research Center AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Associate Professor, Department of Biology, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

3- Assistant Professor, Department of Immunology, School of Medicine AND Isfahan MS and Neuroimmunology Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- Professor, Department of Neurology, School of Medicine AND Isfahan MS and Neuroimmunology Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

5- PhD Student, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

6- Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

7- PhD Student, Department of Epidemiology, School of Health and Nutrition, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

**Corresponding Author:** Sayyed Hamid Zarkesh-Esfahani, Email: s.h.zarkesh@sheffield.ac.uk