

اثر آتورواستاتین در درمان آنسفالومیلیت تجربی خودایمن و نقش آن در پاسخ لنفوسیت‌های T کمکی

دکتر سید میثم ابطحی فروشانی^۱، دکتر نوروز دلیرز^۲، دکتر رحیم حب نقی^۳، دکتر قاسم مسیبی^۴

چکیده

مقدمه: تحقیقات اخیر نقش مهم لنفوسیت‌های Th17 و FoxP3⁺Treg را در پاتوژنز بیماری‌های خودایمنی مشخص نموده‌اند. با وجودی که مطالعات قبلی مؤید نقش تعدیل‌گر ایمنی استاتین‌ها (از قبیل آتورواستاتین) بودند، ولی این اثرات به طور عمده بر مبنای تغییر در نسبت سایتوکاین‌های Th1/Th2 توجیه شده‌اند. در این مطالعه اثرات درمانی آتورواستاتین بر روند آنسفالومیلیت تجربی خودایمن (Experimental autoimmune encephalomyelitis) یا (EAE) و پاسخ‌های لنفوسیت‌های T کمکی مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش‌ها: بیماری EAE با استفاده از پپتید MOG₃₅₋₅₅ و ادجوانت کامل فروند در موش‌های ماده‌ی C57BL/6 القا شد. سپس موش‌ها در دو گروه ۷ رآسی قرار گرفتند. در گروه درمانی بعد از ظهور علائم بالینی بیماری، درمان با آتورواستاتین (روزانه ۱۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن) آغاز شد. هم‌زمان، گروه شاهد خلال دارو را به عنوان دارونما دریافت کردند. تا زمان کشتار موش‌ها در روز سی و سوم علائم بیماری به صورت روزانه ثبت گردید. سپس میزان تکثیر به وسیله‌ی آزمون MTT، میزان تولید سایتوکاین‌ها به وسیله‌ی ELISA و فراوانی سلول‌های FoxP3⁺Treg به وسیله‌ی فلوسایتومتری در بین سلول‌های طحالی سنجیده شد.

یافته‌ها: آتورواستاتین پس از بروز علائم به طور معنی‌داری موجب تخفیف بیماری گشت. به دنبال تحریک مجدد پادگنی در سلول‌های جدا شده از طحال، آتورواستاتین موجب کاهش معنی‌دار تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی IL-17 و IFN- γ هم‌زمان با کاهش تکثیر لنفوسیتی شد. سطح سایتوکاین ضد التهابی IL-10 نیز به طور معنی‌داری افزایش یافت. با این وجود تغییر معنی‌داری در فراوانی سلول‌های FoxP3⁺Treg رخ نداد.

نتیجه‌گیری: درمان با آتورواستاتین پس از بروز علائم EAE ضمن کاهش تکثیر لنفوسیت‌های خود واکنش‌گر و تغییر نسبت سایتوکاین‌های تولیدی به نفع سایتوکاین‌های ضد التهابی، موجب بهبود بیماری می‌گردد.

واژگان کلیدی: آنسفالومیلیت تجربی خودایمن، آتورواستاتین، پاسخ لنفوسیتی

مقدمه

موش به عنوان مدل جانوری بیماری MS برای بررسی

سیر بیماری‌زایی و ارزیابی داروهای جدید جهت درمان MS مورد توجه قرار گرفته است (۲). استاتین‌ها (مانند آتورواستاتین) دسته‌ای از داروهای کاهنده‌ی کلسترول هستند که به علت دارا بودن اثرات تعدیل‌گر ایمنی در امر درمان بیماری‌های خودایمن مورد توجه خاصی قرار

بیماری اسکروز متعدد (Multiple sclerosis یا MS) یک بیماری خودایمن و مزمن التهابی سیستم اعصاب مرکزی می‌باشد که به دلیل قابلیت به شدت ناتوان‌کننده‌ی آن به روی فرد مبتلا، دارای اثرات اجتماعی و اقتصادی مهمی می‌باشد (۱). سال‌ها است که آنسفالومیلیت خودایمن تجربی (EAE یا

^۱ دانشجوی دکترای ایمنی شناسی، گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

^۲ استادیار، گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

^۳ دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

^۴ دانشیار، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

طحالی از نظر میزان تکثیر، تولید سایتوکاین‌های ایتترفرون گاما، IL-17 و IL-10 و همچنین فراوانی سلول‌های FoxP3⁺Treg مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش‌ها

در این مطالعه‌ی تجربی که به صورت موردی-شاهدی انجام شد، جامعه‌ی مورد مطالعه شامل موش‌های ماده‌ی خالص (Inbred) نژاد C57BL/6 با محدوده‌ی سنی ۶ تا ۸ هفته بودند که از انستیتو پاستور ایران خریداری شده بودند. این موش‌ها در حیوان‌خانه‌ی پژوهش‌کده‌ی زیست فناوری دانشگاه ارومیه در شرایط استاندارد آب، غذا، دما و نور کافی نگهداری شدند. کلیه‌ی مراحل این تحقیق در کمیته‌ی اخلاق پژوهشی دانشگاه ارومیه مورد تأیید قرار گرفت.

برای القای EAE، مقدار ۲۰۰ میکروگرم پپتید MOG₃₃₋₅₅ با توالی (M-E-V-G-W-Y-R-S-P-F-S-R-) (شرکت ANASPEC، آمریکا) در ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سالیین (PBS یا Phosphate buffered saline) و ۱۰۰ میکرولیتر ادجوانت فروند کامل (شرکت Sigma، آمریکا) مخلوط شد و به صورت زیر جلدی در ناحیه‌ی پشت هر موش تزریق گردید. مقدار ۴۰۰ نانوگرم سم سیاه سرفه (شرکت Sigma، آمریکا) نیز در حجم ۳۰۰ میکرولیتر PBS پپتید MOG₃₃₋₅₅ در همان روز و ۴۸ ساعت بعد به صورت داخل صفاقی تزریق گردید (۱۴). روند بیماری و تغییرات وزن موش‌ها روزانه مورد ارزیابی قرار گرفت. شدت بیماری بر اساس یم مقیاس هفتگانه بررسی شد. در این مقیاس به عدم بروز بیماری نمره‌ی صفر، اختلال در حرکت دم نمره‌ی ۱، فلج شدن دم نمره‌ی ۲،

گرفته‌اند (۳-۵). مشخص شده است که استاتین‌ها از طریق مهار فاکتورهای نسخه‌برداری STAT-4 و T-bet مانع تشکیل سلول‌های Th1 و تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی می‌گردند. در عین حال این ترکیبات با فعال‌سازی فاکتورهای نسخه‌برداری STAT-6 و GATA-3 موجب پیشبرد تشکیل سلول‌های Th2 و تولید سایتوکاین‌های ضد التهابی می‌گردند (۶). تا همین اواخر به طور گسترده‌ای پذیرفته شده بود که سلول‌های Th1 مولد ایتترفرون گاما (IFN- γ) نقش اصلی را در پاتوژنز بیماری‌های خودایمن از قبیل EAE و MS بازی می‌کنند، در حالی که تشکیل سلول‌های Th2 دارای اثرات حفاظت بخش می‌باشد (۷-۸). با این وجود مشخص شده است که موش‌های دچار نقصان در ایتترفرون گاما یا اجزای گیرنده‌ی آن، جزء p35 ایتترفرون ۱۲ و یا گیرنده‌ی ایتترفرون ۱۲، نه تنها به القای بیماری EAE مقاوم نیستند، بلکه بیماری را با شدت بیشتری بروز می‌دهند (۷-۹). این مسأله با کشف رده‌ی جدیدی از سلول‌های T کمکی به نام Th17 تا حدودی حل شد. ایتترفرون ۱۷ سایتوکاین شاخص این رده است و نقش مهمی در پیشبرد روند التهاب و بیماری‌زایی بسیاری از بیماری‌های خودایمن دارا می‌باشد (۹-۱۱).

برخی شواهد حاکی از تنظیم متقابل لنفوسیت‌های T کمکی تنظیمی (FoxP3⁺ CD 25⁺ CD 4⁺ T) و Th17 هستند (۱۲-۱۳). بنابراین به نظر نمی‌رسد که تغییر پلاریزه شدن پاسخ لنفوسیت‌ها از Th1 به سمت Th2 به تنهایی بتواند ساز و کار تعدیل کننده‌ی ایمنی استاتین‌ها را توجیه نماید. در این مطالعه، ضمن بررسی اثرات درمانی آتورواستاتین بعد از شروع علائم درمانگاهی EAE، اثرات آن بر روی لنفوسیت‌های

۱۶۴۰-RPMI (شرکت Sigma، آمریکا) حاوی ۱۰ درصد FBS (Foetal Bovine Serum، شرکت Gibco، آلمان) له گردید. بافت حاصل جهت تهیه‌ی سوسپانسیون سلولی از توری سیمی به قطر ۰/۲ میلی‌متر عبور داده شد. پس از سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۲۰۰ g، به منظور حذف گلبول‌های قرمز، بر روی رسوب سلولی به دست آمده ۵ میلی‌لیتر بافر لیز کننده [۰/۱۵ مول کلرید آمونیوم، ۱۰ میلی‌مول بی‌کربنات پتاسیم و ۰/۱ میلی‌مول EDTA (Ethylenediaminetetraacetate) با pH = ۷/۲] افزوده شد. بعد از ۵ دقیقه ضمن افزودن ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت بار دیگر به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۲۰۰ g سانتریفوژ گردید. سپس رسوب سلولی در محیط کشت RPMI حاوی FBS ۱۰ درصد به حالت سوسپانسیون در آورده شد. پس از شمارش، سوسپانسیون سلولی با 10^6 \times ۲ سلول در میلی‌لیتر از آن تهیه شد. این سلول‌ها در پلیت‌های کشت ۲۴ خانه در حضور پپتید MOC₃₃₋₅₅ با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور حاوی CO₂ ۵ درصد کشت داده شدند. پس از طی این مدت مایع رویی آن‌ها جمع‌آوری شد.

برای سنجش سایتوکاین‌های IFN- γ ، IL-10 و IL-17 از کیت‌های ELISA مربوط (شرکت BENDERMED، آلمان) استفاده شد و بر طبق دستورالعمل مندرج در دفترچه‌ی راهنمای هر کدام از کیت‌ها اقدام گردید.

میزان تکثیر سلول‌های ایمنی با روش MTT بررسی شد. برای این کار پس از طی مراحل‌ی که در بالا توضیح داده شد، به دنبال شمارش سلول‌ها، سوسپانسیونی حاوی $10^6 \times 1$ سلول در میلی‌لیتر تهیه گردید و ۱۰۰ میکرولیتر از آن در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶

اختلال در راه رفتن نمره‌ی ۳، فلج یک پا نمره‌ی ۴، فلج دو پا نمره‌ی ۵، فلج چهار دست و پا نمره‌ی ۶ و مرگ نمره‌ی ۷ داده شد (۱۵).

۱۴ رأس موش پس از القای بیماری به دو گروه ۷ رأسی با شرایط سنی و وزنی یکسان تقسیم شدند و تا ۲۱ روز پس از بروز علائم درمانگاهی تحت درمان قرار گرفتند. در گروه درمان استوک آتورواستاتین (شرکت Sigma، آمریکا) به میزان ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در PBS حاوی DMSO ۲ درصد حل گردید. به منظور ارزیابی اثرات درمانی دارو بر روی بیماری در حال جریان، آتورواستاتین روزانه با دوز ۱۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن پس از بروز اولین علائم درمانگاهی (۱۲ روز پس از القای بیماری) در همه‌ی موش‌های گروه به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. انتخاب دوز بر مبنای مطالعات گذشته بر روی مدل‌های بیماری‌های خودایمن صورت گرفت (۱۶، ۶).

در گروه شاهد موش‌های مبتلا به EAE ۱۲ روز پس از القای بیماری در حجمی مشابه با گروه قبلی تحت درمان با PBS حاوی DMSO ۲ درصد (دارونما) قرار گرفتند. در ضمن ۷ رأس موش C57BL/6 که از نظر سن، جنس و وزن مشابه با دو گروه قبلی بودند، به عنوان گروه سالم غیر بیمار در نظر گرفته شدند. این موش‌ها فرایند ایجاد بیماری را بدون دریافت پپتید MOC₃₃₋₅₅ طی کردند و هم‌زمان با آن‌ها تحت درمان با دارونما قرار گرفتند.

برای تهیه‌ی کشت سلولی طحال و سنجش سایتوکاین‌های موجود در مایع رویی آن ۳ هفته بعد از آغاز درمان (روز ۳۱ پس از القا) موش‌ها نخاعی شدند. سپس طحال موش‌ها تحت شرایط استریل خارج گردید و بعد از قطعه‌قطعه شدن در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت

خانه‌ای ته تخت ریخته شد. برای هر نمونه سه تکرار بدون حضور پادگن و سه تکرار در حضور ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از پپتید MOG₃₃₋₅₅ در نظر گرفته شد. به عنوان بلانک نیز در سه چاهک از محیط RPMI خالی استفاده گردید. بعد از ۷۲ ساعت نگهداری در انکوباتور حاوی CO₂ ۵ درصد، به هر چاهک ۲۵ میکرولیتر محلول MTT (۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در PBS) افزوده شد و به مدت ۴ ساعت دیگر نگهداری گردید. در این مدت احیای ماده‌ی MTT 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 ۴۹۰ نانومتر تعیین و ایندکس تحریک بر اساس رابطه‌ی زیر محاسبه گردید:

$$\text{بلانک OD} - \text{در حضور پپتید OD} = \frac{\text{بلانک OD} - \text{در عدم حضور پپتید OD}}{\text{اندکس تحریک}}$$

جهت ارزیابی لئوسیت‌های T کمکی تنظیمی (FoxP3⁺ CD4⁺ CD25⁺ T) یا به اختصار FoxP3⁺Treg از کیفیت فلوسیتومتری (شرکت eBioscience، انگلستان) بر طبق پروتکل مربوط استفاده گردید. به طور خلاصه، سوسپانسیونی از سلول‌های طحالی حاوی ۱ × ۱۰^۶ سلول در حجم ۱۰۰ میکرولیتر تهیه شد. در ابتدا سلول‌ها برای مارکرهای سطحی CD4 و CD25 رنگ‌آمیزی شدند. سپس جهت تثبیت سلول‌ها به هر نمونه ۱ میلی‌لیتر از محلول (w/v) ۲ درصد پارافرم آلد‌هاید (Paraformaldehyde) در بافر PBS افزوده شد و سلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

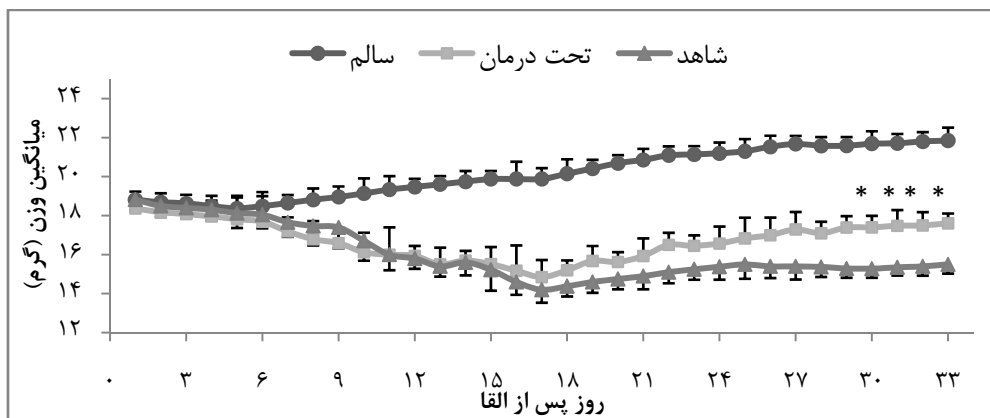
پس از سانتریفوژ نمونه‌ها در دور ۳۰۰ g به مدت ۵ دقیقه و دور ریختن مایع رویی به منظور ورود پادتن‌های ضد FoxP3 به درون سلول، رسوب سلولی

به مدت ۱۵ دقیقه تحت تیمار با ۱ میلی‌لیتر از بافر تراواکننده (محلول (v/v) ۰/۲ درصد توین ۲۰ در بافر PBS) در دمای اتاق قرار گرفت. آن گاه مارکر داخل سلولی FoxP3 رنگ‌آمیزی شد. بعد از شستشوی رنگ اضافی، سلول‌ها در حجم مناسبی از بافر رنگ‌آمیزی فلوسایتومتری به حالت معلق در آورده شدند و با دستگاه فلوسیتومتری (شرکت Partec، آلمان) مورد سنجش قرار گرفتند. نتایج حاصل نیز با نرم‌افزار Cyflogic (نسخه‌ی ۱-۲-۱) مورد آنالیز قرار گرفت.

مقایسه‌ی داده‌های غیر پارامتری مرتبط با شدت علائم درمانگاهی با استفاده از آزمون Mann-Whitney-U و مقایسه‌ی میانگین تغییرات وزن با استفاده از آزمون One way ANOVA و Tukey's test انجام شد. سایر داده‌ها نیز با روش Student-t مقایسه گردید. در تمام بررسی‌ها P < ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد. کلیه‌ی داده‌ها به صورت انحراف معیار ± میانگین گزارش گردید. کلیه‌ی بررسی‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه‌ی ۱۷ (version 17, SPSS Inc., Chicago, IL) انجام گردید و برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Excel نسخه‌ی ۲۰۰۷ استفاده شد.

یافته‌ها

بررسی تغییرات وزن در بین گروه‌های تحت مطالعه نشان داد که میانگین وزن گروه شاهد ۱۶ ± ۰/۱۶ گرم و همچنین موش‌های مبتلا به EAE و تحت درمان ۱۶/۷ ± ۰/۳ گرم بود که در قیاس با موش‌های سالم با میانگین وزن ۲۰/۱ ± ۰/۱۴ گرم به طور معنی‌داری کمتر بود (P < ۰/۰۵).



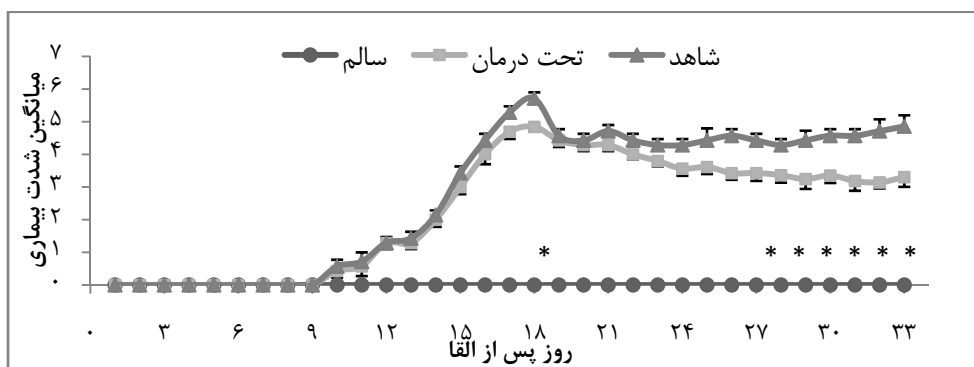
شکل ۱. مقایسه‌ی میانگین تغییرات وزن بین موش‌های سالم، مبتلا به EAE و مبتلا به EAE تحت درمان با آتورواستاتین؛ درمان با آتورواستاتین از روز ۱۲ آغاز شده است.

*: $P < 0.05$ بین موش‌های مبتلای درمان نشده (شاهد) و موش‌های تحت درمان با آتورواستاتین

در مقایسه با موش‌های گروه شاهد ($4/85 \pm 0/26$) کمتر بود ($P < 0/05$). مقایسه‌ی تغییرات روزانه‌ی علایم بین دو گروه نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار در شدت علایم در روز ۱۸ پس از ایمن سازی (زمان بروز حداکثر میانگین شدت بیماری) و در بازه‌ی زمانی روزهای ۲۶ تا ۳۳ پس از القای بیماری بود (شکل ۲).

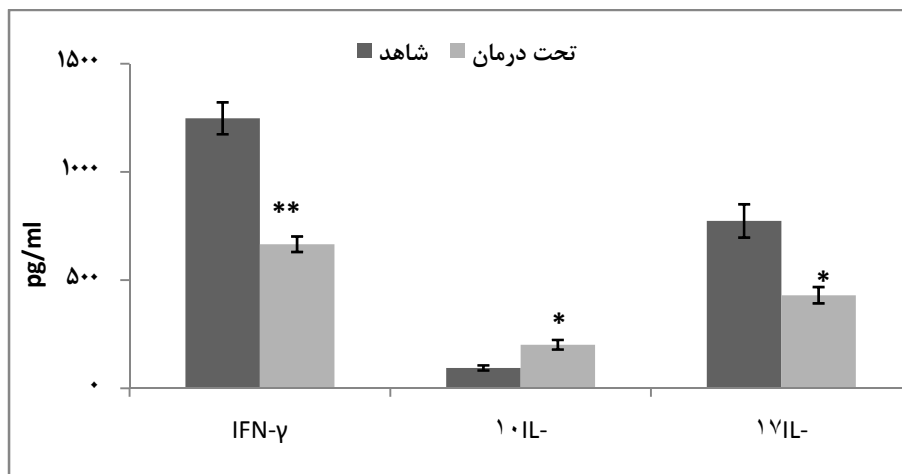
به دنبال تحریک مجدد لنفوسیت‌های طحالی با پپتید MOG در محیط کشت میزان تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی $IFN-\gamma$ و $IL-17$ کاهش و در عوض سطح سایتوکاین ضد التهابی $IL-10$ افزایش معنی‌داری را نشان داد (شکل ۳).

میانگین وزن در موش‌های مبتلا و تحت درمان با آتورواستاتین نسبت به موش‌های گروه شاهد مبتلا به EAE به میزان کمتری کاهش داشت ($P < 0/0005$). مقایسه‌ی تغییرات روزانه نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار وزن بین دو گروه اخیر در بازه‌ی زمانی روزهای ۲۹ تا ۳۳ پس از القای بیماری بود (شکل ۱). بر اساس نتایج به دست آمده میانگین شدت ناتوانی نورولوژیک در طول دوره‌ی درمان در موش‌های تحت درمان با آتورواستاتین ($3/4 \pm 0/17$) نسبت به شاهد مبتلا به EAE ($4/16 \pm 0/13$) کمتر بود ($P < 0/0005$). میانگین حداکثر شدت بیماری نیز در گروه موش‌های مبتلا و تحت درمان ($5/8 \pm 0/18$)



شکل ۲. مقایسه‌ی میانگین شدت بیماری در روزهای مختلف بین گروه‌های مختلف

*: $P < 0.05$ بین موش‌های مبتلای درمان نشده (شاهد) و موش‌های تحت درمان با آتورواستاتین



شکل ۳. مقایسه‌ی میانگین غلظت سایتوکاین‌های IFN- γ , IL-17 و IL-10 در سوپ رویی کشت

سلول‌های طحالی پس از ۷۲ ساعت کشت در حضور پپتید MOG

P < ۰/۰۰۰۵:**

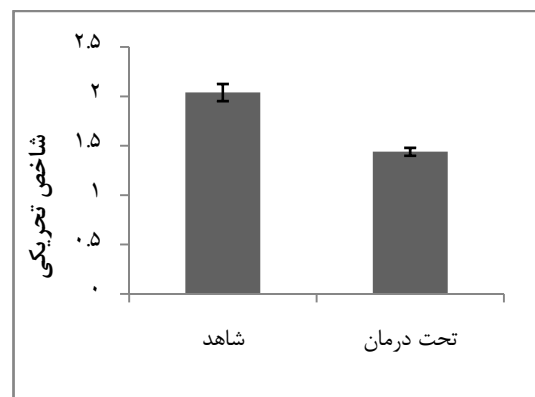
P < ۰/۰۰۵:*

درمان نسبت به گروه شاهد تغییر معنی‌داری نداشت (P = ۰/۳۸). در شکل ۵ چگونگی فرایند محاسبه‌ی سلول‌های Treg نشان داده شده است.

بحث

درمان بیماری‌های خودایمن به طور معمول پس از بروز علائم درمانگاهی یعنی در زمانی که کلون‌های لنفوسیت‌های خود واکنش‌گر به طور گسترده‌ای تکثیر می‌یابند و تبدیل به سلول‌های تمایز یافته‌ی عملکردی می‌شوند، صورت می‌پذیرد. در این مطالعه نیز تجویز دارو پس از بروز علائم ناتوانی نورولوژیک در تمامی موش‌های گروه درمانی صورت گرفته است. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که در این شرایط، تجویز آتوراستاتین موجب بهبود در سیمای بالینی و تغییرات وزن نسبت به گروه شاهد مبتلا به EAE شد. این بهبودی نسبی به طور هم‌زمان با تعدیل پاسخ‌های ایمنی به صورت کاهش تکثیر لنفوسیتی و تغییر الگوی سایتوکاینی از سمت تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی IL-17 و IFN- γ به سمت تولید سایتوکاین ضد التهابی

نتایج آزمون MTT حاکی از کاهش در میزان تکثیر لنفوسیتی در گروه درمانی با آتوراستاتین در قیاس با گروه شاهد مبتلا به EAE، به دنبال تحریک مجدد لنفوسیت‌های طحالی با پپتید MOG در محیط کشت بود (شکل ۴).

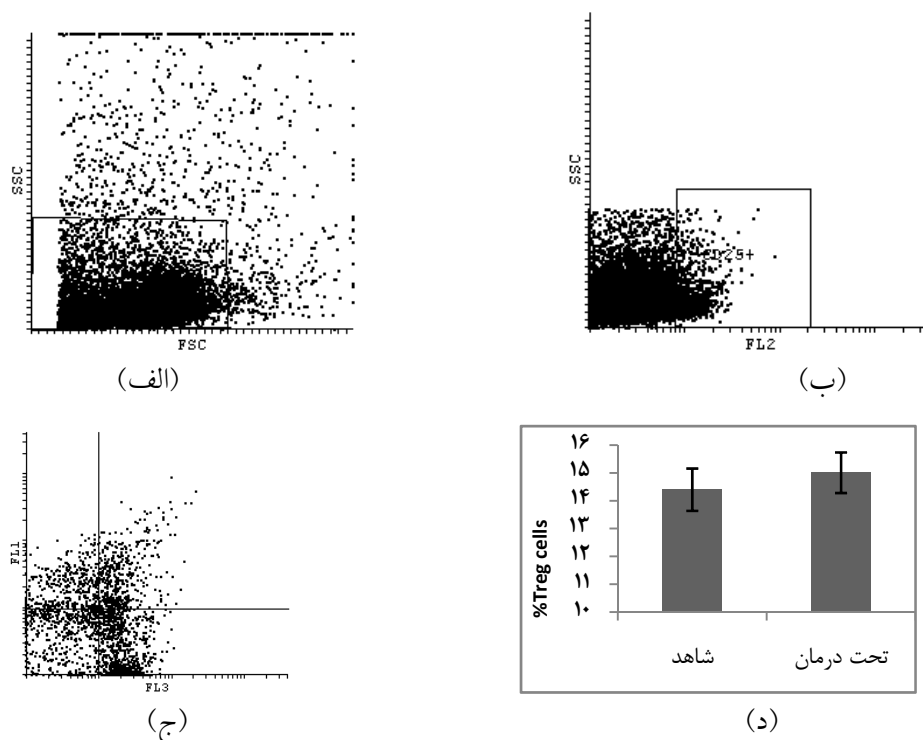


شکل ۴. مقایسه‌ی تکثیر لنفوسیت‌های طحالی در تحریک با پپتید

MOG پس از ۷۲ ساعت

P < ۰/۰۰۵:*

بر اساس نتایج حاصل از آنالیز داده‌های فلوسایتومتری، سطح لنفوسیت‌های T کمکی تنظیمی (T CD4⁺ CD 25⁺ FoxP3⁺) در گروه مبتلا ولی تحت



شکل ۵. نتایج بررسی میزان لنفوسیت‌های T تنظیمی به روش فلوسیتومتری. الف) لنفوسیت‌ها بر روی دات پلات FSC و SSC گیت شدند. ب) سپس سلول‌های CD25+ در گیت یاد شده بر روی دات پلات CD25 (FL2) و SSC مشخص شدند. ج) در نهایت لنفوسیت‌های T CD4+ FOXP3+ در روی گیت سلول‌های CD25+ مورد ارزیابی قرار گرفتند. د) نمودار فراوانی سلول‌های Treg در جمعیت سلول‌های طحالی

IL-17 در موش‌های ایمن شده با پادگن میلینی مانع بروز کموکاین‌ها در مغز می‌شود و متعاقب آن از بروز بیماری جلوگیری می‌کند (۹). نقصان در این سایتوکاین منجر به ایجاد بیماری بسیار ملایم‌تر و همراه با تأخیر در موش‌هایی می‌گردد که EAE در آن‌ها القا شده است (۱۸).

در مجموع به نظر می‌رسد که سلول‌های Th17 نسبت به سلول‌های Th1 پاتوژنیک‌تر باشند (۱۷). سطح بالای IL-17 در خون افراد مبتلا به MS در ارتباط با عدم پاسخ نسبت به IFN- β است (۱۸). بر اساس یافته‌های ما درمان با آتورواستاتین در مدل موشی بیماری MS موجب کاهش سطح IL-17 می‌گردد. بنابراین این احتمال مطرح است که افزودن این دارو به رژیم درمانی این افراد دارای اثرات

IL-10 صورت گرفت.

IL-17 یک سایتوکاین پیش التهابی قوی است که بر روی طیف گسترده‌ای از سلول‌ها از قبیل سلول‌های اپیتلیال، اندوتلیال و میلویید اثر می‌کند و موجب آزادسازی انواع مدیاتورهای التهابی می‌گردد (۱۷). سلول‌های مولد اینترلوکین ۱۷ در سیر پاتوژنز خودایمنی قبل از Th1 به بافت مهاجرت می‌کنند و با ایجاد شرایط التهابی و شکست سد خونی مغزی، زمینه‌ی ورود سایر سلول‌ها را فراهم می‌دارند (۱۸). عملکرد اصلی IL-17 در ایمونوپاتوژنز EAE شکستن سد خونی-مغزی می‌باشد (۱۷-۱۸). وجود سطح بالای IL-17 در پلاک‌های مغزی و مایع مغزی نخاعی مبتلایان به MS نشان دهنده‌ی نقش این سایتوکاین در پاتوژنز بیماری است (۱۷). تجویز پادتن بلوکه کننده‌ی

سودمندی باشد.

در حالی که سلول‌های Th17 نقش اساسی در ایجاد و پیشبرد التهاب و شکست سد خونی مغزی دارند، سلول‌های Th1 مولد IFN- γ ، در ایجاد ضایعات بافتی دخیل می‌باشند (۱۰). القای واسطه‌های فعال اکسیژن و اکسید نیتریک در سلول‌های میکروگلیال به واسطه‌ی ایترفرون گاما (شاخص Th1) نقش مهمی را در پاتوژنز بیماری ایفا می‌نماید (۱۹). بررسی‌های گذشته نیز نشان‌دهنده‌ی کاهش سطح این سایتوکاین به دنبال تجویز استاتین‌ها در مدل‌های بیماری‌های خودایمن بوده است (۴-۶).

IL-10 نقش اصلی در محدود کردن، ختم پاسخ‌های التهابی و ممانعت از ایجاد آسیب‌های بافتی را بازی می‌کند (۲۱-۲۰). افزایش معنی‌دار سطح این سایتوکاین به همراه کاهش در سطح سایتوکاین‌های پیش‌التهابی از جمله عوامل کاهش شدت بیماری در گروه درمانی می‌باشد. افزایش سطح IL-10 ممکن است در کنار کاهش سطح IFN- γ موجب کاهش سطح IL-17 نیز شود (۲۲). این سایتوکاین به عنوان فاکتور مهارکننده‌ی ساخت سایتوکاین (CSIF) یا Cytokine synthesis inhibitory factor شناخته شده است (۲۱).

مطالعات گذشته نشان می‌دهند که در بیماران مبتلا به MS، افزایش تولید IL-10 توسط لنفوسیت‌های CD4⁺ در کاهش شدت علائم مؤثر بوده است (۲۳). تا مدتی قبل IL-10 به عنوان یک سایتوکاین Th2 پذیرفته شده بود، ولی هم‌اکنون مشخص شده است که طیف گسترده‌ای از سلول‌ها از قبیل سلول‌های Treg و حتی رده‌های Th1 و Th17 قادر به تولید آن هستند. از جمله منابع دیگر تولید IL-10 سلول‌های تنظیمی نوع ۱

(Th1) هستند (۲۰). بررسی‌های صورت گرفته در مورد اثرات سودمند استاتین‌ها بر روی بیماری پیوند علیه میزبان، حاکی از افزایش جمعیت این دسته از سلول‌ها بوده است (۲۴). بنابراین این احتمال نیز مطرح می‌گردد که درمان EAE با آتورواستاتین منجر به اثر مشابهی شده باشد.

کاهش تکثیر لنفوسیتی در پاسخ به تحریک مجدد با پپتید MOG و به تبع آن کاهش لنفوسیت‌های اتوراکتیو که در گروه درمانی با آتورواستاتین دیده شد، از جمله عوامل کاهنده‌ی شدت بیماری می‌باشد. با توجه به وجود گزارش‌هایی مبنی بر اثر مستقیم استاتین‌ها بر مهار عرضه‌ی پادگن توسط سلول‌های حرفه‌ای عرضه‌کننده‌ی آنتی‌ژن (۴-۵) و همچنین اثرات ضد تکثیری IL-10 (۲۱-۲۰)، در مجموع می‌توان کاهش تکثیر لنفوسیتی در گروه درمانی را توجیه نمود.

لنفوسیت‌های T کمکی تنظیمی (CD4⁺ CD25⁺ T FoxP3⁺ و یا به اختصار FoxP3⁺Treg) از جمله ساز و کارهای تحمل به خود می‌باشند (۱۳-۱۲).

تعادل بین لنفوسیت‌های FoxP3⁺Treg و سلول‌های تولیدکننده‌ی IL-17 نقش مهمی را در پیش‌گیری و مهار بیماری‌های خودایمن بازی می‌کند (۱۹-۱۲). تکامل سلول‌های FoxP3⁺Treg نیازمند TGF- β است، در حالی که TGF- β در کنار سایتوکاین التهابی IL-6 موجب پیشبرد تکامل سلول‌های Th17 در موش می‌گردد (۲۶-۲۵). نتایج مطالعات اخیر در BALB/C in vitro بر روی لنفوسیت‌های موش‌های نشان داده است که سیمواستاتین با مهار مسیر پیام‌رسانی IL-6، هم‌زمان با کاهش سطح سلول‌های Th17 موجب افزایش سطح سلول‌های Treg می‌گردد (۲۷). این در حالی است که ما در مطالعه‌ی خود

می‌تواند تعادل را به نفع سلول‌های مهارتی FoxP3⁺Treg تغییر دهد.

در نهایت آتورواستاتین موجب بهبود روند EAE پس از بروز علائم در همراهی با کاهش تکثیر لنفوسیت‌های خود واکنش‌گر و تغییر نسبت سایتوکاین‌های تولیدی از سمت سایتوکاین‌های پاتوژنیک به نفع سایتوکاین‌های ضد التهابی می‌گردد.

تشکر و قدردانی

نگارندگان از زحمات مجموعه‌ی کارکنان پژوهشکده‌ی زیست فناوری، دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه ارومیه و همچنین آزمایشگاه ایمنی‌شناسی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اراک کمال تقدیر و تشکر را دارند. این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکتری تخصصی ایمنی‌شناسی دانشگاه ارومیه بود.

افزایش معنی‌دار در سطح سلول‌های Treg را مشاهده نکردیم.

Eller و همکاران نیز نتایج مشابهی با کار ما در مورد گلوومرونفریت خود ایمن در موش‌های نژاد C57BL/6 گزارش کردند (۱۶). باید توجه داشت که مطالعات *in vitro* در شرایط کنترل شده و وجود سایتوکاین‌های پلاریزه کننده در حد بهینه صورت می‌گیرد و همواره نمی‌تواند به طور دقیق بیانگر شرایط *in vivo* باشد. با توجه به نقش دوگانه‌ی TGF- β در تکامل FoxP3⁺Treg /Th17، نویسندگان این مقاله سطح پایین این سایتوکاین به دنبال القای بیماری التهابی EAE و یا تفاوت‌های نژادی را مسؤول عدم افزایش سلول‌های FoxP3⁺Treg می‌دانند. این مسأله مستلزم تحقیق بیشتر می‌باشد. در هر حال کاهش سایتوکاین‌های پاتوژنیک که در بالا به آن‌ها اشاره شد،

References

- Mao P, Reddy PH. Is multiple sclerosis a mitochondrial disease? *Biochim Biophys Acta* 2010; 1802(1): 66-79.
- Luccarini I, Ballerini C, Biagioli T, Biamonte F, Bellucci A, Rosi MC, et al. Combined treatment with atorvastatin and minocycline suppresses severity of EAE. *Exp Neurol* 2008; 211(1): 214-26.
- Sun HY, Singh N. Potential role of statins for the management of immune reconstitution syndrome. *Med Hypotheses* 2011; 76(3): 307-10.
- Chow SC. Immunomodulation by statins: mechanisms and potential impact on autoimmune diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2009; 57(4): 243-51.
- van der Most PJ, Dolga AM, Nijholt IM, Luiten PG, Eisel UL. Statins: mechanisms of neuroprotection. *Prog Neurobiol* 2009; 88(1): 64-75.
- Dunn SE, Youssef S, Goldstein MJ, Prod'homme T, Weber MS, Zamvil SS, et al. Isoprenoids determine Th1/Th2 fate in pathogenic T cells, providing a mechanism of modulation of autoimmunity by atorvastatin. *J Exp Med* 2006; 203(2): 401-12.
- El-behi M, Rostami A, Ciric B. Current views on the roles of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmune Pharmacol* 2010; 5(2): 189-97.
- Jager A, Dardalhon V, Sobel RA, Bettelli E, Kuchroo VK. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *J Immunol* 2009; 183(11): 7169-77.
- Korn T, Oukka M, Kuchroo V, Bettelli E. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol* 2007; 19(6): 362-71.
- Murdaca G, Colombo BM, Puppo F. The role of Th17 lymphocytes in the autoimmune and chronic inflammatory diseases. *Intern Emerg Med* 2011; 6(6): 487-95.
- Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KH. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol* 2010; 162(1): 1-11.
- O'Connor RA, Taams LS, Anderton SM. 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* 2010; 159(2): 137-47.
- Oukka M. Interplay between pathogenic Th17 and regulatory T cells. *Ann Rheum Dis* 2007;

- 66(Suppl 3): iii87-iii90.
14. Costa O, Divoux D, Ischenko A, Tron F, Fontaine M. Optimization of an animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis achieved with a multiple MOG(35-55)peptide in C57BL6/J strain of mice. *J Autoimmun* 2003; 20(1): 51-61.
 15. Skundric DS, Zakarian V, Dai R, Lisak RP, Tse HY, James J. Distinct immune regulation of the response to H-2b restricted epitope of MOG causes relapsing-remitting EAE in H-2b/s mice. *J Neuroimmunol* 2003; 136(1-2): 34-45.
 16. Eller P, Eller K, Wolf AM, Reinstadler SJ, Tagwerker A, Patsch JR, et al. Atorvastatin attenuates murine anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Kidney Int* 2010; 77(5): 428-35.
 17. Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. *Scand J Immunol* 2011; 74(1): 1-13.
 18. Balasa R. T helper 17 cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Rom J Neurol* 2010; 9(4): 181-8.
 19. Petro TM. Regulatory role of resveratrol on Th17 in autoimmune disease. *Int Immunopharmacol* 2011; 11(3): 310-8.
 20. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 2010; 10(3): 170-81.
 21. Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacol Rev* 2003; 55(2): 241-69.
 22. Aktunc E, Kayhan B, Arasli M, Gun BD, Barut F. The effect of atorvastatin and its role on systemic cytokine network in treatment of acute experimental colitis. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2011; 33(4): 667-75.
 23. Perrella O, Sbreglia C, Perrella M, Spetrini G, Gorga F, Pezzella M, et al. Interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha: model of immunomodulation in multiple sclerosis. *Neurol Res* 2006; 28(2): 193-5.
 24. Broady R, Levings MK. Graft-versus-host disease: suppression by statins. *Nat Med* 2008; 14(11): 1155-6.
 25. Dong C. Mouse Th17 cells: current understanding of their generation and regulation. *Eur J Immunol* 2009; 39(3): 640-4.
 26. Aranami T, Yamamura T. Th17 Cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS). *Allergol Int* 2008; 57(2): 115-20.
 27. Kagami S, Owada T, Kanari H, Saito Y, Suto A, Ikeda K, et al. Protein geranylgeranylation regulates the balance between Th17 cells and Foxp3+ regulatory T cells. *Int Immunol* 2009; 21(6): 679-89.

The Effects of Atorvastatin on the Treatment of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and its Role in the Response of T-Helper Lymphocytes

Seyyed Meysam Abtahi Froushani DVM¹, Norouzh Delerezh PhD², Rahim Hobbenaghi DVSc³, Ghasem Mosayebi PhD⁴

Abstract

Background: Recent studies have demonstrated an important role for Th-17 and FoxP3⁺Treg lymphocytes in pathogenesis of autoimmune diseases. Although previous studies have demonstrated the immunomodulatory potential of statins (such as atorvastatin), these effects have been mostly justified by alterations in Th1/Th2 cytokines. The present study was carried out to investigate the therapeutic effects of atorvastatin on experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) and its effects on the response of T-helper cells.

Methods: EAE was induced by MOG₃₅₋₅₅ peptide and complete Freund's adjuvant in female C57BL/6 mice. The mice were placed in two therapeutic groups of 7. Treatment with atorvastatin (10 mg/kg daily) was started in the treatment group at day 12 when they developed a disability score. At the same time, the control group received vehicle alone with the same schedule. Signs of disease were recorded daily until the day 33 when mice were sacrificed. Then, splenocytes were tested to assess proliferation rate, cytokine, and the frequency of FoxP3⁺Treg cells by the 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and flow cytometry, respectively.

Findings: Atorvastatin significantly decreased the clinical signs of established EAE. Aside from reducing lymphocyte proliferation, atorvastatin significantly inhibited the production of pro-inflammatory interleukin 17 (IL-17) as well as interferon gammas (IFN- γ) through antigen-specific restimulation. In addition, the level of anti-inflammatory IL-10 was significantly increased. However, the frequency of FoxP3⁺Treg cells did not alter significantly.

Conclusion: Parallel with decreasing proliferation of autoreactive lymphocyte and cytokine production in favor of pro-inflammatory cytokines, atorvastatin ameliorated established EAE.

Keywords: Experimental autoimmune encephalomyelitis, Atorvastatin, Lymphocyte response

¹ PhD Student of Immunology, Department of Microbiology, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

² Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

³ Associate Professor, Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

⁴ Associate Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Corresponding Author: Seyyed Meysam Abtahi Froushani DVM, Email: meysam.abtahi@yahoo.com