

## اثر درمانی آل-ترانس رتینوییک اسید در آنسفالومیلیت تجربی خود ایمن و نقش آن در پاسخ‌های لنفوسیت‌های T کمکی

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۸/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۹/۰۸

### چکیده

سید میثم ابطحی فروشانی<sup>۱\*</sup>

نوروز دلیرز<sup>۱</sup>

رحیم حب نقی<sup>۲</sup>

قاسم مسیبی<sup>۳</sup>

۱- گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۲- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۳- گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.

\* نویسنده مسئول: ارومیه، جاده سرو، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه میکروبی‌شناسی

تلفن: ۰۹۱۳-۳۰۰۴۷۰

E-mail: meysam.abtahi@yahoo.com

### مقدمه

آنسفالومیلیت تجربی خودایمن Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE)، یک بیماری قابل القا و خودالتهابی سیستم اعصاب مرکزی در جانوران می‌باشد، که سال‌هاست به‌عنوان مدل تجربی بیماری اسکروز متعدد Multiple Sclerosis (MS) مورد استفاده قرار می‌گیرد.<sup>۱</sup> حمله لنفوسیت‌های T کمکی (CD4+) به بافت عصبی نقش مهمی در پاتوژنز هر دو بیماری بازی می‌نماید. مطالعات قبلی مشخص کرده است که پروفایل سایتوکینی تولید شده توسط

زمینه و هدف: تحقیقات اخیر نقش اساسی IL-17 را در پاتوژنز آنسفالومیلیت تجربی خودایمن (EAE) مشخص نموده است. هم‌چنین عملکرد سلول‌های FoxP3<sup>+</sup>Treg در مهار واکنش‌های خودالتهابی مورد توجه قرار گرفته است. با وجودی‌که مطالعات قبلی موید نقش تعدیل‌گر ایمنی آل-ترانس رتینوییک اسید (ATRA) بوده است، ولی این اثرات عمدتاً بر مبنای تغییر در نسبت سایتوکین‌های Th1/Th2 توجیه شده‌اند. در این مطالعه اثرات درمانی ATRA بر روند EAE و پاسخ‌های لنفوسیت‌های T کمکی ارزیابی شد. روش بررسی: بیماری EAE با استفاده از پپتید MOG<sub>35-55</sub> و ادجوانت کامل فروند در موش‌های ماده C57BL/6 القا شد. سپس موش‌ها در دو گروه هفت راسی قرار گرفتند. درمان با ATRA (۵۰۰ μg) به‌ازای هر راس؛ یک‌روز در میان) از زمان بروز علائم درمانگاهی در گروه درمانی (روز ۱۲) آغاز گشت. هم‌زمان، گروه کنترل تنها حلال دارو را دریافت نمودند. علائم تا زمان کشتار موش‌ها (روز ۳۳) روزانه ثبت گردید. میزان تکثیر با آزمون MTT، میزان تولید سایتوکین‌ها با ELISA و فراوانی سلول‌های FoxP3<sup>+</sup>Treg با فلوسیتومتری در بین سلول‌های طحالی سنجیده شد. یافته‌ها: تجویز ATRA پس از بروز علائم به‌طور معنی‌داری موجب تخفیف بیماری گردید. به‌دنبال تحریک مجدد پادگنی در سلول‌های جداشده از طحال، کاهش معنی‌دار تولید سایتوکین‌های پیش‌التهابی IL-17 و IFN-γ هم‌زمان با کاهش تکثیر لنفوسیتی، مشاهده گردید. فراوانی سلول‌های FoxP3<sup>+</sup>Treg و یا سطح IL-10 تغییر معنی‌داری نیافت. با این وجود نسبت‌های IL-10: IFN-γ، IL-10: IL-17 کاهش معنی‌داری یافت. نتیجه‌گیری: تجویز ATRA بعد از بروز علائم بیماری، ضمن کاهش تکثیر لنفوسیت‌های خود واکنش‌گر و تغییر نسبت سایتوکین‌های تولیدی به نفع سایتوکین‌های ضد التهابی، موجب بهبود EAE می‌گردد.

کلمات کلیدی: مولتیپل اسکروزیس، آنسفالومیلیت تجربی خودایمن، آل-ترانس رتینوییک اسید، پاسخ لنفوسیتی.

لنفوسیت‌های T کمکی نقش اساسی در وسعت و نوع ضایعات پاتولوژیک بیماری بازی می‌نماید.<sup>۲</sup> تا همین اواخر به‌طور گسترده‌ای پذیرفته شده بود که سلول‌های Th1 مولد اینترفرون گاما (IFN-γ) نقش اصلی را در پاتوژنز EAE و MS بازی می‌کنند، در حالی‌که تشکیل سلول‌های Th2 دارای اثرات حفاظت‌بخش می‌باشد.<sup>۳-۴</sup> با این وجود مشخص شده است موش‌های دچار نقصان در اینترفرون گاما و یا گیرنده آن، جز P35 اینترلوکین ۱۲ و یا گیرنده اینترلوکین ۱۲، نه تنها به القای بیماری EAE مقاوم نیستند، بلکه بیماری را با شدت بیشتری نشان می‌دهند.<sup>۳-۵</sup> این مساله با کشف رده جدیدی از سلول‌های T

کمکی به نام Th17 تا حدودی حل شد. اینترلوکین ۱۷ از جمله سایتوکین‌های شاخص این رده لنفوسیت کمکی می‌باشد که نقش مهمی در پیشبرد روند التهاب و بیماری‌زایی بسیاری از بیماری‌های خودایمن دارد.<sup>۵-۷</sup> به‌علاوه، برخی شواهد حاکی از تنظیم متقابل سلول‌های Th17 و لنفوسیت‌های T کمکی تنظیمی (T CD4+ CD 25+ FoxP3+ یا FoxP3+Treg) می‌باشد. دسته اخیر نقش مهمی را در ایجاد تحمل به خود، بازی می‌کند.<sup>۸,۹</sup> آل-ترانس رتینوئیک اسید (رتینوئین، ATRA)، یک متابولیت فعال ویتامین آ می‌باشد که دارای اثرات ضد سرطانی و تعدیل‌گر ایمنی است. این ترکیبات به‌منظور درمان آکنه، پسوریازیس و لوسمی پرومیلوسیتی به‌کار رفته است.<sup>۱۰</sup> عمده اثرات این ترکیب از طریق اتصال ترجیحی به گیرنده هسته‌ای موسوم به گیرنده اسید رتینوئیک (RAR) Retinoic Acid Receptor صورت می‌گیرد.<sup>۱۱</sup> در گذشته نشان داده شده است که ترکیبات ویتامین آ بر روی برخی از مدل‌های جانوری بیماری‌های خود ایمن از قبیل آرتریت،<sup>۱۲</sup> کوئیت،<sup>۱۳</sup> دیابت<sup>۱۴</sup> و آنسفالومیلیت آلرژیک خود ایمن<sup>۱۵</sup> موثرند. اما این مطالعات در زمان قبل از کشف Th17 صورت گرفته و اکثراً بر مبنای تغییر در تعادل سایتوکین‌های Th1/Th2 توجیه شده‌اند. در این مطالعه، ضمن بررسی اثرات درمانی ATRA بعد از شروع علائم درمانگاهی EAE، اثرات آن بر روی لنفوسیت‌های طحالی از نظر میزان تکثیر، تولید سایتوکین‌های اینترفرون گاما، IL-17 و IL-10 و همچنین فراوانی سلول‌های FoxP3+Treg مورد ارزیابی قرار گرفته است.

## روش بررسی

این مطالعه از نوع مداخله‌ای- تجربی است که به‌صورت موردی- شاهدی و از فروردین لغایت شهریورماه ۱۳۹۰ در پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه انجام شده است. جامعه مورد مطالعه، شامل موش‌های ماده خالص (Inbred) نژاد C57BL/6 با محدوده سنی شش تا هشت هفته با متوسط وزن ۱۸/۸ گرم می‌باشد که از انستیتو پاستور ایران خریداری شده بود. این حیوانات پس از خریداری در شرایط استاندارد آب، غذا، دما و نور کافی نگهداری شدند.

القای EAE: مقدار ۲۰۰ μg پپتید MOG33-55 با توالی (M-E-V-G-W- Y-R-S-P-F-S-R-V-V-H-L-Y-R-NG-K) و درجه خلوص ۹۵٪

درمان موش‌های مبتلا به EAE با آل-ترانس رتینوئیک اسید: ۱۴ رأس موش پس از القای بیماری به دو گروه هفت رأسی با شرایط سنی و وزنی یکسان تقسیم شده، تا ۲۱ روز پس از بروز علائم درمانگاهی به‌شرح زیر تحت درمان قرار گرفتند:

گروه مطالعه: استوک ATRA (Sigma-USA) به‌میزان ۰/۴mg/ml در PBS حاوی ۲٪ DMSO حل گردید. پس از تقسیم دارو در لوله‌های کرایو به‌میزان مورد نیاز جهت تزریق در هر نوبت، اقدام به فریز کردن دارو در °C ۲۰- تا زمان مورد نظر گردید. به‌منظور ارزیابی اثرات درمانی دارو، بر روی بیماری در حال جریان، اقدام به تجویز یک روز در میان داروی ATRA (۵۰۰ μg) به‌ازای هر رأس) پس از بروز اولین علائم درمانگاهی (۱۲ روز پس از القای بیماری) در همه موش‌های گروه مطالعه به‌صورت داخل صفاقی گردید. انتخاب دوز تزریقی بر مبنای مطالعات گذشته بر روی سایر مدل‌های بیماری خود ایمن صورت گرفته است.<sup>۱۷,۱۸</sup>

گروه شاهد: موش‌های مبتلا به EAE بودند که در حجم مشابه با گروه قبلی پس از بروز علائم در تمام موش‌های گروه (روز ۱۲ پس از القا) تحت درمان با PBS حاوی ۲٪ DMSO (دارونما) قرار گرفتند. هفت رأس موش C57BL/6 که از نظر سن، جنس و وزن مشابه با دو گروه قبلی بودند، به‌عنوان گروه سالم غیر بیمار در نظر گرفته شدند. این موش‌ها فرایند ایجاد بیماری را بدون دریافت پپتید MOG33-55 طی کرده و هم‌زمان با آن‌ها تحت درمان با دارونما قرار گرفتند.

تهیه کشت سلولی طحال و سنجش سایتوکین‌های در سوپ رویی کشت طحال: سه هفته بعد از آغاز درمان (روز ۳۳ پس از القا) اقدام به نخاعی کردن موش‌ها شد. طحال موش‌ها تحت شرایط استریل

اختصار FoxP3+Treg از کیت فلوسیتومتری (eBioscience Co., UK) بر طبق پروتکل مربوطه استفاده گردید. به طور خلاصه، سوسپانسیون از سلول‌های طحالی حاوی  $1 \times 10^6$  سلول در حجم  $100 \mu\text{l}$  تهیه شد. در ابتدا سلول‌ها برای مارکرهای سطحی CD4 و CD25 رنگ‌آمیزی شدند. سپس غشای سلول‌ها با بافر تراوا کننده برای ورود پادتن‌های ضد FoxP3 به درون سلول، تراوا و تثبیت گردید. آن‌گاه مارکر داخل سلولی FoxP3 رنگ‌آمیزی شد. بعد از شستشوی رنگ اضافی، سلول‌ها در حجم مناسبی از بافر مخصوص رنگ‌آمیزی به حالت معلق درآورده شده، با دستگاه فلوسیتومتری (DAKO, Partec Co., Germany) مورد سنجش قرار گرفتند. نتایج حاصل نیز با نرم‌افزار CellQuest ویراست ۲ مورد آنالیز قرار گرفت.

جهت مقایسه داده‌های ناپارامتری (Nonparametric) مرتبط با شدت علائم درمانگاهی از آزمون Mann-Whitney U-test و جهت مقایسه میانگین تغییرات وزن از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و Tukey's test استفاده شد. سایر داده‌ها نیز با روش Student's t-test مقایسه شدند. در تمام بررسی‌ها  $P < 0.05$  به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شده شد. کلیه بررسی‌های آماری در محیط نرم‌افزاری SPSS ویراست ۱۷ انجام شد و برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Excel (۲۰۰۷) استفاده شد. داده‌ها به صورت  $\text{Mean} \pm \text{SEM}$  گزارش گردید.

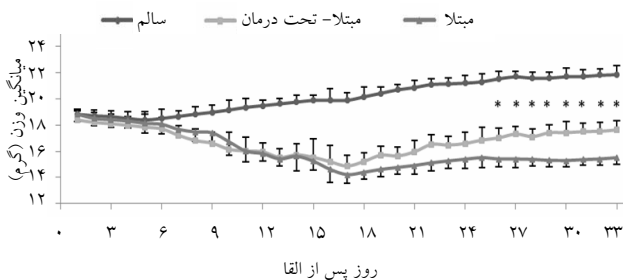
## یافته‌ها

بر اساس نتایج به دست آمده میانگین شدت ناتوانی نورولوژیک در طول دوره درمان در موش‌های مبتلا و تحت درمان با ATRA ( $3.1 \pm 0.14$ ) نسبت به گروه مبتلا ولی بدون درمان ( $4.16 \pm 0.13$ ) کم‌تر می‌باشد ( $P < 0.0005$ ). میانگین حداکثر شدت بیماری نیز در گروه موش‌های مبتلا و تحت درمان ( $5.8 \pm 0.18$ ) در مقایسه با موش‌های مبتلا ولی بدون درمان ( $4.28 \pm 0.42$ ) کم‌تر بود ( $P = 0.014$ ). در کنار روز ۱۸ پس از القا که روز حداکثر میانگین شدت بیماری است، مقایسه تغییرات روزانه علائم بین دو گروه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در شدت علائم در بازه زمانی روزهای ۲۳ تا ۳۳ پس از القای بیماری می‌باشد (نمودار ۱). بررسی تغییرات وزن در بین گروه‌های تحت مطالعه نشان داد که میانگین وزن موش‌های مبتلا به

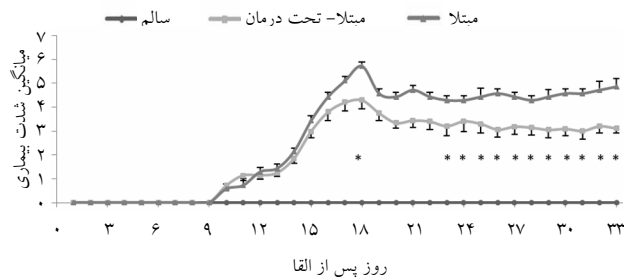
خارج و بعد از قطعه‌قطعه شدن در  $5 \text{ ml}$  محیط کشت RPMI-1640 (Sigma Co., USA) حاوی  $10\%$ ، FBS (Gibco Co., Germany) له گردید. بافت حاصل جهت تهیه سوسپانسیون سلولی از توری سیمی به قطر  $0.2$  میلی‌متر عبور داده شد. پس از سانتریفوژ به مدت  $10$  دقیقه در  $200 \text{ g}$ ، به منظور حذف RBCها، بر روی رسوب سلولی به دست آمده  $5 \text{ ml}$  بافر لیزکننده افزوده شد. بعد از پنج دقیقه ضمن افزودن  $10 \text{ ml}$  محیط کشت بار دیگر به مدت ده دقیقه در  $200 \text{ g}$  سانتریفوژ شد. سپس رسوب سلولی در محیط کشت RPMI حاوی  $10\%$  FBS به حالت سوسپانسیون در آورده شد. پس از شمارش، سوسپانسیون سلولی به تعداد  $2 \times 10^6 \text{ cell/ml}$  از آن تهیه شد. این سلول‌ها در پلیت‌های کشت  $24$  خانه در حضور پپتید MOG33-55 با غلظت  $50 \mu\text{g/ml}$  به مدت  $72$  ساعت در انکوباتور حاوی  $5\%$   $\text{CO}_2$  کشت داده شدند. پس از طی این مدت مایع رویی آن‌ها جمع‌آوری شد.

سنجش سایتوکین‌های موجود در مایع رویی کشت سلول‌های طحالی: برای سنجش سایتوکین‌های  $\gamma\text{-IFN}$ ، IL-10 و IL-17 از کیت‌های الیزای مربوطه (Bendermed Co., Germany) و بر طبق دستورالعمل مندرج در دفترچه راهنمای هر کدام از آن‌ها اقدام گردید.

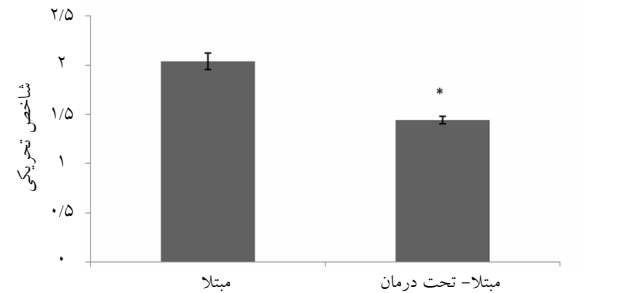
بررسی میزان تکثیر سلول‌های ایمنی با روش MTT: پس از طی مراحل ذکر شده، به دنبال شمارش سلول‌ها، سوسپانسیون حاوی  $1 \times 10^6 \text{ cell/ml}$  تهیه شد و  $100 \mu\text{l}$  از آن در هر یک از چاهک‌های پلیت  $96$  خانه‌ای ته تخت ریخته شد. برای هر نمونه سه تکرار بدون حضور پادگن و سه تکرار در حضور  $50 \mu\text{g/ml}$  از پپتید MOG33-55 در نظر گرفته شد. به عنوان بلانک نیز در سه چاهک از محیط کشت RPMI استفاده شد. بعد از  $72$  ساعت گرم‌خانه‌گذاری در انکوباتور حاوی  $5\%$   $\text{CO}_2$  به هر چاهک  $25 \mu\text{l}$  از محلول  $5 \text{ mg/ml}$  MTT ( $3-4$ )،  $4$ ،  $5$  - دی متیل تiazول ( $2-2$  ایل) -  $5$ ،  $2$  - دی فنیل ترازولیوم بروماید) در PBS، افزوده شده و به مدت چهار ساعت دیگر گرم‌خانه‌گذاری گردید. در این مدت احیای ماده MTT توسط سلول‌های زنده و در حال تکثیر سبب تشکیل کریستال‌های فورمازون گردید که با افزودن  $100$  میکرولیتر DMSO به حالت محلول در آمد. سپس شدت رنگ در طول موج  $490 \text{ nm}$  تعیین و شاخص تحریک بر اساس رابطه زیر محاسبه گردید. شاخص تحریک =  $\frac{\text{OD بلانک} - \text{OD در حضور پپتید}}{\text{OD بلانک} - \text{OD در عدم حضور پپتید}}$  جهت ارزیابی لنفوسیت‌های T کمکی تنظیمی: جهت ارزیابی لنفوسیت‌های T کمکی تنظیمی ( $\text{FoxP3}^+ \text{CD}25^+ \text{CD}4^+ \text{T}$ ) یا به



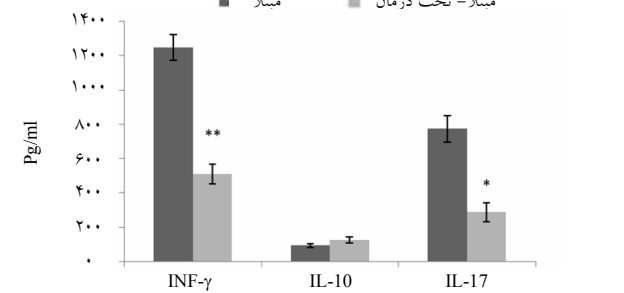
نمودار ۲- مقایسه میانگین تغییرات وزن بین موش‌های سالم، میتلا به EAE و میتلا به EAE تحت درمان با ATRA. درمان با ATRA از روز ۱۲ آغاز شده است. (\* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) بین گروه میتلا- تحت درمان و گروه میتلا می‌باشد).



نمودار ۱- مقایسه میانگین شدت بیماری در روزهای مختلف بین گروه‌های مختلف. درمان با آترواستاتین از روز ۱۲ آغاز شده است. (\* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) بین گروه میتلا- تحت درمان و گروه میتلا می‌باشد).



نمودار ۴- مقایسه تکثیر لنفوسیت‌های طحالی در تحریک با پپتید MOG پس از ۷۲ ساعت. (\* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ( $P < 0.05$ ) بین گروه میتلا و تحت درمان و گروه میتلا می‌باشد).



نمودار ۳- مقایسه میانگین غلظت سایتوکین‌های  $IFN-\gamma$ , IL-17 و IL-10 در سوپ رویی کشت سلول‌های طحالی پس از ۷۲ ساعت کشت در حضور پپتید MOG. (\*\* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ( $P < 0.0005$ ) و \* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ( $P < 0.05$ ) بین گروه میتلا و تحت درمان و گروه میتلا می‌باشد).

یافت. با وجودی که افزایشی در سطح سایتوکین ضد التهابی IL-10 دیده می‌شود، این افزایش معنی‌دار نبوده است (نمودار ۳). مقایسه نسبت  $IFN-\gamma$  به IL-17 حاکی از افزایش معنی‌دار آن در گروه دریافت‌کننده ATRA می‌باشد. هم‌زمان نسبت‌های  $IFN-\gamma$  به IL-10 و IL-17 به IL-10 نیز در گروه دریافت‌کننده ATRA کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد (جدول ۱). در کنار این تغییرات، نتایج تست MTT حاکی از کاهش در میزان تکثیر لنفوسیتی در گروه درمانی با ATRA در قیاس با گروه میتلا ولی بدون درمان، به دنبال تحریک مجدد لنفوسیت‌های طحالی با پپتید MOG در محیط کشت می‌باشد (نمودار ۴). بر اساس نتایج حاصل از آنالیز داده‌های فلوسیتومتری، سطح لنفوسیت‌های T کمکی تنظیمی ( $CD4+ CD25+ FOXP3+$ ) در گروه

EAE و درمان‌نشده ( $16 \pm 0.16$  گرم) و موش‌های میتلا به EAE و درمان‌شده ( $17.7 \pm 0.4$ ) در قیاس با موش‌های سالم ( $20.1 \pm 0.14$ ) به‌طور معنی‌داری کم‌تر می‌باشد ( $P < 0.0005$ ). این یافته‌ها نشان می‌دهند که میانگین وزن موش‌های میتلا ولی تحت درمان با ATRA نسبت به موش‌های میتلا ولی درمان‌نشده به میزان کم‌تری کاهش می‌یابد ( $P < 0.0005$ ). مقایسه تغییرات روزانه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار وزن بین دو گروه اخیر در بازه زمانی روزهای ۲۶ تا ۳۳ پس از القای بیماری می‌باشد (نمودار ۲). به دنبال تحریک مجدد لنفوسیت‌های طحالی با پپتید MOG در محیط کشت میزان تولید سایتوکین‌های پیش‌التهابی  $IFN-\gamma$  و IL-17 به‌طور معنی‌داری کاهش

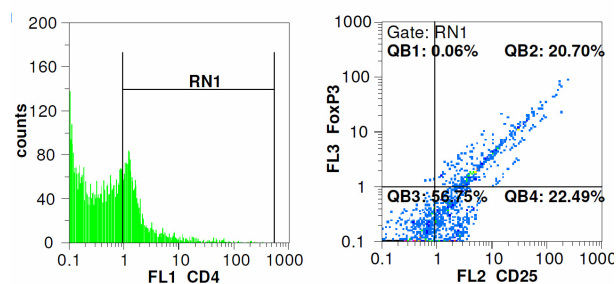
جدول ۱: مقایسه نسبت سایتوکین‌های تولیدی در موش‌های مبتلا به EAE

درمان‌نشده و درمان‌شده با ATRA			
گروه‌ها	نسبت‌ها	IFN- $\gamma$ :IL-17	IFN- $\gamma$ :IL-10
مبتلا، درمان‌شده با ATRA	۳/۶۱±۰/۷۴	۵/۱۴±۰/۸۵	۳/۹۳±۰/۷۹
مبتلا	۱/۹۷±۰/۲	۱۷/۵۴±۲/۱۸	۱۱/۹۵±۰/۷۸
P	۰/۰۲	<۰/۰۰۰۵	<۰/۰۰۰۵

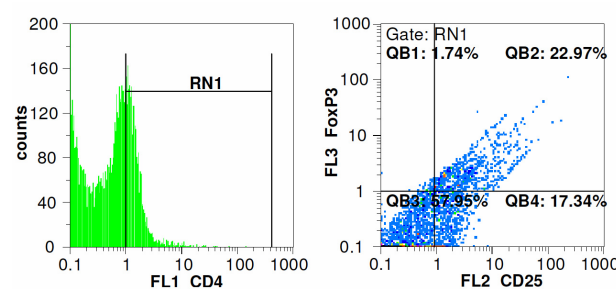
درمانی شده است. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که در این شرایط، تجویز ATRA موجب بهبود در نمای بالینی و تغییرات وزن نسبت به گروه کنترل می‌گردد. این بهبودی نسبی به‌طور هم‌زمان با تعدیل پاسخ‌های ایمنی به‌صورت کاهش تکثیر لنفوسیتی در پاسخ به MOG، در کنار کاهش تولید سایتوکین‌های پیش‌تهابی و پاتوژنیک IL-17 و IFN- $\gamma$  می‌باشد.

IL-17 سایتوکین اصلی و شاخص رده سلولی Th17 می‌باشد. این سایتوکین یک سایتوکین پیش‌تهابی قوی بوده که بر روی طیف گسترده‌ای از سلول‌ها اثر کرده و موجب آزادسازی انواع مدیاتورهای التهابی از قبیل سایتوکین‌های IL-6، IL-8، IL-17، G-CSF و GM-CSF، کموکاین‌های CXCL1 و CXCL10 و متالوپروتئینازها می‌گردد.<sup>۵</sup> نقصان در این سایتوکین، به دنبال القای EAE منجر به ایجاد بیماری بسیار ملایم‌تر و همراه با تأخیر می‌گردد.<sup>۱۹</sup> عملکرد اصلی IL-17 در ایمونوپاتوژنز EAE و MS شکستن سد خونی- مغزی می‌باشد.<sup>۱۹،۲۰</sup> تجویز پادتن بلوکه‌کننده IL-17 در موش‌های ایمن‌شده با پادگن میلینی مانع بروز کموکاین‌ها در مغز شده و متعاقب آن از بروز بیماری جلوگیری می‌شود.<sup>۵</sup> گزارش شده است که بین سطح IL-17 و تعداد پلاک‌های فعال در افراد مبتلا به MS ارتباط وجود دارد.<sup>۲۰</sup> اینترفرون گاما (شاخص Th1) با القای واسطه‌های فعال اکسیژن و نیتریک اکساید در سلول‌های میکروگلیال در پاتوژنز بیماری نقش دارد.<sup>۲۱</sup> به نظر می‌رسد در حالی که سلول‌های Th17 نقش اساسی در ایجاد و پیشبرد التهاب و شکست سد خونی مغزی نقش بازی می‌نماید، سلول‌های Th1 در ایجاد ضایعات بافتی دخیل باشند.<sup>۶</sup>

افزایش معنی‌دار نسبت IFN- $\gamma$  به IL-17 که در گروه دریافت‌کننده ATRA مشاهده گردید، ممکن است از جمله سازوکارهای اثربخشی رژیم دارویی باشد. به‌طور جالب توجهی گزارش شده است که ورود



گروه مبتلا



گروه مبتلا و تحت درمان

شکل ۱: نمونه‌ای از نتایج بررسی فراوانی لنفوسیت‌های تنظیمی به‌روش فلوسیتومتری. سلول‌های موجود در RN1 بیان‌کننده درصد لنفوسیت‌های CD4+ در مجموع سلول‌های استحصالی از طحال می‌باشد. مربع QB2 بیان‌کننده درصد لنفوسیت‌های T CD 25+ FOXP3+ در گیت RN1 می‌باشد.

مبتلا ولی درمان‌شده (۲۳/۸±۱/۲۲) نسبت به گروه درمان‌نشده (۲۰/۶۵±۰/۷۲) تغییر معنی‌داری پیدا نکرده بود (P=۰/۲۲). در شکل ۱ چگونگی فرآیند محاسبه سلول‌های Treg در یک نمونه از هر گروه نشان داده شده است.

## بحث

درمان بیماری‌های خود ایمن به‌طور معمول پس از بروز علائم درمانگاهی یعنی در زمانی که کلون‌های لنفوسیت‌های خود واکنش‌گر به‌طور گسترده‌ای تکثیر یافته و تبدیل به سلول‌های تمایز یافته دارای عملکرد شده‌اند، صورت می‌گیرد. این در حالی است که عمده بررسی‌های گذشته در مورد اثرات تعدیل‌گر ایمنی ATRA به‌صورت پیش‌گیرانه صورت گرفته است.<sup>۱۰،۱۲،۱۳</sup> در این مطالعه اقدام به تجویز دارو پس از بروز علائم ناتوانی نورولوژیک در تمامی موش‌های گروه

اسید رتینویک سطح سلول‌های Th17 به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد، بدون آن‌که تغییر معنی‌داری در سطح سلول‌های FoxP3+Treg رخ دهد. محققین پیشنهاد نموده بودند که کمبود TGF- $\beta$  فاکتور محدودکننده تمایز سلول‌های FoxP3+Treg به دنبال تجویز اسید رتینویک به موش‌ها می‌باشد.<sup>۲۵</sup> این احتمال نیز مطرح شده است که سطح بالای IL-6 در محیط‌های التهابی مانع تشکیل سلول‌های FoxP3+Treg گردد.<sup>۲۸</sup> در حالی‌که تجویز ATRA در موش‌های BALB/C مبتلا به کولیت خود ایمن موجب کاهش سطح IL-17 و افزایش فراوانی سلول‌های FoxP3+Treg گشته است،<sup>۲۹</sup> تجویز آن به موش‌های NOD مبتلا به دیابت موجب افزایش در سطح سلول‌های FoxP3+Treg بدون تغییر در سطح سلول‌های Th17 شده است.<sup>۱۷</sup> این‌گونه اختلاف‌ها می‌تواند به دلیل تفاوت در محیط سایتوکینی ایجاد شده به دلیل ماهیت بیماری و یا تفاوت‌های نژادی باشد. مسلماً این موارد نیازمند تحقیقات گسترده‌تر می‌باشد. در هر حال کاهش سایتوکین‌های پاتوژنیک که در بالا به آن‌ها اشاره شد، می‌تواند تعادل را به نفع سلول‌های مهار کننده FoxP3+Treg تغییر دهد.

در نهایت این‌که ATRA موجب بهبود روند EAE پس از بروز علائم در همراهی با کاهش تکثیر لنفوسیت‌های خود واکنش‌گر و تغییر نسبت سایتوکین‌های تولیدی به نفع سایتوکین‌های ضد التهابی می‌گردد. سطح بالای IL-17 در خون افراد مبتلا به MS در ارتباط با عدم پاسخ نسبت به IFN- $\beta$  بوده است.<sup>۱۹</sup> بر اساس یافته‌های ما درمان با ATRA در مدل موشی بیماری MS موجب کاهش سطح IL-17 را فراهم می‌دارد. بنابراین این احتمال مطرح می‌گردد که افزودن این دارو به رژیم درمانی این افراد دارای اثرات سودمندی باشد.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه تحت عنوان "ارزیابی اثرات تجویز عمومی داروهای آتورواستاتین و اسید رتینویک بر پلاریزه شدن پاسخ لنفوسیت‌های T کمکی و سیمای بالینی و هیستوپاتولوژیک آنسفالومیلیت تجربی خودایمن در موش C57BL/6" در مقطع دکترای تخصصی ایمنی‌شناسی در سال ۱۳۸۹ و کد ۱۱۴۵ می‌باشد که با حمایت دانشگاه ارومیه اجرا شده است. در پایان نگارندگان از زحمات مجموعه کارکنان پژوهشکده زیست فن‌آوری و دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه و هم‌چنین آزمایشگاه ایمنی‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اراک کمال تقدیر و تشکر را دارند.

سلول‌های Th17 به بافت مغزی تنها در صورت بیش‌تر بودن سطح سلول‌های Th17 در قیاس با سلول‌های Th1، صورت می‌گیرد.<sup>۲۲</sup> سلول‌های مولد اینترلوکین ۱۷ در سیر پاتوژنز خود ایمنی قبل از Th1 به بافت مهاجرت کرده و با ایجاد شرایط التهابی و شکست سد خونی مغزی زمینه ورود سایر سلول‌ها را فراهم می‌دارند.<sup>۱۹</sup> در عین حال به نظر می‌رسد که سلول‌های Th1 نیازمند مشارکت Th17 به منظور ایجاد التهاب و تخریب بافتی باشند. مجموعه این عوامل منجر به بیان این نظریه شده است که سلول‌های Th17 در قیاس با Th1 نقش مهم‌تری را در ایجاد بیماری بازی می‌نمایند.<sup>۵</sup>

IL-10، نقش مهمی را در محدود کردن پاسخ‌های التهابی و ممانعت از ایجاد آسیب‌های بافتی، بازی می‌نماید.<sup>۳۳</sup> با وجودی‌که سطح IL-10 در این مطالعه افزایش معنی‌داری را نشان نداد، ولی تغییر معنی‌دار نسبت IFN- $\gamma$  به IL-10 و IL-17 به IL-10 منجر به تغییر توازن به نفع سایتوکین ضد التهابی IL-10 شده و بدین ترتیب می‌تواند در کاهش شدت بیماری در گروه تحت درمان با ATRA مشارکت نماید. کاهش تکثیر لنفوسیتی در پاسخ به تحریک مجدد با پپتید MOG و به تبع آن کاهش لنفوسیت‌های اتوراکتیو که در گروه درمانی با ATRA دیده شد، از جمله عوامل کاهش شدت بیماری می‌باشد. بررسی‌های گذشته نیز حاکی از اثرات ضد تکثیر لنفوسیتی ATRA به صورت وابسته به دوز بوده است.<sup>۱۴،۲۲</sup> تعادل بین لنفوسیت‌های FoxP3+Treg و سلول‌های تولیدکننده IL-17 نقش مهمی را در پیشگیری و مهار بیماری‌های خود ایمن بازی می‌کند.<sup>۸،۹،۲۱</sup> نتایج مطالعات In vitro در مورد ATRA نشان داده است که ATRA هم‌زمان با کاهش سطح سلول‌های Th17 موجب افزایش سطح سلول‌های FoxP3+Treg می‌گردد.<sup>۱۱</sup> در بدن نیز سلول‌های دندرتیک CD103+ موجود در روده با تولید اسید رتینویک عملکرد مشابهی دارند.<sup>۲۵</sup> تکامل سلول‌های FoxP3+Treg نیازمند TGF- $\beta$  است. در حالی‌که TGF- $\beta$  در کنار سایتوکین التهابی IL-6 موجب پیشبرد تکامل سلول‌های Th17 در موش می‌گردد.<sup>۲۶،۲۷</sup> این در حالی است که در مطالعه حاضر افزایش معنی‌داری در سطح سلول‌های FoxP3+Treg مشاهده نگردید. باید توجه داشت که مطالعات In vitro در شرایط کنترل‌شده و حضور سایتوکین‌های پلاریزه‌کننده در حد بهینه صورت می‌گیرد و همواره نمی‌تواند به‌طور دقیق بیان‌گر شرایط In vivo باشد. در گذشته نیز Mucida مشاهده کرده بودند که در موش‌های مبتلا به لیستریا مونوسیتوزن درمان‌شده با

## References

- Pahan K. Neuroimmune pharmacological control of EAE. *J Neuroimmune Pharmacol* 2010;5(2):165-7.
- Lees JR, Iwakura Y, Russell JH. 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* 2008;180(12):8066-72.
- 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.
- Jäger 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:iii87-90.
- Nozaki Y, Yamagata T, Sugiyama M, Ikoma S, Kinoshita K, Funachi M. Anti-inflammatory effect of all-trans-retinoic acid in inflammatory arthritis. *Clin Immunol* 2006;119(3):272-9.
- Elias KM, Laurence A, Davidson TS, Stephens G, Kanno Y, Shevach EM, et al. Retinoic acid inhibits Th17 polarization and enhances FoxP3 expression through a Stat-3/Stat-5 independent signaling pathway. *Blood* 2008;111(3):1013-20.
- Osanai M, Nishikiori N, Murata M, Chiba H, Kojima T, Sawada N. Cellular retinoic acid bioavailability determines epithelial integrity: Role of retinoic acid receptor alpha agonists in colitis. *Mol Pharmacol* 2007;71(1):250-8.
- Zunino SJ, Storms DH, Stephensen CB. Diets rich in polyphenols and vitamin A inhibit the development of type I autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Nutr* 2007;137(5):1216-21.
- Racke MK, Burnett D, Pak SH, Albert PS, Cannella B, Raine CS, et al. Retinoid treatment of experimental allergic encephalomyelitis. IL-4 production correlates with improved disease course. *J Immunol* 1995;154(1):450-8.
- 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 C57BL/6J strain of mice. *J Autoimmun* 2003;20(1):51-61.
- 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.
- Van YH, Lee WH, Ortiz S, Lee MH, Qin HJ, Liu CP. All-trans retinoic acid inhibits type 1 diabetes by T regulatory (Treg)-dependent suppression of interferon-gamma-producing T-cells without affecting Th17 cells. *Diabetes* 2009;58(1):146-55.
- Kinoshita K, Yoo BS, Nozaki Y, Sugiyama M, Ikoma S, Ohno M, et al. Retinoic acid reduces autoimmune renal injury and increases survival in NZB/W F1 mice. *J Immunol* 2003;170(11):5793-8.
- Balasa R.T helper 17 cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Romanian J Neurol* 2010;9(4):181-8.
- Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. *Scand J Immunol* 2011;74(1):1-13.
- Petro TM. Regulatory role of resveratrol on Th17 in autoimmune disease. *Int Immunopharmacol* 2011;11(3):310-8.
- Stromnes IM, Cerretti LM, Liggitt D, Harris RA, Goverman JM. Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. *Nat Med* 2008;14(3):337-42.
- Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 2010;10(3):170-81.
- Lovett-Racke AE, Racke MK. Retinoic acid promotes the development of Th2-like human myelin basic protein-reactive T cells. *Cell Immunol* 2002;215(1):54-60.
- Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M, et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 2007;317(5835):256-60.
- Dong C. Mouse Th17 cells: current understanding of their generation and regulation. *Eur J Immunol* 2009;39(3):640-4.
- Aranami T, Yamamura T. Th17 Cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS). *Allergol Int* 2008;57(2):115-20.
- Korn T, Reddy J, Gao W, Bettelli E, Awasthi A, Petersen TR, et al. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med* 2007;13(4):423-31.
- Bai A, Lu N, Guo Y, Liu Z, Chen J, Peng Z. All-trans retinoic acid down-regulates inflammatory responses by shifting the Treg/Th17 profile in human ulcerative and murine colitis. *J Leukoc Biol* 2009;86(4):959-69.

## Therapeutic effects of all-trans retinoic acid on experimental autoimmune encephalomyelitis and its role in T-helper lymphocyte responses

Received: November 02, 2011 Accepted: November 29, 2011

### Abstract

Seyyed Meysam Abtahi  
Froushani D.V.M.<sup>1\*</sup>  
Norouz Delirez Ph.D.<sup>1</sup>  
Rahim Hobbenaghi D.V.SC<sup>2</sup>  
Ghasem Mosayebi Ph.D.<sup>3</sup>

1- Department of Microbiology,  
Faculty of Veterinary Medicine,  
Urmia University, Urmia, Iran.

2- Department of Pathobiology,  
Faculty of Veterinary Medicine,  
Urmia University, Urmia, Iran.

3- Department of Immunology,  
Faculty of Medicine, Arak  
University of Medical Sciences,  
Arak, Iran.

**Background:** Recent studies have demonstrated an essential role for IL-17 in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Furthermore, it has been shown that FoxP3<sup>+</sup>Treg cells play an important role in the suppression of autoinflammatory reactions. Although, previous studies have determined the immunomodulatory potentials of all-*trans*-retinoic acid (ATRA), but these immunomodulations have been mostly justified by alteration in Th1/Th2 cytokines. The present study was carried out to investigate the therapeutic effects of ATRA on EAE and its effects on T-helper cells responses.

**Methods:** EAE was induced by MOG<sub>35-55</sub> peptide and complete Freund's adjuvant in female C57BL/6 mice. The mice were allocated to two therapeutic groups (n=7 per group). Treatment with ATRA (500 µg/mouse; every other day) was initiated in treatment group on day 12 when they developed a disability score. EAE controls received vehicle alone with the same schedule. Signs of disease were recorded daily until day 33 when the mice were sacrificed. Splenocytes were tested for proliferation by MTT test, cytokine production by ELISA and FoxP3<sup>+</sup>Treg cell frequency by flowcytometry.

**Results:** ATRA significantly reduced the clinical signs of established EAE. Aside from decreasing lymphocytic proliferation (P<0.05), ATRA significantly inhibited the production of pro-inflammatory IL-17 (P<0.005) as well as IFN-γ (P<0.0005) upon antigen-specific restimulation of splenocytes. FoxP3<sup>+</sup>Treg cell frequency and IL-10 levels were not altered significantly. However, IFN-γ to IL-10 and IL-17 to IL-10 ratios decreased significantly (P<0.0005).

**Conclusion:** Parallel to reducing autoreactive lymphocyte proliferation and cytokine production in favor of pro-inflammatory cytokines, all-*trans*-retinoic acid ameliorated established experimental autoimmune encephalomyelitis.

**Keywords:** All-*trans*-retinoic acid, autoimmune response, experimental autoimmune encephalomyelitis, lymphocyte, multiple sclerosis.

\* Corresponding author: Dept. of Microbiology, Veterinary Faculty, Urmia University, Sero Road, Urmia, Iran.  
Tel: +98-913-3000470  
E-mail: meysam.abtahi@yahoo.com