

## *Effect of Phenytoin on the Polarization of Immunity Responses in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*

Rezvan Mansouri<sup>1</sup>,  
Shiva Khezri<sup>2</sup>,  
Seyed Meysam Abtahi Froushani<sup>3</sup>

<sup>1</sup> MSc in Animal Physiology, Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary, Urmia University, Urmia, Iran

(Received January 24, 2016 ; Accepted July 4, 2016)

### **Abstract**

**Background and purpose:** Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is an animal model of multiple sclerosis. The hallmark of this disease is an autoimmune neuroinflammation induced by autoreactive lymphocytes attack. Previous documents indicated that phenytoin can protect axonal loss in EAE. Here, we investigated the immunomodulatory effects of phenytoin in EAE.

**Materials and methods:** In this experimental study, EAE was induced by guinea pig spinal cord homogenate and complete Freund's adjuvant in Wistar rats. The animals were then divided into two therapeutic groups (n=7 per group). Phenytoin therapy (50 mg/kg-daily) was started in treatment group at day 12 when the treatment group developed a disability score. EAE control mice received vehicle alone on the same schedule. Signs of disability were monitored daily until day 36 when mice were sacrificed. Splenocytes were checked for proliferation by MTT test and cytokine production by ELISA.

**Results:** Phenytoin therapy after the occurrence of clinical symptoms significantly regressed the clinical symptoms and improved the weigh index of EAE rats. Phenytoin significantly decreased the production of pro-inflammatory TNF- $\alpha$  and IL-17 as well as IFN- $\gamma$  in supernatant of spleen cells culture (P<0.001). However, the levels of anti-inflammatory IL-10 were not altered significantly. Lymphocyte proliferation significantly decreased in treatment group compared with that in control group (P<0.001).

**Conclusion:** In addition to direct neuroprotective effects, phenytoin can also improve EAE via modulation of immune responses.

**Keywords:** multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalomyelitis, phenytoin

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26 (141): 26-35 (Persian).

# تأثیر فنی توئین بر پلاریزه شدن پاسخ های ایمنی در آنسفالومیلیت تجربی خود ایمن [EAE]

رضوان منصوری<sup>۱</sup>شیوا خضری<sup>۲</sup>سید میثم ابطحی فروشانی<sup>۳</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف:** آنسفالومیلیت تجربی خودایمن (EAE) مدل تجربی مولتیپل اسکلروزیس است. شاخصه اصلی این بیماری یک التهاب عصبی خود ایمن است که به دنبال حمله لنفوسیت های خود واکنش گر ایجاد می گردد. مطالعات قبلی اثرات مستقیم نورپروتکتیو فنی توئین را در EAE نشان داده است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات ایمونومودولاتوری فنی توئین در EAE بوده است.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه تجربی، EAE توسط نخاع هموژنیزه شده خو کچه هندی و ادجوانت کامل فروند در رت های نژاد ویستار القاء شد. سپس رت ها در دو گروه ۷ رآسی قرار گرفتند. درمان با فنی توئین (۵۰ mg/Kg روزانه) از زمان بروز علائم درمانگاهی در گروه درمانی (روز ۱۲) آغاز گشت. هم زمان، گروه کنترل تنها حلال دارو را دریافت نمودند. علائم تا زمان کشتار رت ها (روز ۳۶) روزانه ثبت گردید. میزان تکثیر به وسیله آزمون MTT و میزان تولید سایتوکاین ها به وسیله ELISA و در بین سلول های طحالی سنجیده شد.

**یافته ها:** تجویز فنی توئین پس از بروز علائم به طور معنی داری موجب تخفیف شدت علائم بالینی و بهبود وزن گیری رت های مبتلا به EAE گشت. فنی توئین موجب کاهش سطح سایتوکاین های پیش التهابی  $TNF-\alpha$ ،  $IL-17$  و  $IFN-\gamma$  در سوپ رویی کشت سلول های طحالی شد ( $p < 0/001$ ). با این حال سطح سایتوکاین ضد التهابی  $IL-10$  تغییر معنی داری نیافت. شدت تکثیر لنفوسیتی نیز در رت های گروه تیمار نسبت به گروه شاهد کاهش معنی داری یافت ( $p < 0/001$ ).

**استنتاج:** فنی توئین علاوه بر اثرات مستقیم نورپروتکتیو از طریق تعدیل واکنش های ایمنی نیز می تواند موجب بهبود EAE شود.

**واژه های کلیدی:** مولتیپل اسکلروزیس، آنسفالومیلیت تجربی خودایمن، فنی توئین

## مقدمه

بیماری یک بیماری التهابی مزمن است که با ضایعات دمیله در مغز، طناب نخاعی و عصب چشمی شناسایی می شود (۲۰۱).

مولتیپل اسکلروزیس (MS) یکی از متداول ترین بیماری های نورولوژیک بوده که معمولاً در سنین جوانی و به طور شایع تر در زنان بروز می کند (۱). ماهیت این

E-mail: sh.khezri@urmia.ac.ir

**مؤلف مسئول:** شیوا خضری - ارومیه: دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم

۱. کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ایران

۲. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳. استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۴/۱۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۴/۱۲/۱۴

آنسفالومیلیت تجربی خود ایمن (EAE)، یک بیماری قابل القاء و خود التهابی سیستم اعصاب مرکزی در جانوران می باشد که سال هاست به عنوان مدل تجربی بیماری MS مورد استفاده قرار می گیرد (۳). اطلاعات به دست آمده از این مدل پایه و اساس بسیاری از دانسته های کنونی در مورد فرآیند بیماری زایی MS را تشکیل می دهد. هم چنین بسیاری از ترکیبات دارویی پذیرفته شده و یا در حال بررسی در ابتدا روی مدل جانوری بیماری آزمایش شده اند (۴). شواهد موجود نشان می دهد که سیستم ایمنی نقش مهمی در پاتوژنز MS و هم چنین EAE دارد. براساس این فرضیه، MS و EAE از یک حمله خود ایمن توسط لنفوسیت ها علیه میلین یا آنتی ژن های الیگودندریتی خودی ایجاد می گردد (۱). با وجود پیشرفت هایی که تا کنون در امر درمان مبتلایان صورت گرفته است ولی بسیاری از افراد در حد بهینه به درمان های موجود پاسخ نمی دهند (۳). بنابراین یافتن راه کارهایی جهت افزودن به برنامه درمانی بیماران MS لازم به نظر می رسد. حمله لنفوسیت های خود واکنش گر در بیماری EAE و MS موجب دمیلینه شدن و گسست در هدایت جهشی در آکسون ها نیز می گردد (۲، ۳). در این حالت به منظور بازگرداندن قابلیت هدایت، کانال های سدیمی که معمولاً در گره های رانویه (ranvier nodes) مستقر هستند به طور گسترده ای در طول غشاء آکسون توزیع می گردند. تغییر الگوی بیان و توزیع کانال های سدیمی از طریق افزایش جریان مداوم سدیم به سلول موجب برگرداندن هدایت پتانسیل عمل به ناحیه دمیلینه می گردد. در این شرایط خروج سدیم به منظور برگرداندن سلول به وضع قبل از دیپلاریزاسیون لازم می باشد. طبیعی است که خروج سطح بالاتری از سدیم داخل سلولی مستلزم افزایش فعالیت پمپ های  $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$  خواهد بود. بدین ترتیب نیاز سلول به انرژی به نحو قابل توجهی افزایش می یابد (۵). به طور هم زمان آسیب های اکسیداتیو ناشی از رادیکال های آزاد اکسیژن و نیتریک اکسید در بیماری منجر به آسیب گسترده به میتو کندری ها و

اختلال می شود. اگر محتوای داخل سلولی سدیم به بالای حد آستانه خود برسد به منظور حفظ حالت خنثی الکتریکی سلول، عملکرد مبادله گر  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  که به طور معمول معاوضه کلسیم داخل سلولی با سدیم خارج سلولی را انجام می دهد، معکوس می گردد. افزایش کلسیم داخل سلول به دلیل تلاش سلول جهت رهایی از سربار سدیم موجب بروز پاسخ های استتاله ای و مرگ سلولی می شود (۵، ۶). بنابراین می توان نتیجه گیری کرد عواملی که منجر به تثبیت کانال های سدیمی بگردد، ممکن است که با ایجاد آرامش در آکسون ها موجبات ترمیم آن ها را فراهم آورد.

فنی توئین از جمله قدیمی ترین داروهای ضد صرع می باشد. این دارو از جمله مشتقات هیدانتوئین است که مصرف آن با اثر بر کانال های سدیمی غشاء موجب غیرفعال سازی آن ها می شود و بر ورود سدیم و ایجاد پتانسیل عمل موثر است. مصرف این دارو موجب تغییر در سطح ناقل های عصبی نوراپی نفرین، سروتونین، استیل کولین و GABA می شود (۷، ۸). به طور جالب توجهی برخی مطالعات نشان دهنده اثرات مستقیم نروپروتکتیو این دارو در مدل EAE بوده است (۱۱-۹). با این حال تا کنون مطالعات چندانی در مورد امکان تغییر پلاریزه شدن پاسخ های ایمنی پس از مصرف این دارو صورت نگرفته است. لذا هدف از این مطالعه ضمن بررسی اثرات فنی توئین بر روند بیماری EAE، ارزیابی اثرات آن بر پلاریزه شدن و پاسخ لنفوسیت ها بوده است.

## مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی که به صورت تجربی مداخله ای انجام گرفت، جامعه مورد مطالعه شامل رت های نر نژاد ویستار با محدوده سنی ۶ تا ۸ هفته بود که از مرکز پرورش حیوانات دانشکده علوم دانشگاه ارومیه تهیه شد. رت ها در حیوان خانه دانشکده علوم دانشگاه ارومیه در شرایط استاندارد آب، غذا، دما و نور کافی نگهداری شدند.

## القای بیماری

برای القای EAE، هموزن بافت نخاع کوچک هندی به نسبت ۱ به ۱ با ادجوانت کامل فروند (CFA) که محتوی ۱۰ میلی گرم در کیلوگرم پیکره کشته شده مایکوباکتریوم بود، به حالت امولسیون درآمد. پس از بیهوشی، ۴۰۰ میکرولیتر مخلوط آنتی ژن و ادجوانت مزبور به صورت زیرجلدی در ناحیه پشت و ۱۰۰ میکرولیتر در ناحیه بالشتک هر رت با سوزن ۲۵ Gag تزریق گردید. مقدار  $10^9$  باکتری بروتدلا پاراپروتوسیس (مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، IBRC-MI0710) نیز در حجم ۳۰۰ میکرولیتر PBS در روز تزریق پیتید و ۴۸ ساعت بعد به صورت داخل صفاقی تزریق گردید (۱۲).

## برنامه درمانی

چهارده راس رت ویستار پس از القاء به بیماری به دو گروه ۷ راسی با شرایط سنی و وزنی یکسان تقسیم شد تا ۲۴ روز پس از بروز علائم درمانگاهی تحت درمان قرار گرفتند. در گروه درمان، فنی توین با نام تجاری HYDANTIC (شرکت داروسازی کاسپین تامین) به میزان ۵۰ میلی گرم در کیلوگرم پس از بروز اولین علائم درمانگاهی در همه رت‌های گروه تحت درمان (۱۲ روز پس از القای بیماری) به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. مبنای انتخاب دوز بر مبنای مطالعات گذشته مبنی بر حاشیه سلامت دارو تا این میزان در رت‌های ویستار بود (۱۳). ۷ راس دیگر از رت‌های مبتلا نیز به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شدند. این رت‌ها در حجمی مشابه با گروه قبلی پس از بروز علائم در همه رت‌های این گروه (روز ۱۲ پس از القاء) تحت درمان با PBS قرار گرفتند. در ضمن ۷ راس رت نر نژاد ویستار که از نظر سن، جنس و وزن مشابه با دو گروه قبلی بودند به عنوان گروه سالم غیر بیمار در نظر گرفته شدند. این رت‌ها فرآیند ایجاد بیماری را بدون آنتی ژن (هموزن بافت نخاع کوچک هندی) طی کرده و هم‌زمان با آن‌ها تحت درمان با دارونما قرار گرفتند.

## ارزیابی بیماری

روند بیماری و تغییرات وزن رت‌ها روزانه مورد ارزیابی قرار گرفت. از مقیاس زیر جهت ارزیابی شدت بیماری استفاده گردید: صفر: عدم بروز بیماری، یک: اختلال در حرکت دم، دو: فلج شدن دم، سه: فلجی دو پا، چهار: فلجی چهار دست و پا، پنج: مرگ (۱۲).

## کشت سلول‌های طحال و ارزیابی سایتوکاین‌ها

برای تهیه کشت سلولی طحال و سنجش سایتوکاین‌های موجود در سوپ رویی آن، ۳ هفته بعد از آغاز درمان (روز ۳۶ پس از القای بیماری) هم‌زمان با خون‌گیری اقدام به نخاعی نمودن رت‌ها شد. بلافاصله تحت شرایط استریل طحال رت‌ها خارج و بعد از قطعه‌قطعه شدن در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI-1640 (شرکت Sigma-آمریکا) حاوی ۱۰ درصد FBS (شرکت Gibco-آلمان) له گردید. بافت حاصل جهت تهیه سوسپانسیون سلولی از توری سیمی به قطر  $0/2$  میلی‌متر عبور داده شد. پس از سانتریفیوژ (۱۰ دقیقه در ۲۰۰ گرم)، به‌منظور حذف گویچه‌های سرخ، به رسوب سلولی به دست آمده ۵ میلی‌لیتر بافر لیزکننده ACK (کلرید آمونیوم) افزوده شد. بعد از پنج دقیقه ضمن افزودن ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت بار دیگر به مدت ده دقیقه در ۲۰۰ گرم سانتریفیوژ شد. سپس رسوب سلولی در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰ درصد FBS به حالت سوسپانسیون در آورده شد. پس از فرآیند شمارش، سوسپانسیون سلولی به تعداد  $2 \times 10^6$  سلول در میلی‌لیتر از آن تهیه شد. این سلول‌ها در پلیت‌های کشت ۲۴ خانه در حضور پیتید فیتوم آگلوتین (PHA) با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور حاوی ۵ درصد کشت داده شدند. پس از طی این مدت مایع رویی آن‌ها جمع‌آوری شد (۱۴). برای سنجش سایتوکاین‌های IFN- $\gamma$ ، IL-۱۰ و IL-۱۷ از کیت‌های ELISA مربوطه (شرکت BENDERMED-آلمان) استفاده شد و بر طبق دستورالعمل مندرج در دفترچه راهنمای هر کدام از کیت‌ها اقدام گردید.

## ارزیابی میزان تکثیر لنفوسیتی

میزان تکثیر سلول‌های ایمنی با روش MTT بررسی شد. برای این کار پس از طی مراحل که در بالا توضیح داده شد و به دنبال شمارش سلول‌ها، سوسپانسیون حاوی  $1 \times 10^6$  سلول در میلی‌لیتر تهیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر 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 فیتوهم آگلوتین در نظر گرفته شد. به عنوان بلانک نیز در سه چاهک از محیط RPMI خالی استفاده شد. بعد از ۷۲ ساعت نگهداری در انکوباتور حاوی  $CO_2$  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 ماده MTT توسط سلول‌های زنده و در حال تکثیر سبب تشکیل کریستال‌های فورمازون گردید که با افزودن ۱۰۰ میکرو لیتر DMSO به حالت محلول درآمد. سپس شدت رنگ در طول موج ۴۹۰ نانومتر تعیین و ایندکس تحریک بر اساس رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{ایندکس تحریک (۱۴)} = \frac{OD(\text{بلانک}) - OD(\text{در حضور PHA})}{OD(\text{بلانک}) - OD(\text{در عدم حضور PHA})}$$

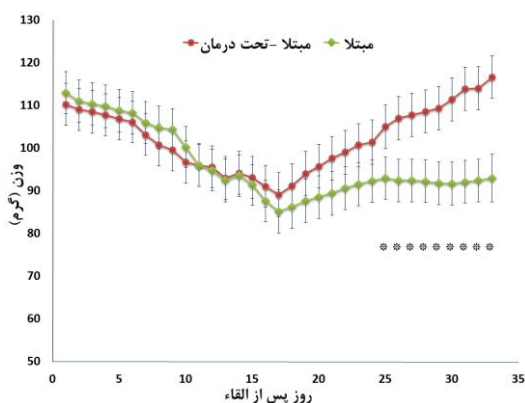
## آنالیز آماری

مقایسه داده‌های ناپارامتری مربوط به شدت علائم درمانگاهی با استفاده از آزمون Mann-Whitney-U انجام 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 شد و به صورت انحراف معیار  $\pm$  میانگین گزارش گردید. کلیه بررسی‌های آماری در محیط نرم‌افزاری SPSS نسخه ۲۰ انجام شد و برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Excel نسخه ۲۰۱۶ استفاده گردید.

## یافته‌ها

بررسی تغییرات وزن در بین گروه‌های تحت مطالعه نشان داد که درمان با فنی توئین موجب بهبود معنی‌داری

در میانگین وزن رت‌های تحت درمان نسبت به رت‌های شاهد و درمان نشده می‌گردد (جدول شماره ۱). مقایسه تغییرات روزانه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار وزن بین دو گروه اخیر در بازه زمانی روزهای ۲۵ تا ۳۳ پس از القاء بیماری بود (نمودار شماره ۱). بر این اساس به نظر می‌رسد که روند کاهش وزن در رت‌های تحت درمان از روز ۲۵ پس از القای بیماری به‌طور معنی‌داری نسبت به رت‌های گروه شاهد معکوس می‌شود.



نمودار شماره ۱: مقایسه میانگین تغییرات وزن بین رت‌های مبتلا به EAE و مبتلا به EAE تحت درمان با فیتوئین. (\* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0.05$ ) بین رت‌های شاهد و رت‌های تحت درمان با فنی توئین می‌باشد).

بر اساس نتایج به دست آمده میانگین شدت اختلال حرکتی در طول دوره درمان در رت‌های تحت درمان با فنی توئین نسبت به گروه شاهد کاهش یافت (جدول شماره ۱). هم‌چنین میانگین حداکثر شدت بیماری در رت‌های تحت درمان در مقایسه با رت‌های شاهد کاهش یافت (جدول شماره ۱). حداکثر شدت بیماری در رت‌های گروه تحت درمان در روز ۲۰ و در رت‌های گروه شاهد روز ۱۷ بود (نمودار شماره ۲). مقایسه تغییرات روزانه علائم بین دو گروه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در شدت علائم در بازه زمانی روزهای ۲۲ تا ۳۳ پس از القاء بیماری بود (نمودار شماره ۲). بر اساس نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد که رت‌های درمان شده با فنی توئین بیماری خفیف‌تری را طی می‌کنند.

فیتو هم آگلوتینین بین رت‌های مبتلا به EAE (شاهد) و مبتلا به EAE و تحت درمان با فنی توئین (تیمار). (\* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0.01$  نسبت به رت‌های گروه شاهد می‌باشد).

جدول شماره ۱: ارزیابی برخی از شاخص‌های بیماری بین رت‌های مبتلا به EAE (شاهد) و مبتلا به EAE تحت درمان با فنی توئین (تیمار)

گروه‌ها	وزن <sup>۱</sup>	شدت ناتوانی <sup>۲</sup>	حداکثر شدت ناتوانی <sup>۳</sup>	شدت تکثیر لنفوسیتی <sup>۴</sup>
	انحراف معیار میانگین	انحراف معیار میانگین	انحراف معیار میانگین	انحراف معیار میانگین
شاهد	1009 ± 55	212 ± 0.1	336 ± 0.24	214 ± 0.2
تیمار	967.4 ± 92	1.58 ± 0.12	2.87 ± 0.17	1.34 ± 0.16
سطح معنی‌داری	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

۱. گرم

۲. شدت بیماری بر اساس مقیاس زیر بین رت‌ها سنجیده شد:

صفر: عدم بروز بیماری، یک: اختلال در حرکت دم، دو: فلج شدن دم،

سه: فلجی دو پا، چهار: فلجی چهار دست و پا، پنج: مرگ

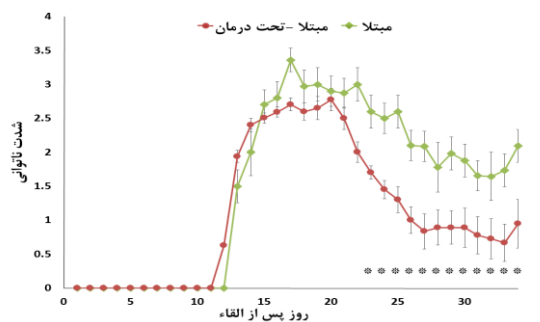
۳. جذب نوری

## بحث

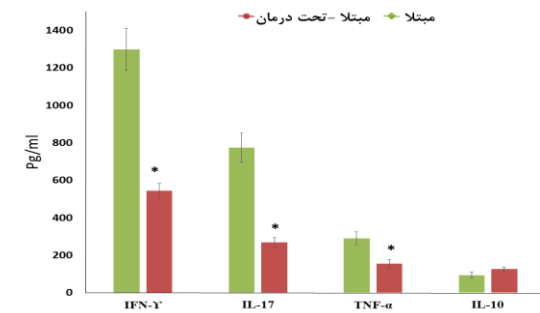
در شرایط واقعی درمان بیماری‌های خود ایمن پس از بروز نشانه‌های بالینی یعنی در زمانی که کلون‌های لنفوسیت‌های خود واکنش گر به طور گسترده‌ای تکثیر یافته و تبدیل به سلول‌های تمایز یافته عملکردی شده‌اند، صورت می‌پذیرد. در این مطالعه نیز تجویز فنی توئین پس از بروز علائم ناتوانی نورولوژیک در رت‌های گروه درمانی صورت گرفت. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که در این شرایط تجویز فنی توئین موجب بهبود در سیمای بالینی و تغییرات وزن رت‌های شاهد نسبت به گروه کنترل می‌گردد. همان‌طور که ذکر شد اثرات مستقیم فنی توئین در حفاظت از آکسون‌ها در مدل‌های مختلف EAE در مطالعات قبلی مشخص شده است. به طور مثال Black و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که در رت‌های شاهد به EAE پس از ۹۰ روز حداقل یک کاهش ۴۰ درصدی در میزان اکسون‌های مسیر کورتیکواسپینال اتفاق می‌افتد. درمان طولانی مدت (۹۰ روزه) با فنی توئین منجر به برگشت سطح اکسون‌ها در حد ۹۶ درصد رت‌های سالم شده است (۱۱). بسیاری از تحقیقات گذشته اثرات مفید فنی توئین در EAE را تنها مرتبط با ایجاد آرامش در کانال‌های سدیمی وابسته به

سنجش سایتوکاین‌های سوپ‌طحالی نشان داد که میزان تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی  $\text{TNF-}\alpha$ ،  $\text{IFN-}\gamma$  و  $\text{IL-17}$  در گروه تحت درمان نسبت به رت‌های شاهد کاهش می‌یابد (نمودار شماره ۳). البته با وجودی که سطح سایتوکاین ضد التهابی  $\text{IL-10}$  در گروه درمانی نسبت به گروه شاهد کاهش یافت اما این کاهش معنی‌دار نبود (نمودار شماره ۳).

میزان تکثیر لنفوسیت‌های طحالی به شیوه MTT سنجیده شد. نتایج حاصل از تست لنفوسیتی حاکی از کاهش معنی‌دار ( $p < 0.01$ ) شدت تکثیر لنفوسیتی در گروه درمان شده با فنی توئین در مقایسه با گروه شاهد به دنبال تحریک لنفوسیت‌های طحالی با میتوزن فیتو هم آگلوتینین در محیط کشت است (جدول شماره ۱). بهبود شاخص‌های میانگین میانگین وزن، میانگین شدت ناتوانی و میانگین حداکثر شدت ناتوانی در رت‌های گروه درمانی در جدول شماره ۱ مشهود است.



نمودار شماره ۲: مقایسه شدت بیماری در روزهای مختلف بین گروه‌های مختلف. (\* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح  $p < 0.05$ ) بین رت‌های مبتلا درمان نشده و رت‌های تحت درمان با فنی توئین می‌باشد).



نمودار شماره ۳: مقایسه میانگین غلظت سایتوکاین‌های سوپ‌رویسی کشت سلول‌های طحالی پس از ۷۲ ساعت کشت در حضور میتوزن

ولتاژ در سطح آکسون‌ها دانسته‌اند (۹-۱۱). لازم به ذکر است که در یک مطالعه قدیمی حضور کانال‌های سدیمی وابسته به ولتاژ را در سطح لنفوسیت‌های T گزارش نموده بودند (۱۵). با این حال عملکرد این گونه کانال‌ها در فعالیت لنفوسیت‌های T تا کنون مشخص نبوده است. به طور جالب توجهی یافته‌ها در این مطالعه اثرات مستقیم ضد التهابی و تعدیل‌کننده ایمنی فنی توئین را نشان داد. در معدود مطالعات گذشته نیز به اثرات ضد التهابی و مهارکننده پاسخ‌های لجام گسیخته ایمنی در شوک آندوتوکسیک توسط فنی توئین (۱۶) و هم‌چنین عملکرد ماکروفاژها (۱۷) اشاره شده است.

گسترش لنفوسیت‌های خودواکنش‌گر در بافت‌های محیطی و نفوذ آن‌ها به دستگاه عصبی مرکزی عامل شعله‌ورسازی بیماری می‌باشد (۱). کاهش تکثیر لنفوسیتی در پاسخ به تحریک مجدد با میتوزن فیتوهم آگلوتین و به تبع آن کاهش لنفوسیت‌های خود واکنش‌گر که در گروه درمانی با فنی توئین دیده از جمله عوامل کاهش‌دهنده شدت بیماری می‌باشد.

فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا (TNF- $\alpha$ ) از جمله سایتوکاین‌های اصلی در ایجاد و تنظیم پاسخ‌های ایمنی می‌باشد (۱۸). بسیاری از سلول‌های دخیل در واکنش‌های ایمنی از قبیل لنفوسیت‌های Th1، ماکروفاژهای التهابی، سلول‌های کشنده طبیعی، ماست سل‌ها، ائوزینوفیل‌ها و حتی خود نوروها و سلول‌های پشتیبان عصبی نیز قادر به تولید این سایتوکاین هستند (۱۹). بر اساس مطالعات انجام شده TNF- $\alpha$  نقش مهمی در پاتوژنز EAE و MS بازی می‌کند (۲۰، ۲۱). این سایتوکاین در ایجاد التهاب و شکست سد خونی- مغزی، فعال‌سازی سلول‌های میکروگلیال و هم‌چنین القای آپوپتوز در نوروها در حین بیماری EAE و MS نقش اساسی بازی می‌کند. بررسی‌ها نشان داده است که سطح این سایتوکاین در خون و مایع مغزی- نخاعی افراد مبتلا به MS افزایش می‌یابد (۲۰). هم‌چنین نشان داده شده است که بین سطح TNF- $\alpha$  و شدت بیماری رابطه مستقیمی وجود دارد (۲۱).

بنابراین کاهش سطح این سایتوکاین در بیماران MS در مهار بیماری ارزنده خواهد بود. مطالعه حاضر نیز نشان داد که فنی توئین موجب کاهش این سایتوکاین در رت‌های شاهد و تحت درمان نسبت به رت‌های شاهد و بدون درمان می‌شود. در همین راستا نشان داده شده است که استفاده از آنتی‌بادی ضد TNF- $\alpha$  موجب کاهش علائم در EAE شده است (۲۲). تولید مداوم TNF- $\alpha$  موجب تحلیل سلول‌های عضلانی و چرب و ایجاد کاشکسی می‌شود (۱۸). بنابراین قسمتی از بهبودی که در کاهش وزن رت‌های مبتلا به EAE و تحت درمان در این مطالعه نشان داده شد، ممکن است که به دلیل کاهش سطح این سایتوکاین توسط فنی توئین صورت گرفته باشد.

اینترلوکین ۱۷ سایتوکاین اصلی و شاخص رده سلولی Th17 است (۲۳). این سایتوکاین یک سایتوکاین پیش التهابی قوی بوده که روی طیف گسترده‌ای از سلول‌ها اثر کرده (۲۴) و موجب آزادسازی انواع مدیاتورهای التهابی از قبیل TNF- $\alpha$ ، کموکاین‌ها و ماتریکس متالوپروتئینازها می‌گردد (۲۳). نقصان در این سایتوکاین به دنبال القاء EAE منجر به ایجاد بیماری بسیار ملایم‌تر و همراه با تأخیر می‌گردد (۲۳). عملکرد اصلی IL-17 در بیماری زایی EAE و MS شکستن سد خونی- مغزی می‌باشد (۲۳، ۲۴). تجویز پادتن بلوکه‌کننده IL-17 در رت‌های ایمن شده با آنتی ژن‌های موجود در میلیون مانع بروز کموکاین‌ها در مغز شده و متعاقب آن از بروز بیماری جلوگیری می‌شود (۲۵). گزارش شده است که بین سطح IL-17 و تعداد پلاک‌های فعال در افراد مبتلا به MS ارتباط وجود دارد (۲۶). اینترفرون گاما (شاخص Th1) نیز با القای واسطه‌های فعال اکسیژن و نیتریک اکساید در سلول‌های میکروگلیال در پاتوژنز بیماری نقش دارد (۲۷). 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 (۲۸). به نظر می‌رسد که مشارکت هر دو سایتوکاین اینترفرون گاما و اینترلوکین

کاهش سطوح سایتوکاین التهابی  $TNF-\alpha$ ،  $IL-17$  و  $IFN-\gamma$ ، به نظر می‌رسد که کفه ترازو به سمت شرایط ضد التهابی سنگینی خواهد کرد.

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که استفاده از فنی توئین پس از بروز علائم بالینی منجر به کاهش علائم در رت‌های مبتلا به EAE از طریق کاهش سطح سایتوکاین التهاب آور  $TNF-\alpha$ ،  $IL-17$  و  $IFN-\gamma$  می‌شود. بنابراین به نظر می‌رسد که فنی توئین علاوه بر اثرات مستقیم نروپروتکتیو که در گذشته اشاره شده است، موجبات مهار تولید سایتوکاین‌های التهابی را نیز در بیماری EAE فراهم می‌آورد. با همه این تفاسیر این مطالعه یک مطالعه مقدماتی بوده و لازم است در آینده مطالعات بیش‌تری صورت گیرد.

### سپاسگزاری

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه در مقطع کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری در سال ۱۳۹۴ می‌باشد که با حمایت دانشگاه ارومیه اجرا شده است. در پایان نگارندگان از زحمات مجموعه کارکنان آزمایشگاه دانشکده علوم گروه زیست‌شناسی و آزمایشگاه ایمنی‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه کمال تقدیر و تشکر را دارند.

### References

1. Comabella M, Khoury SJ. Immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2012; 142(1): 2-8.
2. Gold R, Lington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 2006; 129(pt 8): 1953-1971.
3. Pahan K. Neuroimmune pharmacological control of EAE. *J Neuroimmune Pharmacol* 2010; 5(2): 165-167.
4. Kuerten S, Lehmann PV. The immune pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis: lessons learned for multiple sclerosis? *J Interferon Cytokine Res*. 2011; 31(12): 907-916.
5. Van der Walt A, Butzkueven H, Kolbe S, Marriott M, Alexandrou E, Gresle M, et al. Neuroprotection in multiple sclerosis: a therapeutic challenge for the next decade. *Pharmacol Ther* 2010; 126(1): 82-93.
6. Herz J, Zipp F, Siffrin V. Neurodegeneration in autoimmune CNS inflammation. *Exp Neurol* 2010; 225(1): 9-17.

۱۷ در القای حداکثری  $TNF-\alpha$  لازم باشد (۲۷). هم‌چنین اینترفرون گاما و  $TNF-\alpha$  هر دو موجب القای نسخه‌برداری از آنزیم نیتریک اکسید سنتاز القایی (iNOS) در آستروسیت‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های میکروگلیال می‌گردند. نیتریک اکساید در نهایت به مرگ انتخابی و حذف الیگودندروسیت‌ها و دمی‌لیناسیون منتهی خواهد شد (۲۹). نتایج مطالعه حاضر نیز به خوبی نشان داد که هم‌زمان با کاهش علائم بالینی، میزان این دو سایتوکاین در گروه رت‌های تیمار کاهش معنی‌داری می‌یابد. به طور جالب توجهی نشان داده شده است که سطح بالای  $IL-17$  در خون افراد مبتلا به MS در ارتباط با عدم پاسخ نسبت به  $INF-\beta$  (درمان استاندارد MS) بوده است (۳۰). براساس یافته‌های مطالعه حاضر درمان با فنی توئین در مدل موشی بیماری MS موجبات کاهش سطح  $IL-17$  را فراهم می‌دارد. بنابراین این احتمال مطرح می‌گردد که افزودن فنی توئین به رژیم درمانی استاندارد این افراد دارای اثرات سودمندی باشد. اینترلوکین ۱۰، نقش مهمی را در محدود کردن پاسخ‌های التهابی و ممانعت از ایجاد آسیب‌های بافتی، بازی می‌نماید (۳۱، ۳۲). با این حال سطح این سایتوکاین در مطالعه حاضر تفاوت معنی‌داری را با گروه شاهد نشان نداد. با این حال به دلیل



7. Bertram G. Katzung Basic and Clinical Pharmacology. 8<sup>th</sup> ed. Appleton and Lange; 2000. p. 265-292.
8. Goodman & Gilman's. Pharmacological basis therapeutics. 10<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p. 521-542, 645-669.
9. Liu S, Zwinger P, Black JA, Waxman SG. Tapered withdrawal of phenytoin removes protective effect in EAE without inflammatory rebound and mortality. *J Neurol Sci* 2014; 341(1-2): 8-12.
10. Hashiba N, Nagayama S, Araya SI, Inada H, Sonobe Y, Suzumura A, et al. Phenytoin at optimum doses ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis via modulation of immunoregulatory cells. *J Neuroimmunol* 2011; 233(1-2): 112-119.
11. Black JA, Liu S, Hains BC, Saab CY, Waxman SG. Long-term protection of central axons with phenytoin in monophasic and chronic-relapsing EAE. *Brain* 2006; 129(12): 3196-3208.
12. Chen GQ, Chen YY, Wang XS, Wu SZ, Yang HM, Xu HQ, et al. Chronic caffeine treatment attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis induced by guinea pig spinal cord homogenates in Wistar rats. *Brain Res* 2010; 1309: 116-125.
13. Meshkibaf MH, Subhash MN, Lakshmana KM, Rao BS. Effect of chronic administration of phenytoin on regional monoamine levels in rat brain. *Neurochem Res* 1995; 20(7): 773-778.
14. Abtahi Froushani SM, Delirez N, Hobbenaghi R, Mosayebi G. Synergistic effects of atorvastatin and all-trans retinoic acid in ameliorating animal model of multiple sclerosis. *Immunol Invest* 2014; 43(1): 54-68.
15. Khan NA, Poisson, JP. 5-HT<sub>3</sub> receptor channels coupled with Na<sup>+</sup> influx in human T cells: role in T cell activation. *J Neuroimmunol* 1999; 99(1): 53-60.
16. Serra R, Al-Saidi AG, Angelov N, Nares S. Suppression of LPS-induced matrix-metalloproteinase responses in macrophages exposed to phenytoin and its metabolite, 5-(p-hydroxyphenyl)-, 5-phenylhydantoin. *J Inflamm (Lond)* 2010; 7: 48.
17. Koide M, Kinugawa S, Ninomiya T, Mizoguchi T, Yamashita T, Maeda K, et al. Diphenylhydantoin inhibits osteoclast differentiation and function through suppression of NFATc1 signaling. *J Bone Miner Res* 2009; 24(8): 1469-1480.
18. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001; 104(4): 487-501.
19. Kant S, Swat W, Zhang S, Zhang ZY, Neel BG, Flavell RA, et al. TNF-stimulated MAP kinase activation mediated by a Rho family GTPase signaling pathway. *Genes Dev* 2011; 25(19): 2069-2078.
20. Li R, Rezk A, Healy LM, Muirhead G, Prat A, Gommerman JL, et al. Cytokine-Defined B Cell Responses as Therapeutic Targets in Multiple Sclerosis. *Front Immunol* 2016; 6: 626.
21. Patejdl R, Penner IK, Noack TK, Zettl UK. Multiple sclerosis and fatigue: A review on the contribution of inflammation and immune-mediated neurodegeneration. *Autoimmun Rev* 2016; 15(3): 210-220.
22. Seger J, Zorzella-Pezavento SF, Pelizon AC, Martins DR, Domingues A, Sartori A. Decreased production of TNF-alpha by lymph node cells indicates experimental autoimmune encephalomyelitis remission in Lewis rats. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105(3): 263-268.

23. 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): 7169-7177.
24. Luchtman DW, Ellwardt E, Larochelle C, Zipp F. IL-17 and related cytokines involved in the pathology and immunotherapy of multiple sclerosis: Current and future developments. *Cytokine Growth Factor Rev* 2014; 25(4): 403-413.
25. Korn T, Oukka M, Kuchroo V, Bettelli E. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol* 2007; 19(6): 362-371.
26. Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. *Scand J Immunol* 2011; 74(1): 1-13.
27. Petro TM. Regulatory role of resveratrol on Th17 in autoimmune disease. *Int Immunopharmacol* 2011; 11(3): 310-318.
28. Murdaca G, Colombo BM, Puppo F. The role of Th17 lymphocytes in the autoimmune and chronic inflammatory diseases. *Intern Emerg Med* 2011; 6(4): 321-328.
29. Mao P, Reddy PH. 2010. Is multiple sclerosis a mitochondrial disease? *Biochim Biophys Acta* 2010; 1802(1): 66-79.
30. Balasa RT. Helper 17 cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Rom J Neurol* 2010; 9(4): 181-188.
31. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 2010; 10(3): 170-181.
32. Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacol Rev* 2003; 55(2): 241-269.