Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 8:21 +0330 on Monday December 18th 2017

ORIGINAL ARTICLE

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

Rezvan Mansouri[1],
Shiva Khezri[2],
Seyed Meysam Abtahi Froushani[3]

[1] MSc in Animal Physiology, Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran
[3] 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. Pervious 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-α and IL-17 as well as IFN-γ 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).

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 8:21 +0330 on Monday December 18th 2017

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و ششم شماره ۱۴۱ مهر سال ۱۳۹۵ (۳۵-۲۶)

تاثیر فنی توئین بر پلاریزه شدن پاسخ های ایمنی در آنسفالومیلیت تجربی خود ایمن (EAE)

رضوان منصوری[۱]
شیوا خضری[۲]
سید میثم ابطحی فروشانی[۳]

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 لنفوسیت‌های خود واکنش گر ایجاد می‌گردد. مطالعات قبلی اثرات مستقیم نروپروتکتیو فنی‌توئین را در EAE نشان داده است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات ایمونومودولاتوری فنی توئین در EAE بوده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، EAE توسط نخاع هموژنیزه شده خوکچه هندی و ادجوانت کامل فروند در رت‌های نژاد ویستار القاء شد. سپس رت‌ها در دوگروه ۷رأسی قرار گرفتند. درمان با فنی‌توئین (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 رت‌ها (روز ۳۶) روزانه ثبت گردید. میزان تکثیر به وسیله آزمون MTT و میزان تولید سایتوکاین‌ها به وسیله ELISA و در بین سلول‌های طحالی سنجیده شد.

یافته‌ها: تجویز فنی‌توئین پس از بروز علائم به‌طور معنی‌داری موجب تخفیف شدت علائم بالینی و بهبود وزن‌گیری رت‌های مبتلا به EAE گشت. فنی‌توئین موجب کاهش سطح سایتوکاین‌های پیش التهابی TNF-α، IL-۱۷ و IFN-γ در سوپ رویی کشت سلول‌های طحال شد ($p < ۰/۰۰۱$). با این حال سطح سایتوکاین ضد التهابی IL-۱۰ تغییر معنی‌داری نیافت. شدت تکثیر لنفوسیتی نیز در رت‌های گروه تیمار نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری یافت ($p < ۰/۰۰۱$).

استنتاج: فنی‌توئین علاوه بر اثرات مستقیم نوروپروتکتیو از طریق تعدیل واکنش‌های ایمنی نیز می‌تواند موجب بهبود EAE شود.

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

مقدمه

مولتیپل اسکلروزیس (MS) یکی از متداول‌ترین بیماری‌های نورولوژیک بوده که معمولاً در سنین جوانی و به‌طور شایع‌تر در زنان بروز می‌کند(۱). ماهیت این بیماری یک بیماری التهابی مزمن است که با ضایعات دمیلینه در مغز، طناب نخاعی و عصب چشمی شناسایی می‌شود(۱،۲).

مولف مسئول: شیوا خضری– ارومیه: دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم
E-mail: sh.khezri@urmia.ac.ir
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 دریافت : ۱۳۹۴/۱۱/۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۴/۱۲/۱۴ تاریخ تصویب : ۱۳۹۵/۴/۱۴

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 8:21 +0330 on Monday December 18th 2017

آنسفالومیلیت تجربی خود ایمن(EAE)، یک بیماری قابل القاء و خود التهابی سیستم اعصاب مرکزی در جانوران می‌باشد که سال‌هاست به عنوان مدل تجربی بیماری MS مورد استفاده قرار می‌گیرد(۳). اطلاعات به دست آمده از این مدل پایه و اساس بسیاری از دانسته‌های کنونی در مورد فرآیند بیماری‌زایی MS را تشکیل می‌دهد. هم‌چنین بسیاری از ترکیبات دارویی پذیرفته شده و یا در حال بررسی در ابتدا روی مدل جانوری بیماری آزمایش شده‌اند(۴). شواهد موجود نشان می‌دهد که سیستم ایمنی نقش مهمی در پاتوژنز MS و هم‌چنین EAE دارد. براساس این فرضیه، MS و EAE از یک حمله خودایمن توسط لنفوسیت‌ها علیه میلین یا آنتی‌ژن‌های الیگودندریتی خودی ایجاد می‌گردد(۱). با وجود پیشرفت‌هایی که تا کنون در امر درمان مبتلایان صورت گرفته است ولی بسیاری از افراد در حد بهینه به درمان‌های موجود پاسخ نمی‌دهند(۳). بنابراین یافتن راه کارهایی جهت افزودن به برنامه درمانی بیماران MS لازم به نظر می‌رسد. حمله لنفوسیت‌های خود واکنش‌گر در بیماری EAE و MS موجب دمیلینه شدن و گسست در هدایت جهشی در آکسون‌ها نیز می‌گردد(۳،۲). در این حالت به منظور بازگرداندن قابلیت هدایت، کانال‌های سدیمی که معمولاً در گره‌های رانویه (ranvier nodes) مستقر هستند به‌طور گسترده‌ای در طول غشاء اکسون توزیع می‌گردند. تغییر الگوی بیان و توزیع کانال‌های سدیمی از طریق افزایش جریان مداوم سدیم به سلول موجب برگرداندن هدایت پتانسیل عمل به ناحیه دمیلینه می‌گردد. در این شرایط خروج سدیم به منظور برگرداندن سلول به وضع قبل از دپلاریزاسیون لازم می‌باشد. طبیعی است که خروج سطح بالاتری از سدیم داخل سلولی مستلزم افزایش فعالیت پمپ‌های Na^+/K^+-ATP_{ase} خواهد بود. بدین ترتیب نیاز سلول به انرژی به نحو قابل توجهی افزایش می‌یابد(۵). به‌طور هم زمان آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتریک اکسید در بیماری منجر به آسیب گسترده به میتوکندری‌ها و اختلال می‌شود. اگر محتوای داخل سلولی سدیم به بالای حد آستانه خود برسد به منظور حفظ حالت خنثی الکتریکی سلول، عملکرد مبادله‌گر Na^+/Ca^{2+} که به‌طور معمول معاوضه کلسیم داخل سلولی با سدیم خارج سلولی را انجام می‌دهد، معکوس می‌گردد. افزایش کلسیم داخل سلول به دلیل تلاش سلول جهت رهایی از سربار سدیم موجب بروز پاسخ‌های استحاله‌ای و مرگ سلولی می‌شود(۶،۵). بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد عواملی که منجر به تثبیت کانال‌های سدیمی بگردد، ممکن است که با ایجاد آرامش در آکسون‌ها موجبات ترمیم آن‌ها را فراهم آورد.

فنی‌توین از جمله قدیمی‌ترین داروهای ضد صرع می‌باشد. این دارو از جمله مشتقات هیدانتوین است که مصرف آن با اثر بر کانال‌های سدیمی غشاء موجب غیرفعال‌سازی آن‌ها می‌شود و بر ورود سدیم و ایجاد پتانسیل عمل موثر است. مصرف این دارو موجب تغییر در سطح ناقل‌های عصبی نوراپی نفرین، سروتونین، استیل‌کولین و GABA می‌شود(۸،۷). به‌طور جالب توجهی برخی مطالعات نشان‌دهنده 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 پاسخ‌های 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 لنفوسیت‌ها بوده است.

مواد و روش ها

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

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 8:21 +0330 on Monday December 18th 2017

القای بیماری

برای القای EAE، هموژن بافت نخاع خوکچه هندی به نسبت ۱ به ۱ با ادجوانت کامل فروند (CFA) که محتوی ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم پیکره کشته شده مایکوباکتریوم بود ،به حالت امولوسیون 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 $۱۰^{۹}$باکتری بروتدلا پاراپرتوسیس (مرکزملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، IBRC-M10710) نیز در حجم ۳۰۰ میکرولیتر PBS در روز تزریق پپتید 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 شدتا ۲۴ روز پس از بروز علایم درمانگاهی تحت درمان قرار گرفتند. در گروه درمان، فنی‌تویین با نام تجاری HYDANTIC (شرکت داروسازی کاسپین تامین) به میزان ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم پس از بروز اولین علایم 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 مبزان در رت های 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 آنتی‌ژن (هموژن بافت نخاع خوکچه 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 سلول های طحال و ارزیابی سایتوکاین ها

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) هم زمان با خون‌گیری اقدام به نخاعی نمودن رت‌ها شد. بلافاصله تحت شرایط استریل طحال رت‌ها خارج و بعد از قطعه قطعه شدن در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI-1640 (شرکت Sigma–آمریکا) حاوی ۱۰ درصد FBS (شرکت Gibco–آلمان) له‌گردید. بافت حاصل جهت تهیه سوسپانسیون سلولی از توری سیمی به قطر ۰/۲ 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 درآورده شد. پس از فرآیند شمارش، سوسپانسیون سلولی به تعداد ۲×۱۰^{۶} سلول در میلی‌لیتر از آن تهیه شد. این سلول‌ها در پلیت‌های کشت ۲۴ خانه در حضور پپتید فیتوهم آگلوتین (PHA) با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور حاوی ۵ درصدکشت داده شدند. پس از طی این مدت مایع رویی آن‌ها جمع‌آوری شد(۱۴). برای سنجش سایتوکاین‌های IFN-γ، 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.

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 8:21 +0330 on Monday December 18th 2017

ارزیابی میزان تکثیر لنفوسیتی

میزان تکثیر سلول‌های ایمنی با روش MTT بررسی شد. برای این کار پس از طی مراحلی که در بالا توضیح داده شد و به دنبال شمارش سلول‌ها، سوسپانسیونی حاوی 1×10^{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 حاویCO_2 ۵ درصد، به هر چاهک ۲۵میکرولیتر محلول MTT (۵ میلی گرم 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 براساس رابطه زیر محاسبه گردید:

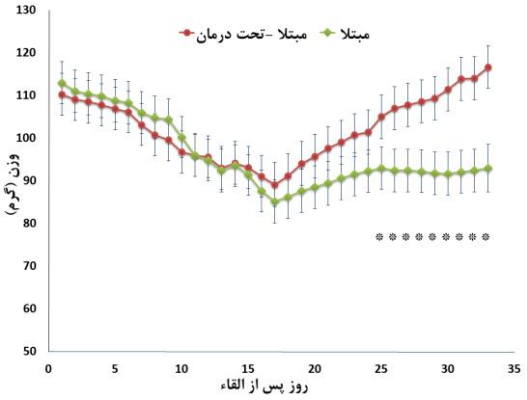
$$\frac{OD(PHA_{\text{در حضور}}) - OD_{(\text{بلانک})}}{ODPHA_{(\text{در عدم حضور})} - OD_{(\text{بلانک})}} = \text{ایندکس تحریک}$$ (۱۴).

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 $p<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد و به صورت انحراف‌معیار± 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.

یافته ها

بررسی تغییرات وزن در بین گروه‌های تحت مطالعه نشان داد که درمان با فنی‌توئین 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 معنی دار وزن بین دو گروه اخیر در بازه زمانی روزهای ۲۵ تا ۳۳ پس از القاء بیماری بود (نمودار شماره ۱). بر این اساس به‌نظر 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.



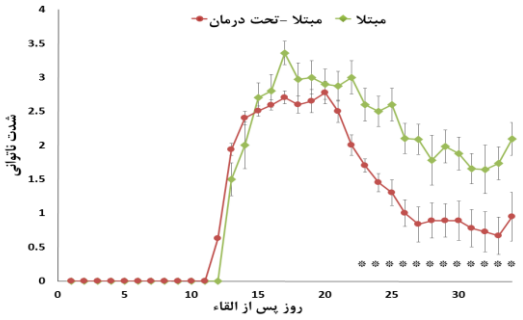
نمودار شماره ۱: مقایسه میانگین تغییرات وزن بین رت‌های مبتلا به EAE و مبتلا به EAE تحت درمان با فنیتوئین. (*نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ($p < ۰/۰۵$) بین رت‌های شاهد و رت‌های تحت درمان با فنی توئین می‌باشد).

براساس نتایج به دست آمده میانگین شدت اختلال حرکتی در طول دوره درمان در رت های تحت درمان با فنی‌توئین 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 معنی دار 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 فنی‌توئین بیماری خفیف‌تری را طی می‌کنند.

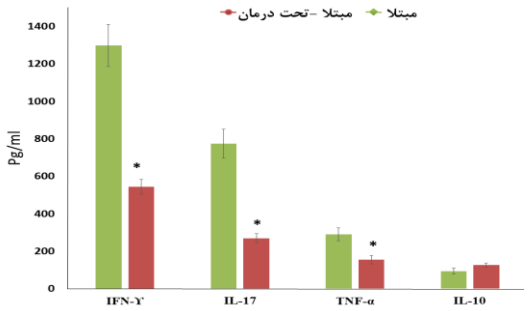
Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 8:21 +0330 on Monday December 18th 2017

سنجش سایتوکاین‌های سوپ طحالی نشان داد که میزان تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی TNF-α، IFN-γ و IL- ۱۷ در گروه تحت درمان نسبت به رت‌های شاهد کاهش می‌یابد (نمودار شماره ۳). البته با وجودی که سطح سایتوکاین ضد التهابی IL- ۱۰ 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<۰/۰۰۱) شدت تکثیر لنفوسیتی در گروه درمان شده با فنی توئین در مقایسه با گروه شاهد به دنبال تحریک لنفوسیت‌های طحالی با میتوژن 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 شماره۲: مقایسه شدت بیماری در روزهای مختلف بین گروه‌های مختلف. (*نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح (p < ۰/۰۵) بین رت‌های مبتلای درمان نشده و رت‌های تحت درمان با فنی‌توئین می‌باشد).



نمودار شماره ۳: مقایسه میانگین غلظت سایتوکاین های سوپ رویی کشت سلول‌های طحالی پس از ۷۲ ساعت کشت در حضور میتوژن 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<۰/۰۰۱ نسبت به رت‌های گروه شاهد می‌باشد).

جدول شماره ۱: ارزیابی برخی از شاخص های بیماری بین رت‌های مبتلا به **EAE** (شاهد) و مبتلا به **EAE** تحت درمان با فنی‌توئین(تیمار)

گروه ها	وزن[1] انحراف معیار±میانگین	شدت ناتوانی[2] انحراف معیار±میانگین	حداکثر شدت ناتوانی[2] انحراف معیار±میانگین	شدت تکثیر لنفوسیتی[3] انحراف معیار±میانگین
شاهد	۱۰۰/۹ ± ۵/۵	۲/۲۹±۰/۱	۳/۳۶ ± ۰/۲۴	۲/۱۴ ±۰/۲
تیمار	۹۶/۷۴±۹۲	۱/۵۸ ±/۱۲	۲/۷۷ ± ۰/۱۷	۱/۳۴ ±۰/۱۶
سطح‌معنی‌داری	<۰/۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱

۱. گرم

۲. شدت بیماری بر اساس مقیاس زیر بین رت ها 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 فنی‌توئین پس از بروز علائم ناتوانی نورولوژیک در رت‌های گروه درمانی صورت گرفت. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که در این شرایط تجویز فنی‌توئین موجب بهبود در سیمای بالینی و تغییرات وزن رت‌های شاهد نسبت به گروه کنترل می‌گردد. همان‌طور که ذکر شد اثرات مستقیم فنی‌توین 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 فنی‌توئین منجر به برگشت سطح اکسون‌ها در حد ۹۶ درصد رت‌های سالم شده است(۱۱). بسیاری از تحقیقات گذشته اثرات مفید فنی‌توین در EAE را تنها مرتبط با ایجاد آرامش در کانال‌های سدیمی وابسته به

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 8:21 +0330 on Monday December 18th 2017

ولتاژ در سطح آکسون‌ها دانسته‌اند(۱۱-۹). لازم به ذکر است که در یک مطالعه قدیمی حضور کانال های 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 فنی‌توئین را نشان داد. در معدود مطالعات گذشته نیز به اثرات ضدالتهابی و مهارکننده پاسخ‌های لجام گسیخته ایمنی در شوک آندوتوکسیک توسط فنی‌توین(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 میتوژن فیتوهم آگلوتین و به تبع آن کاهش لنفوسیت‌های خود واکنش‌گر که در گروه درمانی با فنی‌توئین دیده از جمله عوامل کاهنده شدت بیماری می‌باشد.

فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا (TNF-α) از جمله سایتوکاین‌های اصلی در ایجاد و تنظیم پاسخ‌های ایمن می‌باشد(۱۸). بسیاری از سلول‌های دخیل در واکنش‌های ایمنی از قبیل لنفوسیت‌های Th۱، ماکروفاژهای التهابی، سلول‌های کشنده طبیعی، ماست سل‌ها، ائوزینوفیل‌ها و حتی خود نورون‌ها و سلول‌های پشتیبان عصبی نیز قادر به تولید این سایتوکاین هستند(۱۹). بر اساس مطالعات انجام شده TNF-α نقش مهمی در پاتوژنز EAE و MS بازی می‌کند(۲۱،۲۰). این سایتوکاین در ایجاد التهاب و شکست سد خونی- مغزی، فعال‌سازی سلول‌های میکروگلیال و هم‌چنین القای آپوپتوز در نورون ها 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-α 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 فنی‌توئین 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-α موجب کاهش علائم درEAE شده است(۲۲). تولید مداوم TNF-α 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 فنی‌توئین صورت گرفته باشد.

اینترلوکین ۱۷ سایتوکاین اصلی و شاخص رده سلولی Th۱۷ 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-α، کموکاین‌ها و ماتریکس متالوپروتئینازها می‌گردد(۲۳). نقصان در این سایتوکاین به‌دنبال القاء EAE منجر به ایجاد بیماری بسیار ملایم‌تر و همراه با تأخیر می‌گردد(۲۳). عملکرد اصلی IL-۱۷ در بیماری‌زایی EAE و MS شکستن سدخونی- مغزی می‌باشد(۲۴،۲۳). تجویز پادتن بلوکه‌کننده IL-۱۷ در رت‌های ایمن‌شده با آنتی ژن‌های موجود در میلین مانع بروز کموکاین‌ها در مغز شده و متعاقب آن از بروز بیماری جلوگیری می‌شود(۲۵). گزارش شده است که بین سطح IL-۱۷ 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). به‌نظر می‌رسد در حالی‌که سلول‌های Th۱۷ نقش اساسی در ایجاد و پیشبرد التهاب و شکست سد خونی- مغزی نقش بازی می‌نماید، سلول‌های Th۱ در ایجاد ضایعات بافتی دخیل باشند(۲۸). به نظر می‌رسد که مشارکت هردو سایتوکاین اینترفرون گاما و اینترلوکین

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 8:21 +0330 on Monday December 18th 2017

۱۷ در القای حداکثری TNF-α لازم باشد(۲۷). هم‌چنین اینترفرون گاما و TNF-α هردو موجب القای نسخه‌برداری از آنزیم نیتریک اکسید سنتاز القایی (iNOS) در آستروسیت‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های میکروگلیال می‌گردند. نیتریک اکسایددر 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-۱۷ در خون افراد مبتلا به MS در ارتباط با عدم پاسخ نسبت به INF-β (درمان استاندارد MS) بوده است(۳۰). براساس یافته‌های مطالعه حاضر درمان با فنی‌توین در مدل موشی بیماری MS موجبات کاهش سطح IL-۱۷ را فراهم می‌دارد. بنابراین این احتمال مطرح می‌گردد که افزودن فنی‌توین 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(۳۲،۳۱). با این حال سطح این سایتوکاین در مطالعه حاضر تفاوت معنی‌داری را با گروه شاهد نشان نداد. با این حال به دلیل کاهش سطوح سایتوکاین التهابی TNF-α،IL-۱۷ و IFN-γ، 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 التهاب‌آور TNF-α، IL-۱۷ و IFN-γ 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, Linington 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.

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 8:21 +0330 on Monday December 18th 2017

7. Bertram G. Katzung Basic and Clinical Pharmacology. 8th ed. Appleton and Lange; 2000. p. 265-292.
8. Goodman & Guilman's. Pharmacologycal basis therapeutics. 10th 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 GQ1, 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, Delirezh 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-HT3 receptor channels coupled with Na+ 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, t 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.

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 8:21 +0330 on Monday December 18th 2017

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 scelerosis 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.