Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 12:49 +0330 on Tuesday November 30th 2021

Original Article

Effect of interleukin –27 on recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice

Mojadadi M Sh[1], Ebtekar M [1*], Golkar M[2], Khanahmad H[3]

1- Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I. R. Iran.
2- Molecular Parasitology Laboratory, Department of Parasitology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, I. R. Iran.
3- Department of Anatomical Sciences and Genetics, Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I. R. Iran.

Received December 11, 2011; Accepted May 10, 2012

Abstract:

Background: Multiple sclerosis and its murine model, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), are chronic inflammatory demyelinating diseases of CNS. This study aimed to examine the effects of IL-27coding plasmid on disease status and certain immunological parameters in EAE-affected C57BL/6 mice.
Materials and Methods: IL-27 gene was subcloned in P240 plasmid. The recombinant P240-mIL27 and P240 plasmids were injected two times, each time 200 micrograms, to test and control EAE mice, respectively. The clinical signs of the treated mice were evaluated daily and scored according to a standard method. One week after the last injection, all mice were sacrificed. The ELISA and MTT tests were performed to evaluate the production of IL-4, IFN-γ and IL-17 from and proliferative response of splenocytes against specific antigen challenge, respectively. Furthermore, to demonstrate the immune cells infiltration, histopathological exam was performed on the brainstem of mice.
Results: The P240-mIL27 plasmid could significantly improve clinical course of EAE in the test group. Also in this group, the level of IL-4 was greater than that in the control group, while the levels of IFN-γ and IL-17 were lower than those of the control group. In MTT test, the splenocytes of the test group showed a significantly less proliferative response than the control group. Finally, less infiltration of immune cells was seen in the brainstem of EAE mice treated with P240-mIL27 plasmid.
Conclusion: IL-27 by shifting the immune responses from inflammatory Th1/Th17 towards anti-inflammatory Th2-type responses could be a suitable candidate for the treatment of inflammatory diseases such as MS.

Keywords: Interleukin-27, Experimental autoimmune encephalomyelitis, Multiple sclerosis, Th1 cells, Th2 cells, Th17 cells, C57BL/6 mouse

*** Corresponding Author.**
Email: ebtekarm@modares.ac.ir
Tel: 0098 21 8288 3891
Fax: 0098 21 8288 3891

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences July, 2012; Vol. 16, No 3, Pages 219-228

Please cite this article as: Mojadadi M Sh, Ebtekar M, Golkar M, Khanahmad H. Effect of interleukin –27 on recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. ***Feyz*** 2012; 16(3): 219-28.

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 12:49 +0330 on Tuesday November 30th 2021

تاثیر اینترلوکین-۲۷ بر بهبودی از بیماری انسفالومیلیت خودایمن در موش‌های C57BL/6

محمد شفیع مجددی[۱]، معصومه ابتکار[۲*]، مجید گل کار[۳]، حسین خان احمد[۴]

خلاصه:

سابقه و هدف: مولتیپل‌اسکلروزیس (MS) و مدل حیوانی آن، انسفالومیلیت خود ایمن تجربی (EAE)، بیماری‌های التهابی مزمن تحلیل-برنده میلین سیستم عصبی مرکزی می‌باشند. هدف از این مطالعه، بررسی اثرات پلاسمید کد کننده IL-27 بر وضعیت بیماری و برخی پارامترهای ایمونولوژیکی در موش‌های C57BL/6 مبتلا به EAE بود.

مواد و روش‌ها: ژن IL-27 موشی در پلاسمید P240 کلون شد. ۲۰۰ میکروگرم از پلاسمید نوترکیب حاصل (P240-mIL27) در دو نوبت به هرکدام از موش‌های مبتلا به EAE تزریق شد. گروه کنترل، در این مدت پلاسمید P240 دریافت کردند. حیوانات به‌صورت روزانه از نظر شدت علایم بالینی بررسی و طبق معیارهای استاندارد نمره‌دهی می‌شدند. همه موش‌ها یک هفته پس از آخرین تزریق پلاسمید، کشته شدند. آزمایش‌های الایزا و MTT به‌ترتیب جهت بررسی تولید IL-4، IFN-γ و IL-17 از سلول‌های طحالی، و میزان تکثیر سلول‌های طحالی در پاسخ به تحریک با آنتی‌ژن اختصاصی انجام گرفتند. میزان ارتشاح سلول‌های ایمنی با آزمایش‌های هیستوپاتولوژی بررسی گردید.

نتایج: شدت علایم بالینی در موش‌های گروه آزمایش متعاقب تزریق پلاسمید P240-mIL27 کاهش قابل ملاحظه‌ای یافت. هم‌چنین در این گروه، میزان تولید IL-4، بیشتر و میزان تولید IFN-γ و IL-17 کمتر از گروه کنترل بود. در آزمون MTT، سلول‌های طحالی موش-های گروه آزمایش در مقایسه با گروه کنترل، پاسخ تکثیری کمتری از خود نشان دادند. نتایج آزمایش‌های هیستوپاتولوژی نیز حکایت از ارتشاح کمتر سلول‌های ایمنی به بافت عصبی-مرکزی موش‌های گروه آزمایش داشت.

نتیجه‌گیری: IL-27 با تغییر الگوی پاسخ‌های التهابی Th1 و Th17 به سمت پاسخ‌های ضد التهابی Th2، می‌تواند کاندیدی مناسب در درمان بیماری‌های التهابی نظیر مولتیپل‌اسکلروزیس باشد.

واژگان کلیدی: اینترلوکین ۲۷، بیماری انسفالومیلیت خودایمن تجربی، مولتیپل اسکلروزیس، سلول‌های Th1، سلول‌های Th2، سلول-های Th17، موش C57BL/6

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره شانزدهم، شماره ۳، مرداد و شهریور ۱۳۹۱، صفحات ۲۲۸-۲۱۹

مقدمه

بیماری مولتیپل اسکلروزیس (Multiple sclerosis; MS) بیماری مزمن التهابی سیستم عصبی مرکزی (CNS) بوده و نزدیک به ۲/۵ میلیون نفر در سراسر جهان به این بیماری مبتلا هستند. این بیماری پس از تروما دومین عامل ناتوان کننده نورولوژیکی در بین جوانان می‌باشد [۱]. آسیب و مرگ الیگودندروسیت‌ها مهم‌ترین مشخصه بیماری MS می‌باشد. این امر سبب ایجاد ضایعات پراکنده در سیستم عصبی مرکزی و تخریب میلین می‌گردد [۱].

اگرچه هنوز علت اصلی بیماری MS کاملا مشخص نشده است، اما نقش سیستم ایمنی و به‌خصوص سلول‌های $TCD4^+$ در پاتوژنز این بیماری غیر قابل انکار است [۲]. در ابتدا تصور بر این بود که بیماری MS، یک بیماری مرتبط با سلول‌های Th1 می‌باشد؛ حال آنکه مطالعات اخیر نشان داده‌اند عامل آسیب رسان اصلی در این بیماری و بسیاری دیگر از بیماری‌های خودایمن، زیرگروهی از سلول‌های Th تحت عنوان سلول‌های Th17 می‌باشد [۵-۳]. سلول‌های Th17 به‌طور مشخص مقدار زیادی از سیتوکین‌های IL-17A و IL-17F را تولید می‌کنند. این سلول‌ها نقش عمده‌ای در پاسخ به باکتری‌های خارج سلولی و هم‌چنین نقشی پاتوژنیک در بیماری‌های خودایمن ایفا می‌کنند. [۷،٦]. از این‌رو سرکوب پاسخ‌های التهابی ناشی از سلول‌های Th17، می‌تواند راه‌کاری مناسب در درمان و یا تخفیف علایم بیماران MS باشد. اینترلوکین-۲۷ (IL-27) یک سیتوکین هترودایمر و متشکل از دو زیرواحد p28 و Ebi3 می‌باشد که از سلول‌های عرضه‌کننده آنتی-ژن به‌خصوص سلول‌های دندریتیک و ماکروفاژها تولید می‌شود. گیرنده این سیتوکین از دو زنجیره پلی‌پپتیدی WSX-1 و gp130

[۱] دانشجوی دکتری، گروه ایمونولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
[۲] دانشیار، گروه ایمونولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
[۳] استادیار، آزمایشگاه انگل شناسی مولکولی، گروه انگل شناسی، انستیتو پاستور
[۴] استادیار، گروه آناتومی و ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
* نشانی نویسنده مسئول:
تهران، گروه ایمونولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
تلفن: ۰۲۱ ۸۲۸۸۳۸۹۱ دورنویس: ۰۲۱ ۸۲۸۸۳۸۹۱
پست الکترونیک: ebtekarm@modares.ac.ir
تاریخ دریافت: ۹۰/۹/۲۰ تاریخ پذیرش نهایی: ۹۱/۲/۲۱

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 12:49 +0330 on Tuesday November 30th 2021

تشکیل یافته و بر سطح مونوسیت‌ها، ماکروفاژها، سلول‌های دندرتیک، لنفوسیت‌های B و T، سلول‌های NK، ماست سل‌ها و سلول‌های اندوتلیال بارز می‌شود [۸]. مطالعات اولیه بر روی IL-27 نشان داده است که این سیتوکین در مراحل اولیه ایجاد سلول‌های Th1 از سلول‌های Th بکر نقش مهمی را ایفا می‌کند؛ به این ترتیب که این سیتوکین با تاثیر بر سلول‌های Th بکر، باعث بروز گیرنده IL-12 بر سطح آنها شده و از این طریق، پاسخ‌دهی سلول‌های Th بکر را به IL-12 افزایش می‌دهد. در ادامه، IL-12 با تاثیر بر این سلول‌ها، تمایز آنها را به سلول‌های Th1 سبب می‌شود [۹]. با این حال، مطالعات اخیر به جنبه دیگری از عملکرد IL-27، یعنی خواص ضد التهابی آن اشاره دارند. بر اساس این مطالعات که در مدل‌های عفونی و خودایمن التهابی صورت گرفته‌اند، مشاهده شده است در موش‌هایی که فاقد زیر واحد WSX-1 گیرنده IL-27 می‌باشند، پاسخ‌های التهابی ناشی از سلول‌های Th1 و Th17 بسیار شدید و آسیب‌زا می‌باشد [۱۰،۹]. امروزه پژوهش‌گران به منظور تحقیق در زمینه مکانیسم‌های دخیل در بیماری MS و نیز کشف راه-های جدید درمانی برای آن، از مدل حیوانی این بیماری یعنی بیماری انسفالومیلیت خودایمن تجربی (EAE) Experimental autoimmune encephalomyelitis بهره می‌گیرند. بیماری EAE را می‌توان با تزریق پروتئین‌ها و یا پپتیدهای میلین در موش-ها، موش‌های صحرائی و هم‌چنین پریمات‌ها القاء کرد [۱۲،۱۱]. مشابه آنچه که در بیماری MS ذکر شد، در این بیماری نیز عامل آسیب رسان اصلی سلول‌های Th17 می‌باشند؛ به‌طوری‌که تنها با انتقال سلول‌های Th17 اختصاصی پروتئین MOG، می‌توان EAE را در موش‌های گیرنده القاء نمود [۱۳]. مطالعات نشان داده‌اند که حضور هم‌زمان TGF-β و IL-6 سبب شکل‌گیری سلول‌های Th17 از سلول‌های Th بکر موشی می‌گردد؛ در حالی‌که IL-27 می‌تواند به‌طور مؤثری از ایجاد سلول‌های Th17 درحضور TGF-β+IL-6 جلوگیری به‌عمل آورد [۱٤]. به‌علاوه، مطالعات نشان داده-اند که بیماری EAE در موش‌های فاقد WSX-1 در مقایسه با موش‌های طبیعی، از شدت بیشتری برخوردار است و این امر با افزایش تمایز سلول‌هایTh17 همراه است [۱۰]. این‌گونه گزارش‌ها در حقیقت نشان‌گر این موضوع می‌باشند که فعالیت محور WSX-1/IL-27 با مهار تمایز سلول‌های Th17، جلوی ایجاد بسیاری از بیماری‌های خود ایمن را می‌گیرد. هم‌چنین، گزارش شده است که تجویز IL-27 می‌تواند از ایجاد التهاب در سیستم عصبی مرکزی و القاء EAE متعاقب انتقال سلول‌های Th17 انسفالیتوژنیک جلوگیری به‌عمل آورد [۸]. با توجه به خواص ضد التهابی IL-27، این سیتوکین می‌تواند کاندیدی مناسب در درمان و یا بهبودی نسبی بیماری‌های التهابی باشد. به‌همین دلیل تصمیم گرفته شد تا در این تحقیق از پلاسمید کد کننده IL-27، جهت سرکوب و یا کاهش شدت پاسخ‌های التهابی در مدل EAE بهره گرفته شود و تاثیر آن بر وضعیت بیماری و هم‌چنین برخی از پارامترهای ایمونولوژیکی در موش‌های نژاد C57BL/6 مبتلا بررسی شود.

مواد و روش‌ها

ساخت پلاسمید کد کننده IL-27 و تایید آن

ژن mIL-27 موشی (شماره دسترسی در PubMed: NM_145636) به‌طول تقریبی ۱۳۵۰ جفت باز، از شرکت invivogen خریداری شد. سپس این ژن در پلاسمید P240 (شکل شماره ۱) ساب‌کلون شد. پلاسمید P240 با داشتن پروموتر بسیار قوی EF1-alpha، امکان بروز مداوم یک ژن را در شرایط مختلف برون‌تنی و درون‌تنی فراهم می‌سازد. هم‌چنین، این پلاسمید با کد کردن پروتئین فلوئورسنس سبز (GFP) این امکان را فراهم می آورد تا در موارد انتقال ژن به سلول‌ها، به آسانی انتقال ژن را با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری و یا میکروسکوپ فلورسانس ردیابی کرد. از این‌رو در این مطالعه ژن mIL-27 در پلاسمید P240 ساب کلون شد. به این ترتیب که ابتدا پرایمرهای رفت (F) و برگشت (R) طراحی شده و به‌منظور ساب‌کلونینگ در پلاسمید P240، به‌ترتیب جایگاه‌های برش برای آنزیم‌های XmaI و BamHI (بازهایی که زیر آنها خط کشیده شده است) در آنها تعبیه شد:

توالی پرایمر F:

5’ ATTC^CCGGGGCCAACATGTCCAAGCTGC 3’

توالی پرایمر R:

5’ATTG^GATCCAGCTTAGGAATCCCAGGCTG 3’

سپس با استفاده از این پرایمرها، ژن mIL-27 با شرایط باز شدن اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ دقیقه؛ و ۳۵ سیکل با شرایط باز شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه؛ و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه، با بهره‌گیری از تکنیک PCR و در حجم ۱۰۰ میکرولیتر تکثیر شد. سپس تمامی محصول PCR بر روی ژل آگاروز یک درصد الکتروفورز (شکل ۲ الف)، و باند مربوط به ژن mIL-27 با استفاده از کیت استخراج پلاسمید از ژل شرکت فرمنتاز جدا (شکل ۲ ب) و تمیز شد. در مرحله بعد، ژن mIL-27 و پلاسمید P240 با استفاده از آنزیم‌های XmaI و BamHI شرکت فرمنتاز و بر طبق پروتکل پیشنهادی شرکت برش زده شدند. محصولات حاصل از هضم آنزیمی پس از تمیز شدن با کیت تمیز سازی شرکت Bioneer، با استفاده از آنزیم

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 12:49 +0330 on Tuesday November 30th 2021

DNA لیگاز شرکت تاکارا و بر طبق پروتکل شرکت با هم‌دیگر ادغام، و سپس در باکتری E. coli مستعد سوش DH5α ترانسفورم شدند. پس از طی مراحل غربال‌گری با استفاده از تکنیک‌های کلونی PCR و هضم آنزیمی، پلاسمید نوترکیب حاصل (P240-mIL27) با استفاده از تکنیک تعیین توالی (شرکت ژن فن آوران، تهران)، تایید نهایی شد. در ادامه به‌منظور اطمینان از بیان ژن mIL-27 از پلاسمید P240-mIL27، پلاسمید مذکور با استفاده از روش کلسیم فسفات به سلول‌های 293T ترانسفکت شد. پس از گذشت ۷۲ ساعت از ترانسفکشن، محیط کشت رویی سلول‌های 293T جهت انجام آزمایش الایزا جمع آوری شد. آزمایش الایزا برای سنجش mIL-27 با استفاده از کیت اختصاصی شرکت eBioscience انجام شد. در نهایت برای استفاده در موش‌ها، پلاسمید P240-mIL27 با استفاده از کیت EndoFree Plasmid Mega شرکت کیاژن به‌مقدار زیاد و به‌صورت عاری از اندوتوکسین تهیه شد.

القای بیماری EAE در موش‌ها و تزریق پلاسمید

در این مطالعه، کار بر روی حیوانات بر اساس دستور کار کمیته اخلاقی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. به‌منظور القای بیماری EAE، مقدار۲۰۰ میکروگرم از پپتید MOG_{35-55} شرکت Alexis در ادجوانت کامل فروند (سیگما)، به هریک از موش‌های ماده نژاد C57BL/6 (انستیتو پاستور ایران) به‌صورت زیر پوستی تزریق شد. در فواصل زمانی ۰ و ٤٨ ساعت بعد از تزریق MOG، مقدار ۵۰۰ نانوگرم سم پرتوزیس شرکت Alexis به‌صورت داخل صفاقی به هر یک از موش‌ها تزریق شد. موش‌ها در شرایط استریل و با آب و غذای کافی نگهداری شدند. پس از ظهور علائم EAE که حدود ۱۲ تا ١٤ روز پس از تزریق MOG اتفاق افتاد، موش‌های مبتلا به EAE به‌طوری‌که از نظر میانگین علایم بیماری و تا حد امکان وزن یکسان باشند، و به تعداد ۱۰ سر در دو گروه آزمایش و کنترل قرار گرفتند. سپس به هر یک از موش‌های گروه آزمایش در دو نوبت (روزهای ۱۵ و ۲۲ از زمان تزریق پپتید MOG) مقدار ۲۰۰ میکروگرم پلاسمید P240-mIL27 در حجم ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سالین (PBS) استریل، و به موش‌های گروه کنترل همین مقدار از پلاسمید P240 به‌صورت داخل عضلانی تزریق شد. موش‌ها تا زمان کشته شدن، روزانه از نظر شدت علائم بالینی بررسی شده و بر اساس معیارهای استاندارد زیر، نمره دهی و میانگین نمره برای هرکدام از گروه‌ها محاسبه شد [۱۵]. نمره صفر: فاقد هرگونه علایم بالینی، نمره یک: افتادن دم (شل شدن دم)، نمره دو: بی‌حسی و یا فلج نسبی اندام پشتی، نمره سه: فلج کامل اندام پشتی، نمره چهار: فلج کامل اندام پشتی و جلویی، و نمره پنج: مرگ حیوان. یک هفته پس از آخرین تزریق پلاسمید، همه موش‌ها به‌منظور انجام آزمایشات ایمونولوژی و هیستوپاتولوژی کشته شدند.

اندازه‌گیری سیتوکین‌های IL-17، IL-4 و IFN-γ

به‌منظور اندازه‌گیری میزان تولید سیتوکین‌های IL-17، IL-4 و IFN-γ، ابتدا طحال هر کدام از موش‌های گروه آزمایش و کنترل در شرایط استریل جدا شده، و سوسپانسیون سلول‌های طحالی تهیه شد. سپس تعداد سه میلیون سلول طحالی (میزان سلول‌های زنده بالای ۹۵ درصد) از هر کدام از موش‌های گروه‌های آزمایش و کنترل در مجاورت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از پپتید MOG در محیط RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد FBS، و در چاهک‌های پلیت ٢٤ خانه ای به‌مدت ۷۲ ساعت کشت داده شد. پس از مدت زمان مذکور، محیط کشت رویی سلول‌ها جهت انجام آزمایشات الایزا جمع‌آوری شد. برای اندازه‌گیری سیتوکین‌های IL-17، IL-4 و IFN-γ در محیط کشت رویی سلول‌ها، از کیت‌های الایزای اختصاصی هر کدام از سیتوکین‌ها (همگی از شرکت eBioscience) استفاده شد. به‌طور اختصار ابتدا آنتی‌بادی گیرنده (capture) هر کدام از سیتوکین‌های ذکر شده در بافر کوتینگ و به‌صورت شبانه در یخچال، در داخل چاهک‌های میکروپلیت ۹٦ خانه‌ای کوت شد. پس از شستشوی چاهک‌ها، بافر بلاکینگ اضافه شد. مراحل بعد شامل شستشو، اضافه کردن محیط کشت رویی سلول‌ها در کنار نمونه‌های استاندارد، شستشو، اضافه کردن آنتی‌بادی اختصاصی کونژوگه با بیوتین، شستشو، اضافه کردن آنزیم HRP کونژوگه با آویدین، شستشو و در نهایت اضافه کردن سوبسترای تترا متیل بنزیدین (TMB) بود. در پایان، جذب هر کدام از چاهک‌ها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ٤٥٠ نانومتر قرائت شد و پس از رسم نمودار استاندارد، مقدار هر کدام از سیتوکین‌ها با توجه به نمودار استاندارد مربوطه، برحسب پیکوگرم در میلی لیتر محاسبه شد.

انجام تست MTT

تست MTT در اوایل دهه ۱۹۸۰ میلادی توسط موسمان (Mosman) ارائه شد [١٦]. اساس این تست تبدیل نمک MTT به بلورهای فورمازان ارغوانی رنگ، توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده می‌باشد که توسط محلول دی متیل سولفوکساید (DMSO) به‌صورت محلول در می‌آید. هر چه سلول‌ها فعال‌تر و تکثیرشان بیشتر باشد، میزان رنگ ایجاد شده بیشتر است. به‌منظور بررسی میزان تکثیر سلول‌های طحالی موش‌های

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 12:49 +0330 on Tuesday November 30th 2021

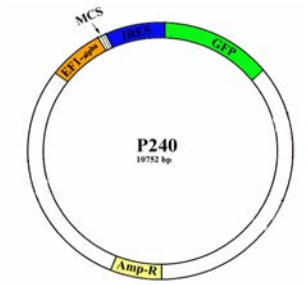
گروه‌های آزمایش و کنترل در پاسخ به تحریک با آنتی‌ژن اختصاصی، از تست MTT استفاده شد. بدین منظور تعداد صد هزار سلول طحالی (میزان سلول‌های زنده بالای ۹۵ درصد) از هر کدام از موش‌های گروه‌های آزمایش و کنترل در چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای و در مجاورت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از پپتید MOG در محیط RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد FBS، به‌مدت ۷۲ ساعت کشت داده شد. پس از این مدت، مقدار ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد. میکروپلیت به‌مدت ٤ ساعت در داخل انکوباتور قرار گرفت. پس از این مدت، پلیت به‌مدت ۵ دقیقه و با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی سلول‌ها دور ریخته شد، و بلورهای فورمازان حاصل در ۲۰۰ میکرولیتر از محلول DMSO حل شد. در نهایت جذب هر یک از چاهک‌ها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد.

آزمایش هیستوپاتولوژی

به‌منظور بررسی میزان ارتشاح سلول‌های ایمنی (لنفوسیت‌ها و ماکروفاژها) به بافت عصبی مرکزی، ساقه مغز موش‌های گروه‌های آزمایش و کنترل در پایان دوره تیمار، جدا شده و پس از قرار گرفتن در فرمالین ۱۰ درصد به آزمایشگاه پاتولوژی فرستاده شد. در آزمایشگاه پاتولوژی پس از تهیه حداقل پنج برش ۱۰ میکرومتری به ازای هر نمونه مغزی، رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (H&E) انجام شده، و نمونه‌ها از نظر ارتشاح سلول‌های ایمنی (لنفوسیت‌ها و ماکروفاژها)، توسط پاتولوژیستی که از نظر نوع تیمارهای صورت گرفته کاملا بی‌اطلاع بود، مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیزهای آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها، به‌وسیله نرم‌افزار SPSS نسخه ۱٦ و با استفاده از آزمون‌های آماری t مستقل و من‌ویتنی صورت گرفت. در تمامی موارد سطح معنی‌داری داده‌ها، ۹۵ درصد در نظر گرفته شد.



شکل شماره ۱- پلاسمید P240. این پلاسمید دارای پروموتر بسیار قوی EF1-alpha بوده و پروتئین فلورسانس سبز (GFP) را بیان می‌کند.

نتایج

تیمار موش‌های مبتلا به EAE و تعیین نمره بیماری

حدود ۱۲ تا ١٤ روز پس از تزریق آنتی ژن MOG_{35-55} به موش‌ها، علایم بیماری EAE در آنها ظاهر شد. موش‌ها پس از قرار گرفتن در دو گره آزمایش و کنترل به‌نحوی‌که در قسمت مواد و روش‌ها ذکر شده است، روزانه از نظر علائم بالینی بررسی و نمره‌گذاری می‌شدند. نتایج میانگین نمرات بیماری دو گروه آزمایش و کنترل در نمودار شماره ۱ آورده شده است. همان‌طور که در این نمودار مشاهده می شود با گذشت زمان، میانگین نمرات علایم بالینی در گروه تیمار شده با P240-mIL27، در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی داری یافت (P=۰/۰۱).

اندازه‌گیری سیتوکین‌های IL-17، IL-4 و IFN-γ

پس از کشتن موش‌های تیمار شده در موعد زمانی ذکر شده در قسمت مواد و روش‌ها، سوسپانسیون سلول‌های طحالی از هر کدام از موش‌های گروه آزمایش و کنترل تهیه شد. پس از اینکه سلول‌های طحالی در شرایط برون‌تنی با آنتی‌ژن اختصاصی تحریک شدند، آزمایش الایزا به‌منظور اندازه‌گیری سیتوکین‌های IL-17 (نماینده سلول‌های Th17)، IFN-γ (نماینده سلول‌های Th1) و IL-4 (نماینده سلول‌های Th2)، بر روی محیط کشت رویی سلول‌های طحالی انجام شد. همان‌طور که در نمودار شماره ۲ مشاهده می‌شود، سلول‌های طحالی موش‌های تیمار شده با پلاسمید P240-mIL27 در مقایسه با موش‌های تیمار شده با P240 مقدار کمتری از سیتوکین‌های IL-17 (۱۰±۱۲۱ پیکوگرم در میلی‌لیتر در مقابل ۱۹±٤۳۷ پیکوگرم در میلی‌لیتر) و IFN-γ (۱۱/۵±٤۱ پیکوگرم در میلی‌لیتر در مقابل ۱۸±۱۳۱ پیکوگرم در میلی لیتر) را تولید می‌کردند (P=۰/۰۰۱)، در حالی‌که میزان تولید IL-4 در آنها بیشتر از گروه کنترل بود (۸/۵±۱۱۹ پیکوگرم در میلی‌لیتر در مقابل ٤±۲۸ پیکوگرم در میلی‌لیتر) (P=۰/۰۰۱). به‌عبارت دیگر، تیمار موش‌های مبتلا به EAE با پلاسمید P240-mIL27 از شدت پاسخ‌های التهابی Th1 و Th17 کاسته و در عوض پاسخ‌های ایمنی را به سمت پاسخ‌های ضد التهابی Th2 سوق داده است.

تکثیر سلول‌های طحالی در پاسخ به تحریک با آنتی ژن اختصاصی

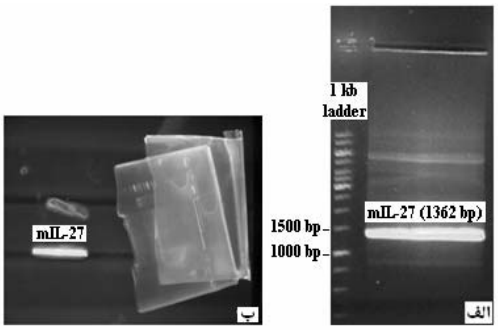
به‌منظور بررسی میزان تکثیر سلول‌های طحالی موش‌های گروه‌های آزمایش و کنترل در پاسخ به تحریک با آنتی‌ژن اختصاصی، از تست MTT استفاده شد. نتایج حاصل از تست MTT نشان داد که میزان تکثیر سلول‌های طحالی موش‌های تیمار

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 12:49 +0330 on Tuesday November 30th 2021

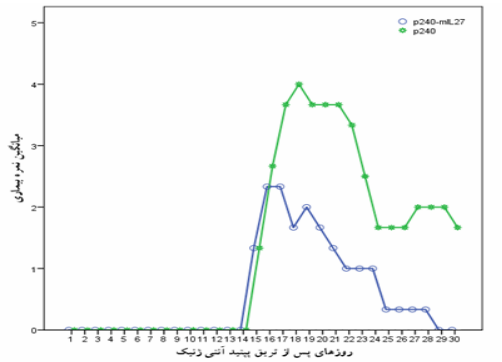
شده با پلاسمید P240-mIL27، در برابر تحریک با آنتی‌ژن MOG، کمتر از نصف پاسخ تکثیری سلول‌های طحالی موش‌های گروه کنترل بود. به‌عبارت دیگر، سلول‌های طحالی موش‌های گروه کنترل، حدود دو برابر سلول‌های طحالی موش‌های گروه آزمایش، در پاسخ به تحریک با آنتی‌ژن اختصاصی تکثیر یافتند. میزان جذب نوری گروه‌های آزمایش و کنترل، حاصل از تست MTT در نمودار شماره ۳ نشان داده شده است.

آزمایشات هیستوپاتولوژی

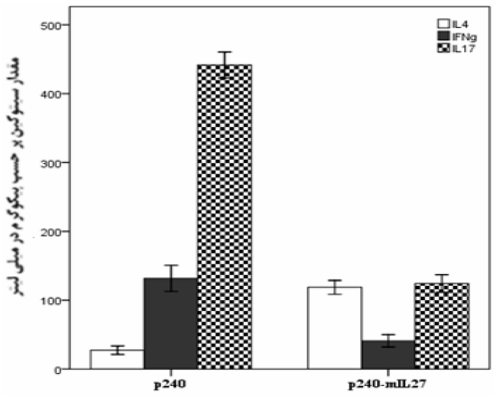
پس از آماده سازی و تهیه برش‌های ۱۰ میکرومتری و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، میزان ارتشاح سلول‌های ایمنی (لنفوسیت‌ها و ماکروفاژها) در بافت عصبی موش‌های گروه‌های آزمایش و کنترل، توسط پاتولوژیست به‌صورت نیمه کمی (۰= بدون ارتشاح، ۱= ارتشاح کم، ۲= ارتشاح متوسط و ۳= ارتشاح زیاد) گزارش شده و با استفاده از آزمون آماری من‌ویتنی مقایسه شد. نتایج حاصله نشان داد که در موش‌های گروه آزمایش، میزان ارتشاح سلول‌های ایمنی به بافت عصبی، به‌مراتب کمتر از گروه کنترل بود؛ در حالی‌که جمعیت زیادی از سلول‌های ایمنی در اطراف عروق و حتی پارانشیم بافت عصبی موش‌های گروه کنترل قابل مشاهده بود (شکل شماره ۳ و نمودار شماره ٤) و این اختلاف ارتشاح از نظر آماری در سطح معنی‌داری قرار داشت (P=۰/۰۵).



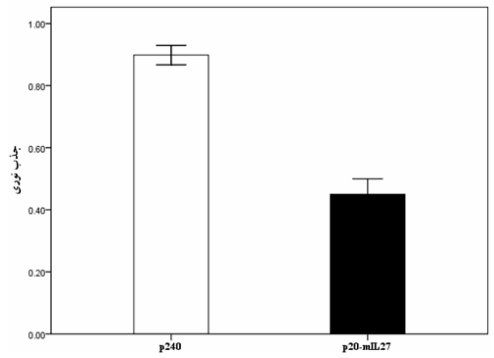
شکل شماره ۲- الکتروفورز محصول PCR ژن mIL-27 و استخراج آن از ژل. ژن mIL-27 پس از طراحی پرایمرهای مناسب تکثیر شد. الف: کل محصول PCR در ژل آگاروز یک درصد الکتروفورز شد؛ و سپس ب: باند مربوط به ژن mIL-27 از ژل استخراج شد.



نمودار شماره ۱- میانگین نمرات بیماری در موش‌های EAE تیمار شده با P240-mIL27 (آزمایش) و P240 (کنترل). در مقایسه با گروه کنترل، در موش‌های گروه آزمایش تیمار با P240-mIL27، منجر به کاهش شدت علایم EAE شد (P=۰/۰۱ آزمون آماری من‌ویتنی).

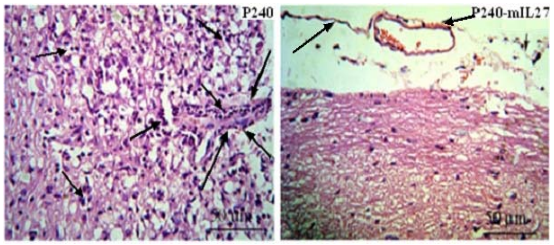


نمودار شماره ۲- مقدار سیتوکین‌های تولیدی از سلول‌های طحالی موش-های تیمار شده با P240-mIL27 و P240، متعاقب تحریک با آنتی‌ژن اختصاصی در شرایط برون تنی. سلول‌های طحالی موش‌های EAE تیمار شده با P240-mIL27، IFN-γ و IL-17 کمتری در مقایسه با موش-های EAE تیمار شده با P240 تولید کردند؛ در حالی‌که این وضعیت در مورد IL-4 حالت معکوس داشت. نتایج به‌صورت میانگین±انحراف معیار نمایش داده شده است. (P=۰/۰۰۱ آزمون آماری t مستقل).

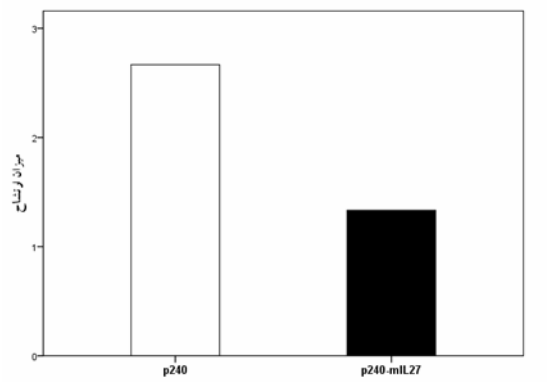


نمودار شماره ۳- نتایج تست MTT در دو گروه آزمایش(P240-mIL27) و کنترل (P240). سلول‌های طحالی گروه آزمایش در پاسخ به تحریک با آنتی ژن اختصاصی، کمتر تکثیر یافتند.

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 12:49 +0330 on Tuesday November 30th 2021



شکل شماره ۳- وضعیت ارتشاح سلول‌های ایمنی به بافت عصبی مرکزی موش‌های EAE. نمونه‌های ساقه مغز موش‌های EAE گروه‌های آزمایش (P240-mIL27) و کنترل (P240) پس از رنگ آمیزی با هماتوکسیلین-ائوزین (H&E) از نظر میزان ارتشاح سلول-های ایمنی (لنفوسیت‌ها و ماکروفاژها) مورد بررسی قرار گرفتند. فلش‌ها، وضعیت ارتشاح سلول‌های ایمنی را در ناحیه اطراف عروق و پارانشیم نشان می‌دهند. بزرگ‌نمایی ٤٠٠ برابر.



نمودار شماره ٤- گزارش نیمه کمی از میزان ارتشاح سلولی در نمونه-های تهیه شده از بافت عصبی موش‌های تیمار شده با P240-mIL27 و P240، پس از رنگ آمیزی با هماتوکسیلین-ائوزین. ۰=بدون ارتشاح، ۱= ارتشاح کم، ۲= ارتشاح متوسط و ۳= ارتشاح زیاد

بحث

بارزترین مشخصه بیماری MS و مدل حیوانی آن، EAE، التهاب در سیستم عصبی مرکزی می‌باشد. بر اثر این پاسخ-های التهابی، غلاف میلین از بین رفته و در نتیجه هدایت عصبی دچار اختلال می‌شود. اختلال در هدایت عصبی نقایص نورولوژیکی مختلفی را باعث می‌شود که از آن جمله می‌توان به اختلالات بینایی و حسی، خستگی، مشکلات راه رفتن و نقایص شناختی اشاره کرد [۱۷]. از این‌رو، امروزه اکثر درمان‌های رایج برای MS، بر پایه سرکوب پاسخ‌های التهابی استوارند. به‌عنوان مثال، اینترفرون بتا (IFN-β) مورد استفاده در درمان مبتلایان به MS، اثرات سودمند خویش را از طریق سرکوب پاسخ‌های التهابی اعمال می‌نماید. به این صورت که باعث مهار بروز MHCII بر سطح سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن، مهار ترشح IFN-γ و تقلیل فعالیت سلول‌های T از طریق جلوگیری از تولید IL-2 می‌شود [۱۸]. در این مطالعه، تاثیر استفاده از سیتوکین ضد التهابی IL-27 در سرکوب پاسخ‌های ایمنی آسیب رسان در مدل EAE بررسی شده است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که پلاسمید P240-mIL27 به‌طور قابل ملاحظه‌ای توانست پاسخ‌های التهابی ناشی از سلول‌های Th1 را سرکوب نماید که دلیل آن، کاهش قابل توجه تولید IFN-γ (به‌عنوان سیتوکین اصلی تولید شده از سلول‌های Th1) از سلول‌های طحالی موش‌های EAE تیمار شده با این پلاسمید می‌باشد. سلول‌های التهابی Th1 با تولید IFN-γ در ایمونوپاتوژنز بیماری MS و EAE دخالت دارند. در واقع IFN-γ تولیدی از سلول‌های Th1 با افزایش دادن بروز مولکول-های چسبان لکوسیتی بر روی سلول‌های اندوتلیال سد خونی مغزی، نفوذپذیری این سد را افزایش می‌دهند [۱۹]. هم‌چنین، این سیتوکین با افزایش دادن بروز مولکول‌های MHCI و MHCII بر سطح آستروسیت‌ها و الیگودندروسیت‌ها، سبب افزایش واکنش-پذیری این سلول‌ها با سلول‌های ایمنی شده و احتمالا مرگ این سلول‌ها را باعث می‌شوند [۲۰]. به‌علاوه، اینکه ماکروفاژها و میکروگلیاها نیز تحت تاثیر سطح افزایش یافته IFN-γ در بیماری MS و EAE، در تخریب غلاف میلین مشارکت می‌کنند [۲۱]. بالاخره اینکه IFN-γ می‌تواند به‌طور مستقیم با القاء آپوپتوزیس و یا نکروزیس (بسته به وضعیت بلوغ سلول) مرگ الیگودندروسیت-ها را باعث شود [۲۲]. بنابراین، کاهش پاسخ‌های التهابی ناشی از سلول‌های Th1، که به‌دنبال تزریق پلاسمید P240-mIL27 در موش‌های گروه آزمایش مشاهده شد، می‌تواند یکی از علت‌های التیام بخشی IL-27 در بیماری EAE باشد. تاثیر مهاری IL-27 بر سلول‌های Th1 که در مطالعه ما مشاهده شد، شاید در نگاه اول مخالف این عقیده باشد که این سیتوکین را یک سیتوکین القا کننده سلول‌های Th1 می‌داند [۹]؛ با این حال، این یافته ما در توافق با یافته‌های دیگر محققینی می‌باشد که بر روی اثرات ایمونوساپرسیو IL-27 مطالعه کرده‌اند. به‌عنوان مثال Fitzgerald و همکاران در تحقیقی نشان داده‌اند که تیمار سلول‌های T انسفالیتوژنیک در محیط آزمایشگاه با IL-27، سبب کاهش تولید IFN-γ از آنها می‌شود [۲۳]. در مطالعه دیگری گزارش شده است که تاثیر IL-27 بر روی سلول‌های $TCD4^+$ بستگی به این دارد که این سلول-ها در چه وضعیتی از نظر فعالیت قرار داشته باشند؛ به این صورت که IL-27 تاثیری بر تولید سیتوکین از سلول‌های $TCD4^+$ی که در ابتدای مرحله فعال شدن خود قرار دارند، ندارد؛ در حالی‌که تولید سیتوکین‌های IFN-γ و IL-17 را از سلول‌های $TCD4^+$ی که در اوج فعالیت خویش می‌باشند، سرکوب می‌کند [۲٤]. از این-رو، می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که در مطالعه ما با توجه به

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 12:49 +0330 on Tuesday November 30th 2021

اینکه سلول‌های Th1 در اوج فعالیت خود قرار داشته و فعالانه در ایجاد علایم EAE مشارکت داشته‌اند، هدف اثرات ایمونوساپرسیو IL-27 تزریقی قرار گرفته، و به‌همین دلیل میزان تولید IFN-γ از سلول‌های طحالی موش‌های دریافت‌کننده پلاسمید P240-mIL27، به‌مراتب کمتر از میزان تولید IFN-γ از سلول‌های طحالی موش‌های گروه کنترل می‌باشد. در کنار سلول‌های Th1، سلول‌های Th17 از بازیگران اصلی در ایمونوپاتوژنز بیماری‌های MS و EAE می‌باشند. مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های T ($CD4^+$ یا $CD8^+$) تولیدکننده IL-17 در هر دو مرحله فعال و مزمن بیماری MS حضور دارند [۲۵]. علاوه بر این، شمار زیادی از سلول‌های Th17 خود واکنش‌گر را می‌توان در اندام‌های لنفاوی محیطی، قبل از شروع علائم بالینی EAE مشاهده کرد؛ حال آنکه در EAE حاد جمعیت زیادی از این سلول‌ها در بافت عصبی مرکزی حضور داشته، و با بهبودی علایم اگر چه آنها را نمی‌توان در بافت عصبی مرکزی مشاهده کرد، ولی هم‌چنان در اندام‌های محیطی یافت می شوند [۲۶]. هم‌چنین، در حال حاضر مشخص شده است که حداقل بخشی از اثرات التیام بخشی داروهای مورد استفاده در درمان MS به‌خاطر مهار سلول‌های Th17 می‌باشد [۲۸،۲۷]. از این‌رو در مطالعه ما، یکی دیگر از علل بهبود علایم EAE در موش‌های تیمار شده با پلاسمید P240-mIL27، می‌تواند به‌خاطر اثر سرکوب کنندگی IL-27 بر سلول-های Th17 باشد، آنجا که سلول‌های طحالی موش‌های گروه آزمایش، در پاسخ به تحریک مجدد با پروتئین MOG در محیط آزمایشگاه، در مقایسه با سلول‌های طحالی موش‌های گروه کنترل، IL-17 کمتری تولید کرده‌اند. محققین دیگر نیز در مطالعاتی مشابه، همین اثر سرکوب‌کنندگی IL-27 را بر سلول‌های Th17 گزارش کرده، و آن را عامل اثرات التیام بخش IL-27 در MS و EAE دانسته‌اند. به‌عنوان مثال Sweeney و همکاران گزارش کرده‌اند که تجویز اینترفرون بتا (IFN-β) به موش‌های EAE از طریق افزایش دادن میزان IL-27 باعث کاهش میزان IL-17 در آنها، و بهبود علایم EAE شده است. به‌علاوه اینکه آنها مشاهده کردند سلول‌های خون محیطی بیماران مبتلا به MSی که به درمان با IFN-β پاسخ نمی‌دهند، در مقایسه با سلول‌های خون محیطی بیمارانی که به درمان با این اینترفرون به‌خوبی جواب می‌دهند، در محیط آزمایشگاه و در برابر تیمار با IFN-β، IL-27 کمتری تولید می‌کنند [۲۹]. به‌عبارت دیگر، این محققین اثرات درمانی IFN-β را در بیماران MS، مربوط به IL-27 القا شده در پاسخ به این اینترفرون می‌دانند. در مطالعه دیگری، تزریق زیر پوستی IL-27 نوترکیب به‌مدت ۷ روز، توانست جمعیت سلول‌های Th17 را در مدل EAE کاهش داده، و هم‌چنین از میزان سلول‌های ایمنی ارتشاح یافته به بافت عصبی موش‌ها بکاهد [۲۳]. در تحقیق ما نیز همین نتایج مشاهده شد؛ به‌طوری‌که در بافت عصبی موش‌های دریافت‌کننده پلاسمید P240-mIL27، میزان ارتشاح سلول‌های ایمنی به‌طور قابل ملاحظه‌ای کمتر از گروه کنترل بود. حال آنکه در نمونه‌های تهیه شده از بافت عصبی موش‌های گروه کنترل، ارتشاح شدید سلول‌های ایمنی هم در اطراف عروق و هم در پارانشیم قابل مشاهده بود (شکل شماره ۳). به‌طور خلاصه می‌توان گفت که در تحقیق ما IL-27 به‌طور موثری توانسته است الگوی کلی پاسخ‌های ایمنی را در موش‌های EAE، از پاسخ‌های التهابی Th1 و Th17 به سمت پاسخ‌های ضد التهابی Th2 سوق دهد؛ وضعیتی که در مطالعات دیگر نیز از آن به‌عنوان یک حالت مطلوب در بهبود بیماری EAE ذکر شده است [۳۱،۳۰]. یکی دیگر از نتایج قابل توجه در مطالعه ما، تکثیر کم سلول‌های طحالی موش‌های EAE تیمار شده با پلاسمید P240-mIL27، در مواجهه مجدد با آنتی‌ژن اختصاصی در محیط آزمایشگاه می‌باشد. در واقع، نتایج تست MTT می‌تواند بیان‌گر نوعی تولرانس محیطی القاء شده در سلول‌های طحالی موش‌های گروه آزمایش باشد. بدین معنی که پلاسمید P240-mIL27 توانسته است باعث ایجاد تولرانس در سلول‌های طحالی شود، به‌نحوی‌که این سلول‌ها در برابر تحریک مجدد با آنتی‌ژن اختصاصی MOG، بسیار کمتر از سلول‌های طحالی موش‌های گروه کنترل تکثیر یابند. این نوع حالت تولرانس در سلول‌های طحالی، متعاقب تزریق سلول‌های بنیادی مزانشیمال به موش‌های EAE نیز گزارش شده است [۳۲]. اینکه دقیقا علت این تولرانس محیطی چیست؟ و آیا احتمالا به-خاطر افزایش جمعیت سلول‌های T تنظیمی (Treg) می‌باشد، سوالی است که موضوع تحقیق آینده ما خواهد بود. از این‌رو به-منظور شناخت هر چه بیشتر مکانیسم‌های درمانی IL-27 در مدل حیوانی MS، مطالعاتی در رابطه با تاثیر این سیتوکین بر روی جمعیت سلول‌های Tی تنظیمی، جمعیت سلول‌های گلیال و میلین سازی مجدد پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

به‌طور خلاصه، نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که IL-27 می‌تواند از طریق ایجاد تولرانس در سلول‌های ایمنی، مهار پاسخ‌های التهابی ناشی از سلول‌های Th1 و Th17، سوق دادن پاسخ‌های ایمنی به سمت پاسخ‌های ضد التهابی Th2، و نیز کاستن از روند ارتشاح سلول‌های ایمنی به بافت عصبی، در بهبودی بیماری EAE در موش‌های C57BL/6 موثر باشد. از

این‌رو IL-27 و یا آگونیست‌های آن، احتمالا می‌توانند کاندیـدای مناسبی در درمان بیماری‌های التهابی نظیر MS باشند.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در قالب بخشی از رسـاله دکتـری تخصـصی ایمونولوژی و با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام گرفته است. نویسندگان این مقاله بدین‌وسیله مراتـب تـشکر و قـدردانی خویش را از حمایت‌ها و مساعدت‌های بخش‌هـای مختلـف ایـن دانشگاه که ما را در انجام این تحقیق یاری نموده‌اند، ابراز می‌دارند.

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 12:49 +0330 on Tuesday November 30th 2021

References:

[1] Holmøy T, Vartdal F. The immunological basis for treatment of multiple sclerosis. ***Scand J Immunol*** 2007;66(4): 374-82.

[2] Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. ***Annu Rev Immunol*** 2005; 23: 683-747.

[3] Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. ***J Exp Med*** 2005; 201(2): 233.

[4] Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. ***Nat Immunol*** 2005; 6(11): 1133-41.

[5] Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, Mckenzie B, et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. ***J Clin Invest*** 2006; 116(5): 1310.

[6] Nakae S, Nambu A, Sudo K, Iwakura Y. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. ***J Immunol*** 2003; 171(11): 6173-7.

[7] Veldhoen M, Stockinger B. TGFβ1 ,a 'Jack of all trades': the link with pro-inflammatory IL-17-producing T cells. ***Trends Immunol*** 2006; 27(8): 358-61.

[8] Yoshida H, Miyazaki Y. Regulation of immune responses by interleukin-27. ***Immunol Rev*** 2008; 226(1): 234-47.

[9] Lucas S, Ghilardi N, Li J, De Sauvage FJ. IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4+ T cells through Stat1-dependent and-independent mechanisms. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 2003; 100(25): 15047.

[10] Stumhofer JS, Laurence A, Wilson EH, Huang E, Tato CM, Johnson LM, et al. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17–producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. ***Nat Immunol*** 2006; 7(9): 937-45.

[11] Rao P, Segal BM. Experimental autoimmune encephalomyelitis. ***Methods Mol Med*** 2004; 102: 363-76.

[12] Selmaj KW, Raine CS. Experimental autoimmune encephalomyelitis. ***Neurol*** 1995; 45(6 Suppl 6): S44-S9.

[13] Pugliatti M, Rosati G, Carton H, Riise T, Drulovic J, Vécsei L, et al. The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. ***Eur J Neurol*** 2006; 13(7): 700-22.

[14] Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. ***Curr Opin Immunol*** 2007; 19(6): 652-7.

[15] Rafei M, Campeau PM, Aguilar-Mahecha A, Buchanan M, Williams P, Birman E, et al. Mesenchymal stromal cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting CD4 Th17 T cells in a CC chemokine ligand 2-dependent manner. ***J Immunol*** 2009; 182(10): 5994-6002.

[16] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. ***J Immunol Methods*** 1983; 65(1-2): 55-63.

[17] Steinman L. A molecular trio in relapse and remission in multiple sclerosis. ***Nat Rev Immunol*** 2009; 9(6): 440-7.

[18] Javed A, Reder AT. Therapeutic role of beta-interferons in multiple sclerosis. ***Pharmacol Ther*** 2006; 110(1): 35-56.

[19] Cayrol R, Wosik K, Berard JL, Dodelet-Devillers A, Ifergan I, Kebir H, et al. Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. ***Nat Immunol*** 2007; 9(2): 137-45.

[20] Rodriguez M. Effectors of demyelination and remyelination in the CNS: implications for multiple sclerosis. ***Brain Pathol*** 2007; 17(2): 219-29.

[21] Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. ***Nat Neurosci*** 2007; 10(11): 1387-94.

[22] Balabanov R, Strand K, Kemper A, Lee JY, Popko B. Suppressor of cytokine signaling 1 expression protects oligodendrocytes from the deleterious effects of interferon. ***J Neurosci*** 2006; 26(19): 5143.

[23] Fitzgerald DC, Ciric B, Touil T, Harle H, Grammatikopolou J, Sarma JD, et al. Suppressive effect of IL-27 on encephalitogenic Th17 cells and the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. ***J Immunol*** 2007; 179(5): 3268-75.

[24] Yoshimura T, Takeda A, Hamano S, Miyazaki Y, Kinjyo I, Ishibashi T, et al. Two-sided roles of IL-27: induction of Th1 differentiation on naive CD4+ T cells versus suppression of proinflammatory cytokine production including IL-

23-induced IL-17 on activated CD4+ T cells partially through STAT3-dependent mechanism. ***J Immunol*** 2006; 177(8): 5377.
[25] Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. ***Am J Pathol*** 2008; 172(1): 146-55.
[26] Hofstetter HH, Toyka KV, Tary-Lehmann M, Lehmann PV. Kinetics and organ distribution of IL-17-producing CD4 cells in proteolipid protein 139–151 peptide-induced experimental autoimmune encephalomyelitis of SJL mice. ***J Immunol*** 2007; 178(3): 1372-8.
[27] Durelli L, Conti L, Clerico M, Boselli D, Contessa G, Ripellino P, et al. T helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon. ***Ann Neurol*** 2009; 65(5): 499-509.
[28] Ramgolam VS, Sha Y, Jin J, Zhang X, Markovic-Plese S. IFN-β inhibits human Th17 cell differentiation. ***J Immunol*** 2009; 183(8): 5418-27.
[29] Sweeney CM, Lonergan R, Basdeo SA, Kinsella K, Dungan LS, Higgins SC, et al. IL-27 mediates the response to IFN-[beta] therapy in multiple sclerosis patients by inhibiting Th17 cells. *Brain, Behav, Immun* 2011.
[30] Bai L, Lennon DP, Eaton V, Maier K, Caplan AI, Miller SD, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis. ***Glia*** 2009; 57(11): 1192-203.
[31] Constantin G, Marconi S, Rossi B, Angiari S, Calderan L, Anghileri E, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. ***Stem Cells*** 2009; 27(10): 2624-35.
[32] Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. ***Blood*** 2005; 106(5): 1755-61.

Downloaded from feyz.kaums.ac.ir at 12:49 +0330 on Tuesday November 30th 2021