

اثرات نیکوتین بر تحریک سیستم التهابی کولینرژیک و تغییر پاسخ‌های ایمنی در مدل حیوانی مولتیپل اسکلروز

مژگان شاهمرادی^۱، شیوا خضری^۱، سید میثم ابطحی^۱، فروشانی^{۲*}

^۱گروه زیست‌شناسی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران، ^۲گروه میکروبیولوژی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۴/۱۰/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۲/۱۷

چکیده:

زمینه و هدف: اخیراً نشان داده شده است که مسیر پیام‌رسانی در گیرنده‌های نیکوتینی nA7 منجر به ایجاد شرایط ضد التهابی در ماکروفاژها و لنفوسیت‌های T می‌شود. از طرفی ماکروفاژها و لنفوسیت‌های T نقش مهمی را در اسکلروز متعدد (MS) بازی می‌کنند. در این مطالعه اثرات درمانی نیکوتین بر روند آنسفالومیلیت خودایمن (EAE، مدل تجربی MS) و پاسخ‌های لنفوسیت‌های T کمکی مورد ارزیابی قرار گرفته است.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، آنسفالومیلیت خودایمن تجربی به وسیله نخاع هموژنیزه شده خوکچه هندی و ادجوانت کامل فروند در موش‌های صحرایی نژاد ویستار القا شد. سپس رت‌ها در دو گروه ۷ سری قرار گرفتند. درمان با نیکوتین (۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه) از زمان بروز علائم درمانگاهی در گروه درمانی (روز ۱۲) آغاز گشت. هم‌زمان، گروه شاهد، تنها حلال دارو را با همان برنامه دریافت نمودند. علائم تا زمان کشتار موش‌ها یعنی روز ۳۶، روزانه ثبت گردید. میزان تکثیر لنفوسیتی به وسیله آزمون MTT و میزان تولید سایتوکاین‌ها به وسیله ELISA در بین سلول‌های طحالی سنجیده شد. میزان نیتریک اکساید سرم هم به شیوه گریس سنجیده شد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون‌های من ویتنی یو و تی دانشجویی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: تجویز نیکوتین در گروه درمان پس از بروز علائم به طور معنی‌داری موجب تخفیف شدت علائم بالینی گشت. هم‌زمان با کاهش سطح نیتریک اکساید سرمی، نیکوتین موجب کاهش معنی‌دار تولید سایتوکاین پیش التهابی اینترلوکین ۱۷ و IFN- γ شد. سطح سایتوکاین ضد التهابی اینترلوکین ۱۰ تغییر معنی‌داری نیافت. شدت تکثیر لنفوسیتی نیز در موش‌های گروه تیمار نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری یافت.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که نیکوتین اثرات تعدیل‌کننده سیستم ایمنی را دارد و می‌تواند برای کنترل بیماری MS مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: مولتیپل اسکلروزیس، آنسفالومیلیت تجربی خودایمن، نیکوتین، پاسخ لنفوسیتی

*نویسنده مسئول: سید میثم ابطحی، ارومیه، دانشگاه ارومیه، گروه میکروبیولوژی

Email: meysamabtahi@hotmail.com

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمال و سلول‌های ایمنی حضور دارند (۱۱ و ۱۰).

بیماری اسکلروز متعدد (MS)^(۱) یک بیماری مزمن، پیش‌رونده و خودایمنی سیستم اعصاب مرکزی می‌باشد، که به علت پاسخ نابجای سیستم ایمنی به آنتی ژن‌های موجود در غشاء میلین در افراد مستعد شعله‌ور می‌گردد. به دلیل قابلیت ناتوان کننده این بیماری، مولتیپل اسکلروز دارای اثرات اجتماعی و اقتصادی مهمی می‌باشد (۱۲ و ۱۳). با وجودی که تا کنون پیشرفت‌های خوبی در امر درمان مبتلایان صورت گرفته است، ولی بسیاری از افراد در حد بهینه به درمان‌های موجود پاسخ نمی‌دهند (۱۴). بنابراین یافتن ترکیبات جدید دارویی جهت افزودن به برنامه درمانی بیماران MS لازم به نظر می‌رسد. آنسفالمیلیت تجربی خودایمن (EAE)^(۲) مدل تجربی اسکلروز متعدد است (۱۵). شاخصه اصلی این بیماری و همچنین MS یک التهاب عصبی خود ایمن است که به وسیله لنفوسیت‌های Th17^(۳) و Th1 القا شده است (۱۳). با این حال عمده مطالعه‌هایی که در زمینه اثرات ضدالتهابی نیکوتین صورت گرفته قبل از زمان کشف رده لنفوسیت‌های Th17 صورت گرفته است، لذا در این مطالعه بر آن شدیم که اثرات درمانی نیکوتین بعد از شروع علائم - کلینیکی EAE، اثرات آن بر روی لنفوسیت‌های طحالی از نظر میزان تکثیر، تولید

نیکوتین از جمله مهم‌ترین عوامل موجود در دود سیگار است که منجر به وابستگی در افراد سیگاری می‌شود. هر نخ سیگار حاوی ۱۰ تا ۱۴ میلی‌گرم نیکوتین می‌باشد. یک فرد سیگاری پس از استعمال هر نخ سیگار به طور متوسط ۱ میلی‌گرم نیکوتین دریافت می‌دارد (۱). برخلاف دود سیگار که به عنوان یک ترکیب بسیار خطرناک و کارسینوژن شناخته می‌شود، از نیکوتین به عنوان یک ترکیب دارای اثرات ضدالتهابی، تعدیل کننده ایمنی و محافظ بافت عصبی یاد شده است (۳ و ۲). مطالعه‌های پیشین نشان داده است که نیکوتین منجر به تخفیف و بهبود بیماری‌هایی نظیر کولیت اولسراتیو (۵ و ۴) آلزایمر و پارکینسون (۷ و ۶) و سایر بیماری‌های نورولوژیکی (۸ و ۷) شده است.

نیکوتین یک آلکالوئید قوی مقلد اثرات کولینرژیک بوده که به مقدار فراوان در برگ‌های گیاهان خانواده سولاناسه بالاخص در برگ‌های گیاه تنباکو یافت می‌شود (۹). واسطه‌های کولینرژیک به عنوان مولکول‌های انتقال دهنده پیام در طیف بسیار گسترده‌ای از موجودات زنده از قبیل باکتری‌ها، گیاهان و حشرات و پستانداران عمل می‌کنند (۱۱ و ۱۰). نیکوتین همچنین در برخی از آفت‌کش‌ها حضور دارد (۱۱). به طور جالب توجهی نشان داده شده است که گیرنده‌های پاسخ‌گو به نیکوتین بر روی سلول‌های مختلفی از قبیل سلول‌های عصبی،

1- Multiple sclerosis
2-Experimental autoimmune encephalomyelitis
3-T helper

سایتوکاین‌های اینترفرون گاما (IFN- γ)^(۱)، اینترلوکین ۱۰ و اینترلوکین ۱۷ و هم‌چنین میزان تولید نیتریک اکساید سرم را مورد ارزیابی قرار دهیم.

روش بررسی

این مطالعه از نوع مداخله‌ای - تجربی است. جامعه مورد مطالعه، شامل ۱۴ رأس رت‌های ویستار با محدوده سنی ۶ تا ۸ هفته بود. رت‌ها در شرایط استاندارد (۱۲ ساعت چرخه نوری - ۱۲ ساعت تاریکی) درجه حرارت ۲۲ الی ۲۴ درجه سانتی‌گراد با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. در این مطالعه کلیه موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی طبق قوانین مصوب کمیته اخلاق در پژوهش‌های پزشکی و مطابق معاهده هلسینکی رعایت شد.

بیماری EAE با استفاده از هموژن بافت نخاع خوکچه هندی و ادجوانت کامل فروند القا شد. به طور خلاصه، هموژن بافت نخاع خوکچه هندی به نسبت ۱ به ۱ با ادجوانت کامل فروند (CFA)^(۲) که محتوی ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پیکره کشته شده مایکوباکتریوم به حالت امولسیون درآمد. جهت تهیه سوسپانسیون مزبور از دو سرنگ شیشه‌ای که به وسیله رابطی از جنس استیل به هم متصل هستند استفاده گردید. در یکی از سرنگ‌ها محلول بافت نخاع هموژن شده خوکچه و سرنگ دیگر محتوی هم حجم آن CFA وارد شده و عمل پر و خالی کردن سرنگ‌ها به نوبت تا حصول امولسیونی سفید رنگ، یکنواخت و با قوام

ادامه یافت. پس از بیهوشی رت‌ها، ۴۰۰ میلی‌لیتر مخلوط آنتی‌ژن و ادجوانت مزبور به صورت زیر جلدی در ناحیه پشت و ۱۰۰ میکرولیتر در ناحیه بالشتک هر موش با سوزن گیج ۲۵ تزریق گردید. مقدار 10^9 باکتری برودتلا پاراپرتوسیس نیز در حجم ۳۰۰ میلی‌لیتر PBS در روز تزریق پپتید و ۴۸ ساعت بعد به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. لازم به ذکر است که باکتری برودتلا پاراپرتوسیس پس از کشت در بافر PBS به حالت سوسپانسیون درآمد و تعداد باکتری بر اساس استاندارد نفلومتری مک فارلند (McFarland) مشخص شد. روند بیماری و تغییرات وزن موش‌ها 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 (۱۶).

تعداد ۱۴ سر رت ویستار پس از نشان دادن بیماری به دو گروه ۷ سر با شرایط سنی و وزنی یکسان تقسیم شده، تا ۲۴ روز پس از بروز علائم کلینیکی به شرح زیر تحت درمان قرار گرفتند.

گروه تیمار، به منظور ارزیابی اثرات درمانی دارو، بر روی بیماری در حال جریان، پس از بروز اولین علائم کلینیکی (روز ۱۲ پس از القای بیماری) اقدام به تجویز روزانه نیکوتین (شرکت Sigma - آمریکا)

1-Interferon Gamma
2-Complete Freund's Adjuvant

رگرسیون و معادله خطی، غلظت نیتريت موجود در نمونه‌ها تعیین گردید.

تهیه کشت سلولی طحال و سنجش

سایتوکاین‌ها در مایع رویی کشت طحال؛ پس از

خون‌گیری اقدام به نخاعی کردن رت‌ها شد. سپس

طحال موش‌ها تحت شرایط استریل خارج و بعد از

قطعه قطعه شدن در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI-

1640 (شرکت Sigma- آمریکا) حاوی ۱۰ درصد FBS

(^۲) (شرکت Gibco- آلمان) له گردید. بافت حاصل جهت

تهیه سوسپانسیون سلولی از توری سیمی به قطر ۲

میلی‌متر عبور داده شد. پس از سانتریفیوژ (مدت ۱۰

دقیقه در ۲۰۰g)، به منظور حذف RBCها، بر روی

رسوب سلولی به دست آمده ۵ میلی‌لیتر بافر لیز

کننده (کلرید آمونیوم، ۰/۱۵M، بی‌کربنات پتاسیم، ۱۰

میلی‌مولار) افزوده شد. سپس سلول‌ها بار دیگر به

مدت ده دقیقه در ۲۰۰g سانتریفیوژ شدند. سپس

رسوب سلولی در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰ درصد

FBS به حالت سوسپانسیون درآورده شد. پس از

شمارش، سوسپانسیون سلولی به تعداد 2×10^6

سلول در میلی‌لیتر از آن تهیه شد. این سلول‌ها در

پلیت‌های کشت ۲۴ خانه در حضور فیتوهم

آگلوتینین (PHA)^(۳) به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور

حاوی ۵ درصد CO₂ کشت داده شدند. پس از طی این

مدت مایع رویی آن‌ها جمع‌آوری شد (۱۷).

1- Griess
2- Fetal Bovine Serum
3- Phytohemagglutinin

به میزان ۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم حل شده در PBS به رت‌های گروه مطالعه به صورت داخل صفاقی گردید.

گروه شاهد، موش‌های مبتلا به EAE بودند که در حجم مشابه با گروه قبلی پس از بروز اولین علائم (روز ۱۲ پس از القا) تحت درمان با دارونما (بافر PBS) قرار گرفتند.

برای سنجش، ۲۴ روز بعد از آغاز

درمان (روز ۳۶ پس از القای بیماری) از رت‌ها

خون‌گیری به عمل آمده و سرم خون آنها جدا شد.

میزان تولید نیتريك اکسید در سرم به وسیله روش

رنگ سنجی گریس^(۱) و استفاده از منحنی استاندارد

نیتريت سدیم تعیین گردید. به طور خلاصه، ۱۰۰

میلی‌لیتر از نمونه سرمی به صورت دوتایی به داخل

چاهک‌های پلت ۹۶ خانه‌ای ته تخت ریخته شد. سپس

۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول ۱ درصد سولفانیل‌آمید

(شرکت Sigma- آمریکا) به چاهک‌ها اضافه شد. پلیت

به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی و درجه حرارت اتاق

نگهداری شد. آنگاه به تمام حفره‌ها ۱۰۰ میلی‌لیتر از

محلول ۱ درصد N-۱-۱-نفتیل اتیلن دی آمین دی

هیدروکلراید (شرکت Sigma- آمریکا) اضافه شد و بار

دیگر به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی و درجه حرارت اتاق

نگاه داری شد. در نهایت جذب نوری نمونه در طول

موج ۵۳۰ نانومتر به وسیله دستگاه الیزانگار قرائت

گردید. هم‌زمان با استفاده از غلظت‌های مختلف

نیتريت سدیم منحنی استاندارد ترسیم شده و از طریق

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری مان ویتنی تی دانشجویی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

به دنبال فرآیند القای بیماری، موش‌های رت به صورت روزانه تحت نظر قرار گرفتند. بر اساس نتایج به دست آمده میانگین شدت ناتوانی نورولوژیکی در طول دوره درمان در موش‌های تحت درمان با نیکوتین نسبت به گروه شاهد کمتر می‌باشد. میانگین حداکثر شدت بیماری نیز در گروه موش‌های تیمار در مقایسه با موش‌های تحت درمان کمتر بود (جدول ۱). ارزیابی شاخص تجمعی بیماری (CDI)^(۱) نیز که نشان دهنده مجموعه بار و فشار بیماری در طی مدت مطالعه بین گروه‌های مختلف می‌باشد، نیز حاکی از کاهش این شاخص در موش‌های گروه تیمار بود (نمودار ۱). بر این اساس شاخص مزبور در موش‌های مبتلا و تحت درمان با نیکوتین به میزان ۲۵ درصد نسبت به همین شاخص در گروه شاهد کاهش نشان می‌دهد.

برای سنجش سائتوکاین‌های IFN- γ ، اینترلوکین ۱۰ و اینترلوکین ۱۷ از کیت‌های ELISA مربوطه (شرکت BENDERMED - آلمان) استفاده شد و بر طبق دستورالعمل مندرج در دفترچه راهنمای هر کدام از کیت‌ها اقدام گردید.

میزان تکثیر سلول‌های ایمنی با روش MTT بررسی شد. برای این کار پس از طراحی که در بالا توضیح داده شد، 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 آنتی ژن و در حضور PHA در نظر گرفته شد. به عنوان بلانک نیز در سه چاهک از محیط RPMI خالی استفاده شد. بعد از ۷۲ ساعت نگه داری در انکوباتور حاوی CO₂ ۵ درصد، به هر چاهک ۲۵ میکرولیتر محلول MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در PBS) افزوده شد و به مدت ۴ ساعت دیگر نگه داری گردید. در این مدت احیای ماده ی MTT به وسیله سلول‌های زنده و در حال تکثیر سبب تشکیل کریستال‌های فورمازون گردید که با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به حالت محلول درآمد. سپس شدت رنگ در طول موج ۴۹۰ نانومتر تعیین و ایندکس تحریک براساس رابطه ی زیر محاسبه گردید:

$$\text{ایندکس تحریک} = \frac{\text{OD} - \text{OD در حضور ODPHA}}{\text{OD در عدم حضور ODPHA}}$$

تحریک (۱۷).

1-Cumulative Disease Score

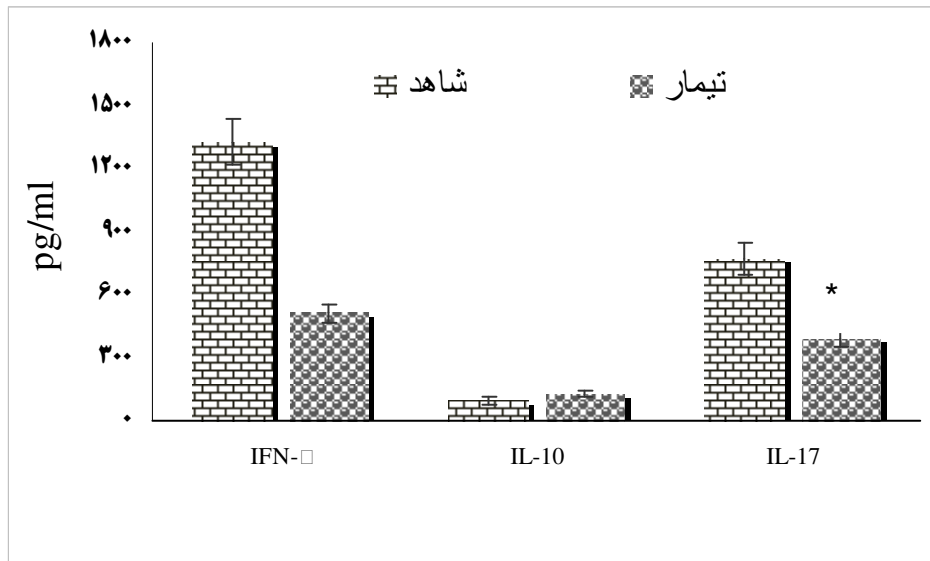
نتایج به دست آمده همچنین نشان داد که به دنبال تحریک لنفوسیت‌های طحالی، در گروه درمان شده با نیکوتین نسبت به رت‌های مبتلا و درمان نشده (شاهد) میزان تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی اینترلوکین ۱۷ و IFN- γ کاهش معنی‌داری دارد (نمودار ۲). با وجودی که سطح سایتوکاین ضد التهابی اینترلوکین ۱۰ در گروه درمانی نسبت به گروه شاهد کاهش می‌یابد، اما این کاهش معنی‌دار نمی‌باشد (نمودار ۲).

میزان تولید نیتریک اکساید به طور معنی‌داری در گروه تحت درمان با نیکوتین نسبت به گروه شاهد کاهش یافت (جدول ۱).

میزان تکثیر لنفوسیت‌های طحالی به شیوه MTT سنجیده شد و تحت عنوان شاخص تحریکی گزارش گردید. نتایج حاصل از تست تکثیر لنفوسیتی حاکی از کاهش معنی‌دار در سطح شدت تکثیر لنفوسیت‌ها در گروه‌های دریافت کننده درمان نسبت به گروه شاهد به دنبال تحریک لنفوسیتی‌های طحالی با میتوزن - PHA در محیط کشت می‌باشد (جدول ۱).



نمودار ۱: مقایسه میانگین شاخص تجمعی بیماری بین رت‌های مبتلا به EAE (شاهد) و مبتلا به EAE و تحت درمان با نیکوتین (تیمار). * نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($p < 0.001$) نسبت به گروه شاهد می‌باشد. (هر دایره نمودار یک موش می‌باشد. هر خط تیره نیز میانگین شاخص مزبور را در آن گروه مشخص می‌نماید).



نمودار ۲: مقایسه میانگین غلظت سایتوکاین‌های در سوپ رویی کشت سلول‌های طحالی پس از ۷۲ ساعت کشت در حضور میتوزن فیتو هم آگلوتینین بین رت‌های مبتلا به EAE (شاهد) و مبتلا به EAE و تحت درمان با نیکوتین (تیمار). * نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح $p < 0.001$ نسبت به موش‌های گروه شاهد می‌باشد.

جدول ۱. ارزیابی برخی از شاخصهای بیماری بین رت‌های مبتلا به EAE (شاهد) و مبتلا به EAE و تحت درمان با نیکوتین (تیمار)

گروه‌ها	میانگین شدت ناتوانی ^۱	میانگین حداکثر شدت بیماری ^۱	میزان نیتریک اکساید سرمی (میکرومولار)	شدت تکثیر لنفوسیتی (جذب نوری)
شاهد	۲/۳۴ ± ۰/۰۸	۳/۳۶ ± ۰/۱۱	۱۷/۶ ± ۳	۲/۰۴ ± ۰/۱
تیمار	۱/۶ ± ۰/۱	۲/۹۴ ± ۰/۰۹	۱۴/۲۱ ± ۲	۱/۴۴ ± ۰/۰۸
سطح معنی‌داری	< ۰/۰۰۱	< ۰/۰۵	< ۰/۰۰۱	< ۰/۰۰۱

^۱ 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

بحث

می‌شود (۲۰-۱۸). در سال ۲۰۰۳ نشان داده شد که

عمده اثرات ضدالتهابی از طریق اثرگذاری بر گیرنده‌های $\alpha 7$ سطح سلول‌های مونوسیت - ماکروفاژ صورت می‌پذیرد (۲۰). نیکوتین از طریق اتصال به این گیرنده‌ها موجب کاهش بیان فاکتور نسخه‌برداری NF κ B در این سلول‌ها شده و از آزادسازی سایتوکاین‌های التهابی جلوگیری می‌کند. پروفایل

مطالعه‌های متعددی حاکی از این بوده است که تحریک عصب واگ منجر به تخفیف شرایط التهابی در مواردی از قبیل سپتی سمی و برخی از بیماری‌های خود ایمن از قبیل روماتوئید آرتریت می‌شود (۱۹) و (۱۸). نیکوتین به عنوان یک آگونیست کولینرژیک جزئی از سیستم مسیر ضدالتهابی کولینرژیک محسوب

سایتوکاینی تولید شده به وسیله این سلول‌ها مسلماً در پلاریزه شدن و جهت گیری پاسخ‌های ایمنی مؤثر است (۲۱).

در بررسی‌های اخیر که به وسیله گائو و همکاران اخیر صورت گرفته است، به اثرات نروپروتکتیو نیکوتین در مدل EAE اشاره شده است (۲۲ و ۲۳). بر این اساس نشان داده شده است که تجویز نیکوتین به موش‌های مبتلا به EAE در کنار کاهش علائم درمانگاهی و بهبود وزن‌گیری منجر به کاهش شاخص‌های التهابی، دیمیلیناسیون و میزان فعالیت سلول‌های میکروگلیال در بافت عصبی حیوانات مبتلا شده است. به طور جالب توجهی نشان داده شده است که غیر از نیکوتین سایر مواد موجود در دود سیگار منجر به وخامت علائم بالینی در حیوانات مبتلا به EAE شده‌اند (۲۲). بررسی‌های دقیق‌تر صورت گرفته نشان داده است که تجویز نیکوتین به طور معنی‌داری منجر به کاهش بروز نستین شده و منجر به افزایش تکثیر سلول‌های اپاندیمال و الیگودندروسیت‌ها در موش‌های مبتلا به EAE می‌گردد (۲۳). در مطالعه حاضر نیز به جنبه‌های دیگری از عملکرد نیکوتین که شامل اثرگذاری بر روند پروفایل سایتوکاینی تولیدی به وسیله لنفوسیت‌های T در رت‌های مبتلا EAE است، پرداخته شده است.

مطالعه‌های قبلی مشخص کرده است که پروفایل سایتوکاینی تولید شده به وسیله لنفوسیت‌های T کمکی نقش اساسی در وسعت و نوع

ضایعات پاتولوژیک بیماری بازی می‌نماید (۱۳). تا همین اواخر به طور گسترده‌ای پذیرفته شده بود که سلول‌های Th1 مولد IFN- γ نقش اصلی را در پاتوژنز EAE و MS بازی می‌کنند (۲۴ و ۲۵). با وجود این مشخص شده است موش‌های دچار نقصان در اینترفرون گاما و یا زنجیره P35 از مجموعه گیرنده اینترلوکین ۱۲، نه تنها به القای بیماری EAE مقاوم نیستند، بلکه بیماری را با شدت بیشتری نشان می‌دهند (۲۴). این مساله با کشف رده جدیدی از سلول‌های T کمکی به نام اینترلوکین ۱۷ تا حدودی حل شد. اینترلوکین ۱۷ از جمله سایتوکاین‌های شاخص این رده سلولی می‌باشد که نقش مهمی در پیشبرد روند التهاب و بیماری‌زایی بسیاری از بیماری‌های خود ایمن دارد (۲۶ و ۲۵). این سایتوکاین یک فاکتور پیش التهابی قوی بوده که بر روی طیف گسترده‌ای از سلول‌ها اثر کرده و موجب آزادسازی انواع واسطه‌های التهابی از قبیل؛ سایتوکاین‌های اینترلوکین ۶، اینترلوکین ۸، کموکاین‌های CXCL1 و CXCL10 و متالوپروتئینازها می‌گردد (۲۵). سلول‌های مولد اینترلوکین ۱۷ قبل از یاخته‌های Th1 (لنفوسیت‌های مولد IFN- γ) به بافت مهاجرت کرده و با ایجاد شرایط التهابی و شکست سد خونی مغزی زمینه ورود سایر سلول‌های ایمنی از جمله سلول‌های Th1 را فراهم می‌دارند (۲۶ و ۲۷).

پس از ورود سلول‌های Th1 این سلول‌ها از طریق القای گونه‌های فعال اکسیژن و نیتریک اکسید

در سلول‌های میکروگلیال در ایجاد EAE دخالت می‌کنند(۲۶). نتایج تحقیق حاضر نیز به خوبی نشان داد که هم‌زمان با کاهش علائم بالینی، میزان این دو سایتوکاین در گروه موش‌های تیمار کاهش معنی‌داری می‌یابد.

اینترلوکین ۱۰، نقش مهمی را در محدود کردن پاسخ‌های التهابی و ممانعت از ایجاد آسیب‌های بافتی، بازی می‌نماید(۲۸). با این حال سطح این سایتوکاین در مطالعه حاضر تفاوت معنی‌داری را با گروه شاهد نشان نداد. همان‌طور که ذکر شد اثر نیکوتین عمدتاً وابسته به کاهش سطح سایتوکاین‌های التهابی است، بنابراین با وجود عدم تغییر سطح سایتوکاین ضدالتهابی اینترلوکین ۱۰ به دلیل کاهش سطوح دو سایتوکاین التهابی اینترلوکین ۱۷ و IFN- γ کفه ترازو به سمت شرایط ضدالتهابی سنگینی خواهد کرد.

در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس میزان نیتریک اکسید (NO) سرم افزایش می‌یابد(۲۹). نقش NO در ایجاد بیماری MS با مشاهده واحدهای نیتروتیروزین در سلول‌های پلاک‌های مغزی بیماران MS ثابت شده است(۳۰). نشان داده شده است که استرس‌های اکسیداتیو و یا نیتراتیو ممکن است به مرگ انتخابی و حذف الیگودندروسیت و در نتیجه دمی‌لیناسیون در شرایط درون تنی بینجامد(۳۱ و ۳۲). گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن و یا نیتروژن، هم‌چنین ممکن است که منجر به آسیب غلاف میلین شده و زمینه پیش‌برد حمله به وسیله سلول‌های ماکروفاژ/میکروگلیال را فراهم سازند(۳۲). نیتریک

اکسید به سرعت موجب مهار سیتوکروم C اکسیداز شده و بدین ترتیب در زنجیره تنفسی اختلال ایجاد می‌نماید. نیتریک اکسید و رادیکال‌های سوپراکسید با یکدیگر ترکیب شده و پراکسی نیتريت را تولید می‌کنند (۳۲ و ۳۳). پراکسی نیتريت و سایر گونه‌های واکنش‌پذیر NO دارای اثرات سمی بر روی نرون‌ها، آکسون‌ها و سلول‌های گلیال بوده و موجب القای آپوپتوز در آن‌ها می‌گردند (۳۲ و ۳۳). NO به صورت غیر مستقیم و از طریق القای آزاد شدن گلوتامات به وسیله میکروگلیاها و ماکروفاژها منجر به ایجاد آسیب می‌گردد (۳۲ - ۳۴). همان‌طور که ذکر شد گیرنده‌های نیکوتینی $\alpha 7$ در سطح سلول‌های ماکروفاژ و میکروگلیال توزیع شده است(۲۰). بنابراین بخشی از کاهش سطح نیتریک اکساید که در گروه موش‌های تیمار دیده می‌شود، به دلیل اثرات مستقیم خود نیکوتین بر این سلول‌ها می‌باشد. هم‌چنین مشخص شده است سلول‌های میکروگلیال در حضور هم‌زمان سلول‌های مولد هر دو سایتوکاین IFN- γ و اینترلوکین ۱۷ میزان فراوانی از سایتوکاین‌های التهابی و گونه‌های فعال اکسیژن و نیتریک اکسید را تولید می‌نمایند(۲۴ و ۲۵). به طور جالب توجهی نتایج حاضر نیز حاکی از کاهش تولید اینترلوکین ۱۷ و IFN- γ در گروه تیمار بود.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که کاربرد نیکوتین پس از بروز علائم بالینی منجر به کاهش علائم در

رت‌های مبتلا به EAE از طریق کاهش سطح سایتوکاین التهاب آور اینترلوکین ۱۷ و IFN- γ و همچنین نیتریک اکساید می‌شود. البته این پژوهش یک مطالعه مقدماتی بوده و لازم است در آینده مطالعه‌های بیشتری صورت گیرد.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایانامه‌ی دوره کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری دانشگاه ارومیه می‌باشد که با حمایت مالی آن دانشگاه انجام شده است.

REFERENCES

1. Herning RI, Jones RT, Benowitz NL, Mines AH. How a cigarette is smoked determines blood nicotine levels. *Clin Pharmacol Ther* 1983; 33: 84-90.
2. Soper ML, Kozak W. Immunomodulatory effects of cigarette smoke. *J Neuroimmunol* 1998; 83(1-2): 148-56.
3. McRobbie H, Bullen C, Hartmann-Boyce J, Hajek P. Electronic cigarettes for smoking cessation and reduction. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; 12: Cd010216.
4. Hayashi S, Hamada T, Zaidi SF, Oshiro M, Lee J, Yamamoto T, et al. Nicotine suppresses acute colitis and colonic tumorigenesis associated with chronic colitis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2014; 307: 968-78.
5. Lunney PC, Leong RW. Review article: Ulcerative colitis, smoking and nicotine therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2012; 36: 997-1008.
6. Lombardo S, Maskos U. Role of the nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease pathology and treatment. *Neuropharmacol* 2015; 96: 255-62.
7. Piao WH, Campagnolo D, Dayao C, Lukas RJ, Wu J, Shi FD. Nicotine and inflammatory neurological disorders. *Acta Pharmacol Sin* 2009; 30: 715-22.
8. Shi FD, Piao WH, Kuo YP, Campagnolo DI, Vollmer TL, Lukas RJ. Nicotinic attenuation of central nervous system inflammation and autoimmunity. *J Immunol* 2009; 182: 1730-9.
9. Chakraborty A, Gupta A, Singh AK, Patni P. Effect of Oxidative Phytochemicals on Nicotine-stressed UMN5AH/DF-1 Cell Line. *J Tradit Complement Med* 2014; 4(2):126-31.
10. Hoogduijn MJ, Cheng A, Genever PG. Functional nicotinic and muscarinic receptors on mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2009; 18(1): 103-12.
11. Schraufstatter IU, DiScipio RG, Khaldoyanidi SK. Alpha 7 subunit of nAChR regulates migration of human mesenchymal stem cells. *J Stem Cells* 2009; 4(4): 203-15.
12. 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 (8): 1953-71.
13. Comabella M, Houry SJ. Immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2012; 142(1): 2-8.
14. Pahan K. Neuroimmune pharmacological control of EAE. *J Neuroimmune Pharmacol* 2010; 5(2):165-7.
15. Kuersten S, Lehmann PV. The immune pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis: lessons learned for multiple sclerosis?. *J Interferon Cytokine Res* 2011; 31(12): 907-16.
16. 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: 116-25.
17. 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.
18. Wu H, Li L, Su X. Vagus nerve through $\alpha 7$ nAChR modulates lung infection and inflammation: models, cells, and signals. *Biomed Res Int* 2014; ID 283525.
19. Levine YA, Koopman FA, Faltys M, Caravaca A, Bendele A, Zitnik R, et al. Neurostimulation of the cholinergic anti-inflammatory pathway ameliorates disease in rat collagen-induced arthritis. *PLoS One* 2014; 9(8): 1-9.
20. Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 2003; 421: 384-8.
21. Andersson U, Tracey KJ. Reflex principles of immunological homeostasis. *Annu Rev Immunol* 2012; 30: 313-35.
22. Gao Z, Nissen JC, Ji K, Tsirka SE. The experimental autoimmune encephalomyelitis disease course is modulated by nicotine and other cigarette smoke components. *PLoS One* 2014; 9(9): e107979.
23. Gao Z, Nissen JC, Legakis L, Tsirka SE. Nicotine modulates neurogenesis in the central canal during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroscience* 2015; 297:11-21.
24. El-behi M, Rostami A, Ciric B. Current views on the roles of Th1 and Th17 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmune Pharmacol* 2010; 5(2): 189-97.

25. Jäger A, Dardalhon V, Sobel RA, Bettelli E, Kuchroo VK. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *J Immunol* 2009; 183(11): 7169-77.
26. 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): 403-13.
27. Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. *Scand J Immunol* 2011; 74: 1-13.
28. Sabat R, Grutz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, et al. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010; 21: 331-44.
29. Nazliel B, Taşkıran D, Irkeç C, Kutay FZ, Pöğün S. Serum nitric oxide metabolites in patients with multiple sclerosis. *J Clin Neurosci* 2002; 9(5): 530-2.
30. Xiao BG, Ma CG, Xu LY, Link H, Lu CZ. IL-12/IFN-gamma/NO axis plays critical role in development of Th1-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol Immunol* 2008; 45(4): 1191-6.
31. Mao P, Reddy PH. Is multiple sclerosis a mitochondrial disease?. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1802: 66-79.
32. Morvaridi A, Delirez N, Hobbenaghi R, Abtahi Froushani SM, Malekinejad H. The effects of All-Trans Retinoic Acid on clinical symptoms, nitric oxide levels and total antioxidant capacity of plasma in mouse model of multiple sclerosis. *RJMS* 2013; 20(108): 1-18.
33. Sasaoka T. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: friend and foe. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2012; 39(7): 597-8.
34. Herz J, Zipp F, Siffrin V. Neurodegeneration in autoimmune CNS inflammation. *Exp Neurol* 2010; 225(1): 9-17.

The Effects of Nicotine on the Stimulation of the Cholinergic System and Immune Responses Changes in Animal Models of Multiple Sclerosis

Shahmoradi M¹, Khezri SH¹, Abtahi Froushani SM^{2*}

¹ Department of biology, Urmia University, Urmia, Iran, ² Department of Microbiology, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 9 Jan 2016 Accepted: 6 May 2016

Abstract:

Background & aim: Lately, it has been demonstrated that the signaling by the $\alpha 7$ nicotinic receptors produces the anti-inflammatory condition in both macrophages and T cells. Moreover, activation of macrophages and T cells play an important role in multiple sclerosis (MS). In the present study, the therapeutic effect of nicotine on experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an animal model of MS, and its effects on T-helper cells responses was evaluated.

Methods: In the present experimental study, EAE was induced by homogenised guinea pig spinal cord and complete Freund's adjuvant in wistar rats. Animals were allocated in two therapeutic groups (n=7 per group). Treatment with nicotine (2.5 mg/kg-daily) was started in treatment group when the treatment group developed a disability score (at day 12). At the same time, the control group received only the solvent with the same program. Signs of disease were recorded daily until the day 36 when animals were sacrificed. The Splenocytes were checked for proliferation by MTT test and cytokine production by ELISA. The level of nitric oxide in serum was checked by griess test. The data was analyzed using the Student t test and Mann-Whitney U.

Results: Nicotine administration in the treatment group significantly reduced the clinical symptoms after the onset of symptoms. Simultaneously with the decrease of the level of serum nitric oxide, nicotine significantly decreased the pro-inflammatory cytokine IL-17 and IFN- γ . The levels of anti-inflammatory IL-10 were not changed significantly. Lymphocyte proliferation was significantly decreased in treatment group compared to control group

Conclusion: The results of this study indicated that nicotine had immune modulatory effects and could be used to control MS disease.

Keywords: Multiple sclerosis; Experimental autoimmune encephalomyelitis; Nicotine; lymphocyte response.

Corresponding author: Abtahi Froushani SM, Department of Microbiology, Urmia University, Urmia, Iran.

Email: meysamabtahi@hotmail.com

Please cite this article as follows:

Shahmoradi M, Khezri SH, Abtahi Froushani SM. The Effects of Nicotine on the Stimulation of the Cholinergic System and Immune Responses Changes in Animal Models of Multiple Sclerosis. *Armaghane-danesh* 2016; 21 (3): 212-224.