مقاله پژوهشی

اثر مهاری اینترفرون بتا در آزادسازی میکروپارتیکل های مشتق شده از سلول‌های اندوتلیال در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکروزیس

نویسندگان:

اکبر هاشمی طیر*[1]، مریم جلالی[1]، مریم کامروان[1]

۱- مرکز تحقیقات بیماری های غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.20, No.2, Summer 2022

Pars J Med Sci 2022;20(2):

چکیده:

مقدمه: افزایش مقدار میکروپارتیکل‌ها (MPs) در بسیاری از بیماری های خودایمنی همچون مولتیپل اسکلروزیس (MS) دیده شده است. در MS به دنبال فعال شدن لنفوسیت‌ها و تولید سایتوکاین های التهابی، سلول های اندوتلیال از غشای خود MPs آزاد می کنند. هدف از این مطالعه بررسی اثر مهاری داروی اینترفرون بتا (INFβ) بر آزادسازی MPs مشتق شده از سلول های اندوتلیال (EnMPs) بود.

روش کار: ۲۰ نفر از بیماران مبتلا به MS که بیماری آن ها به تازگی تشخیص داده شده بود وارد مطالعه شدند. نمونه خون، در دو مرحله قبل و سه ماه بعد از درمان با اینترفرون بتا از بیماران گرفته شد. از فلوسیتومتری برای شمارش و تعیین فنوتیپ MPs و برای نشاندار کردن EnMPs از anti-CD51 و anti-CD31 استفاده شد. همچنین در هر دو مرحله، MRI بیماران از نظر تعداد پلاک های مغزی مورد بررسی قرار گرفت. داده ها با کمک نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۳ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: میانگین سنی بیماران ۸/۳ ± ۳۱/۳ سال بود. نتایج این مطالعه، کاهش ۴۰ درصدی مقدار CD31+MPs و ۳۲ درصدی مقدار CD51+MPs به دنبال درمان با داروی اینترفرون بتا نشان داد که از نظر آماری معنادار بود (p<۰/۰۰۱). در این مطالعه، ارتباط مثبت و معناداری بین تعداد EnMPs با تعداد پلاک های مغزی (p=۰/۰۶۷)، سن (p=۰/۰۵۸) و جنسیت بیماران (p=۰/۰۶۱) مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: اینترفرون بتا اثر مهاری بر آزادسازی EnMPs از سلول‌های اندوتلیال دارد و نشان می‌دهد که EnMPs احتمالاً می‌توانند به عنوان بیومارکر حساس برای پایش پیشرفت بیماری و اثربخشی درمان استفاده شوند.

واژگان کلیدی: مولتیپل اسکلروزیس، اینترفرون بتا، میکروپارتیکل مشتق شده از اندوتلیال

مقدمه:

تصلب بافت چندگانه (Multiple Sclerosis) که با نام اختصاری اِم‌اِس (MS) شناخته می‌شود، یک بیماری التهابی منحصر به انسان است که در آن غلاف‌های میلین سلول‌های عصبی در مغز و نخاع آسیب می‌بینند. این آسیب‌دیدگی می‌تواند در توانایی بخش‌هایی از سیستم عصبی که مسئول ارتباط هستند اختلال ایجاد کرده و باعث به وجود آمدن علائم و نشانه‌های زیاد جسمی شود [۲-۱]. از نظر بالینی این بیماری به چند شکل ظاهر می‌شود و علائم جدید آن یا به صورت عود مرحله‌ای به شکل برگشتی و یا در طول زمان به شکل متناوب اتفاق می‌افتد. ممکن است در بین عود، نشانه‌های بیماری به کلی از بین برود. با این وجود، مشکلات عصبی دائمی به ویژه با پیشرفت بیماری در مراحل بعدی به طور مداوم اتفاق می‌افتد. MS از نظر نوروپاتولوژیکی با حضور پلاک‌های التهابی فعال در مغز و نخاع مشخص می‌شود [۳].

این بیماری به‌طور معمول بر اساس ارائه نشانه‌ها و علائم، همراه با تصویربرداری پزشکی و آزمایش‌های آزمایشگاهی لازم

* نویسنده مسئول، نشانی: دکترای هماتولوژی ـ استادیار دانشکده پزشکی- مرکز تحقیقات بیماری های غیر واگیر- دانشگاه علوم پزشکی جهرم ـ جهرم ـ ایران.

تلفن تماس:۵۴۳۴۰۴۰۵-۰۷۱ کد پستی: ۷۴۱۴۸۰۴۶۱۹۹ پست الکترونیک:a.hashemi@jums.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۶ اصلاح: ۱۴۰۰/۱۱/۲ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۰۹

تشخیص داده می‌شود. تأیید تشخیص به ویژه در مراحل اولیه آن به دلیل این که ممکن است علائم و نشانه‌ها مشابه با سایر مشکلات پزشکی باشند، دشوار است. روش‌های پاراکلینیکی تشخیص MS شامل MRI مغز و نخاع برای رویت پلاک‌های مغزی، آزمایش‌های الکتروفیزیولوژی و سرانجام بررسی مایع مغزی نخاع برای تشخیص آنتی‌بادی مربوط به بیماری است [۴]. اگرچه علت بیماری هنوز مشخص نیست، اما سازوکار اصلی آن آسیب زدن توسط سیستم ایمنی بدن یا اختلال در سلول‌های تولیدکننده غلاف میلین است [۳]. لنفوسیت‌ها و ماکروفاژها به عنوان اصلی‌ترین عناصر سلولی درگیر در نواحی التهابی دمیلینه شده از پلاک‌های فعال MS می‌باشند. تصور می‌شود که چسبندگی اندوتلیوم و مهاجرت ترانس اندوتلیال لکوسیت‌ها فعال از طریق سد خونی- مغزی به عنوان یک مرحله کلیدی در تشکیل ضایعات دمیلینه در این بیماری مطرح باشند [۵]. بر خلاف سایر بسترهای اندوتلیالی، سلول‌های اندوتلیال مغزی اتصالات محکمی با هم دیگر داشته و در مقابل ترافیکینگ مولکول‌ها و سلول‌ها در کمپارتمانت داخل عروقی به عنوان یک سد فیزیولوژیکی و آناتومیکی کاملاً نفوذ ناپذیر عمل می‌کنند. تولید سایتوکاین‌های التهابی همچون IFN-γ و TNF-α باعث بازآرایی مجدد سلول‌های اندوتلیال و افزایش نفوذپذیری آن‌ها می‌شوند. افزایش نفوذپذیری سلول‌های اندوتلیال در سد خونی- مغزی به طور عمده ناشی از واکنش‌های بین T سل‌ها و منوسیت‌ها با سلول‌های اندوتلیال مغزی است که همراه با تولید لنفوکاین‌ها و کموکاین‌ها است [۶].

به دنبال فعال شدن لنفوسیت‌ها و ماکروفاژها و تولید سایتوکاین‌های التهابی همچون IFN-γ، TNF-α و سایر سایتوکاین‌ها، سلول‌های اندوتلیال از غشای سیتوپلاسمی خود، وزیکول‌های کوچکی آزاد می‌کنند که MPهای مشتق شده از سلول‌های اندوتلیال (EnMP) نامیده می‌شوند[۷]. EnMPs مارکرهای CD31 (PECAM; Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule)، VE-Cadherin (CD144)، MCAM (CD146)، VCAM-1 (CD106)، اندوژلین (CD105) و سلکتین E (CD62E) را بیان می‌کنند [۹-۸].

افزایش مقدار پلاسمایی EnMP در بیماری‌های مختلفی همچون بیماری MS [۱۰]، ضد انعقادهای لوپوسی [۱۱]، پورپورای ترومبوسیتوپنیک ترومبوتیک [۱۲]، سندرم حاد کرونری [۱۳]، افزایش فشار خون بدخیم [۱۴] و دیابت ملیتوس[۱۵] که در آن‌ها به طور شاخص عملکرد سلول‌های اندوتلیال مختل می‌شود، گزارش شده است و بیانگر این حقیقت است که EnMPs نقش مهمی در التهاب داشته و می‌توانند به عنوان یک عامل تشخیصی، پروگنوستیک و یا درمانی در بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار گیرند. نشان داده شده است که مقدار پلاسمایی MPs مثبت از نظر CD31 و CD51 در مراحل عود کننده و تشدید یافته بیماری MS افزایش پیدا می‌کنند. EnMPs آزاد شده با منوسیت‌های بیان کننده فاکتور بافتی (TF) تشکیل کمپلکس داده که این ترکیب به نوبه خود نقش مهمی در پاتوژنز بیماری و تخریب میلین دارد. در چندین مطالعه افزایش مقدار پلاسمایی EnMPs در بیماران MS به خصوص در مراحل پیشرونده بیماری گزارش شده و بیان شده است که شروع درمان با اینترفرون بتا، باعث کاهش نفوذپذیری سلول‌های اندوتلیال در سد خونی- مغزی می‌شود [۱۲]. داروی مذکور به عنوان خط اول دارویی در فرم‌های عود کننده MS استفاده گسترده ای دارد و از طریق افزایش بیان عوامل ضد التهابی، کاهش بیان عوامل پیش التهابی، کاهش ترافیکینگ سلول‌های التهابی در سد خونی- مغزی و افزایش تولید فاکتورهای رشد عصبی ایفای نقش می‌کند[۱۲].

در مطالعه حاضر، EnMP بیان کننده CD31 و CD51 در پلاسمای تازه مبتلایان به MS، قبل و بعد از درمان با اینترفرون بتا مورد ارزیابی قرار می‌گیرند که در مرحله اول ارتباط بین EnMP با خصوصیات نوروراديولوژیک بیماران و در مرحله بعد تاثیر مهاری درمان با IFNβ بر میزان EnMP پلاسمایی بررسی می‌شود.

روش کار:

نمونه گیری از بیماران

در این مطالعه نیمه تجربی قبل و بعد، از بیماران مبتلا به MS مراجعه‌کننده به مراکز درمانی جهرم، ۲۰ بیمار که به تازگی تشخیص آن‌ها توسط متخصص مغز و اعصاب تایید شده بود وارد مطالعه شدند.

به منظور تائید تشخیص MS از MRI بدون تزریق و با تزریق گادولینیوم استفاده شد. در MRI بدون تزریق، تعداد پلاک‌ها و در MRI با تزریق، تعداد پلاک های فعال مشخص می‌شوند. تشخیص بیماری و انتخاب نوع درمان توسط متخصص مغز و اعصاب انجام شد. بیماران MS بر اساس تعداد پلاک‌ها، محل درگیر شدن عصب (مغز – نخاع) و مدل حمله، کاندید دریافت داروهای تزریقی سرکوب کننده ایمنی (اینترفرون) می‌باشند که توسط متخصص مغز و اعصاب تجویز انجام شد.

در دو مقطع زمانی، یکی قبل از شروع درمان با اینترفرون بتا و دیگری سه ماه بعد از شروع درمان، از بیماران نمونه گیری به عمل آمد. در این مطالعه، بعد از کسب رضایت از بیماران ۵ میلی لیتر نمونه خون وریدی با ضد انعقاد سیترات سدیم جمع آوری شد.

جداسازی میکروپارتیکل ها از نمونه خون افراد بیمار

به روش سانتریفیوژ، MPs موجود در پلاسما از سایر محتویات خون جدا شدند. از نمونه‌های گرفته شده حاوی ضد انعقاد سیترات سدیم به روش زیر سوپرناتانت حاوی میکروپارتیکل‌ها تهیه شد. ۱۰ میلی لیتر گلبول قرمز با ۴ میلی‌لیتر فسفات بافرسالین (۷/۴ =pH) مخلوط و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰۰×g در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. بعد از این مرحله، سوپ رویی برداشته شده و سانتریفیوژ مجدد با همان شرائط قبل انجام شد. بعد از اتمام سانتریفیوژ، از پلاسمای رویی برای تحلیل فلوسیتومتری EnMPs استفاده شد [۱۶].

تحلیل فلوسیتومتری میکروپارتیکل‌ها

در این مطالعه برای شمارش و تعیین فنوتیپ میکروپارتیکل‌ها در پلاسمای رویی از دستگاه فلوسیتومتری استفاده شد. دستگاه مورد نظر دارای لیزر و فیلتر اپتیکال استاندارد بوده و برای تحلیل سلولی ولتاژهای فتومولتی پلایر در محدوده مورد نظر تنظیم شد. همچنین پارامترهای پراکندگی رو به جلو (FSC) و پراکندگی کناری (SSC) که به ترتیب تعیین کننده اندازه و گرانولاریته سلول‌ها هستند به صورت لگاریتمی تنظیم شدند.

در تحلیل فلوسیتومری برای تعریف اندازه events ها از بیدهای ۱ میکرومتری (Yellow-Green Carboxylate Microspheres 1.0 µm, Polysciences, Warrington, Philadelphia) استفاده شد. ویال بید حاوی تعداد مشخصی از بیدهای فلورسانت زرد–سبز است که امکان مقایسه تعداد MPs تعیین شده بین نمونه‌های مختلف را فراهم می‌کند. در واقع بیدهای مورد نظر برای تعیین کمیت MPs مورد استفاده قرار گرفتند [۱۶]. در این مطالعه برای نشاندار کردن MPs مشتق شده از اندوتلیال سل ها از Phycoerythrin (PE)anti-human CD51 (BD) و FITC anti-human CD31 (BD) استفاده شد. علاوه بر این، برای افتراق دادن نویزهای سیتومتریک فلوسیتومتری، از ایزوتیپ کنترل PE Mouse IgG2b k (BD) که قابلیت واکنش بر علیه آنتی‌ژن‌های انسانی را ندارد به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

در مطالعه حاضر، منشاء سلولی میکروپارتیکل‌ها و غلظت آن ها در پلاسمای رویی نمونه‌ها تعیین شد. بدین ترتیب که ۵۰ میکرولیتر از نمونه‌ها با ۵ میکرولیتر از anti-CD51 و ۵ میکرولیتر anti-CD31 و ۵ میکرولیتر از ایزوتیپ کنترل PE-IgG2b مخلوط و برای ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در تاریکی انکوبه شدند. قبل از تحلیل نمونه‌ها، میزان ۵ میکرولیتر از رقت ۱/۵۰۰ بیدهای ۱ میکرومتری که با آب مقطر دوبار تقطیر رقیق شده به هر نمونه افزوده شد. غلظت EMPs در مقایسه با غلظت بیدهای ۱ میکرومتری محاسبه شد. در واقع تعداد EnMPs در تناسب با شمارش ۱۰۰۰۰ بید به دست می‌آید. در این مطالعه برای افتراق دادن events های واقعی از events های ناشی از نویزهای الکترونیک دستگاه، MPs را با توجه اندازه آن‌ها (کمتر از ۱ میکرومتر) و منشاء اندوتلیالی (بیان مثبت CD51 و CD31) تعریف کرده و در نهایت شمارش مطلق MPs در هر میکرولیتر پلاسما به صورت زیر محاسبه شد [۱۶].

$$\text{MPs per } \mu l = \frac{\text{N. of events in gating containing MPs} \times \text{Absolute count of bead per tube}}{\text{N. of events in bead region} \times \text{test volume}}$$

در تحلیل فلوسیتومتری، امکان ذخیره سازی نمونه های حاوی MPs برای مدت طولانی وجود ندارد و لازم است به محض جداسازی از نظر فلوسیتومتری مورد بررسی قرار گیرند. البته با افزودن فرمالدهید به عنوان فیکساتیو به مخلوط واکنش، قابلیت تحلیل نمونه‌ها تا ۲۴ ساعت وجود دارد.

این طرح در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی جهرم با کد IR.Jums.REC.1397.115 به تصویب رسیده و از تمام بیماران رضایت نامه کتبی برای شرکت در مطالعه اخذ شده است.

تحلیل آماری

با توجه به تعداد کم نمونه ها (کمتر از ۳۰ نفر)، برای اطمینان از توزیع نرمال داده ها از آزمون کولموگراف – اسمیرنوف بهره گرفته شد. بر اساس مقدار p حاصل (بیشتر از ۰/۰۵)، مشخص شد که داده‌ها از توزیع نرمال برخوردار هستند. برای بررسی ارتباط بین متغیرهای کمی از آزمون همبستگی پیرسون و برای متغیر اسمی از ضریب اتا استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده ها داده ها به کمک نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۳ انجام شد. در تمامی آزمون‌ها سطح معناداری آماری کوچکتر مساوی ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها:

در این مطالعه نیمه تجربی، ۲۰ بیمار مبتلا به MS که به تازگی بیماری آن‌ها تشخیص داده شده وارد مطالعه شده و تحت درمان با رسیژن که نوعی اینترفرون بتا می‌باشد قرار داده شدند. از بیماران، ۱۶ نفر (۷۵ درصد) زن و بقیه مرد بودند. میانگین سنی بیماران ۸/۳ ± ۳۱/۳ سال (۴۸–۲۰) بود.

تحلیل فلوسیتومتری نمونه‌ها از نظر حضور میکروپارتیکل‌های مشتق شده از سلول‌های اندوتلیال

بر اساس تحلیل پلاسمای فاقد پلاکت (PPP) به دست آمده از نمونه‌های خونی بیماران با استفاده از تکنیک فلوسیتومتریک مشخص شد که تمامی نمونه‌های مورد آزمایش حاوی MPs

هستند. در ابتدای کار، MPs بر اساس اندازه و در مقایسه با بید ۱ میکرومتری و با توجه به سیگنال‌های اختصاصی FSC (محور x با مقیاس لگاریتمی–Forward Scatter) و SSC (محور y با مقیاس لگاریتمی–Side scatter) گیت‌بندی شدند. پراکندگی رو به جلو و پراکندگی کناری به ترتیب بیانگر اندازه و گرانولاریته میکروپارتیکل‌ها هستند. هم‌چنان که نشان داده شده است، MPs به عنوان جمعیتی تقریباً کوچکتر و با SSC پایین‌تر از بیدهای ۱ میکرومتری مشخص شده اند (شکل ۱ الف و ب). در مراحل بعد، با نشاندار کردن MPs با استفاده از مارکرهای فلورسانت CD31 (شکل ۱ ج) و CD51 و (شکل ۱ د) و تحلیل آن‌ها شناخت بهتری از MPs در بیماران مبتلا به اختلالات MS به دست آمد.

شمارش میکروپارتیکل‌های CD31+ مشتق شده از سلول‌های اندوتلیال

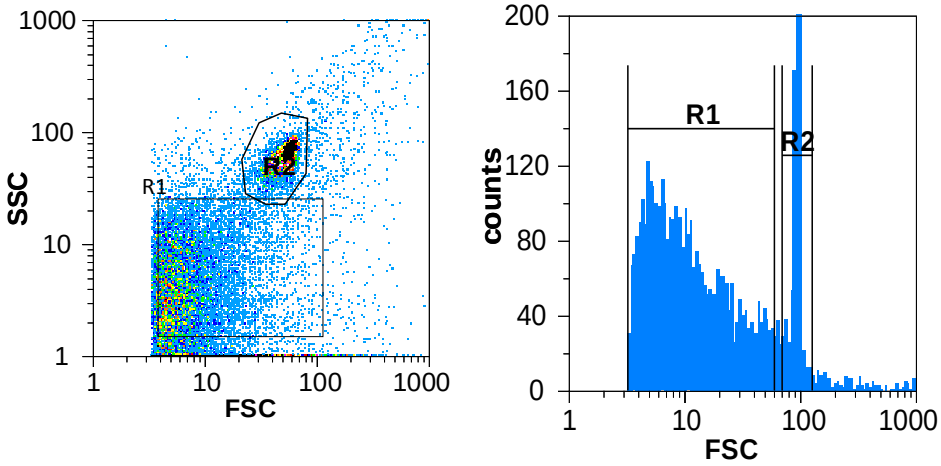
نتایج فلوسیتومتری نشان داد که شمارش MPs مشتق شده از سلول‌های اندوتلیال در گروه بیماران مبتلا به MS دریافت کننده اینترفرون بتا قبل از شروع درمان ۲۴۹۸ ± ۴۹۴۳ (۱۰۷۲۵–۹۹۹) در هر میکرولیتر پلاسما و ۶ ماه بعد از دریافت دارو ۱۶۶۶ ± ۲۹۸۳ (۶۲۳۵–۷۵۰) بوده است. اختلاف میزان میکروپارتیکل ها قبل از درمان با بعد از درمان از نظر آماری معنادار بود (p<۰/۰۰۱). تعداد EnMPs در پلاسمای فاقد پلاکت به دنبال درمان با IFNβ به میزان ۴۰ درصد کاهش یافته بود که از نظر آماری معنادار بود (p<۰/۰۰۱) (نمودار ۱). داده‌ها به صورت mean±sd (Min-Max) گزارش شده‌اند.

شمارش میکروپارتیکل‌های CD51+ مشتق شده از سلول‌های اندوتلیال

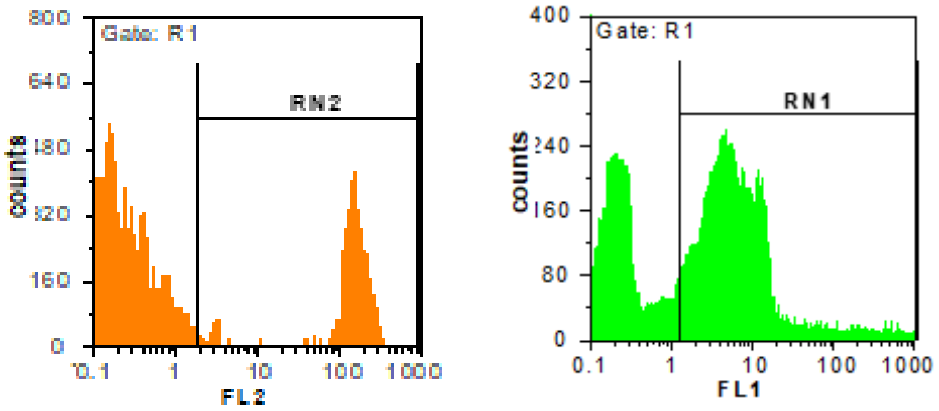
نتایج فلوسیتومتری نشان داد که شمارش MPs مثبت از نظر CD51 در گروه بیماران مبتلا به MS دریافت کننده اینترفرون بتا قبل از شروع درمان ۱۸۳۷ ± ۳۴۶۱ (۷۹۰۰–۹۸۹) در هر میکرولیتر پلاسما و ۶ ماه بعد از دریافت دارو ۱۲۲۶ ± ۲۳۵۴ (۵۶۴۵–۱۱۰۰) بوده است. اختلاف میزان میکروپارتیکل ها قبل از درمان با بعد از درمان از نظر آماری معنادار بود (p<۰/۰۰۱). تعداد MPs در پلاسمای فاقد پلاکت به دنبال درمان با اینترفرون بتا به میزان ۳۲ درصد کاهش یافته بودند که این از نظر آماری معنادار بود (p<۰/۰۰۱) (نمودار ۱).

نتایج مربوط به MRI در بیماران دریافت کننده اینترفرون بتا

نتایج مربوط به MRI با و بدون تزریق در خصوص تعداد پلاک‌های فعال و غیر فعال در دو مرحله قبل و بعد از درمان در بیماران دریافت کننده اینترفرون بتا در جدول ۲ آورده شده است. همبستگی شمارش EnMPs با تعداد پلاک‌ها، سن و جنسیت بیماران MS در جدول ۳ آورده شده است. در این مطالعه ارتباط مثبت و معناداری بین تعداد EnMPs با تعداد پلاک‌ها وجود نداشت. همچنین ارتباط معناداری بین سن و جنسیت بیماران با تعداد EnMPs نیز مشاهده نشد.

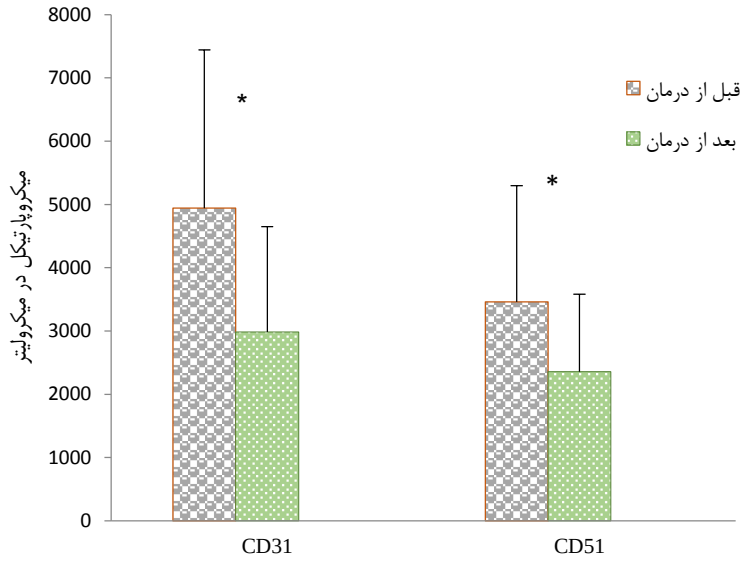


الف ب



ج د

شکل ۱: گراف های فلوسیتومتریک EnMPs: الف- دو محدوده R1 و R2 به ترتیب نمایانگر MPs و بیدهای ۱ میکرومتری هستند. ب- هیستوگرام لگاریتمی FSC در مقابل شمارش میکروپارتیکل ها که نشان دهنده توزیع MPs در مقایسه با بیدها می باشد. ج- ناحیه RN2 بیانگر منطقه گیت شده R1 است که با کونژوگه PE- CD31 نشان دار شده است. د- ناحیه RN1 بیانگر منطقه گیت شده R1 است که با کونژوگه FITC-CD51 نشان دار شده است.



نمودار ۱: شمارش میکروپارتیکل ها مشتق شده از سلول های اندوتلیال +CD31 و +CD51 در بیماران قبل و بعد از درمان.
* بیانگر تفاوت معنادار قبل از درمان با بعد از درمان می باشد.

جدول ۲: نتایج مربوط به MRI با و بدون تزریق گادولینیوم در دو مرحله قبل و بعد از درمان با اینترفرون بتا

بیمار(n)	تعداد پلاک ها قبل از درمان		تعداد پلاک ها بعد از درمان	
	MRI- gad	MRI+ gad	MRI- gad	MRI+ gad
۱	۸	۰	۸	۰
۲	۱۲	۰	۱۰	۰
۳	۳	۰	۳	۰
۴	۶	۰	۶	۰
۵	۱۸	۱	۱۴	۰
۶	۴	۰	۴	۰
۷	۲	۰	۲	۰
۸	۶	۰	۶	۰
۹	۱۳	۰	۹	۰
۱۰	۴	۰	۴	۰
۱۱	۶	۰	۶	۰
۱۲	۸	۰	۸	۰
۱۳	۹	۰	۹	۰
۱۴	۲۳	۲	۲۳	۱
۱۵	۵	۰	۴	۰
۱۶	۵	۰	۵	۰
۱۷	۱۲	۱	۱۲	۰
۱۸	۱۱	۰	۱۱	۰
۱۹	۱۰	۰	۱۰	۱
۲۰	۹	۰	۹	۰

جدول ۳: همبستگی بین تعداد MPs با تعداد پلاک های مغزی، سن و جنس در بیماران

متغیر	تعداد EnMPs	
	P value	R
تعداد پلاک	۰/۰۶۷	۰/۵۲
سن	۰/۰۵۸	۰/۳۶
جنسیت	۰/۰۶۱	۰/۴۲

بحث:

MS بیماری التهابی تخریب کننده CNS است که به طور غالب افراد جوان را درگیر می‌کند. برخی پژوهشگران، این بیماری را یک سندرم عصبی می‌دانند که در آن فرآیند تخریب التهابی و دمیلیناسیون با نورودژنراسیون مزمن هم‌پوشانی دارد. با وجود این پیچیدگی، درمان‌های کنونی روی تعدیل و اصلاح این بیماری تمرکز داشته که البته تاکنون درمان موثر و قطعی برای آن پیدا نشده است. درک بیشتر پاتولوژی این بیماری می‌تواند منجر به ایجاد استراتژی درمانی موثرتری شود. همچنین روش‌های تشخیصی جدید منجر به تسریع در تشخیص و شروع درمان می‌شوند [۱۷]. از این رو، مطالعه بیومارکرهای حساس برای استفاده از آن‌ها در تشخیص بیماری حتی پیش از بروز علایم بالینی و پیگیری بیماران از نظر تاثیر دارو و سیر بیماری اهمیت پیدا می‌کند.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که میزان میکروپارتیکل‌های CD51+ و CD31+ در بیماران مبتلا به MS با مصرف داروی اینترفرون بتا به عنوان داروهای تعدیل‌کننده سیستم ایمنی، کاهش معناداری پیدا می‌کند. همچنین تحلیل فلوسایتومتریک این بیماران نشان داد که مقدار بالای این میکروپارتیکل‌ها در شروع و هنگام تشخیص بیماری در خون بیماران وجود دارد. مطالعات مختلفی نقش MPs را در پیشرفت التهاب و افزایش میزان آن‌ها در بیماری‌های عصبی و همچنین بهبود ضایعات بررسی کرده و سعی در به کارگیری آن‌ها در راستای تشخیص و

تحلیل اثر داروها در درمان داشته اند. از این گونه موارد می‌توان به مطالعات Mause SF و Matías Sáenz-Cuesta اشاره کرد که نتایج هم راستا با مطالعه حاضر بیان داشته‌اند [۱۹-۱۸].

MPs طیف گسترده‌ای از مواد فعال زیستی و گیرنده‌های سطحی مانند سیتوکین‌ها، پروتئین‌های سیگنالینگ، mRNA و microRNA را در خود جای داده‌اند [۱۸]. مقایسه آنتی‌ژن‌های بیان شده در EMPs نشان می‌دهد که اندوتلیال مارکر CD31 (PECAM-1) و CD62E (E-selectin) غالباً در MPs آزاد شده از سلول‌های آپوپتیک بیان می‌شوند، در حالی که CD51(Integrinα5) و CD54 (ICAM-1) در MPs که آزاد شدن آن به واسطه فعال شدن سلول القا شده بیان می‌شود [۱۸، ۲۰]. اختلال عملکرد اندوتلیال در MS نقش مهمی دارد و EMPs به دلیل این که بیومارکرهای اختصاصی برای آسیب سد خونی – مغزی در MS را بیان می‌کنند به عنوان شاهدی از این اختلال می‌باشند. این مارکرها شامل CD51 ، CD31 ، CD54 ، CD45 هستند. مطالعات مختلف افزایش میزان EnMPs حاوی CD51 را در بیماران MS به صورت مزمن و صرف نظر از دوره عود یا بهبود نشان می‌دهد. از طرفی EnMPs حاوی CD31 در دوره عود افزایش و در دوره بهبود کاهش می‌یابند و در واقع مارکری برای آسیب حاد اندوتلیوم هستند، در حالی که CD51، التهاب مزمن در نتیجه آسیب اندوتلیوم و در معرض قرار گرفتن ساب اندوتلیوم را نشان می‌دهد [۲۱].

مطالعات مختلف به دنبال یافتن روش‌های جدید برای بررسی اثر داروهای MS هستند. مطالعه ویولینا و همکاران به بررسی بیومارکرهای مختلف در پاسخ به درمان MS ، از جمله درمان با اینترفرون بتا پرداخته و نشان دادند که بیومارکر پروتئین ریبوزومی S6 در پاسخ به اینترفرون بتا کاهش می‌یابد و استفاده از EnMPs را مطرح کردند. در این مقاله بیان شده است که مطالعات کمتری به بررسی میزان MPs در CSF بیماران مبتلا به MS پرداخته اند و مشخص شده که منشا آن‌ها از سلول‌های تخریب شده اولیگودندروسیت می‌باشد که نقش مهمی در تخریب میلین دارند (۲۲). از میزان میکروپارتیکل های CD31+ برای تعیین اثر بخشی INFβ1a در MS عود کننده– بهبود یابنده استفاده می شود. در تایید نتایج این مطالعه مبنی بر کاهش مقادیر پلاسمایی میکروپارتیکل‌های CD31+ و CD51+ در پاسخ به درمان با اینترفرون بتا، پژوهش های لاوری نوردبرگ و همکاران نشان می‌دهد که میزان CD31+ و CD54+ می‌تواند بیومارکر مناسب برای تعیین اثربخشی INFβ1a باشد که مقدار هر دو در پاسخ به درمان کاهش می‌یابند [۲۳]. همچنین نشان داده شده که مقادیر پایین‌تر این MPs با کاهش ضایعات MS همراه است [۲۱]. اثر INFβ1b نیز بر میزان MPs توسط جیمنز و همکاران مورد مطالعه قرار گرفت و اثر مهاری آن بر MPs ها هم در فاز عود و هم بهبود مشاهده شد. همچنین نشان داده شده که INFβ1b تشکیل کمپلکس‌های مونوسیت–EMP و مهاجرت در عرض اندوتلیوم را مختل می‌کند [۲۰]. در پژوهش‌های دیگر اثر مهاری INFβ1a بر مقدار CD31، سه ماه بعد از مصرف این دارو تایید شد [۲۵-۲۴]. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که کاهش مقدار MPs پلاسما در پاسخ به درمان با اینترفرون بتا منعکس کننده کاهش واکنش‌های میان اندوتلیوم و CD4+ T cell و کاهش مهاجرت سلول‌ها از سد خونی – مغزی می باشد. از سوی دیگر، آنچه اهمیت دارد، ارتباط بین مقدار MPs و کاهش آن‌ها در پاسخ به درمان با تغییر در تظاهرات نوروراديولوژیک بیماری است. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که ارتباط مثبت و معناداری بین تعداد MPs با تعداد پلاک های مغزی وجود ندارد. همچنین ارتباط معناداری بین سن و جنسیت بیماران با تعداد MPs نیز وجود نداشت که با نتایج مطالعه شرماتا و همکاران هم‌خوانی دارد [۲۵]. همچنین در چندین مطالعه ارتباط بین مقدار CD31+EnMPs و یافته های MRI+gad بررسی و بیان شده است که MPs به اندازه MRI+gad برای تعیین فعالیت بیماری حساس می‌باشند و این کاهش در مقدار MPs می‌تواند پیشگویی کننده منفی شدن یافته های MRI باشد، اما این مطلب به طور قطعی قابل تایید نیست [۱۹، ۲۶]. با توجه به این که تعداد کم نمونه‌ها یکی از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌باشد، از این رو، پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری با جامعه آماری بزرگ تر و بررسی سایر CD مارکرها برای تعیین این ارتباط انجام شود. از این رو با توجه به نتایج مطالعات، EnMPs را می‌توان به عنوان بیومارکر جدید و حساس در تشخیص و بررسی اثر درمانی داروی اینترفرون بتا در بیماری MS به کار گرفت.

نتیجه‌گیری:

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مصرف داروی اینترفرون بتا در بیماران MS باعث مهار آزاد سازی EnMPs می‌شود و پیشنهاد کننده سازوکار جدید داروی مذکور در بیماری MS می‌باشد. همچنین می‌توان از EnMPs به عنوان بیومارکر جدیدی در سنجش میزان اثربخشی داروها و پیشرفت بیماری استفاده کرد. با توجه به بالا بودن میزان این مارکرها در شروع بیماری، ممکن است بتوان از آن ها برای تشخیص زودرس بیماری MS حتی در بیمارانی که هنوز علایم بالینی در آن ها ظاهر نشده است، استفاده کرد.

تشکر و قدردانی:

از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی جهرم برای تصویب و تامین بودجه این پژوهش و همچنین از بیماران عزیز به خاطر همکاری در انجام آن تشکر و قدردانی می‌شود.

تعارض منافع :

نویسندگان هیچگونه تعارض منافعی را بیان نکرده‌اند.

References:

1. McGinley MP, Goldschmidt CH, Rae-Grant AD. Diagnosis and treatment of multiple sclerosis: A review. JAMA 2021; 325(8): 765–79.
2. Lublin FD, Reingold SC. National multiple sclerosis society (USA) advisory committee on clinical trials of new agents in multiple sclerosis. "Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey". Neurology 1996; 46(4): 907–11.
3. Nakahara J. Current concepts in multiple sclerosis: autoimmunity versus oligodendrogliopathy. Clin Rev Allergy Immunol 2012; 42(1): 26–34.
4. Ford H. Clinical presentation and diagnosis of multiple sclerosis. Clin Med 2020; 20(4): 380-3.
5. Zuroff LR, Benjamins JA, Bar-Or A, Lisak RP. Inflammatory mechanisms underlying cortical injury in progressive multiple sclerosis. Neuroimmunol Neuroinflammation 2021; 8: 111-33.
6. Minagar A, Alexander JS. Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. Mult Scler 2003;9(6):540-9.
7. Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, et al. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. Circulation 2000; 101(8): 841-3.
8. Amabile N, Guerin AP, Tedgui A, Boulanger CM, London GM. Predictive value of circulating endothelial microparticles for cardiovascular mortality in end-stage renal failure: a pilot study. Nephrol Dial Transplant 2012; 27(5): 1873-80.
9. Dignat-George F, Boulanger CM. The many faces of endothelial microparticles. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2011; 31(1): 27-33.
10. Minagar A, Jy W, Jimenez JJ, Sheremata WA, Mauro LM, Mao WW, et al. Elevated plasma endothelial microparticles in multiple sclerosis. Neurology 2001; 56: 1319-24.
11. Combes V, Simon AC, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. J Clin Invest 1999; 104(1): 93-102.
12. Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Horstman LL, Ahn YS. Endothelial microparticles released in thrombotic thrombocytopenic purpura express von Willebrand factor and markers of endothelial activation. Br J Haematol 2003; 123(5): 896-902.
13. Liao HX, Meng LL, Yu X, Song M, Shang GK, Wang D, et al. Increased circulating erythrocyte-derived microparticles in patients with acute coronary syndromes. Biomark Med 2021; 15(10): 741-51.
14. Preston RA, Jy W, Jimenez JJ, Mauro LM, Horstman LL, Valle M, et al. Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles. Hypertension 2003; 41: 211-7.
15. Gkaliagkousi E, Nikolaidou B, Gavriilaki E, Lazaridis A, Yiannaki E, Anyfanti P, et al. Increased erythrocyte- and platelet-derived microvesicles in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. Diabetes Vasc Dis Res 2019: 16(5): 458-65.
16. Hashemi Tayer A, Amirizadeh N, Ahmadinejad M, Nikougoftar M, Deyhim MR, Zolfaghari S. Procoagulant Activity of Red Blood Cell-Derived Microvesicles during Red Cell Storage. Transfus Med Hemother 2019; 46(4): 224-30.
17. Marcos-Ramiro B, Nacarino PO, Serrano-Pertierra E, Blanco-Gelaz MÁ, Weksler BB, Romero IA, et al. Microparticles in multiple sclerosis and clinically isolated syndrome: effect on endothelial barrier function. BMC Neurosci 2014; 15(1): 110.
18. Mause SF, Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. Circ Res 2010; 107(9): 1047-57.
19. Sáenz-Cuesta M, Osorio-Querejeta I, Otaegui D. Extracellular Vesicles in Multiple Sclerosis: What are They Telling Us? Front Cell Neurosci 2014; 8: 100.
20. Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Soderland C, Horstman LL, Ahn YS. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. Thromb Res 2003; 109(4): 175-80.
21. Jin T, Gu J, Li Z, Xu Z, Gui Y. Recent Advances on Extracellular Vesicles in Central Nervous System Diseases. Clin Interv Aging 2021; 16: 257-74 .
22. Harris VK ,Sadiq SA. Biomarkers of therapeutic response in multiple sclerosis: current status. Mol Diagn Ther 2014; 18(6): 605-17.
23. Lowery-Nordberg M, Eaton E, Gonzalez-Toledo E, Harris MK, Chalamidas K, McGee-Brown J, et al. The effects of high dose interferon-β1a on plasma microparticles: correlation with MRI parameters. J Neuroinflammation 2011; 8(1): 1-6.
24. Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Horstman LL, Ahn ER, Ahn YS, et al. Elevated endothelial microparticle—monocyte complexes induced by multiple sclerosis plasma and the inhibitory effects of interferon-β1b on release of endothelial microparticles, formation and transendothelial migration of monocyte-endothelial microparticle complexes. Mult Scler J 2005; 11(3): 310-5.
25. Sheremata WA, Jy W, Delgado S, Minagar A, McLarty J, Ahn Y. Interferon-β1a reduces plasma CD31+ endothelial microparticles (CD31+ EMP) in multiple sclerosis. J Neuroinflammation 2006; 3(1): 23.
26. Larkin M. Raised endothelial microparticles an early marker for multiple sclerosis? Lancet 2001; 357(9269): 1679.

Original Article

Inhibitory effect of the interferon beta on the release of endothelial cell derived microparticles in patients with multiple sclerosis

Akbar Hashemi Tayer[1*] , Maryam Jalali[1], Maryam Kamravan[1]

Received:2022.01.06 Revised:2022.01.22 Accepted: 2022.05.30

1. Research Center for Noncommunicable Diseases, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.20, No.2, Summer 2022

Pars J Med Sci 2022;20(2):

Abstract:

Introduction:
Increased levels of microparticles (MPs) have been reported in many autoimmune diseases such as multiple sclerosis (MS). In MS, endothelial cells release MPs from their membranes following the activation of lymphocytes and the production of inflammatory cytokines. The aim of this study was to investigate the inhibitory effect of interferon beta (INFβ) on the release of endothelial cell-derived MPs (EnMPs).

Material and Methods:
Twenty newly diagnosed MS patients were included in this study. Blood samples were taken from patients in two stages before and three months after INFβ treatment. Flow cytometry was used to count and determine the phenotype of MPs. Anti-CD51 and anti-CD31 were used to tag EnMPs. In both stages, patients' MRI was also evaluated for the number of brain plaques. Data were analyzed using SPSS-23 statistical software, and kolmogorov-smirnov test.

Result:
The mean age of patients was 31.3 ± 8.3 years. The results of this study showed a 40% decrease in the level of CD31 + MPs and a 32% decrease in the level of CD51 + MPs following treatment with INFβ, which was statistically significant ($p < 0.001$). In this study, there was no positive and significant relationship between the number of EnMPs and the number of brain plaques ($p = 0.067$), age ($p = 0.058$) and sex of patients ($p = 0.061$).

Conclusion:
INFβ has an inhibitory effect on the release of EnMPs from endothelial cells and suggest that EnMPs can probably be used as sensitive biomarkers to monitor disease progression and treatment effectiveness.

Keywords: Multiple Sclerosis, Interferon Beta, Endothelial Cell-Derived Microparticles

* Corresponding author Email: