

مقاله اصلی

بررسی اثرات درمانی تجویز هم‌زمان استروژن و ویتامین D3 بر مدل حیوانی آنسفالومیلیت خودایمن تجربی (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis) در موش‌های تخمدان برداری شده نژاد C57BL/6

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۲۰

خلاصه

مقدمه: مولتیپل اسکلروزیس (MS) یک بیماری خودایمنی مزمن سیستم عصبی مرکزی است که با التهاب، دمیالینه‌شدن و اختلال عملکرد نورونی همراه بوده و عمدتاً زنان جوان را درگیر می‌کند. مدل حیوانی آنسفالومیلیت خودایمن تجربی (EAE) به‌عنوان مدل استاندارد شبیه‌سازی پاتوفیزیولوژی MS استفاده می‌شود. هورمون‌های جنسی مانند استروژن و ویتامین D در تعدیل پاسخ‌های ایمنی و کاهش شدت بیماری نقش دارند. این مطالعه اثرات درمانی ترکیبی ویتامین D3 و ۱۷-بتا استرادیول را در مدل EAE بررسی کرد.

روش کار: در این مطالعه تجربی، ۳۲ موش ماده نژاد C57BL/6 اوارکتومی‌شده به چهار گروه درمان ترکیبی، ویتامین D3، استروژن و کنترل تقسیم شدند. EAE با تزریق پپتید MOG₃₅₋₅₅ القا شد. گروه ترکیبی روزانه ۱۰۰ نانوگرم بر کیلوگرم ویتامین D3 به‌صورت داخل صفاقی و پلت ۱۵ میلی گرمی ۱۷-بتا استرادیول (معادل دوز فیزیولوژیک بارداری) دریافت کرد. ارزیابی‌های بالینی، بافت‌شناسی، سنجش تکثیر سلولی با BrdU، اندازه‌گیری سایتوکاین‌ها با الایزا و بررسی بیان ژن با Real-Time PCR (روش $\Delta\Delta Ct$) انجام شد.

نتایج: درمان ترکیبی شدت علائم بالینی را به‌طور معناداری کاهش داد (میانگین نمره بالینی 1.1 ± 0.1) در برابر 4.5 ± 0.15 در گروه کنترل، ($p < 0.001$)، نفوذ سلول‌های التهابی و تکثیر سلولی را مهار کرد ($p < 0.001$). سایتوکاین‌های التهابی (IL-6، IL-17، TNF- α ، IFN- γ) کاهش و سایتوکاین‌های ضدالتهابی (IL-4، IL-10، TGF- β) افزایش یافتند (همگی $p < 0.001$). بیان ژن‌های T-bet و ROR γ t کاهش و Foxp3 و GATA3 افزایش یافت که موجب تغییر نسبت Th1/Th2 و Th17/Treg به‌نفع پاسخ ضدالتهابی گردید.

نتیجه‌گیری: تجویز هم‌زمان ویتامین D3 و استروژن اثرات هم‌افزای ضدالتهابی و ایمن‌تنظیمی در مدل EAE داشته و می‌تواند رویکردی بالقوه برای درمان MS باشد.

کلمات کلیدی: مولتیپل اسکلروزیس، آنسفالومیلیت خودایمن تجربی، سیستم عصبی مرکزی (CNS)، استروژن، ویتامین D3

مهديه ترحمی^۱

علیرضا شاداب^۱

علیرضا پازوکی^۱

داریوش حق مراد^{۱*}

^۱ گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی

سمنان، سمنان، ایران

Email: dhaghmorad@gmail.com

مقدمه

مولتیپل اسکلروزیس (MS)^۱ یک بیماری خودایمن مزمن است که با التهاب و دمیالیناسیون در سیستم عصبی مرکزی (CNS)^۲ مشخص می‌شود و عمدتاً بزرگسالان جوان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. عوامل ژنتیکی، محیطی و ایمونولوژیک در استعداد ابتلا به این بیماری نقش دارند، اما علت دقیق آن هنوز ناشناخته است (۱). پاسخ‌های ایمنی سبب ایجاد یک واکنش التهابی در CNS شده که به دنبال آن دمیالیناسیون، از دست دادن آکسون و اختلال عصبی رخ می‌دهد و علائم بالینی مانند ضعف، بی‌حسی، اختلال بینایی، خستگی و تغییر عملکردهای ذهنی بروز می‌کند (۲). پاتوژن بیماری با فعال شدن و نفوذ سلول‌های تک‌هسته‌ای شامل سلول‌های $T CD4^+$ ، $T CD8^+$ و سلول‌های B اختصاصی آنتی‌ژن به CNS همراه است (۳). آنسفالومیلیت خودایمن تجربی (EAE)^۳، رایج‌ترین مدل حیوانی مورد استفاده برای مطالعه MS است. این مدل از طریق ایمن‌سازی حیوانات با آنتی‌ژن‌های میلین، ایجاد شده و سبب التهاب و دمیالیناسیون CNS مشابه تظاهرات بیماری MS می‌شود (۴).

سلول‌های $Th1$ و $Th17$ با ترشح $IFN-\gamma$ و $IL-17$ و از طریق به‌کارگیری و فعال‌سازی سلول‌های ایمنی یا القای اثرات پیش آپوپتوتیک بر الیگودندروسیت‌ها، در پاتوژنز MS نقش اساسی دارند. از طرفی، سلول‌های T تنظیمی (Treg)^۴ که در حفظ تحمل و هموستاز ایمنی ضروری هستند، نقش محافظتی مهمی در EAE ایفا می‌کنند (۵). بر اساس یافته‌ها، موش‌های فاقد سلول‌های Treg، حساسیت بیشتری به EAE نشان می‌دهند، در حالی که انتقال سلول‌های Treg سبب کاهش بروز EAE می‌شود. علاوه بر این، $IL-10$ نیز که از سلول‌های $Th2$ ترشح می‌شود، به عنوان تنظیم‌کننده منفی عمل کرده و در تعدیل و مهار پاسخ‌های ایمنی در EAE نقش دارد (۶).

تفاوت‌های جنسیتی در اپیدمیولوژی EAE و MS نشان داده است که هورمون‌های جنسی نقش مهمی در پاتوژنز این

بیماری‌ها دارند. اگرچه بروز MS در زنان بیشتر است، اما میزان عود آن در اواخر بارداری کاهش می‌یابد. علاوه بر این، بارداری، علائم EAE را در مدل‌های حیوانی نیز کاهش می‌دهد (۷). بالاترین سطح استروژن خون که در طول سه ماهه آخر بارداری مشاهده می‌شود، با کاهش میزان عود در زنان باردار مبتلا به MS همراه است. این بیماران تغییر قابل توجهی از پروفایل سایتوکاینی $Th2$ در دوران بارداری به پروفایل سایتوکاینی $Th1$ پس از زایمان نشان می‌دهند (۸). مطالعات بالینی نشان داده است که درمان با استروژن ($E2$) در مدل EAE، تولید سایتوکاین‌ها، فاکتورهای رشد، مولکول‌های چسبندگی، کموکاین‌ها و گیرنده‌های کموکاین را در موش‌های القا شده با EAE تغییر می‌دهد (۹). علاوه بر این، درمان با استروژن در بیماران مبتلا به MS می‌تواند علائم بالینی را بهبود بخشد و تظاهرات عصبی را کاهش دهد بنابراین، سطوح بالای استروژن، همانطور که در دوران بارداری رخ می‌دهد، می‌تواند در کاهش شدت MS در زنان مؤثر باشد (۸).

بیماری MS درمان اختصاصی ندارد و استفاده از کورتون‌ها و عوامل مهارکننده سیستم ایمنی، متداول‌ترین روش درمانی است. این داروها دارای عوارض جانبی متعدد از جمله تضعیف سیستم ایمنی هستند (۱۰). گزارشات نشان می‌دهد که شکل فعال ویتامین D، $1,25(OH)_2D_3$ ، دی‌هیدروکسی ویتامین D3 در تعدیل پاسخ‌های ایمنی نقش دارد (۱۱). اخیراً شواهدی مبنی بر نقش محافظتی ویتامین D در MS ارائه شده است و مصرف مکمل ویتامین D را به افراد مبتلا به MS و همچنین افرادی که در معرض خطر بالای MS هستند، توصیه می‌کنند (۱۲). مطالعات *in vivo* و *in vitro* انجام شده، اثر درمانی قابل توجهی از ویتامین D3 یا آنالوگ‌های آن را بر EAE نشان داده است (۱۳). خواص محافظت‌کنندگی اعصاب و تعدیل‌کنندگی سیستم ایمنی توسط ویتامین D3 در EAE و MS به توانایی آن در مهار تولید سلول‌های $Th1$ و $Th17$ و نیز ایجاد سلول‌های Treg نسبت داده می‌شود (۱۴).

¹ Multiple Sclerosis² Central nervous system³ Experimental autoimmune encephalomyelitis⁴ Regulatory T cells

شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای محیطی ۲۰-۲۲ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. انتخاب تعداد نمونه‌ها (n=8) در هر گروه بر اساس ویژگی‌های ژنتیکی نژاد خالص (inbred) موش‌های استفاده شده و با استناد به مطالعات پیشین در مدل EAE انجام شد، که در آن به دلیل همگنی ژنتیکی و کاهش واریانس بین گروهی، تعداد 5 تا 8 موش برای دستیابی به توان آماری مناسب کافی گزارش شده است.

در تمام مراحل پژوهش، حیوانات به غذا و آب آشامیدنی به اندازه کافی و به طور آزادانه دسترسی داشتند. کلیه اقدامات و مراقبت‌های حیوانی مطابق با دستورالعمل‌های اخلاقی مورد تأیید دانشگاه علوم پزشکی سمنان انجام گرفت. کد اخلاق طرح IR.SEMUMS.REC.1399.260 می باشد.

جراحی، درمان با استروژن و ویتامین D3 و القای بارداری

برای انجام اوارکتومی، پس از بیهوشی با کتامین هیدروکلراید (۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۰/۱ میلی گرم بر کیلوگرم) به روش تزریق داخل صفاقی، با ایجاد یک برش بر روی پوست و عضله در ناحیه تحتانی شکم، تخمدان‌ها و بافت چربی آن‌ها خارج شدند. پس از حذف تخمدان‌ها، ابتدا عضله و سپس پوست بخیه زده شد و حیوان در جای گرم قرار گرفت تا به هوش بیاید. جراحی دوهفته قبل از القای EAE انجام شد. به منظور بهبودی حیوانات پس از عمل جراحی، آن‌ها به قفس خود بازگردانده شدند. در حیوانات گروه کنترل، به منظور از بین بردن اثر احتمالی تزریق داروی بیهوشی و استرس جراحی، مراحل بیهوشی و جراحی به طور دقیق همانند گروه اوارکتومی شده، بدون حذف تخمدان‌ها انجام شد.

جهت بررسی تأثیر ویتامین D3 و استرادیول، ۳۲ سرموش در ۴ گروه (در هر گروه ۸ سر) با شرایط سنی و وزنی یکسان (با میانگین وزنی 17.7 ± 0.8 گرم) به طور تصادفی گروه بندی شدند و تا ۲۱ روز پس از القا EAE تحت درمان قرار گرفتند.

موش‌ها به ۴ گروه به شرح زیر تقسیم بندی شدند: ۱- یک گروه از موش‌های مورد مطالعه، موش‌های تخمدان برداری شده مبتلا به EAE بودند که تحت درمان با ویتامین D3 و ۱۷- بتا

با وجود این شواهد، مطالعات اندکی به بررسی اثرات هم‌زمان استروژن و ویتامین D3 در EAE پرداخته‌اند و شکاف دانشی مهمی در خصوص مکانیسم‌های احتمالی هم‌افزایی این دو عامل وجود دارد. شواهد مقدماتی حاکی از آن است که استروژن می‌تواند حساسیت سلول‌های ایمنی به ویتامین D را افزایش دهد و این تعامل، پاسخ‌های ضدالتهابی و تنظیمی را تقویت کند (۱۵، ۱۶).

در مطالعات انسانی، استفاده از استروژن با محدودیت‌هایی مانند خطر ترومبوآمبولی، افزایش احتمال بروز تومورهای وابسته به هورمون، و دشواری تعیین دوز ایمن برای مصرف طولانی مدت همراه است (۱۷). از سوی دیگر، دوزهای بالای ویتامین D3 می‌تواند خطر هیپرکلسمی ایجاد کنند. این ملاحظات اخلاقی و ایمنی، انجام مطالعات کنترل شده در مدل‌های حیوانی مانند EAE را ضروری می‌سازد (۱۸).

در مطالعات قبلی که توسط ما انجام شده بود اثر بخشی استروژن در دوزهای حاملگی و همچنین اثر بخشی ویتامین D در مدل EAE مورد تأیید قرار گرفت (۱۴، ۱۹، ۲۰) تحقیق حاضر تأثیر همزمان استروژن و ویتامین D3 را بر مدل EAE مورد بررسی قرار می‌دهد. در این پژوهش، برای جلوگیری از مخدوش کننده‌های بالقوه هورمون‌های جنسی در گردش، به‌ویژه استروژن از موش‌های تخمدان‌برداری شده (OVA)^۱ استفاده شد. فرض بر این بود که تجویز همزمان استروژن و ویتامین D3 می‌تواند با اثرات هم‌افزای خود، پاسخ‌های ایمنی را به سوی الگوی ضدالتهابی و تنظیمی سوق داده و شدت بیماری را در مدل EAE کاهش دهد.

روش کار

جامعه مورد مطالعه

تحقیق حاضر به روش تجربی بوده و جامعه مورد بررسی شامل ۳۲ سر موش خالص (Inbred) نژاد C57BL/6 ماده با محدوده سنی ۸ تا ۱۲ هفته می‌باشد که از انستیتو پاستور ایران تهیه شده و در مرکز نگهداری حیوانات دانشگاه علوم پزشکی سمنان در

¹ Ovariectomized

استرادیول (T1) قرار گرفتند و به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن، مقدار ۱۰۰ نانوگرم ویتامین D3 (شرکت Sigma، آمریکا) در روغن سویا (حامل ویتامین D3) را هر روز همزمان با القا به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند. علاوه بر این، به این گروه، پلت های ۱۷- بتا استرادیول با رهاسازی ۱۵ میلی گرم در ۲۱ روز (Innovative Research of America) یک روز قبل از القای EAE، تجویز شد. این مقدار معادل تقریبی دوزهای فیزیولوژیک مشاهده شده در دوران بارداری موش ها گزارش شده است (۲۱).

۲- یک گروه از موش های تخمدان برداری شده مبتلا به EAE، تحت درمان با ویتامین D3 (T2) بودند که به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن، مقدار ۱۰۰ نانوگرم ویتامین D3 در روغن سویا هر روز همزمان با القا به صورت تزریق داخل صفاقی به آن ها تزریق شد.

۳- یک گروه از موش های تخمدان برداری شده مبتلا به EAE، نیز تحت درمان با ۱۷- بتا استرادیول (T3) قرار گرفتند که به آن ها پلت های ۱۷- بتا استرادیول با رهاسازی ۱۵ میلی گرم در ۲۱ روز تجویز شد.

۴- گروه کنترل (CTRL) ویتامین D3 و استرادیول موش های تخمدان برداری شده مبتلا به EAE بودند که هر روز از یک روز قبل از القای EAE، به هر موش، ۰/۰۰۵ میلی لیتر روغن سویا به عنوان حلال به صورت داخل صفاقی و پلت های دارونما حاوی حلال استرادیول به آن ها تجویز شد. پلت های دارونما حاوی تمام اجزای پلت های هورمونی به جز ۱۷- بتا استرادیول می باشند. تزریق ویتامین D3 به صورت روزانه بین ساعت ۸ تا ۹ صبح انجام شد. انتخاب دوز تزریقی ویتامین D3 بر اساس مطالعات مشابهی بود که از آن در جهت درمان بیماری ها در مدل های حیوانی استفاده شده است (۲۲).

القای EAE و ارزیابی علائم بالینی آن

بیماری EAE بر اساس روش کار زیر در حیوانات القا شد: در روز صفر، مقدار ۲۵۰ میکروگرم پپتید میلین الیگودندروسایت

گلیکوپروتئین MOG₃₅₋₅₅^۱ و درجه خلوص بیش از ۹۵ درصد (شرکت Biopharm، چین) در ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سالین (PBS)^۲ و ۱۰۰ میکرولیتر ادجوانت کامل فروند (شرکت Sigma، آمریکا) حاوی ۴ میلی گرم بر میلی لیتر مایکوباکتریوم توبرکلوزیس H37Ra (Difco Laboratories، آمریکا) مخلوط شد و به صورت زیرجلدی در ناحیه پهلو به هر موش C57BL/6 تزریق گردید. پپتید مذکور، خاصیت آنسفالیتوزنیک داشته و باعث تحریک پاسخ ایمنی علیه پروتئین های دارای توالی مشابه در مغز می گردد. سپس، مقدار ۲۵۰ نانوگرم سم سیاه سرفه^۳ (شرکت Sigma، آمریکا) به منظور افزایش نفوذپذیری سد خونی - مغزی در بافر فسفات حل شده و بلافاصله بعد از این تزریق و ۴۸ ساعت بعد به صورت داخل صفاقی تجویز گردید (۲۳). برای گروه کنترل نیز مراحل فوق اعمال شد با این تفاوت که به آن ها پپتید MOG₃₅₋₅₅ تجویز نشد. روند بیماری و تغییرات وزن موش ها به صورت روزانه تا ۲۱ روز پس از ایمن سازی مورد بررسی قرار گرفت و شدت بیماری به شرح زیر (جدول ۱) درجه بندی شد (۲۴).

جدول ۱. درجه بندی شدت بیماری بر اساس علائم ناشی از

تجویز پپتید MOG₃₅₋₅₅

درجه شدت بیماری	علائم
۰	عدم ابتلا به بیماری
۱	اختلال در حرکت دم
۲	فلج شدن دم
۳	اختلال در راه رفتن
۴	فلجی یک پا
۵	فلجی هر دو پا
۶	فلجی کامل دست و پا
۷	مرگ

¹ Myelin oligodendrocyte glycoprotein

² Phosphate-buffered saline

³ Pertussis Toxin

هیستوپاتولوژی

جهت بررسی میزان التهاب و دمیالیناسیون بافت CNS در موش‌های مبتلا به EAE، موش‌ها در روز ۲۱ ام با کتامین و زایلازین بیهوش شدند و پرفیوژ حیوان با سرم فیزیولوژی حاوی ۴ درصد پارافرمالدهید انجام شد. پس از فیکساسیون با پارافین، برش‌های ۵ میلی‌متری از بافت مغز و نخاع تهیه گردید.

به‌منظور ارزیابی التهاب بافت CNS، این برش‌ها با رنگ هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند. مقاطع توسط میکروسکوپ نوری بررسی گردید.

میزان التهاب بافت CNS به شرح زیر درجه‌بندی شد. صفر: بدون التهاب، یک: مشاهده تعداد کمی از سلول‌های التهابی در بافت CNS، دو: وجود ارتشاح اطراف عروقی و سه: افزایش شدت کاف دور عروقی با گسترش به بافت‌های مجاور (۲۵).

کشت سلولی و بررسی میزان تکثیر سلول‌ها با استفاده از روش BrdU

طحال و غدد لنفاوی محیطی (غدد لنفاوی کشاله ران و زیربغل) از موش‌های C57BL/6 در روز ۲۱ ام پس از ایمن‌سازی جدا گردید. سوسپانسیون‌های سلولی تهیه شدند و در محیط RPMI 1640 (شرکت GIBCO، آمریکا) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) (شرکت GIBCO، آمریکا)، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین (شرکت GIBCO، آمریکا) و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین (شرکت GIBCO، آمریکا) در پلیت‌های ۲۴ چاهکی (2×10^6 سلول در هر چاهک) و پلیت‌های ۹۶ چاهکی (4×10^5 سلول در هر چاهک) کشت داده شدند.

سلول‌ها در حضور و عدم حضور پپتید MOG₃₅₋₅₅ با غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. سپس محلول BrdU (۱۰۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر) به چاهک‌ها افزوده شد و انکوباسیون پلیت‌ها برای ۲۴ ساعت دیگر صورت گرفت. میزان تکثیر سلول‌ها با استفاده از کیت تکثیر سلولی ELISA، BrdU (رنگ‌سنجی، شرکت Roche، آمریکا) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده ارزیابی شد. آزمایش بررسی میزان تکثیر سلول‌ها یک بار بصورت دپلیکیت برای هر نمونه انجام شد.

اندازه‌گیری سایتوکاین‌های IL-4، IL-6، IL-10، IL-17

IL-17، TNF- α ، TGF- β و IFN- γ با روش الایزا

پس از ۷۲ ساعت کشت سلول‌های تک‌هسته‌ای در حضور و عدم حضور آنتی‌ژن، مایع رویی از پلیت‌های ۲۴ چاهکی جمع‌آوری شد و غلظت سایتوکاین‌های IL-4، IL-6، IL-10، IL-17، TNF- α ، TGF- β و IFN- γ با استفاده از کیت‌های مخصوص هر یک، بر اساس دستورالعمل شرکت تولیدکننده آن (شرکت eBioscience، آمریکا) و با روش ELISA اندازه‌گیری شدند. به طور خلاصه، تیترا مناسبی از آنتی‌بادی‌ها در بافرهای پوشاننده مربوط به خود تهیه و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر اضافه گردید. پلیت به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

پس از شستشوی چاهک‌ها، بافر بلاکینگ اضافه شد. مراحل بعد به ترتیب شامل شست‌وشو، اضافه‌کردن محیط کشت رویی سلول‌ها در کنار نمونه‌های استاندارد، شست‌وشو، افزودن آنتی‌بادی اختصاصی کونژوگه با بیوتین، شست‌وشو، افزودن آنزیم HRP کونژوگه با آویدین، شست‌وشو و در نهایت اضافه‌کردن سوبسترای تترا متیل بنزیدین (TMB)^۱ بود. سپس، جذب هر یک از چاهک‌ها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (شرکت Stat Fax 2100 Awareness، آمریکا) در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد و مقدار هر کدام از سایتوکاین‌ها با توجه به نمودار استاندارد مربوطه، برحسب پیکوگرم در میلی‌لیتر محاسبه گردید. آزمایش الایزا یک بار بصورت دپلیکیت برای هر نمونه انجام شد.

ارزیابی میزان بیان سایتوکاین‌ها و فاکتورهای

رونویسی در بافت CNS با Real-time PCR

برای تعیین میزان بیان سایتوکاین‌ها و فیلتراسیون سلول‌های ایمنی، بافت‌های مغز و نخاع گروه‌های تحت درمان و کنترل در روز ۲۱ ام پس از القای EAE جدا شدند و از آن‌ها به طور جداگانه، سوسپانسیون‌های سلولی تهیه گردید.

سوسپانسیون سلولی در دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و به‌منظور استخراج RNA، پلت سلولی حاصل

^۱ Tetramethylbenzidine

AATG-3'	ACAACA-3'	
5'- CATGCGAGTAAACC AATG-3'	5'- CTGCGGACTCTA CCATAA-3'	GA TA3
5'- CATCCTGTAATGGC TTGTG-3'	5'- TGTGGTCCAAGT TCAACC-3'	T- bet
5'- CCTTGTCGATGAGT CTTG-3'	5'- GGATGAGATTG CCCTCTA-3'	RO R-γt
5'- GTAGCAGTTCAGTA TGTTTC-3'	5'- CCTGTATGCTAT CCAGAA-3'	β2 MG

در معرف جداسازی TriPure (شرکت Roche، آمریکا) حل شد. سنتز cDNA توسط کیت PrimeScript™ RT reagent (شرکت Takara، ژاپن) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام گردید. Real-time PCR با استفاده از مسترمیکس TaqMan PCR (شرکت Takara، ژاپن) و پرایمرهای اختصاصی برای ژنهای هدف (جدول ۲) با دستگاه Rotor-Gene 6000 (شرکت Corbett Life Science، استرالیا) انجام شد. مقدار نسبی بیان mRNA با ژن مرجع بتا ۲ - میکروگلوبولین (β2MG) مقایسه گردید و محاسبه مقادیر نسبی با استفاده از روش استاندارد ΔΔCt انجام شد.

جدول ۲- توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه

ژن	پرایمر F	پرایمر R
IFN-γ	5'- CCAAGTTTGAGG TCAACA-3'	5'- CTGGCAGAATTATT CTTATTGG-3'
IL-4	5'- CTGGATTCATCG ATAAGC-3'	5'- GATGCTCTTTAGGCT TTC-3'
IL-6	5'- CCAACAGACCT GTCTATA-3'	5'- GCATCATCGTTGTTC ATA-3'
IL-10	5'- CAGGTGAAGAC TTTCTTTC-3'	5'- AACCCAAGTAACCC TTAA-3'
IL-17	5'- CCTCAGACTACC TCAACC-3'	5'- CCAGATCACAGAGG GATA-3'
IL-23	5'- CGGGACATATG AATCTACTAA-3'	5'- TGTCCTTGAGTCCTT GTG-3'
TN F-α	5'- GGCTGCCCCGAC TACGT-3'	5'- TTTCTCCTGGTATGA GATAGCAAATC-3'
TG F-β	5'- CGGACTACTATG CTAAAGA-3'	5'- CTGTGTGAGATGTC TTTG-3'
Fox p3	5'- CAGAGTTCTTCC	5'- CATGCGAGTAAACC

آنالیز آماری

تمامی ارزیابی‌های شدت بیماری، بررسی‌های هیستوپاتولوژی و آنالیز داده‌ها به صورت کور (blind) و توسط محقق مستقل انجام شد تا از بروز سوگیری در نتایج جلوگیری شود. به منظور تجزیه و تحلیل علائم بالینی و شدت بیماری بین گروه‌ها از روش غیر پارامتریک (آزمون Kruskal-Wallis) و نیز تست‌های Dunn's multiple comparison استفاده گردید. آزمون آنالیز واریانس برای مقایسه تأثیر سطح استروژن بارداری در مقابل گروه‌های کنترل در بروز علائم بالینی به کار رفت. علاوه بر این، از آزمون Mann-Whitney non-parametric unpaired t به منظور مقایسه دوگروهی استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ SEM نشان داده شدند و $p < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌دار بودن داده‌ها در نظر گرفته شد. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS 26 استفاده گردید.

نتایج

تجویز همزمان ویتامین D3 و استروژن، باعث کاهش علائم بیماری EAE می‌شود

موش‌ها در گروه‌های درمانی تجویز همزمان استروژن و ویتامین D (T1) در روز ۱۷ پس از القا (روز اوج بیماری) کاهش علائم بیماری نشان دادند ($1/1 \pm 0/1$) که نسبت به گروه کنترل ($4/5 \pm 0/15$) بطور معناداری کاهش یافته بود ($p < 0.001$). علائم

($p < 0.05$). بین گروه ویتامین D (T2) و گروه استروژن (T3) اختلاف معناداری مشاهده نشد.

تجویز همزمان ویتامین D3 و استروژن، تولید سایتوکاین های پیش التهابی را سرکوب و سایتوکاینهای ضد التهابی را افزایش می دهد

برای تعیین نقش واسطه های التهابی خاص مانند IL-6، TNF- α ، IL-17 و IFN- γ ، تولید سایتوکاین در طحال و غدد لنفاوی را در روز ۲۱ پس از ایمن سازی بررسی کردیم. سلول های گروه های درمانی (T1، T2 و T3) به طور قابل توجهی IFN- γ ، TNF- α ، IL-6 و IL-17 کمتری نسبت به گروه کنترل تولید کردند. میزان تولید سایتوکاینهای IFN- γ ، TNF- α ، IL-6 و IL-17 در گروه تجویز همزمان استروژن و ویتامین D (T1) نسبت به گروه ویتامین D (T2) و گروه استروژن (T3) کاهش معناداری نشان داد ($p < 0.05$). بین گروه ویتامین D (T2) و گروه استروژن (T3) اختلاف معناداری مشاهده نشد (شکل ۴ الف).

علاوه بر این، ما دریافتیم که سلول های طحال و غدد لنفاوی از گروه های درمان (T1، T2 و T3) تولید IL-4، IL-10 و TGF- β را افزایش داده اند. میزان تولید سایتوکاینهای IL-4، IL-10 و TGF- β در گروه تجویز همزمان استروژن و ویتامین D (T1) نسبت به گروه ویتامین D (T2) و گروه استروژن (T3) کاهش معناداری نشان داد ($p < 0.05$). بین گروه ویتامین D (T2) و گروه استروژن (T3) اختلاف معناداری مشاهده نشد (شکل ۴ ب).

این داده ها نشان می دهند که تجویز همزمان ویتامین D3 و استروژن ترجیحاً باعث افزایش تولید سایتوکاین های Th2 و Treg و کاهش تولید سایتوکاین های Th1 و Th17 می شود. در واقع، تعادل سایتوکاین های پیش التهابی و تنظیمی در مدل EAE را تغییر می دهد.

نفوذ سلول های T و تولید سایتوکاین در CNS

برای ارزیابی نفوذ سلول های T فعال و همچنین تعیین پلازماسیون T helper در ریز محیط CNS، سطوح بیان mRNA سایتوکاین ها و فاکتور های رونویسی مرتبط با سلول T توسط ریل تایم PCR مورد سنجش قرار گرفت. در روز ۲۱ پس از

بیماری در گروه تجویز همزمان استروژن و ویتامین D (T1) نسبت به گروه ویتامین D (T2) (2 ± 0.2) و گروه استروژن (T3) (2 ± 0.2) کاهش معناداری نشان داد ($p < 0.05$). بین گروه ویتامین D (T2) و گروه استروژن (T3) اختلاف معناداری مشاهده نشد. بین گروه های درمانی، گروه T1 نتایج بهتری داشت و تجویز همزمان ویتامین D3 و استروژن تقریباً به طور کامل در برابر EAE محافظت می کرد (شکل ۱).

تجویز همزمان ویتامین D3 و استروژن، باعث کاهش نفوذ سلولی به CNS می شود

برای یافتن اثر ویتامین D و استروژن بر آسیب شناسی CNS، ما انفیلتراسیون سلولی التهابی را در طول EAE در روز ۲۱ پس از ایمن سازی ارزیابی کردیم. برای ارزیابی انفیلتراسیون سلول های تک هسته ای و کاف دور عروقی، مغز و نخاع توسط هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) آنالیز شد. سلول های نفوذی کمتر و نواحی کاف دور عروقی در گروه های درمانی (T1، T2 و T3) در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد (شکل ۲ الف). کمترین التهاب و انفیلتراسیون سلولی در مغز و نخاع مربوط به گروه T1 است (شکل ۲ ب).

سلول های طحال موش های تحت درمان با ویتامین D3 و استروژن تکثیر سلول های T را کاهش دادند

EAE القا شده با MOG یک بیماری با واسطه سلول های T است و سلول های T خود واکنشگر در EAE قبل از مهاجرت به CNS در غدد لنفاوی محیطی و طحال فعال می شوند. برای تعیین قابلیت تکثیر سلول های T، سلول های غدد لنفاوی و طحال ۲۱ روز پس از ایمن سازی جداسازی و پس از تحریک با پپتید MOG₃₅₋₅₅ کشت داده شدند و سپس سنجش ادغام BrdU انجام شد. نتایج به وضوح نشان داد که سلول های تک هسته ای موش های گروه های درمانی (T1، T2 و T3) قابلیت تکثیر پایین تری در غدد لنفاوی و طحال نسبت به گروه کنترل داشتند (شکل ۳). میزان تکثیر سلول های تک هسته ای در گروه تجویز همزمان استروژن و ویتامین D (T1) نسبت به گروه ویتامین D (T2) و گروه استروژن (T3) کاهش معناداری نشان داد

الفای EAE با پپتید MOG، گروه های درمان (T1 و T3) کاهش بیان سیتوکین ها و فاکتور رونویسی Th1 (T-bet، IFN- γ و TNF- α) و افزایش بیان سیتوکین ها و فاکتور رونویسی Th2 را (IL-4، GATA3، IL-10) در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند (شکل ۵). همچنین این گروه کاهش بیان سیتوکین ها و فاکتور رونویسی Th17 (ROR- γ t، IL-6، IL-17 و IL-23) و افزایش بیان سیتوکین ها و فاکتور رونویسی Treg (Foxp3 و TGF- β) را در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند. در این تغییرات در سیتوکین ها و فاکتور های رونویسی Th1/Th2 و Th17/Treg در گروه های T1 و T3 نسبت به گروه کنترل از نظر آماری معنی دار بود (شکل ۵).

این پیامدها نتایج الایزا را تایید کرد که از اندام های لنفاوی محیطی از جمله طحال و غدد لنفاوی گرفته شده است.

بحث

مولتیپل اسکلروزیس (MS) یک اختلال عصبی التهابی مزمن در سیستم عصبی مرکزی (CNS) است و عمدتاً زنان جوان را تحت تأثیر قرار می دهد که اکثر آن ها در سنین باروری (۲۰ تا ۴۰ سال) هستند (۲۶). سلول های پیش التهابی Th1 و Th17 که آنتی ژن های خودی CNS را هدف قرار می دهند، به شدت در پاتوژنز MS نقش دارند و سلول های Th2 که IL-4، IL-5 و IL-10 را ترشح می کنند، پاسخ های ایمنی ناشی از سلول های Th1 را مهار می کنند (۲۷). در حالی که سلول های Treg در این بیماری، ناکارآمد شده و تعداد آن ها کاهش می یابد. اهمیت تعادل بین سلول های Th1، Th17 و Treg در التهاب CNS از طریق مطالعات متعدد در مدل های حیوانی و در بیماران نشان داده شده است (۲۸، ۲۹).

ثابت شده است که حاملگی اثرات سرکوب کننده ای بر چندین بیماری خودایمنی از جمله MS دارد. بهبود بیماری به ویژه در سه ماهه سوم بارداری در زنان مبتلا به MS رخ می دهد (۳۰). هورمون های جنسی، از جمله آندروژن ها و استروژن ها (استرادیول و استریول) در شکل دهی پاسخ های ایمنی سلول های

T در دوران بارداری نقش حیاتی دارند و محیط سیتوکینی غالب از شرایط پیش التهابی Th1 به ضد التهابی Th2 تغییر می کند (۳۱). سطح بالای استرادیول (E2) در بارداری از طریق افزایش بیان ژن های مرتبط با سلول های Th2 (GATA3، IL-4، IL-10، PD-1، Foxp3) Treg و نیز ژن های مرتبط با سلول های Treg (TGF- β و بر پلاریزاسیون سلول های T CD4⁺ تأثیر گذاشته و در عین حال، بیان ژن های مرتبط با سلول های Th1 (T-bet، IL-2، IFN- γ ، TNF- α) و ژن های مرتبط با سلول های Th17 (ROR- γ t، IL-6، IL-17، IL-23) را سرکوب می کند (۳۲). علاوه بر این که استروژن ها در اواخر بارداری به بالاترین سطح خود می رسند، در بیماری های عصبی نیز نقش مهمی دارند (۳۳). اثرات بهبود دهنده استروژن بر EAE در مطالعات متعددی شرح داده شده است (۳۴). در مقابل، درمان با پروژسترون تنها اثرات اندکی در درمان EAE داشته است (۳۵). مطالعات پیش بالینی نشان دادند که استروژن، هنگامی که در دوز فیزیولوژیک دوران بارداری استفاده شود، در مدل EAE محافظت ایجاد می کند. در واقع، پژوهش ها نشان می دهند که استروژن به عنوان محرک اصلی محافظت ناشی از بارداری در MS است (۳۶).

علاوه بر استروژن، در سال های اخیر، نقش ویتامین D در بیماری MS مورد توجه قرار گرفته است، زیرا سطوح پایین سرمی آن، احتمال ابتلا به MS را افزایش می دهد. علاوه بر این، در چندین مطالعه، سطوح پایین ویتامین D سرم با افزایش میزان عود، افزایش ناتوانی و افزایش بار ضایعه در افراد مبتلا به MS مرتبط بوده است (۳۷). بنابراین، مکمل ویتامین D نه تنها می تواند در پیشگیری و جلوگیری از پیشرفت EAE استفاده شود، بلکه می تواند به عنوان یک رویکرد درمانی در MS نیز به کار رود.

بررسی ها نشان داده اند که درمان با استروژن سبب افزایش سطوح کلستریول متصل و آزاد (1، 25-OH-D₃) شکل فعال ویتامین D و پروتئین متصل به ویتامین می شود (۳۸). علاوه بر این، استروژن می تواند با افزایش بیان ژن گیرنده ویتامین D و کاهش بیان Cyp24a1 (آنزیمی که 1، 25-OH-D₃ را غیرفعال می کند)، مقاومت ناشی از ویتامین D را در موش های تخمدان برداری شده مبتلا به EAE کاهش دهد. بنابراین، اثرات

محافظتی ویتامین D در EAE ممکن است با حضور استروژن ها افزایش یابد که نشان دهنده تعامل بالقوه عوامل بارداری در خودایمنی است (۳۹، ۱۶).

در این مطالعه، اثرات همزمان ویتامین D و سطح بالای استروژن بر موش های تخمدان برداری شده مبتلا به EAE بررسی شد و اثرات استروژن آگزوژن در بهبود بیماری بدون دخالت استروژن درونزا مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که درمان همزمان با ۱۷-بتا استرادیول و ویتامین D3 به طور قابل توجهی سبب کاهش التهاب و دمیالیناسیون در مدل EAE شد. طبق یافته های این مطالعه، تجویز ویتامین D3 و استروژن در موش های مبتلا به EAE، با کاهش سلول های Th1 و Th17 از علائم بالینی و پاتولوژیک بیماری جلوگیری می کند، اما سبب افزایش سلول های Th2 و Treg می شود.

تقریباً دو دهه پیش یک مطالعه بالینی محوری نشان داد که تجویز ۸ میلی گرم استریول در روز به مدت ۶ ماه سبب بهبود فعالیت بیماری MS در زنان غیر باردار می شود (۴۰). گسترش سلول های Treg اختصاصی آنتی ژن و مهار سلول های T ناشی از نوسانات هورمونی مرتبط با بارداری با بهبودی قابل توجهی در شدت بیماری EAE در موش ها همراه بوده است و سلول های Treg در موش های باردار مبتلا به EAE و همچنین موش های دریافت کننده استروژن افزایش می یابد (۴۱). شواهد موجود نشان می دهد که با توجه به عملکرد ویتامین D در فعال سازی و تکثیر لنفوسیت ها، تمایز سلول های Th و اثرات تنظیمی آن بر پاسخ ایمنی، این ویتامین نقش مهمی در پاتوژنز MS ایفا می کند (۴۲). علاوه بر این، با تجویز ویتامین D، پاسخ ایمنی ذاتی تقویت شده و فعالیت ایمنی تطبیقی با سرکوب تولید سایتوکاین های التهابی که توسط سلول های Th1 ترشح می شوند، فروکش می کند (۴۳). با وجود دمیالیناسیون پیشرونده در بیماران مبتلا به MS، مطالعات مختلف نشان داده اند که ویتامین D در فرآیند میلین سازی نقش مهمی را ایفا می کند و می تواند با تنظیم تمایز سلول های پیش ساز الیگودندروسیت، دمیالیناسیون را کاهش داده و باعث تحریک مجدد ساخت میلین شود (۴۴).

با توجه به این که سطوح بالای TGF- β ، IL-10 و IL-4 با مرحله بهبودی در مدل های EAE، مرتبط است و مهار تولید IL-4، TGF- β و IL-10 شدت بیماری EAE را افزایش می دهد (۴۵)، مطالعه حاضر نشان داد که درمان همزمان با ۱۷-بتا استرادیول و ویتامین D3، تولید سایتوکاین های پیش التهابی مانند TNF- α ، IFN- γ ، IL-6 و IL-17 را کاهش داده و تولید سایتوکاین های ضد التهابی مانند IL-4، IL-10 و TGF- β را افزایش داد. پس سطح بالای استروژن و ویتامین D3 به نفع تمایز Treg است، اما توسعه Th17 را محدود می کند. سلول های Treg نقش اساسی در تنظیم پاسخ های خود ایمنی دارند و تقویت سلول های Treg و تنظیم تعادل سلول های Treg/Teff به عنوان روش درمانی برای بیماری های خودایمنی مورد استفاده قرار گرفته است (۴۶). مطالعات نشان داده اند که تجویز استروژن در موش های مبتلا به EAE، تکثیر سلول های T و تولید IFN- γ را سرکوب کرده و تکثیر سلول های T اختصاصی Ag را کاهش می دهد (۴۷). علاوه بر این، IL-10 در پاسخ به دوز بالای استروژن در موش های مبتلا به EAE یک اثر سرکوب کنندگی قوی ایجاد می کند و می تواند التهاب را با کاهش بیان MHC کلاس II توسط APC ها کاهش دهد (۴۸). نتایج مطالعه Nafiseh Toghianifar و همکاران نشان داد که در بیماران مبتلا به MS، در طول مصرف مکمل ویتامین D، سطوح IL-10 و IL-17 به طور قابل توجهی تغییر کرد. همچنین دوزهای بالای ویتامین D قادر به کاهش نسبت سلول های CD4⁺ T تولید کننده IL-17 بودند (۴۹).

نتایج این پژوهش نشان داد که تجویز همزمان ویتامین D3 و استروژن در موش های مبتلا به EAE، سبب افزایش سطح سایتوکاین های ضد التهابی و کاهش سطح سایتوکاین های پیش التهابی گردید. به طور مشابه، همان طور که Chiuso-Minicucci و همکاران توضیح دادند، درمان با ویتامین D3 تولید واسطه های التهابی مانند IL-6 و IL-17 را سرکوب می کند و کاهش قابل توجهی در شدت بیماری EAE ایجاد می کند (۵۰). علاوه بر این، ویتامین D3، پیشرفت بیماری و فلج ناشی از آن را کاهش می دهد و درصد سلول های CD4⁺ T ترشح کننده IL-17A و نیز بیان IL-17A را کاهش داده و میزان IL-10 را به میزان قابل

توجهی افزایش می‌دهد (۵۱). بنابراین، درمان همزمان با ویتامین D و استروژن با بهبود عدم تعادل سلول‌های Th1/Th2 و Th17/Treg و با تغییر شرایط از Th1 و Th17 به سمت سلول‌های Th2 و Treg، روند EAE را تحت تأثیر قرار می‌دهد. یافته‌های این پژوهش نشان داد که درمان با استروژن و ویتامین D3، سبب افزایش بیان فاکتورهای رونویسی Foxp3 و GATA3 و کاهش بیان فاکتورهای رونویسی T-bet و ROR γ t در CNS موش‌های تحت درمان شد. در واقع دریافت همزمان استروژن و ویتامین D3، تعادل بین سلول‌های Th1/Th2 و Th17/Treg را تغییر می‌دهد. نتایج ذکر شده با گزارش Wittke و همکاران مطابقت دارد که نشان دادند، تجویز ویتامین D3 بیان ژن‌های مرتبط با Th2 (GATA-3) را در موش‌های BALB/c تنظیم می‌کند (۵۲). GATA3 برای تمایز سلولی Th2 مورد نیاز است و می‌تواند T-bet و ROR- γ t را تنظیم کند (۵۳). بنابراین تغییر فنوتیپ Th1 و Th17 به Th2 با افزایش بیان GATA3 ممکن است شدت بیماری‌های دمی‌لینه‌کننده التهابی، از جمله MS را کاهش دهد (۵۴). همچنین، مطالعات دیگر گزارش کردند که درمان با ویتامین D3، بیان و تولید Foxp3 را در مدل‌های موشی EAE افزایش می‌دهد و می‌تواند بیان IL-17 و IFN- γ را سرکوب کند (۵۱). نتایج حاصل از مطالعه Liu T و همکاران نشان داد که درمان با ویتامین D3 می‌تواند بیان فاکتورهای رونویسی Th1 و Th17، (T-bet و ROR- γ t) را کاهش دهد (۵۵). علاوه بر این، در دو مطالعه که بر روی موش‌های باردار و تحت درمان با E2 انجام شد، افزایش بیان FoxP3 در سلول‌های T CD4⁺ CD25⁺ و افزایش ظرفیت سرکوب‌کنندگی Treg را نشان دادند (۵۶، ۵۷).

با وجود اینکه مدل EAE به عنوان یکی از پرکاربردترین مدل‌های حیوانی برای مطالعه پاتوژن و درمان‌های بالقوه MS شناخته می‌شود، باید توجه داشت که این مدل به طور کامل منعکس‌کننده پیچیدگی‌های بیماری در انسان نیست. تفاوت‌های اساسی در ترکیب سلولی، مسیرهای سیگنالینگ ایمنی، و مکانیسم‌های دمی‌لیناسیون بین جوندگان و انسان وجود دارد که می‌تواند بر تعمیم‌پذیری نتایج اثر بگذارد. به‌ویژه، پاسخ به

درمان‌ها ممکن است در مدل EAE و بیماران MS متفاوت باشد، زیرا فاکتورهای مانند تنوع ژنتیکی، تفاوت‌های متابولیک، و تعاملات پیچیده بین سیستم ایمنی و محیط در انسان نقش پررنگ‌تری دارند (۵۸). بنابراین، یافته‌های حاصل از مطالعات EAE باید با احتیاط به شرایط بالینی تعمیم داده شوند و نیازمند تأیید در مطالعات پیش‌بالینی پیشرفته‌تر و کارآزمایی‌های بالینی انسانی هستند.

اگرچه نتایج این مطالعه نشان‌دهنده اثرات بالقوه مفید ۱۷-بتا استرادیول و ویتامین D3 در بهبود EAE است، اما باید عوارض جانبی احتمالی این ترکیبات نیز مدنظر قرار گیرد. درمان با استروژن می‌تواند با افزایش خطر بروز وقایع ترومبوآمبولیک و تحریک رشد تومورهای وابسته به هورمون، به‌ویژه در مصرف طولانی‌مدت، همراه باشد (۵۸). از سوی دیگر، مصرف طولانی‌مدت یا دوزهای بالای ویتامین D3 ممکن است باعث بروز هیپرکلسمی و عوارض مرتبط با آن، از جمله سنگ کلیه و اختلال عملکرد کلیوی شود (۵۹). این موضوع اهمیت ارزیابی دقیق دوز، مدت درمان، و پایش ایمنی بیماران در مطالعات بالینی را برجسته می‌کند.

نتیجه گیری

یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که تجویز همزمان ویتامین D3 و استروژن (بتا-استرادیول-۱۷) در مدل حیوانی EAE با کاهش معنی‌دار علائم بالینی، مهار ارتشاح سلول‌های التهابی در سیستم عصبی مرکزی، کاهش تولید سایتوکاین‌های التهابی (مانند IL-17، IFN- γ ، TNF- α ، IL-6) و افزایش سایتوکاین‌های ضدالتهابی (نظیر IL-10، IL-4، TGF- β) همراه است. همچنین، این درمان منجر به تغییر تعادل پاسخ‌های ایمنی از الگوی التهابی Th1/Th17 به سوی الگوی تنظیمی Treg/Th2 گردید که با کاهش شدت بیماری و بهبود بالینی در حیوانات همراه بود. تحلیل بیان ژن‌ها نیز مؤید این تغییرات ایمنی بود.

این نتایج حاکی از آن است که ترکیب استروژن و ویتامین D3 می‌تواند به عنوان یک رویکرد ایمنومدولاتور محتمل در تنظیم پاسخ‌های التهابی در بیماری‌های خودایمن از جمله مولتیپل اسکلروزیس مورد توجه قرار گیرد. با توجه به ویژگی‌های

ضدالتهابی، تنظیمی و اثرات همافزای این دو ترکیب، انجام مطالعات بیشتر بر روی انسان و بررسی اثرات دوز، زمان‌بندی و مکانیسم‌های مولکولی دقیق توصیه می‌شود تا امکان استفاده بالینی از این رویکرد فراهم گردد.

References

1. Attfield KE, Jensen LT, Kaufmann M, Friese MA, Fugger L. The immunology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol*. 2022 Dec;22(12):734-750. doi: 10.1038/s41577-022-00718-z. Epub 2022 May 4.
2. Young D. The relationship between etiology and symptomatology in psychiatry. *Cult Med Psychiatry*. 1980 Mar;4(1):17-23. doi: 10.1007/BF00051941.
3. Rossi B, Santos-Lima B, Terrabuio E, Zenaro E, Constantin G. Common Peripheral Immunity Mechanisms in Multiple Sclerosis and Alzheimer's Disease. *Front Immunol*. 2021 Feb 19;12:639369. doi: 10.3389/fimmu.2021.639369.
4. Demirci, H. Expression Patterns of miRNA in the Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE)/MS Model Treated With *Oenothera biennis* Oil. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2025; **2025**(1): p. 3001118.
5. Tobias, M. The role of TH17 cells in multiple sclerosis: Therapeutic implications. *Autoimmunity Reviews*. 2020. **19**(10): p. 102647.
6. Ghorbani MM, Farazmandfar T, Abediankenari S, Hassannia H, Maleki Z, Shahbazi M. Treatment of EAE mice with Treg, G-MDSC and IL-2: a new insight into cell therapy for multiple sclerosis. *Immunotherapy*. 2022 Jul;14(10):789-798. doi: 10.2217/imt-2021-0045.
7. Ghorbani MM, Farazmandfar T, Abediankenari S, Hassannia H, Maleki Z, Shahbazi M. Treatment of EAE mice with Treg, G-MDSC and IL-2: a new insight into cell therapy for multiple sclerosis. *Immunotherapy*. 2022 Jul;14(10):789-798. doi: 10.2217/imt-2021-0045.
8. Pozzilli C, Pugliatti M; ParadigMS Group. An overview of pregnancy-related issues in patients with multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 2015 Oct;22 Suppl 2:34-9. doi: 10.1111/ene.12797.
9. Spence RD, Wisdom AJ, Cao Y, Hill HM, Mongerson CR, Stapornkul B, Itoh N, Sofroniew MV, Voskuhl RR. Estrogen mediates neuroprotection and anti-inflammatory effects during EAE through ER α signaling on astrocytes but not through ER β signaling on astrocytes or neurons. *J Neurosci*. 2013 Jun 26;33(26):10924-33. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0886-13.2013.
10. Baecher-Allan C, Kaskow BJ, Weiner HL. Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. *Neuron*. 2018 Feb 21;97(4):742-768. doi: 10.1016/j.neuron.2018.01.021.
11. Bikle DD. Vitamin D Regulation of Immune Function. *Curr Osteoporos Rep*. 2022 Jun;20(3):186-193. doi: 10.1007/s11914-022-00732-z. Epub 2022 May 4.
12. Feige J, Moser T, Bieler L, Schwenker K, Hauer L, Sellner J. Vitamin D Supplementation in Multiple Sclerosis: A Critical Analysis of Potentials and Threats. *Nutrients*. 2020 Mar 16;12(3):783. doi: 10.3390/nu12030783.
13. Ahangar-Parvin R, Mohammadi-Kordkhayli M, Azizi SV, Nemati M, Khorramdelazad H, Taghipour Z, Hassan Z, Moazzeni SM, Jafarzadeh A. The Modulatory Effects of Vitamin D on the Expression of IL-12 and TGF- β in the Spinal Cord and Serum of Mice with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Iran J Pathol*. 2018 Winter;13(1):10-22. PMID: 29731791; PMCID: PMC5929384.
14. Haghmorad D, Yazdanpanah E, Jadid Tavaf M, Zargarani S, Soltanmohammadi A, Mahmoudi MB, Mahmoudi M. Prevention and treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis induced mice with 1, 25-dihydroxyvitamin D $_3$. *Neurol Res*. 2019 Oct;41(10):943-957. doi: 10.1080/01616412.2019.1650218.
15. Lu M, Taylor BV, Körner H. Genomic Effects of the Vitamin D Receptor: Potentially the Link between Vitamin D, Immune Cells, and Multiple Sclerosis. *Front Immunol*. 2018 Mar 12;9:477. doi: 10.3389/fimmu.2018.00477.
16. Spanier JA, Nashold FE, Mayne CG, Nelson CD, Hayes CE. Vitamin D and estrogen synergy in Vdr-expressing CD4(+) T cells is essential to induce Helios(+)FoxP3(+) T cells and prevent autoimmune demyelinating disease. *J Neuroimmunol*. 2015 Sep 15;286:48-58. doi: 10.1016/j.jneuroim.2015.06.015.
17. Cignarella A, Fadini GP, Bolego C, Trevisi L, Boscaro C, Sanga V, Seccia TM, Rosato A, Rossi GP, Barton M. Clinical efficacy and safety of angiogenesis inhibitors: sex differences and current challenges. *Cardiovasc Res*. 2022 Mar 16;118(4):988-1003. doi: 10.1093/cvr/cvab096.
18. Häusler D, Torke S, Weber MS. High-Dose Vitamin D-Mediated Hypercalcemia as a Potential Risk Factor in Central Nervous System Demyelinating Disease. *Front Immunol*. 2020 Feb 25;11:301. doi: 10.3389/fimmu.2020.00301.
19. Haghmorad D, Amini AA, Mahmoudi MB, Rastin M, Hosseini M, Mahmoudi M. Pregnancy level of estrogen attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in both ovariectomized and pregnant C57BL/6 mice through expansion of Treg and Th2 cells. *J Neuroimmunol*. 2014 Dec 15;277(1-2):85-95. doi: 10.1016/j.jneuroim.2014.10.004.

20. Haghmorad D, Salehipour Z, Nosratabadi R, Rastin M, Kokhaei P, Mahmoudi MB, Amini AA, Mahmoudi M. Medium-dose estrogen ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in ovariectomized mice. *J Immunotoxicol*. 2016 Nov;13(6):885-896. doi: 10.1080/1547691X.2016.1223768.
21. Seifert HA, Gerstner G, Kent G, Vandenbark AA, Offner H. Estrogen-induced compensatory mechanisms protect IL-10-deficient mice from developing EAE. *J Neuroinflammation*. 2019 Oct 29;16(1):195. doi: 10.1186/s12974-019-1588-z.
22. Al-Otaibi KM, Alghamdi BS, Al-Ghamdi MA, Mansouri RA, Ashraf GM, Omar UM. Therapeutic effect of combination vitamin D3 and siponimod on remyelination and modulate microglia activation in cuprizone mouse model of multiple sclerosis. *Front Behav Neurosci*. 2023 Jan 5;16:1068736. doi: 10.3389/fnbeh.2022.1068736.
23. Haghmorad D, Yousefi B, Eslami M, Rashidy-Pour A, Tarahomi M, Tavaf MJ, Soltanmohammadi A, Zargarani S, Kamyshnyi A, Oksenysh V. RETRACTED: Oral Administration of Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Attenuates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis through Induction of Th2/Treg Cells and Suppression of Th1/Th17 Immune Responses. *Curr Issues Mol Biol*. 2022 Nov 18;44(11):5728-5740. doi: 10.3390/cimb44110388. Retraction in: *Curr Issues Mol Biol*. 2025 Sep 20;47(9):781. doi: 10.3390/cimb47090781.
24. Soltanmohammadi A, Tavaf MJ, Zargarani S, Yazdanpanah E, Sadighi-Moghaddam B, Yousefi B, Sameni HR, Haghmorad D. Daphnetin alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing Th1 and Th17 cells and upregulating Th2 and regulatory T cells. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2022;82(3):273-283. doi: 10.55782/ane-2022-026.
25. Horstmann L, Schmid H, Heinen AP, Kurschus FC, Dick HB, Joachim SC. Inflammatory demyelination induces glia alterations and ganglion cell loss in the retina of an experimental autoimmune encephalomyelitis model. *J Neuroinflammation*. 2013 Oct 4;10:120. doi: 10.1186/1742-2094-10-120.
26. Varytė G, Arlauskienė A, Ramašauskaitė D. Pregnancy and multiple sclerosis: an update. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2021 Oct 1;33(5):378-383. doi: 10.1097/GCO.0000000000000731.
27. Liu R, Du S, Zhao L, Jain S, Sahay K, Rizvanov A, Lezhnyova V, Khaibullin T, Martynova E, Khaiboullina S, Baranwal M. Autoreactive lymphocytes in multiple sclerosis: Pathogenesis and treatment target. *Front Immunol*. 2022 Sep 23;13:996469. doi: 10.3389/fimmu.2022.996469.
28. Reich DS, Lucchinetti CF, Calabresi PA. Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*. 2018 Jan 11;378(2):169-180. doi: 10.1056/NEJMr1401483.
29. Mexhitaj I, Nyirenda MH, Li R, O'Mahony J, Rezk A, Rozenberg A, Moore CS, Johnson T, Sadovnick D, Collins DL, Arnold DL, Gran B, Yeh EA, Marrie RA, Banwell B, Bar-Or A. Abnormal effector and regulatory T cell subsets in paediatric-onset multiple sclerosis. *Brain*. 2019 Mar 1;142(3):617-632. doi: 10.1093/brain/awz017.
30. Vukusic S, Michel L, Leguy S, Lebrun-Frenay C. Pregnancy with multiple sclerosis. *Rev Neurol (Paris)*. 2021 Mar;177(3):180-194. doi: 10.1016/j.neurol.2020.05.005.
31. Alanazi H, Zhang Y, Fatunbi J, Luu T, Kwak-Kim J. The impact of reproductive hormones on T cell immunity; normal and assisted reproductive cycles. *J Reprod Immunol*. 2024 Sep;165:104295. doi: 10.1016/j.jri.2024.104295.
32. Alanazi H, Zhang Y, Fatunbi J, Luu T, Kwak-Kim J. The impact of reproductive hormones on T cell immunity; normal and assisted reproductive cycles. *J Reprod Immunol*. 2024 Sep;165:104295. doi: 10.1016/j.jri.2024.104295.
33. The pathophysiological role of estrogens in the initial stages of pregnancy: molecular mechanisms and clinical implications for pregnancy outcome from the periconceptional period to end of the first trimester
34. Estrogen-mediated protection of experimental autoimmune encephalomyelitis: Lessons from the dissection of estrogen receptor-signaling in vivo
35. Rafiee Zadeh A, Ghadimi K, Mohammadi B, Hatamian H, Naghibi S N, Danaeiniya A. Effects of Estrogen and Progesterone on Different Immune Cells Related to Multiple Sclerosis. *Caspian J Neurol Sci* 2018; 4 (2) :83-90
36. Rafiee Zadeh A, Ghadimi K, Mohammadi B, Hatamian H, Naghibi S N, Danaeiniya A. Effects of Estrogen and Progesterone on Different Immune Cells Related to Multiple Sclerosis. *Caspian J Neurol Sci* 2018; 4 (2) :83-90.
37. Cassard SD, Fitzgerald KC, Qian P, Emrich SA, Azevedo CJ, Goodman AD, Sugar EA, Pelletier D, Waubant E, Mowry EM. High-dose vitamin D₃ supplementation in relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised clinical trial. *EClinicalMedicine*. 2023 Apr 13;59:101957. doi: 10.1016/j.eclinm.2023.101957.
38. Disanto G, Handel AE, Ramagopalan SV. Estrogen-vitamin D interaction in multiple sclerosis. *Fertil Steril*. 2011 Jan;95(1):e3; author reply e4. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.09.047.
39. Haghmorad D, Soltanmohammadi A, Jadid Tavaf M, Zargarani S, Yazdanpanah E, Shadab A, Yousefi B. The protective role of interaction between vitamin D, sex hormones and calcium in multiple sclerosis. *Int J Neurosci*. 2024 Jul;134(7):735-753. doi: 10.1080/00207454.2022.2147431.
40. Sicotte NL, Liva SM, Klutch R, Pfeiffer P, Bouvier S, Odesa S, Wu TC, Voskuhl RR. Treatment of multiple sclerosis with the pregnancy hormone estradiol. *Ann Neurol*. 2002 Oct;52(4):421-8. doi: 10.1002/ana.10301.
41. Engler JB, Heckmann NF, Jäger J, Gold SM, Friese MA. Pregnancy Enables Expansion of Disease-Specific Regulatory T Cells in an Animal Model of Multiple Sclerosis. *J Immunol*. 2019 Oct 1;203(7):1743-1752. doi: 10.4049/jimmunol.1900611.

42. Sirbe C, Rednic S, Grama A, Pop TL. An Update on the Effects of Vitamin D on the Immune System and Autoimmune Diseases. *Int J Mol Sci*. 2022 Aug 29;23(17):9784. doi: 10.3390/ijms23179784.
43. Khosravi-Largani M, Pourvali-Talatappeh P, Rousta AM, Karimi-Kivi M, Noroozi E, Mahjoob A, Asaadi Y, Shahmohammadi A, Sadeghi S, Shakeri S, Ghiyasvand K, Tavakoli-Yaraki M. A review on potential roles of vitamins in incidence, progression, and improvement of multiple sclerosis. *eNeurologicalSci*. 2018 Jan 28;10:37-44. doi: 10.1016/j.ensci.2018.01.007.
44. Matías-Guío J, Oreja-Guevara C, Matias-Guío JA, Gomez-Pinedo U. Vitamin D and remyelination in multiple sclerosis. *Neurologia (Engl Ed)*. 2018 Apr;33(3):177-186. English, Spanish. doi: 10.1016/j.nrl.2016.05.001.
45. Cooper SD, Felkins K, Baker TE, Hale TW. Transfer of methylprednisolone into breast milk in a mother with multiple sclerosis. *J Hum Lact*. 2015 May;31(2):237-9. doi: 10.1177/0890334415570970.
46. Goswami TK, Singh M, Dhawan M, Mitra S, Emran TB, Rabaan AA, Mutair AA, Alawi ZA, Alhumaid S, Dhama K. Regulatory T cells (Tregs) and their therapeutic potential against autoimmune disorders - Advances and challenges. *Hum Vaccin Immunother*. 2022 Dec 31;18(1):2035117. doi: 10.1080/21645515.2022.2035117.
47. Bodhankar S, Wang C, Vandembark AA, Offner H. Estrogen-induced protection against experimental autoimmune encephalomyelitis is abrogated in the absence of B cells. *Eur J Immunol*. 2011;41(4):1165-1175. doi:10.1002/eji.201040992
48. Seifert HA, Gerstner G, Kent G, Vandembark AA, Offner H. Estrogen-induced compensatory mechanisms protect IL-10-deficient mice from developing EAE. *J Neuroinflammation*. 2019 Oct 29;16(1):195. doi: 10.1186/s12974-019-1588-z.
49. Toghianifar N, Ashtari F, Zarkesh-Esfahani SH, Mansourian M. Effect of high dose vitamin D intake on interleukin-17 levels in multiple sclerosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J Neuroimmunol*. 2015 Aug 15;285:125-8. doi: 10.1016/j.jneuroim.2015.05.022.
50. Chiuso-Minicucci F, Ishikawa LL, Mimura LA, Fraga-Silva TF, França TG, Zorzella-Pezavento SF, Marques C, Ikoma MR, Sartori A. Treatment with Vitamin D/MOG Association Suppresses Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *PLoS One*. 2015 May 12;10(5):e0125836. doi: 10.1371/journal.pone.0125836.
51. Joshi S, Pantalena LC, Liu XK, Gaffen SL, Liu H, Rohowsky-Kochan C, Ichiyama K, Yoshimura A, Steinman L, Christakos S, Youssef S. 1,25-dihydroxyvitamin D(3) ameliorates Th17 autoimmunity via transcriptional modulation of interleukin-17A. *Mol Cell Biol*. 2011 Sep;31(17):3653-69. doi: 10.1128/MCB.05020-11.
52. Wittke A, Weaver V, Mahon BD, August A, Cantorna MT. Vitamin D receptor-deficient mice fail to develop experimental allergic asthma. *J Immunol*. 2004 Sep 1;173(5):3432-6. doi: 10.4049/jimmunol.173.5.3432.
53. Ozgur BA, Cinar SA, Coskunpinar E, Yilmaz A, Altunkanat D, Deniz G, Gurol AO, Yilmaz MT. The role of cytokines and T-bet, GATA3, ROR-γt, and FOXP3 transcription factors of T cell subsets in the natural clinical progression of Type 1 Diabetes. *Immunol Res*. 2023 Jun;71(3):451-462. doi: 10.1007/s12026-022-09355-z.
54. Fernando V, Omura S, Sato F, Kawai E, Martinez NE, Elliott SF, Yoh K, Takahashi S, Tsunoda I. Regulation of an autoimmune model for multiple sclerosis in Th2-biased GATA3 transgenic mice. *Int J Mol Sci*. 2014 Jan 23;15(2):1700-18. doi: 10.3390/ijms15021700.
55. Liu T, Shi Y, Du J, Ge X, Teng X, Liu L, Wang E, Zhao Q. Vitamin D treatment attenuates 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS)-induced colitis but not oxazolone-induced colitis. *Sci Rep*. 2016 Sep 13;6:32889. doi: 10.1038/srep32889.
56. Tai P, Wang J, Jin H, Song X, Yan J, Kang Y, Zhao L, An X, Du X, Chen X, Wang S, Xia G, Wang B. Induction of regulatory T cells by physiological level estrogen. *J Cell Physiol*. 2008 Feb;214(2):456-64. doi: 10.1002/jcp.21221.
57. Tai P, Wang J, Jin H, Song X, Yan J, Kang Y, Zhao L, An X, Du X, Chen X, Wang S, Xia G, Wang B. Induction of regulatory T cells by physiological level estrogen. *J Cell Physiol*. 2008 Feb;214(2):456-64. doi: 10.1002/jcp.21221.
58. Hart BA, Gran B, Weissert R. EAE: imperfect but useful models of multiple sclerosis. *Trends Mol Med*. 2011 Mar;17(3):119-25. doi: 10.1016/j.molmed.2010.11.006.
59. Malihi Z, Wu Z, Stewart AW, Lawes CM, Scragg R. Hypercalcemia, hypercalciuria, and kidney stones in long-term studies of vitamin D supplementation: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr*. 2016 Oct;104(4):1039-1051. doi: 10.3945/ajcn.116.134981.

*Original Article***Therapeutic Effects of Combined Administration of Estrogen and Vitamin D3 on Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) in Ovariectomized C57BL/6 Mice**

Received: 19/05/2025 - Accepted: 11/08/2025

Mahdieh Tarahomi¹
Alireza Pazoki¹
Alireza Shadab¹
Dariush Haghmorad^{1*}

¹ Department of Immunology, School of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, 35147-99442, Semnan, Iran

Email: dhaghmorad@gmail.com

Abstract

Introduction: Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune disease of the central nervous system characterized by inflammation, demyelination, and neuronal dysfunction, mainly affecting young women. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) serves as a standard animal model for studying MS pathophysiology and immune responses. Sex hormones like estrogen and vitamin D are implicated in modulating immunity and reducing disease severity. This study evaluated the therapeutic effects of combined vitamin D3 and 17-beta estradiol treatment on clinical symptoms, immune responses, and gene expression in ovariectomized mice with EAE.

Methods: Thirty-two ovariectomized female C57BL/6 mice were randomly assigned to four groups: combination therapy, vitamin D3, estrogen, and control. EAE was induced by subcutaneous injection of 250 µg MOG₃₅₋₅₅ peptide. The combination group received daily intraperitoneal vitamin D3 (100 ng/kg) and a 17-beta estradiol pellet (15 mg/21 days). Clinical scores were recorded daily up to day 21. Brain and spinal cord histology, BrdU proliferation assays, cytokine levels by ELISA, and gene expression by real-time PCR were analyzed.

Results: Combination therapy significantly reduced EAE severity at peak disease (mean score 1.1 ± 0.1 vs. 4.5 ± 0.15 , $p < 0.001$), decreased CNS inflammatory infiltration and immune cell proliferation ($p < 0.001$). Pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-17, TNF- α , IFN- γ) decreased, while anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10, TGF- β) increased (all $p < 0.001$). Expression of T-bet and ROR γ t decreased, whereas Foxp3 and GATA3 increased, favoring anti-inflammatory immune responses.

Conclusion: Combined vitamin D3 and estrogen therapy exerts synergistic immunomodulatory effects in EAE and may offer a promising approach for MS treatment.

Keywords: Multiple Sclerosis (MS); Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE); Central Nervous System (CNS); Estrogen; Vitamin D3