

افزایش سلول‌های T تنظیمی از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی پس از مجاورت با آنتی‌ژن نوکلئوکپسید ویروس هپاتیت C در شرایط آزمایشگاهی

طیبه هاشم‌پور^۱، طراوت بامداد^{۲*}، شاهین مرات^۳، فاضل صحرانشین‌سامانی^۴، کامبیز باقری^۵، مهدی مهدوی^۶، مهدی آجورلو^۷

۱- دانشجوی دکتری، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه داخلی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد بیمارستان شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۴- دانشجوی کارشناسی ارشد، بخش سلول‌های بنیادی، انستیتو رویان، تهران، ایران

۵- استادیار، گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون، ایران

۶- استادیار، گروه ویروس‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

۷- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۹/۰۶/۲۴

دریافت مقاله: ۸۹/۰۴/۲۳

چکیده

هدف: ویروس هپاتیت C یکی از عوامل شایع ایجاد عفونت مزمن در انسان است. کنترل تکثیر ویروس به سیستم ایمنی فرد وابسته است. مکانیسم‌های متعددی در ارتباط با اختلال در پاسخ مؤثر سیستم ایمنی بیان شده است که مکانیسم مرتبط با سلول‌های T تنظیمی یکی از فرضیه‌های جدید است. در این مطالعه برای اولین بار به بررسی نقش پروتئین نوکلئوکپسید ویروس هپاتیت C (HCV-core) در افزایش فرکانس سلول‌های T تنظیمی طبیعی در میان جمعیت پیچیده سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی پرداخته شد.

مواد و روش‌ها: برای بررسی اثر نوکلئوکپسید ویروس هپاتیت C بر فرکانس سلول‌های T تنظیمی طبیعی اختصاصی ویروس هپاتیت C روی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی ۱۹ بیمار که به شکل مزمن ویروس هپاتیت C آلوده بودند و نیز ۶ نفر به‌عنوان کنترل مطالعه شد. برای این منظور سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی از گروه‌های مختلف جدا و توسط آنتی‌ژن نوکلئوکپسید تحریک شد. سپس با روش فلوسایتومتری سه‌رنگی دستی، فرکانس سلول‌های T تنظیمی طبیعی ارزیابی شد.

نتایج: نتایج بررسی حاضر نشان داد که به‌دنبال انکوباسیون سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی با آنتی‌ژن نوکلئوکپسید ویروس هپاتیت C، جمعیت سلول‌های T تنظیمی طبیعی در افراد آلوده به ویروس هپاتیت C نسبت به کنترل منفی افزایش داشته است.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه از این نظریه که سلول‌های T تنظیمی طبیعی می‌تواند اختصاصاً به آنتی‌ژن ویروس هپاتیت C پاسخ دهد، حمایت می‌کند؛ بنابراین سلول‌های T تنظیمی طبیعی اختصاصی ویروس هپاتیت C می‌تواند یکی از دلایل پاسخ ضعیف سیستم ایمنی باشد که منجر به عفونت مزمن ویروس هپاتیت C و نیز تحمل

*نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ویروس‌شناسی، کدپستی: ۱۴۱۷۱۳۱۱۶

ایمنی در هنگام عفونت ویروس هپاتیت C شود. پیشنهاد می‌شود در هنگام طراحی واکسن برای ویروس هپاتیت C از اپی‌توپ‌هایی که تکثیر شدید سلول‌های T تنظیمی طبیعی را موجب می‌شوند استفاده نشود.

کلیدواژگان: بیماران آلوده به شکل مزمن ویروس هپاتیت C، آنتی‌ژن نوکلئوکسپید ویروس هپاتیت C، سلول‌های T تنظیمی، فرکانس

۱- مقدمه

هپاتیت (Hepatitis) یک واژه کلی و به‌معنای التهاب کبدی است که می‌تواند به دلایل مختلف از جمله مصرف الکل، استفاده از داروهای خاص، بیماری‌های خودایمن (Autoimmune) و عفونت‌های ویروسی اتفاق افتد که در این میان عفونت‌های ویروسی از جمله ویروس هپاتیت C (Hepatitis C Virus: HCV) علت اصلی التهاب کبد در دنیا هستند [۱]. HCV جزء ویروس‌های RNA دار تک رشته‌ای مثبت است که در خانواده فلاوی‌ویریده (Flaviviridae) و جنس هپاسی‌ویروس (Hepacivirus) قرار می‌گیرد [۲]. اکثریت افرادی که به HCV آلوده می‌شوند به سمت عفونت مزمن پیش می‌روند و در درصدی از این بیماران نقص در عملکرد کبد، سیروز و سرطان مشاهده می‌شود [۳]. به‌طور کلی مزمن شدن این ویروس مرتبط با پاسخ ضعیف سیستم ایمنی است؛ اما هنوز علت پاسخ ضعیف سیستم ایمنی مشخص نشده است ولی فاکتورهای متفاوتی از جمله نقص عملکردی سلول دندریتیک (Dendritic Cell: DC) [۴]، تحمل سلول‌های T، ارتشاح سلول‌های CD_8^+ T به کبد که سیتوکین‌های (Cytokines) سرکوب کننده سیستم ایمنی از جمله اینترلوکین ۱۰ (Interleukin 10: IL-10) تولید می‌کنند [۵] و نیز عدم توانایی تولید IL-2 توسط سلول‌های CD_4^+ T در خون محیطی افراد آلوده در این زمینه نقش دارند [۶]. اخیراً نشان داده شده است که در مزمن شدن عفونت HCV جمعیتی از سلول‌های T CD_4^+ به‌نام سلول‌های T تنظیمی (Regulatory T Cells: Tregs) نقش ایفا می‌کنند [۷-۹]. یکی از زیرگروه‌های Tregs، سلول‌های T تنظیمی طبیعی (Natural Tregs: nTregs) است

که نشانگرهای CD_4 (Markers)، CD_{25} و FoxP3 را بیان می‌کند [۱۰، ۱۱]. نشانگر FoxP3 یک مهار کننده رونویسی است [۱۲] و اختصاصاً توسط سلول‌های T که نقش تنظیمی دارند، بیان می‌شود [۱۳]. دسته دیگر از Tregs، سلول‌هایی هستند به‌نام iTregs (Induced Tregs) که در نتیجه عفونت القا می‌شوند. iTregs قسمتی از ایمنی اکتسابی است که می‌تواند به‌صورت اختصاصی آنتی‌ژن‌های بیماری‌زاها را شناسایی کند و بدین ترتیب تولید سیتوکین به میزان زیاد توسط این سلول‌ها در محلی که با آنتی‌ژن برخورد می‌کنند، صورت می‌گیرد که می‌تواند یکی از آثار جانبی سرکوبی این سلول‌ها باشد [۱۴]. زیرگروه nTregs در تیموس (Thymus) در هنگام بلوغ سلول‌های T به‌وجود می‌آیند [۱۰، ۱۱] و بعد از خروج از تیموس، در پاسخ به علائم هموستازی (Homeostasis Signals) تکثیر می‌یابد [۱۵] که با نشانگرهای CD_4^+ ، CD_{25} ، FoxP3 شناسایی می‌شوند [۱۰، ۱۱]. زیرگروه دیگر Tregs، سلول‌های T تنظیمی القایی هستند که به‌دنبال ورود آنتی‌ژن مثلاً از طریق دهان (T-helper cell type 3: TH3) [۱۶]، یا در حضور شرایط خاص ایمونولوژیک مثل IL-10 یا برخی از آنتی‌ژن‌ها القا می‌شوند (Regulatory T cells Type 1: Tr1). که از جمله نشانگرهای اختصاصی آن‌ها به‌ترتیب $TGF-\beta$ (Transforming Growth Factor-beta) و IL-10 است [۱۷]. گزارش‌های متعددی مبنی بر نقش Tregs در پیشبرد عفونت‌های ویروسی به سمت مرحله مزمن از طریق مکانیسم‌های متعددی مثل سرکوب سلول‌های CD_8^+ T ویژه ویروس‌ها وجود دارد که بدین ترتیب موجب پیش رفتن

تحریک PBMCs توسط HCV-core انجام شد تا به نتایج نزدیک‌تری به برهم‌کنش شرایط طبیعی بدن با HCV دست یابیم.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- بیماران

این مطالعه روی ۱۹ بیمار آلوده به بیماری HCV مزمن مراجعه کننده به مرکز تحقیقات گوارش و کبد بیمارستان شریعی دانشگاه علوم پزشکی تهران و نیز ۶ نفر به‌عنوان گروه کنترل انجام شد. بیمارانی که به این مرکز مراجعه می‌کنند از نظر آنتی‌بادی علیه ویروس نقص ایمنی اکتسابی در انسان (Human Immunodeficiency Virus: HIV) و ویروس هپاتیت B (Hepatitis B Virus: HBV) توسط کیت‌های تجاری (Organom) ELISA ساخت بلژیک بررسی شدند و سابقه این عفونت در آن‌ها مشاهده نشد. نمونه‌های کنترل افرادی بودند که سابقه برخورد با این ویروس را نداشتند و از سازمان انتقال خون ایران دریافت شدند.

۲-۲- آنتی‌بادی‌های مورد استفاده در فلوسایتومتری

(Flowcytometry)

برای انجام فلوسایتومتری، آنتی‌بادی‌های مورد نیاز و نیز ایزوتایپ‌های مرتبط از شرکت BD (Becton Dickenson) آمریکا خریداری شد (جدول ۱).

ویروس‌ها به سمت مرحله مزمن می‌شود [۱۸]. برخلاف مطالعات گسترده‌ای که روی Tregs در حال انجام است، دلایل متعددی مانند درصد بسیار کم این سلول‌ها در شرایط فیزیولوژیک [تقریباً ۱ درصد از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (Peripheral Blood Mononuclear Cells: PBMCs)]، قابلیت تکثیر پایین آن‌ها در شرایط آزمایشگاه و فقدان وجود نشانگرهای مشخص برای تشخیص این سلول‌ها باعث شده است تا نقش دقیق Tregs در عفونت مزمن HCV مشخص نشود [۸، ۱۹]. گروه‌های مختلفی درصد Tregs را در خون محیطی افراد آلوده به HCV ارزیابی کرده‌اند [۲۰-۲۲] که در اکثر آن‌ها، درصد این سلول‌ها در افراد آلوده به HCV افزایش یافته است [۸، ۲۰، ۲۱] و این افزایش می‌تواند نشان دهنده تضعیف پاسخ سلول‌های T اختصاصی HCV باشد [۱۸]. شناخت پروتئین‌هایی از ویروس که بتواند باعث القا یا تکثیر سلول‌های Treg شود، می‌تواند به کنترل بیماری و پیشگیری از مزمن شدن آن کمک نماید. اخیراً در یک گزارش نشان داده شده است که در اثر تحریک لنفوسیت‌های T CD₄ افراد آلوده به HCV با تعدادی از اپی‌توپ‌های ویروس از جمله اپی‌توپ‌های آنتی‌ژن نوکلئوکسپید (Core)، این سلول‌ها به سمت القا یا تکثیر Tregs پیش می‌روند [۲۴]. از آنجا که هنوز عملکرد nTregs در عفونت مزمن HCV مشخص نیست و از سوی دیگر، تاکنون اثر آنتی‌ژن کامل نوکلئوکسپید ویروس هپاتیت C (HCV-Core) بر nTregs مطالعه نشده است، در این پژوهش برای اولین بار

جدول ۱ مشخصات آنتی‌بادی‌های به‌کار رفته برای تشخیص nTregs

| نام | شماره کاتالوگ | نوع کونژوگه | تهیه شده از |
|--------------------------------------|---------------|-------------|------------------------|
| آنتی‌بادی انسانی ضد CD ₄ | ۵۵۵۳۴۶ | FITC | BD PharMingen, CA, USA |
| آنتی‌بادی کنترل ایزوتایپ موشی IgG1 | ۵۵۵۷۴۸ | FITC | BD PharMingen, CA, USA |
| آنتی‌بادی انسانی ضد CD ₂₅ | ۳۳۵۸۲۴ | PE-Cy7 | BD PharMingen, CA, USA |
| آنتی‌بادی کنترل ایزوتایپ موشی IgG1 | ۵۵۷۶۴۶ | PE-Cy7 | BD PharMingen, CA, USA |
| آنتی‌بادی انسانی ضد FoxP3 | ۵۶۰۰۴۶ | PE | BD PharMingen, CA, USA |
| آنتی‌بادی کنترل ایزوتایپ موشی IgG1 | ۵۵۵۷۴۹ | PE | BD PharMingen, CA, USA |

۲-۳- جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون

محیطی

خونگیری در لوله‌های حاوی EDTA (Ethylenediamine) و Tetraacetic acid از افراد تحت آزمایش صورت گرفت. به دنبال آن جداسازی PBMCs توسط روش شیب غلظت فایکول (Ficol) انجام شد. به‌طور خلاصه نمونه‌های خونی به میزان ۱:۱ با PBS (Phosphate Buffered Saline) مخلوط و روی فایکول (Lymphoprep, Axis) با نسبت برابر برده و به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۹ g در دمای اتاق سانتریفوژ شد. بعد از دور ریختن بخش رویی (پلازما)، لایه PBMCs جدا و در PBS ریخته و برای مدت ۱۰ دقیقه در ۱۷ g شسته شد. در نهایت سلول‌ها در محیط کشت کامل RPMI-1640 (Gibco) حاوی گلوتامین (۲ میلی‌مول)، سرم جنین گاوی (۱۰ درصد) (Gibco) پنی‌سیلین (Penicillin) (۵۰ واحد در هر میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (Streptomycin) (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) نگهداری شد. میزان زنده بودن سلول‌ها به‌وسیله تریپان بلو (Trypan Blue) بیشتر از ۹۰ درصد به‌دست آمد.

۲-۴- بهینه‌سازی تشخیص nTregs توسط

روش فلوسایتومتری سه‌رنگی

در مرحله اول این پروژه، میزان آنتی‌بادی‌های Anti-FoxP3- و Anti-CD25-PE-Cy-7، Anti-CD4-FITC در آزمایش‌های مکرر بهینه‌سازی شد و سپس نحوه انجام رنگ‌آمیزی همزمان نشانگر داخل سلولی و خارج سلولی بررسی شد. به‌طور کلی بعد از جداسازی PBMCs، تعداد 2×10^6 سلول در لوله‌های فلوسایتومتری قرار داده شد و سپس توسط بافر شستشوی سرد (PBS حاوی ۱۰ درصد سرم و ۱ میلی‌مول EDTA) شسته شد و با استفاده از پارافرمالدهید ۴ درصد (Sigma) به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ، مرحله تثبیت (Fixation) انجام شد. بعد از شستشوی سلول‌ها، با استفاده از رقت ۰/۰۱ درصد تریتون X100 (Sigma) (Triton X-100)

نفوذپذیری سلول‌ها صورت گرفت. مرحله بعد بلاکینگ توسط سرم موشی ۱۰ درصد برای مدت ۱۵ دقیقه روی یخ انجام شد. این مرحله انتخابی است. در ادامه نمونه‌ها با رقت مناسب از آنتی‌بادی ضد FoxP3 به مدت ۴۵ دقیقه در تاریکی و روی یخ انکوبه شدند. بعد از انجام مرحله شستشو، سلول‌ها با رقت مناسب از آنتی‌بادی‌های سطحی ضد CD4 و CD25 برای مدت ۳۰ دقیقه روی یخ و در تاریکی انکوبه و سپس شسته شد و در نهایت نمونه‌ها در پارافرمالدهید ۲ درصد سوسپانسیون و سریعاً برای تجزیه و تحلیل به پژوهشکده رویان ارسال شد. ایزوتایپ‌های متناسب با آنتی‌بادی‌های سطحی و داخل سلولی برای ارزیابی و حذف باندهای غیراختصاصی و جلوگیری از نتایج کاذب استفاده شد. فلوسایتومتری با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری (از شرکت BD) و توسط نرم‌افزار CellQuest انجام شد. برای هر تجزیه و تحلیل، ده هزار سلول شمارش شد.

۲-۵- تحریک اختصاصی PBMCs

برای شناسایی nTregs از نشانگرهای CD4، CD25 و FoxP3 استفاده شد. در این مطالعه برای بررسی تکثیر اختصاصی nTregs در عفونت HCV، تعداد 2×10^6 PBMCs در ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل، به چاهک‌های ۹۶ خانه (BD Pharmingen) اضافه شد. در چاهک‌هایی که اثر HCV-core بررسی می‌شد، آنتی‌بادی ضد CD49d (۱ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) (Ebioscience)، آنتی‌بادی ضد CD28 (۱ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) (Ebioscience) و آنتی‌ژن نوکلئوکپسید (۱۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) اضافه شد. آنتی‌ژن نوکلئوکپسید به‌صورت هدیه از دکتر ژان پیر (Jeen Pear) (فرانسه) دریافت شد. در چاهک‌های کنترل منفی، سلول‌ها در کنار محیط کشت قرار گرفت. چاهک‌هایی که به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده بود توسط آنتی‌بادی ضد CD-3 (Ebioscience) پوشانده شد؛ سپس به آن چاهک‌ها به همان تعداد PBMCs و نیز آنتی‌بادی ضد CD28 (۱ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) اضافه شد. استفاده

حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده شد و سپس به سلول‌ها اضافه شد. درصد متوسط سلول‌های CD_4 مثبت و CD_{25} به ترتیب ۵۰ و ۲-۱ بود. به دنبال آن رنگ‌آمیزی دو رنگی با استفاده از نشانگرهای CD_4 و FoxP3 انجام شد. درصد سلول‌های $CD_4^+FoxP3^+$ در میان جمعیت PBMCs ۰/۶-۰/۴ درصد به دست آمد. در نهایت با انجام رنگ‌آمیزی سه‌رنگی، درصد nTregs در افراد کنترل و بیمار به ترتیب ۰/۲۶ درصد و ۰/۸۳ درصد تشخیص داده شد (شکل ۱).

از آنتی‌بادی‌های کمک محرک، تحریک بهینه را برای سلول‌های T فراهم می‌کند [۲۵]. چاهک‌های کنترل منفی به دو صورت در نظر گرفته شد؛ در کنترل منفی گروه بیمار کلیه اجزای آزمون به استثنای پروتئین و در کنترل منفی سالم کلیه اجزای آزمون روی نمونه افراد سالم قرار داده شد. تمامی کشت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 دار (۵ درصد) به مدت ۱۲ ساعت انجام شد. به دنبال آن فلوسایتومتری روی سلول‌ها صورت گرفت.

۲-۶- بررسی آماری

در این مطالعه از آزمون‌های مختلف آماری اعم از آزمون t زوج برای مقایسه میانگین قبل و بعد از تحریک یا در دو گروه شبیه به هم که از لحاظ تعداد باید مساوی باشند و از آزمون t برای مقایسه میانگین یک پارامتر در دو گروه استفاده شد. با استفاده از تجزیه و تحلیل واریانس آنوا (ANOVA) میانگین گروه آزمون بیمار با کنترل منفی افراد سالم مقایسه شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها در نرم‌افزار SPSS انجام شد. تغییرات در دو گروه یا بیشتر استفاده می‌شود. مقدار P-value کمتر از ۵ درصد معنی‌دار تلقی شد.

۳- نتایج

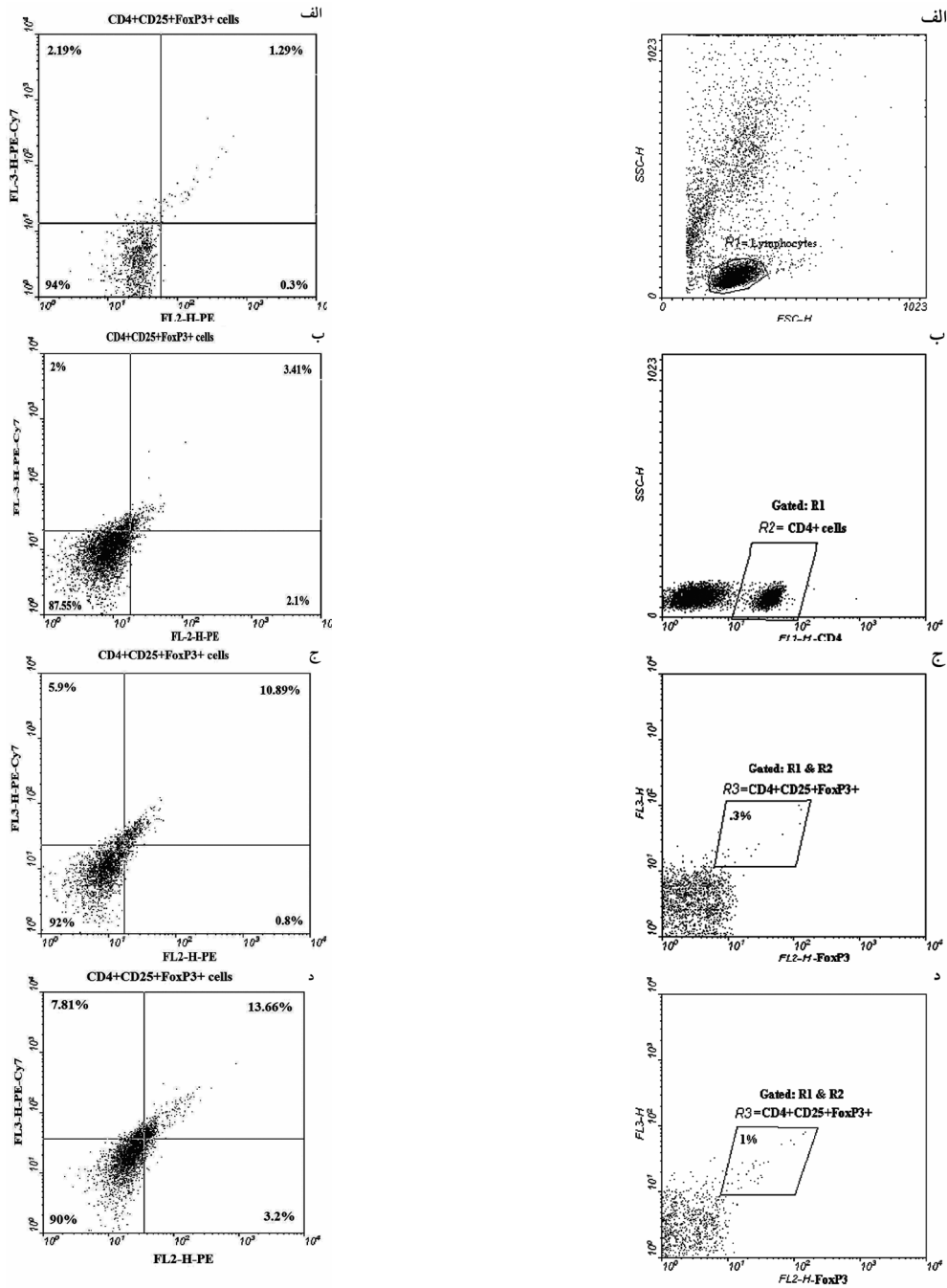
۳-۱- تشخیص nTregs

nTregs لنفوسیت‌های CD_4 T مثبت هستند که نشانگرهای CD_{25} و FoxP3 را بیان می‌کنند [۱۰، ۱۱]. به دنبال جداسازی PBMCs از نمونه خونی افراد کنترل، تشخیص nTregs بهینه شد. برای این منظور در ابتدا رقت بهینه آنتی‌بادی‌های مختلف سطحی CD_{25} و CD_4 ، توسط آزمایش‌های تیتراسیون مشخص شد. میزان مناسب آنتی‌بادی ضد CD_{25} ، ۱ میکرولیتر از استوک (Stock) آنتی‌بادی بود و برای آنتی‌بادی ضد CD_4 ، ۱ میکرولیتر از استوک آنتی‌بادی به

۳-۲- افزایش فرکانس nTregs در افراد آلوده

به HCV در پاسخ به آنتی‌ژن نوکلئوکپسید

به علت این‌که پروتئین نوکلئوکپسید یا HCV-core یک محرک ایمنی همورال و سلولی است [۲۶-۲۹]، بنابراین آنتی‌ژن نوکلئوکپسید به‌عنوان محرک در این مطالعه استفاده شد. برای بررسی این‌که آیا آنتی‌ژن نوکلئوکپسید می‌تواند باعث تکثیر اختصاصی nTregs در محیط آزمایشگاه شود، PBMCs افراد آلوده و سالم به مدت ۱۲ ساعت با آنتی‌ژن نوکلئوکپسید در کنار آنتی‌بادی‌های کمک محرک، تحریک شدند و سپس بیان همزمان نشانگرهای CD_4 ، CD_{25} و FoxP3 به‌وسیله روش فلوسایتومتری روی PBMCs بررسی شد. در شکل ۲ نشان داده شده است که به دنبال تحریک PBMCs، درصد سلول‌های $CD_4^+CD_{25}^+FoxP3^+$ در افراد آلوده در مقایسه با افراد سالم افزایش معنی‌داری داشته است ($P=0/001$). نتیجه حاصل نشانگر این بود که تکثیر nTregs تنها به دنبال تحریک با آنتی‌ژن نوکلئوکپسید در افراد بیمار اتفاق افتاده است ($P=0/001$ ، $10/56 \pm 2/57$ درصد) در صورتی که در کنترل منفی بیمار ($P=0/001$ ، $3/19 \pm 0/95$ درصد) و نیز افراد سالم ($P=0/001$ ، $1/42 \pm 0/84$ درصد) افزایش nTreg معنی‌دار نبوده است (نمودار ۱). بنابراین در عفونت HCV، آنتی‌ژن نوکلئوکپسید باعث تکثیر اختصاصی nTregs می‌شود.



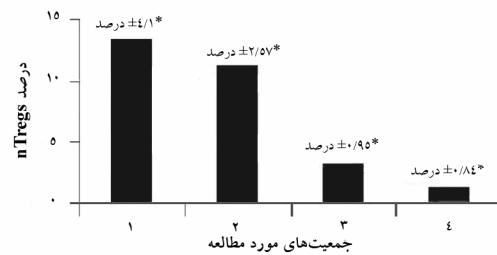
شکل ۲ کشت PBMCs افراد آلوده و کنترل؛ الف) تحریک سلول‌های افراد سالم به‌عنوان کنترل منفی در کنار آنتی‌بادی‌های کمک محرک anti-CD₂₈ و anti-CD49d بدون حضور آنتی‌ژن نوکلئوکسیسید که افزایش معنی‌دار نبوده است. ب) تحریک سلول‌های افراد آلوده به‌عنوان کنترل منفی در کنار آنتی‌بادی‌های کمک محرک anti-CD₂₈ و anti-CD49d بدون حضور آنتی‌ژن نوکلئوکسیسید که افزایش معنی‌دار نبوده است. ج) آزمون سلول‌های افراد آلوده که افزایش معنی‌دار بوده است. د) کنترل مثبت

شکل ۱ استراتژی گیت کردن سلول‌های PBMCs برای تشخیص nTregs؛ الف) در R1 جمعیتی از لنفوسیت‌ها براساس FSC و SSC گیت شده است که برای شناسایی سلول‌های CD₄⁺ انتخاب شده‌اند. ب) R2 جمعیت لنفوسیت‌های CD₄⁺ را نشان می‌دهد که از جمعیت سلول‌های R1 گرفته شده است. ج) در R3 فرکانس سلول‌های nTregs (سلول‌های CD₄⁺CD₂₅⁺FoxP3⁺) در افراد آلوده به HCV (سمت راست) در مقایسه با گروه کنترل (چپ) نشان داده شده است.

خون محیطی بیشتر است [۳۴-۳۶]. نتایج حاصل از یک پژوهش نشان می‌دهد که در سیستم آزمایشگاهی (Vitro) حذف سلول‌های $CD4^+CD25^+$ از خون محیطی منجر به افزایش تولید اینترفرون گامای (Interferon gamma: IFN- γ) اختصاصی HCV [۸] و وجود این سلول‌ها در محیط کشت باعث سرکوب سیستم ایمنی شده است [۳۷، ۳۸]. ویژگی اختصاصیت آنتی‌ژن برای Tregs هنوز به صورت قطع مشخص نشده است. در تعدادی از مطالعات نشان داده شده است که nTregs نه تنها پاسخ ایمنی اختصاصی آنتی‌ژن را تحت تأثیر قرار می‌دهد بلکه پاسخ اختصاصی علیه آنتی‌ژن‌های خارجی را نیز سرکوب می‌کند [۳۹].

کابرا (Cabrera) و همکارانش نشان دادند که سلول‌های T تنظیمی تحت تأثیر HCV-core در افراد آلوده به HCV که در مرحله مزمن هستند، نسبت به افراد بهبود یافته یا سالم بیشتر تولید می‌شود [۸] که این نتیجه توسط بلاچی (Bolacchi) و همکارانش نیز به تأیید رسیده است [۹]. اما در هیچ کدام از این مطالعات اثر این آنتی‌ژن‌ها بر PBMCs بررسی نشده است [۸، ۴۰].

تمامی این نتایج منطبق با نقش HCV-core در مزمن شدن این عفونت است. مشخص شده است که بیان پروتئین نوکلئوکسپید در حین عفونت همزمان HCV و واکسینیا (Vaccinia)، باعث سرکوب پاسخ سلول‌های T سیتوتوکسیک اختصاصی واکسینیا نیز می‌شود [۴۱]. همچنین HCV-core از تولید IFN- γ نیز جلوگیری کرده است [۴۲-۴۵]. بر پایه این نتایج می‌توان پیشنهاد کرد که احتمالاً HCV-core به عنوان یک تنظیم کننده ایمنی به نحوی عمل می‌کند تا عفونت HCV به سمت مرحله مزمن پیش رود [۴۶، ۴۷]. اما نتیجه تحقیقات در این زمینه هنوز به قطعیت نرسیده است [۴۸، ۴۹]. همچنین در مطالعه‌ای که توسط لی (Li) و همکارانش انجام شد به این نتیجه رسیدند که پپتیدهای HCV-core می‌تواند Tregs را تحریک کند؛ ضمن این که در یک فرد اپی‌توپ‌های ویژه‌ای می‌تواند Tregs را بیشتر تحریک کند و بدین ترتیب برای اولین بار وجود اپی‌توپ‌های غالب Tregs (Dominant Treg Epitopes) گزارش شد [۲۴].



نمودار ۱ بررسی تکثیر nTregs به دنبال تحریک با آنتی‌ژن نوکلئوکسپید؛ ستون ۱ افزایش nTregs در کنترل مثبت را نشان می‌دهد و در ستون ۲ نتایج حاصل از تحریک PBMCs افراد آلوده با آنتی‌ژن نوکلئوکسپید و آنتی‌بادی‌های کمک محرک را نشان می‌دهد که افزایش آن نسبت به ستون‌های ۳ و ۴ که به ترتیب کنترل منفی گروه بیمار و کنترل منفی گروه سالم هستند، معنی‌دار بوده است. (*: انحراف معیار)

۴- بحث

بسیاری از عفونت‌های ویروسی منجر به سرکوب بعضی از عملکردهای سیستم ایمنی می‌شود [۲، ۲۹، ۳۱]. HCV نیز از مکانیسم‌های متعددی مانند استفاده از پروتئین‌هایی مثل NS3/4a برای جلوگیری از پاسخ‌های ضد ویروسی سلولی، ایجاد جهش‌های فراری در اپی‌توپ‌های لئوسیت‌های B و لئوسیت‌های T سیتوتوکسیک (Cytotoxic T Lymphocyte: CTL) [۳۱] و نیز تولید کوآسی‌اسپیشز (Quasispecies) برای فرار از سیستم ایمنی، استفاده می‌کند [۳۲]. از طرفی با محدود شدن پاسخ‌های کارآی سلول‌های T و فعال شدن Tregs ممکن است که در سیستم ایمنی نقص ایجاد شود و بدین ترتیب ریشه‌کنی عفونت‌های ویروسی ممکن نشود. از طرفی فعالیت Tregs سبب محدود شدن آسیب‌های وارده به بافت به دنبال پاسخ‌های ضد ویروسی سیستم ایمنی می‌شود [۳۳].

در مقابل در مطالعات دیگر گزارش شده است که فرکانس Tregs به صورت معکوس با وضعیت التهاب کبدی ارتباط دارد. این نتیجه نشان می‌دهد که Tregs می‌تواند موجب سرکوب بیماری‌زایی به واسطه سلول‌های T شود [۸]. در بیمارانی که در مرحله عفونت مزمن HCV هستند، نشان داده شده است که در مقایسه با گروه کنترل سالم، درصد Tregs در

در واقع طبیعت شناسایی آنتی‌ژن توسط nTregs در هنگام عفونت، یک مرحله مقدماتی برای طراحی استراتژی‌های مرتبط با عملکرد Tregs در هنگام عفونت است. به نظر می‌رسد که برای طراحی واکسن‌های ضد ویروسی، از اپی‌توپ‌هایی که موجب تحریک شدید Tregs می‌شود باید اجتناب کرد [۸، ۲۴]. برای به‌کارگیری و جهت‌دهی‌های احتمالی Tregs برای اهداف بالینی نیاز است که مطالعات زیادی صورت گیرد تا بتوان فعالیت و تکثیر این سلول‌ها را با توجه به هدف مورد نظر پیش برد.

۵- تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه دکتری رشته ویروس‌شناسی پزشکی است که با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس و مرکز تحقیقات کبد و گوارش دانشگاه علوم پزشکی تهران به انجام رسیده است. نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از دکتر آلبرتو برگامینی، دکتر ژان پیر و دکتر شهرام کوردستی اعلام می‌دارند. همچنین از پرسنل بیمارستان شریعی تهران و سازمان انتقال خون تهران و نیز از همکاری صمیمانه جناب آقای دکتر امانی مشاور آماری صمیمانه تشکر و سپاسگزاری می‌نمایند.

برخلاف مطالعات دیگر که رفتار Tregs در میان سلول‌های CD₄ T جداسازی شده از خون محیطی ارزیابی شده است، در بررسی حاضر از PBMCs استفاده شد تا مدل‌سازی دقیق‌تری از عفونت HCV مهیا شود. علاوه بر این؛ با استفاده از روش مذکور، از خرید کیت‌های جداسازی CD₄ T که بسیار گران هستند و علاوه بر زمان‌بر بودن مراحل انجام آزمایش، به میزان زیادی نمونه خونی هم نیاز دارد جلوگیری شد.

با استفاده از روش دستی که برای شناسایی nTregs در این مطالعه استفاده شد، درصد سلول‌های CD₄ مثبت، سلول‌های CD₂₅ مثبت و nTregs در میان PBMCs به ترتیب ۵۰ درصد، ۱/۴۵ درصد و ۰/۲۶ درصد ارزیابی شد که با گزارش‌های قبل مطابقت داشت [۲۴، ۵۰، ۵۱].

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که جمعیت nTregs به‌دنبال تحریک با آنتی‌ژن نوکلئوکسپید در افراد آلوده به HCV در مقایسه با افراد سالم افزایش می‌یابد؛ بنابراین Tregs برای آنتی‌ژن اختصاصیت (Antigen-specific) دارد. همچنین احتمال می‌رود که آنتی‌ژن نوکلئوکسپید با افزایش nTregs می‌تواند باعث مزمن شدن عفونت HCV شود چرا که Tregs یک تنظیم‌کننده ایمنی است و بدین ترتیب احتمالاً پروتئین نوکلئوکسپید با افزایش این سلول‌ها به‌عنوان یکی از آنتی‌ژن‌های HCV که می‌تواند سیستم ایمنی را هدایت کند، عمل می‌کند [۴۶، ۴۷].

۶- منابع

- [1] van der Poel CL, Cuypers HT, Reesink HW. Hepatitis C virus six years on. *Lancet* 1994; 344(8935): 1475-9.
- [2] Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 2000; 81: 1631-48.
- [3] Dutoit V, Ciuffreda D, Comte D, Gonvers JJ, Pantaleo G. Differences in HCV-specific T cell responses between chronic HCV infection and HIV/HCV co-infection. *Eur J Immunol* 2005; 35(12): 3493-504.
- [4] Gowans EJ, Jones KL, Bharadwaj M, Jackson DC. Prospects for dendritic cell vaccination in persistent infection with hepatitis C virus. *J Clin Virol* 2004; 30(4): 283-90.
- [5] Accapezzato D, Francavilla V, Paroli M, Casciaro M, Chircu LV, Cividini A, Abrignani S, Mondelli MU, Barnaba V. Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8(+) T cell population in chronic hepatitis C virus infection. *J Clin Invest* 2004; 113(7):

- 963-72.
- [6] Semmo N, Day CL, Ward SM, Lucas M, Harcourt G, Loughry A, Klenerman P. Preferential loss of IL-2-secreting CD4+ T helper cells in chronic HCV infection. *Hepatology* 2005; 41(5): 1019-28.
- [7] Rijnbrand R, Bredenbeek PJ, Haasnoot PC, Kieft JS, Spaan WJ, Lemon SM. The influence of downstream protein-coding sequence on internal ribosome entry on hepatitis C virus and other flavivirus RNAs. *RNA* 2001; 7(4): 585-97.
- [8] Cabrera R, Tu Z, Xu Y, Firpi RJ, Rosen HR, Liu C, Nelson DR. An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2004; 40(5): 1062-71.
- [9] Bolacchi F, Sinistro A, Ciaprini C, Demin F, Capozzi M, Carducci FC, Drapeau CM, Rocchi G, Bergamini A. Increased hepatitis C virus (HCV)-specific CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes and reduced HCV-specific CD4+ T cell response in HCV-infected patients with normal versus abnormal alanine aminotransferase levels. *Clin Exp Immunol* 2006; 144(2): 188-96.
- [10] Shevach EM, DiPaolo RA, Andersson J, Zhao DM, Stephens GL, Thornton AM. The lifestyle of naturally occurring CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. *Immunol Rev* 2006; 212: 60-73.
- [11] Tsuji NM. Antigen-specific CD4(+) regulatory T cells in the intestine. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2006; 5(3): 191-201.
- [12] Chatenoud L, Salomon B, Bluestone JA. Suppressor T cells--they're back and critical for regulation of autoimmunity! *Immunol Rev* 2000; 182: 149-63.
- [13] Khanna A, Kapur S, Sharma V, Li B, Suthanthiran M. In vivo hyperexpression of transforming growth factor-beta1 in mice: stimulation by cyclosporine. *Transplantation* 1997; 63(7): 1037-9.
- [14] Rouse BT, Suvas S. Regulatory T cells and immunity to pathogens. *Expert Opin Biol Ther* 2007; 7(9): 1301-9.
- [15] Li S, Gowans EJ, Chougnet C, Plebanski M, Dittmer U. Natural regulatory T cells and persistent viral infection. *J virol* 2008; 82(1): 21-30.
- [16] Manigold T, Racanelli V. T-cell regulation by CD4 regulatory T cells during hepatitis B and C virus infections: facts and controversies. *Lancet Infect Dis* 2007; 7(12): 804-13.
- [17] Robertson SJ, Hasenkrug KJ. The role of virus-induced regulatory T cells in immunopathology. *Springer Semin Immunopathol* 2006; 28(1): 51-62.
- [18] Aandahl EM, Michaëlsson J, Moretto WJ, Hecht FM, Nixon DF. Human CD4+ CD25+ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. *J Virol* 2004; 78(5): 2454-9.
- [19] Hsieh CS, Liang Y, Tzysnik AJ, Self SG, Liggitt D, Rudensky AY. Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors. *Immunity* 2004; 21(2): 267-77.
- [20] Sugimoto K, Ikeda F, Stadanlick J, Nunes FA, Alter HJ, Chang KM. Suppression of HCV-

- specific T cells without differential hierarchy demonstrated *ex vivo* in persistent HCV infection. *Hepatology* 2003; 38(6): 1437-48.
- [21] Boettler T, Spangenberg HC, Neumann-Haefelin C, Panther E, Urbani S, Ferrari C, Blum HE, von Weizsäcker F, Thimme R. T cells with a CD4+CD25+ regulatory phenotype suppress *in vitro* proliferation of virus-specific CD8+ T cells during chronic hepatitis C virus infection. *J Virol* 2005; 79(12): 7860-7.
- [22] Boyer O, Saadoun D, Abriol J, Dodille M, Piette JC, Cacoub P, Klatzmann D. CD4+CD25+ regulatory T-cell deficiency in patients with hepatitis C-mixed cryoglobulinemia vasculitis. *Blood* 2004; 103(4): 3428-30.
- [23] Heeg MH, Ulsenheimer A, Grüner NH, Zchoval R, Jung MC, Gerlach JT, Raziorrouh B, Schraut W, Horster S, Kauke T, Spannagl M, Diepolder HM. FOXP3 expression in hepatitis C virus-specific CD4+ T cells during acute hepatitis C. *Gastroenterology* 2009; 137(4): 1280-8.
- [24] Li S, Jones KL, Woollard DJ, Dromej J, Paukovics G, Plebanski M, Gowans EJ. Defining target antigens for CD25+ FOXP3 + IFN-gamma- regulatory T cells in chronic hepatitis C virus infection. *Immunol Cell Biol* 2007; 85(3): 197-204.
- [25] Waldrop SL, Davis KA, Maino VC, Picker LJ. Normal human CD4+ memory T cells display broad heterogeneity in their activation threshold for cytokine synthesis. *J Immunol* 1998; 161(10): 5284-95.
- [26] Koskinas J, McFarlane BM, Nouri-Aria KT, Tibbs CJ, Mizokami M, Donaldson PT, McFarlane IG, Williams R. Cellular and humoral immune reactions against auto-antigens and hepatitis C viral antigens in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 1994; 107(5): 1436-42.
- [27] Hu GJ, Wang RY, Han DS, Alter HJ, Shih JW. Characterization of the humoral and cellular immune responses against hepatitis C virus core induced by DNA-based immunization. *Vaccine* 1999; 17(23-24): 3160-70.
- [28] Aandahl EM, Michaëlsson J, Moretto WJ, Hecht FM, Nixon DF. Human CD4+ CD25+ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. *J Virol* 2004; 78(5): 2454-9.
- [29] Kinter AL, Hennessey M, Bell A, Kern S, Lin Y, Daucher M, Planta M, McLaughlin M, Jackson R, Ziegler SF, Fauci AS. CD25(+)/CD4(+) regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4(+) and CD8(+) HIV-specific T cell immune responses *in vitro* and are associated with favorable clinical markers of disease status. *J Exp Med* 2004; 200(3): 331-43.
- [30] Suvas S, Kumaraguru U, Pack CD, Lee S, Rouse BT. CD4+CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses. *J Exp Med*. 2003; 198(6): 889-901.
- [31] Gale M Jr, Foy EM. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature* 2005; 436(7053): 939-45.
- [32] Chisari FV. Unscrambling hepatitis C virus-

- host interactions. *Nature* 2005; 436(7053): 930-2.
- [33] Erickson AL, Kimura Y, Igarashi S, Eichelberger J, Houghton M, Sidney J, McKinney D, Sette A, Hughes AL, Walker CM. The outcome of hepatitis C virus infection is predicted by escape mutations in epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 2001; 15(6): 883-95.
- [34] Vahlenkamp TW, Tompkins MB, Tompkins WA. The role of CD4+CD25+ regulatory T cells in viral infections. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 108(1-2): 219-25.
- [35] Yoshizawa K, Abe H, Kubo Y, Kitahara T, Aizawa R, Matsuoka M, Aizawa Y. Expansion of CD4(+)/CD25(+)/FoxP3(+) regulatory T cells in hepatitis C virus-related chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2010; 40(2): 179-87.
- [36] Ward SM, Fox BC, Brown PJ, Worthington J, Fox SB, Chapman RW, Fleming KA, Banham AH, Klenerman P. Quantification and localisation of FOXP3+ T lymphocytes and relation to hepatic inflammation during chronic HCV infection. *J Hepatol* 2007; 47(3): 316-24.
- [37] Jones RC, Capen DE, Cohen KS, Munn LL, Jain RK, Duda DG. A protocol for phenotypic detection and characterization of vascular cells of different origins in a lung neovascularization model in rodents. *Nat Protoc* 2008; 3(3): 388-97.
- [38] Peng G, Li S, Wu W, Sun Z, Chen Y, Chen Z. Circulating CD4+ CD25+ regulatory T cells correlate with chronic hepatitis B infection. *Immunology* 2008; 123(1): 57-65.
- [39] Yang XH, Yamagiwa S, Ichida T, Matsuda Y, Sugahara S, Watanabe H, Sato Y, Abo T, Horwitz DA, Aoyagi Y. Increase of CD4+ CD25+ regulatory T-cells in the liver of patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2006; 45(2): 254-62.
- [40] Suffia IJ, Reckling SK, Piccirillo CA, Goldszmid RS, Belkaid Y. Infected site-restricted Foxp3+ natural regulatory T cells are specific for microbial antigens. *J Exp Med* 2006; 203(3): 777-88.
- [41] Lemon SM, Walker C, Alter MJ, Yi M. Hepatitis C virus: *Fields Virology*. 5th ed., Lippincott Williams & Wilkins publication, 2007; p: 1151-2.
- [42] Kittlesen DJ, Chianese-Bullock KA, Yao ZQ, Braciale TJ, Hahn YS. Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation. *J Clin Invest* 2000; 106(4): 1239-49.
- [43] Yao ZQ, Eisen-Vandervelde A, Ray S, Hahn YS. HCV core/gC1qR interaction arrests T cell cycle progression through stabilization of the cell cycle inhibitor p27Kip1. *Virology* 2003; 314(1): 271-82.
- [44] Yao ZQ, Eisen-Vandervelde A, Waggoner SN, Cale EM, Hahn YS. Direct binding of hepatitis C virus core to gC1qR on CD4+ and CD8+ T cells leads to impaired activation of Lck and Akt. *J Virol* 2004; 78(12): 6409-19.
- [45] Yao ZQ, Nguyen DT, Hiotellis AI, Hahn YS. Hepatitis C virus core protein inhibits human T lymphocyte responses by a complement-dependent regulatory pathway. *J Immunol* 2001; 167(9): 5264-72.
- [46] Eisen-Vandervelde AL, Waggoner SN, Yao

- ZQ, Cale EM, Hahn CS, Hahn YS. Hepatitis C virus core selectively suppresses interleukin-12 synthesis in human macrophages by interfering with AP-1 activation. *J Biol Chem* 2004; 279(42): 43479-86.
- [47] Large MK, Kittlesen DJ, Hahn YS. Suppression of host immune response by the core protein of hepatitis C virus: possible implications for hepatitis C virus persistence. *J Immunol* 1999; 162(2): 931-8.
- [48] Sun J, Bodola F, Fan X, Irshad H, Soong L, Lemon SM, Chan TS. Hepatitis C virus core and envelope proteins do not suppress the host's ability to clear a hepatic viral infection. *J Virol* 2001; 75(24): 11992-8.
- [49] Liu ZX, Nishida H, He JW, Lai MM, Feng N, Dennert G. Hepatitis C virus genotype 1b core protein does not exert immunomodulatory effects on virus-induced cellular immunity. *J Virol* 2002; 76(3): 990-7.
- [50] Rallón NI, López M, Soriano V, García-Samaniego J, Romero M, Labarga P, García-Gasco P, González-Lahoz J, Benito JM. Level, phenotype and activation status of CD4+FoxP3+ regulatory T cells in patients chronically infected with human immunodeficiency virus and/or hepatitis C virus. *Clin Exp Immunol* 2009; 155(1): 35-43.
- [51] Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001; 167(3): 1245-53.