AUMJ Journal Alborz University of Medical Sciences
نشریه دانشگاه علوم پزشکی البرز، زمستان ۱۴۰۲، سال ۱۳، شماره ۱، صفحه‌های ۱۶-۹
مقاله تحقیقی

مقایسه میزان بیان PD-1 در خون محیطی بیماران مولتیپل اسکلروزیس و نورومیلیت اپتیکا

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۱۲/۱۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۲۷

طیبه آقایی[۱،۲]
ملیکا گرگانی[۱،۲]
مرتضی مطلب نژاد[۱،۲]
میر هادی جزایری[۱،۲*]

۱- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
۲- مرکز تحقیقات ایمونولوژی، پژوهشکده ایمونولوژی و بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول:
استادیار گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
تلفن: +۹۸۹۱۲۳۵۴۱۰۶۷
ایمیل: hoohadi@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: گیرنده PD-1 یا مرگ برنامه ریزی شده سلولی-۱، یکی از گیرنده‌های مهم مهارکننده در حفظ تحمل یا تولرانس و مهار تکثیر و فعالیت سلول‌های ایمنی فعال است. PD-1 تکثیر سلول‌های T تنظیمی و مهار سلول‌های T خود واکنشگر را افزایش می‌دهد و تحمل مرکزی و محیطی را تنظیم می‌کند. مولتیپل اسکلروزیس (MS) و نورومیلیت اپتیکا (NMO) اختلالات عصبی هستند که با التهاب، دمیلینه شدن توسط سیستم ایمنی و آسیب آکسونی و عصبی در سیستم عصبی مرکزی مشخص می‌شوند. تظاهرات بالینی NMO بسیار شبیه به MS است و منجر به تشخیص اشتباه می‌شود. بنابراین وجود بیومارکرها یا نشانگرهای تشخیصی خاص برای تشخیص صحیح بیماری‌های مدنظر، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

مواد و روش‌ها: در اینجا، بیان ژن PD-1 را در ۴۰ بیمار MS، ۲۰ بیمار NMO و ۱۵ فرد سالم بررسی کردیم. بدین منظور، پس از استخراج RNA از خون افراد مورد مطالعه و سنتز cDNA، بیان ژن PD-1 با استفاده از روش کمی PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان می‌دهد که بیان mRNA ژن PD-1در خون محیطی گروه بیماران MS در مقایسه با گروه بیماران NMO و گروه افراد سالم به طور قابل توجهی افزایش یافته است (به ترتیب با احتمال معنا داری p=۰/۰۰۰۸ و p=۰/۰۰۲۴) با این حال، از نظر آماری تفاوت معنی داری در بیان mRNA ژن PD-1 بین گروه NMO و گروه سالم وجود نداشت.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه ما نشان می‌دهد که سطح بیان mRNA PD-1 در بین بیماران این دو گروه تفاوت معنی داری دارد و پس از انجام مطالعات بیشتر در این زمینه، می‌توان از این ژن به عنوان بیومارکر تشخیصی برای افتراق این دو بیماری استفاده کرد.

کلمات کلیدی: مولتیپل اسکلروزیس، نورومیلیت اپتیکا، تشخیص اشتباه، PD-L1، PD-1، سلول T، بیان ژن

مقدمه

سیستم ایمنی برای دفاع در برابر عوامل بیماری زای مختلف در بدن تکامل یافته است و همچنین باید از حمله به عوامل غیر بیگانه در بدن و خودواکنشگری و در نتیجه از ایجاد بیماری‌های خود ایمنی جلوگیری کند. به همین دلیل، سیستم ایمنی مکانیسم‌های مختلفی را به کار می‌گیرد از جمله بیان مولکول‌های کمک محرک و بازدارنده در سلول‌های متنوع و تعادل بین سیگنال‌های تنظیمی مثبت و منفی برای حفظ تحمل و تعدیل پاسخ‌های ایمنی [۱-۳]. فعال سازی و تنظیم پاسخ سلول‌های T یک رویداد پیچیده است و مولکول‌های ابرخانواده B7-CD28 با بیان مولکول‌های کمک محرک و بازدارنده، نقش کلیدی در فعال‌سازی و عملکرد این سلول‌ها دارند. ابرخانواده B7-CD28 تعادل بین سیگنال‌های محرک و مهاری را برای دفاع در برابر پاتوژن‌ها و تحمل به آنتی ژن‌های خودی تنظیم می‌کند [۴،۵]. جدیدترین عضو ابرخانواده CD28-B7، مولکول مرگ سلولی برنامه ریزی شده-۱یا (PD-1؛ CD279) است که توسط ژن PDCD1 واقع در کروموزوم 2q37 در انسان، کدگذاری شده و یکی از گیرنده‌های مهم مهارکننده درحفظ تحمل و مهار تکثیر و فعالیت سلول‌های T است. PD-1 ابتدا به عنوان یک مولکول مرتبط با فرآیند آپوپتوز معرفی شد و متعاقباً مشخص شد که یک مولکول بازدارنده است که پاسخ ایمنی را تنظیم می‌کند PD-1. [۲،۶،۷] توسط انواع سلول‌های ایمنی فعال شده از جمله سلول‌های T فعال، بیان می‌شود و از تکثیر و تولید سیتوکین‌های این سلول‌ها و فعالیت سلول‌های T سیتوتوکسیک (CTL) جلوگیری می‌کند. این مولکول یک گلیکوپروتئین گذرنده نوع) 288 I اسید آمینه؛ ۵۵ کیلو دالتون) است که یک گیرنده حاوی یک موتیف مهاری ایمونوتیروزین (ITIM) و یک موتیف سوئیچ ایمونوتیروزین است PD-1. [۲،۸-۱۱] به دو لیگاند شناخته شده متصل می‌شود،) PD–L1 همچنین به عنوان CD274؛ B7-H1 نیز شناخته می‌شود) و) PD-L2 همچنین به عنوان CD273؛ B7–DC نیز شناخته می‌شود) که ۳۸٪ مشابه هستند و پروتئین‌های غشایی نوع I هستند که دارای یک الگوی بیان متفاوت PD-L1 می‌باشند. PD–L1 دارای توزیع بافتی وسیع است و در سطح سلول‌های T، سلول‌های B، سلول‌های دندریتیک و ماکروفاژها بیان می‌شود، اما PD–L2 توزیع بافتی محدود تری دارد و در سطح سلول‌های دندریتیک و ماکروفاژها بیان می‌شود. این تفاوت در توزیع بیان لیگاندها، احتمالاً به دلیل عملکرد متمایز آنها است PD–L. [۶،۹،۱۰] به دلیل نقش مهمی که در تنظیم سیستم ایمنی دارد، تکثیر سلول‌های T تنظیمی و مهار سلول‌های T خود واکنشگر را افزایش می‌دهد و تحمل مرکزی و محیطی را تنظیم می‌کند. توزیع بافتی گسترده لیگاندها در این مسیر، جنبه‌های مختلف سیستم ایمنی را تحت تاثیر قرار داده است و در انواع بیماری‌ها از جمله بیماری‌های خودایمنی و سرطان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است [۱۲،۱۸].

مولتیپل اسکلروزیس (MS) یک اختلال عصبی است که با التهاب و نفوذ سلول‌های ایمنی فعال شده به سیستم عصبی مرکزی، دمیلینه شدن، آسیب آکسونی و عصبی در CNS مشخص می‌شود که در نهایت منجر به ناتوانی‌های قابل توجهی در بیماران، به ویژه بزرگسالان جوان (محدوده سنی ۴۵-۲۰) می‌شود. علت بیماری MS تاکنون نسبتاً ناشناخته است اما عوامل مختلف محیطی، ژنتیکی و اپی ژنتیکی در بیماری زایی این اختلال دخیل هستند. ام اس یک بیماری التهابی مزمن با واسطه سیستم ایمنی در نظر گرفته می‌شود زیرا مکانیسم‌های ایمنی در این بیماری منجر به التهاب در CNS می‌شود. یکی از مکانیسم‌های مهم ایمونولوژیک درگیر در این بیماری، فعال شدن و انتقال سلول‌های T خود واکنشگر به CNS است که در نهایت باعث التهاب بافتی و دمیلینه شدن عصب می‌شود. بیماران الگوهای بالینی متفاوتی را نشان می‌دهند که به چهار گروه اصلی طبقه بندی می‌شوند: عودکننده- فروکش کننده (RRMS)، پیشرونده ثانویه (SPMS)، پیشرونده اولیه (PPMS) و پیشرونده عود کننده (PRMS). بیش از ۸۰ درصد بیماران در گروه RRMS هستند [۱۰،۱۲-۱۴]. مطالعات انجام شده در زمینه بهبود بیماری‌های عصبی نشان داده است که عصاره جفت انسان توانسته است علائم بالینی ام اس را بهبود بخشد و سطح سایتوکاین‌های التهابی را در این بیماری کاهش دهد [۱۵]. همچنین در این راستا نشان داده شده است که نانوتکنولوژی با طراحی نانوذرات طلا (GNPs) با خواص ضدالتهابی و آنتی اکسیدانی، توانسته است اثرات مثبت زیادی بر سلول‌های عصبی ایجاد کند و از شدت برخی بیماری‌های عصبی بکاهد [۱۶،۱۷] . در راستای نقش تنظیم کننده ایمنی مولکول PD-1 و بیماری ام اس، مطالعات متعددی گزارش شده است که مهار یا حذف مولکول PD-1 با افزایش سطح سایتوکین‌های التهابی و نفوذ سلول‌های ایمنی به CNS همراه است. مطالعات همچنین پلی‌مورفیسم‌هایی را در ژن PD-1 نشان داده‌اند، مانند PD 1.3 SNP، که با کاهش فعالیت پروتئین PD-1 و افزایش خطر ابتلا و شیوع بیماری ام‌اس مرتبط است [۱۸].

یکی دیگر از اختلالات عصبی رایج Neuromyelitis Optica

(NMO) است که مانند ام اس یک اختلال در سیستم عصبی مرکزی است و یک بیماری خود ایمنی است. عوامل ژنتیکی و ایمونولوژیکی مختلفی در پاتوژنز NMO دخیل هستند و باعث تظاهرات بالینی ناهمگن مانند التهاب، دمیلینه شدن شدید توسط سیستم ایمنی و آسیب عصبی به عصب بینایی می‌شوند. این بیماری از دیرباز به عنوان یکی از انواع بیماری ام اس در نظر گرفته شده است، اما ویژگی‌های پاتولوژیک و ایمونولوژیک آن با ام اس متفاوت است، به ویژه شناسایی سطوح بالای آنتی بادی Aquaporin-4 (AQP4) در سرم افراد مبتلا به NMO که منجر به تمایز تشخیص با MS می‌شود. آنتی بادی AQP4 (به یک کانال بیان شده در سلول‌های آستروسیت متصل می‌شود و منجر به آسیب پاتولوژیک به CNS می‌شود) نقش مهمی در پاتوژنز این بیماری دارد. با این حال، این آنتی بادی برای برخی از بیماران مبتلا به NMO منفی گزارش شده است که تشخیص و تمایز صحیح این بیماری از MS را دشوار می‌کند. بنابراین، شناسایی بیومارکرهای جدید با حساسیت و ویژگی بالا برای تشخیص افتراقی NMO از مولتیپل اسکلروزیس و سایر بیماری‌های دمیلینه کننده سیستم عصبی بسیار مهم است، زیرا علی رغم شباهت‌های بین MS و NMO، درمان هر یک متفاوت است [۱۹-۲۶]. علاوه بر این، فرض بر این است که بین نشانگر PD-1 و بیماری NMO ارتباط وجود دارد و درمان‌هایی مانند Nivolumab که این نشانگر را مهار می‌کنند، می‌توانند فعالیت لنفوسیت‌های Th2 و B را افزایش دهند، تولید آنتی‌بادی‌های ضد AQP4 را القا کنند و پاسخ‌های ایمنی و التهابی را در سلول‌های عصبی و ایمنی که به نوبه خود می‌تواند باعث این بیماری شود افزایش دهند. [۲۷]. در راستای مجموعه‌ای از مطالعات مربوط به تفاوت بین بیماری MS و NMO، نشان داده شده است که درصد سلول‌های B در خون محیطی بیماران ام اس بیشتر از NMO و درصد سلول‌های NK در هر دو گروه بیمار بیشتر از گروه افراد سالم می‌باشد [۲۸]. از این رو، با توجه به اهمیت تشخیص افتراقی بیماری نورومیلیت اپتیکا از مولتیپل اسکلروزیس، این مطالعه با هدف بررسی میزان بیان PD-1 در سرم بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس و نورومیلیت اپتیکا با استفاده از رویکرد مبتنی بر بیومارکر برای تشخیص افتراقی این بیماران انجام شد.

مواد و روش‌ها

جمعیت مطالعه

برای این مطالعه از ٤٠ بیمار مبتلا به ام اس، ۲۰ بیمار NMO و ۱۵ فرد سالم به عنوان گروه کنترل نمونه خون گرفته شد. بیماران مبتلا به ام اس و NMO به ترتیب بر اساس معیارهای مک دونالد و وینگرچوک تشخیص داده شدند. همچنین، ارزیابی شدت بیماری با استفاده از نمره وضعیت ناتوانی گسترده (EDSS) انجام شد. بیماران NMO بر اساس وجود آنتی بادی‌های NMO–IgG تشخیص داده شدند. بیماران ام اس سابقه عود و علائم بالینی داشتند و هیچ گونه درمان تعدیل کننده ایمنی دریافت نکرده بودند. گروه کنترل نیز فاقد بیماری خودایمنی یا سابقه خانوادگی بیماری‌های التهابی بودند. این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران تایید شد. حدود ۲ میلی‌لیتر نمونه خون محیطی از همه افراد برای استخراج RNA با استفاده از خونگیری سیاهرگی گرفته شد و در لوله‌های حاوی EDTA جمع آوری شد.

استخراج RNA

RNA با استفاده از کیت کوچک RNeasy Qiagen)، آلمان) مطابق دستورالعمل سازنده استخراج شد. کمیت و کیفیت RNAهای استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتر NanoDrop در طول موج ۲٦۰/۲۸۰ نانومتر (NanoDrop ND–2000C Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, USA) و الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ تعیین شد.

رونویسی معکوس و سنتز DNA مکمل

طبق دستورالعمل سازنده، RNAهای استخراج شده با استفاده از کیت سنتز cDNA Revertaid First، (#K1632, Fermentas, Thermo Fisher Scientific) به DNA مکمل رشته اول (cDNA) رونویسی شدند. به طور خلاصه، ٤ میکرولیتر از RNA استخراج شده (۳۰ میکروگرم) با ۱ میکرولیتر پرایمر هگزامر تصادفی و ۷ میکرولیتر آب مقطر بدون RNase،در لوله بدون RNase اضافه شد. پس از مخلوط کردن محتویات فوق به کمک ورتکس سریع، مخلوط به مدت ۵ دقیقه در دمای ٦۵ درجه سانتیگراد انکوبه شد. پس از قرار دادن مخلوط فوق روی یخ، مخلوطی از بافر واکنش (٤ میکرولیتر) dNTP (۲ میکرولیتر)، بازدارنده RNase ۱)میکرولیتر) و آنزیم رونوشت بردار معکوس (۱ میکرولیتر) به نمونه‌ها اضافه شد. نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و سپس در دمای ٤۲ درجه سانتیگراد به مدت ٦۰ دقیقه انکوبه شدند. واکنش در

دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه متوقف شد. حجم نهایی رونویسی معکوس در هر لوله ۲۰ میکرولیتر بود.

تکنیک Real time–PCR

بیان ژن PD-1 با استفاده از پرایمرهای به‌دست‌آمده و دستگاه Chromo4 (BioRad, USA) و سیستم Step One plus PCR به کمک تکنیک real time PCRتعیین شد. مجموعه پرایمرهای اختصاصی برای mRNA ژن PD-1 و گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH) با استفاده از ابزار طراحی پرایمر، NCBI، NIH (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) طراحی شد. همچنین برای تعیین ویژگی و دقت پرایمرها از ابزار NCBI Primer Blast Tool استفاده شد. همچنین برای تعیین اختصاصیت و دقت پرایمرها از ابزار NCBI Primer Blast Tool (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) استفاده شد.

ری اکشن میکس در هر لوله حاوی ۱۰ میکرولیتر از مستر میکس SYBR Green PCR، (ژاپن، Takara)، ٤/٨ میکرولیتر آب مقطر بدون RNase، ٦/٠ میکرولیتر پرایمر (۳/۰ میکرولیتر پرایمر فوروارد و ۳/۰ میکرولیتر پرایمر معکوس) و ۱ میکرولیتر cDNA می‌باشد. حجم نهایی ری اکشن میکس ۲۰ میکرولیتر بود. شرایط RT–qPCR به شرح زیر بود: ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، سپس ٤٠ سیکل ۱۵ ثانیه‌ای در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، ۱۰ ثانیه در دمای ٦٤ درجه سانتی گراد و ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد. سطوح بیان نسبی mRNAهای هدف(PD-1) در تمام نمونه‌های آزمایش اندازه‌گیری شد و با سطوح بیان mRNAژن GAPDH به عنوان یک ژن house keeping نرمالایز شد. سطح بیان mRNA نسبی PD-1 با استفاده از روش 2-ΔΔCT محاسبه و آزمایش به صورت duplicateانجام شد.

آنالیزهای آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و ارائه‌های گرافیکی، از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۰۱/٦ (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA, www.graphpad.com) استفاده کردیم. برای مقایسه گروه‌ها از آزمون من ویتنی جفت نشده استفاده شد. تفاوت‌ها از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد ($p < ۰/۵۰$) .

نتایج

ویژگی‌های افراد مورد مطالعه

مشخصات بالینی و دموگرافیک شرکت کنندگان در مطالعه در جدول ۲ ارائه شده است. میانگین سنی (± انحراف معیار) همه گروه‌های مورد بررسی در زمان جمع آوری نمونه (بیماران MS؛ ۹/۵۸±۳۳ سال، ۷۵٪ زن ۲۵٪ مرد)، (بیماران NMO؛ ۷/٤٦±۳۵ سال، ۸۰٪ زن / ۲۰٪ مرد)، (کنترل سالم، از همان منطقه جغرافیایی؛ ۸/٤۵±۳۰ سال، ٦۷٪ زن ۳۳٪ مرد). شرکت کنندگان از نظر سن و جنس همسان بودند. نمره مقیاس وضعیت ناتوانی گسترده(EDSS) بیماران MS و NMO به ترتیب ۱/۳٦±۱/۷۵ و ۱/۱±۱/۳۳ (میانگین ± S.D) در زمان خونگیری بود.

بیان نسبی mRNA ژن PD-1

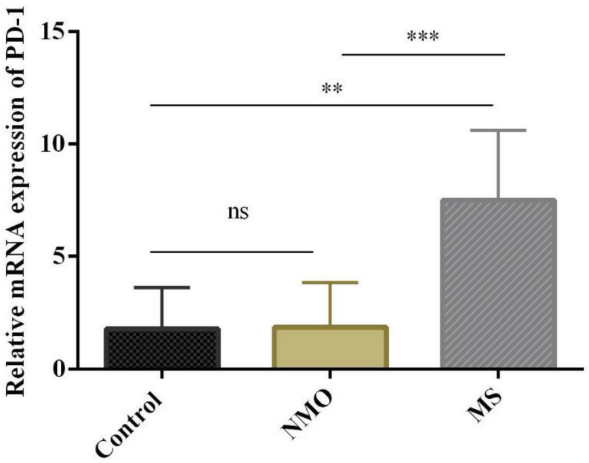
مطابق شکل ۱، بیان mRNA ژن PD-1 در خون محیطی گروه MS در مقایسه با گروه NMO (p=۰/۰۰۰۸) و گروه سالم (p=۰/۰۰۲٤) افزایش یافته است. با این حال، تفاوت معنی داری در بیان mRNA ژن PD-1 بین گروه NMO و گروه سالم وجود نداشت (p=۰/٦۸۲۵).

افزایش بیان mRNA PD-1 در بیماران MS در مقایسه با بیماران NMO و افراد سالم ***p=۰/۸۰۰۰, **p=۰/٤۲۰۰ و n.s یعنی معنی‌دار نیست.

جدول ۱. توالی پرایمرهای استفاده شده در تکنیک ریل تایم پی سی آر

ژن	توالی پرایمرها
PD-1	F: 5′-GTC TGG GCG GTG CTA CAA CT-3′ (20 mer)
	R: 5′-GCA GGT GAA GGT GGC GTT GT-3′ (20 mer)
GAPDH	F: 5′-TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-3′ (20 mer)
	R: 5′-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAC-3′ (21 mer)

جدول ۲. مشخصات بالینی گروه‌های مورد مطالعه				
گروه	تعداد	سن (میانگین انحراف معیار)	جنسیت (مرد/ زن)	مقیاس وضعیت ناتوانی گسترده
مالتیپل اسکلروزیس	۴۰	۳۳±۹/۵۸	۳۰/۱۰	۱/۳۶±۱/۷۵
نورومیلیت اوپتیکا	۲۰	۳۵±۷/۴۶	۱۶/۴	۱/۱±۱/۳۳
کنترل سالم	۱۵	۳۰±۸/۴۵	۱۰/۵	-



شکل ۱. بیان نسبی PD-1 در بیماران MS، NMO و افراد سالم

بحث

در این مطالعه، ما به اهمیت یافتن نشانگر زیستی مناسب برای افتراق بین بیماری‌های MS و NMO با وجود شباهت‌های بین این دو بیماری و چالش‌های تمایز بین آنها اشاره کردیم. سطح بیان نشانگر زیستی PD-1 به عنوان یک مولکول بازدارنده برای حفظ هموستاز ایمنی و تنظیم کننده پاسخ‌های ایمنی در سلول‌های T، در بین بیماران مبتلا به MS و NMO و افراد سالم در این مطالعه بررسی و مقایسه شد. جالب است بدانید که میزان بیان ژن PD-1 در بیماران مبتلا به ام اس نسبت به افراد سالم و بیماران مبتلا به NMO به طور قابل توجهی افزایش داشته است و در بیماران NMO در مقایسه با افراد سالم، میزان بیان این ژن تفاوت معنی داری نشان نداده است. برخلاف نتایج مطالعه ما، آزمایش دیگری نشان داد که در بیماران مبتلا به ام اس، سطح بیان mRNA ژن PD-1 کمتر از افراد سالم بود. همچنین جالب است گزارش شده که درمان بیماران مبتلا به ام اس با بتا اینترفرون (IFN-β)، بیان mRNA ژن PD-1 را در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs)، که اشاره به نقش تنظیمی و بازدارنده این مولکول دارد،در این بیماران افزایش داده است [۲۹]. همچنین گزارش شده است که بیان مولکول PD-1 در سطح سلول‌های T در بیماران مبتلا به RRMS کمتر از افراد سالم بود [۳۰]. علاوه بر این، یک مطالعه فرض کرده است که در مرحله بهبودی بیماری ام اس، بیان PD-1 به دلیل فعال شدن سلول‌های ایمنی و ترشح سیتوکین‌ها القا می‌شود [۳۱]. در رابطه با بیماری NMO، مطالعه‌ای گزارش داد که سطح بیان مولکول PD-1 در سطح سلول‌های T در مراحل اولیه بیماری NMO در مقایسه با افراد سالم بیشتر بود [۳۲]. بر اساس گزارش‌ها، می‌توان فرض کرد که وضعیت و مرحله بیماری می‌تواند بر سطح بیان نشانگر PD-1 تأثیر بگذارد. با توجه به اهمیت تمایز بین بیماری‌های MS و NMO و جلوگیری از تشخیص اشتباه به دلیل شباهت‌های این دو بیماری، استفاده از نشانگر زیستی تشخیصی برای این منظور حائز اهمیت است. نتایج مطالعه ما نشان می‌دهد که سطح بیان mRNA ژن PD-1 در بین بیماران این دو گروه تفاوت معنی داری دارد و پس از انجام مطالعات بیشتر در این زمینه، می‌توان از این ژن به عنوان بیومارکر تشخیصی برای افتراق این دو بیماری استفاده کرد.

نتیجه‌گیری

در نتیجه، آزمایش حاضر نشان داد که سطح بیان mRNA PD-1 بین بیماران MS و NMO به طور قابل توجهی متفاوت است و با انجام مطالعات بیشتر در آینده، با در نظر گرفتن حجم نمونه بزرگتر و سنجش سطح بیان mRNA ژن PD-1 در مراحل مختلف هر یک از این بیماری‌ها، فرض می‌شود که می‌توان از سطح بیان mRNA ژن PD-1 به عنوان یک نشانگر زیستی مناسب برای تشخیص و تمایز صحیح بین بیماری‌های MS و NMO استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران به خاطر حمایت‌های مالی پروژه تقدیر و تشکر می‌کنیم.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که در این مطالعه هیچگونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود نداشته است.

منابع

1. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. Immunological reviews. 2010;236(1):219-42.
2. Bardhan K, Anagnostou T, Boussiotis VA. The PD1: PD-L1/2 pathway from discovery to clinical implementation. Frontiers in immunology. 2016;7:550.
3. Chitnis T, Khoury SJ. Role of costimulatory pathways in the pathogenesis of multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. Journal of allergy and clinical immunology. 2003;112(5):837-49.
4. Pittet CL, Newcombe J, Antel JP, Arbour N. The majority of infiltrating CD8 T lymphocytes in multiple sclerosis lesions is insensitive to enhanced PD-L1 levels on CNS cells. Glia. 2011;59(5):841-56.
5. Keir ME, Francisco LM, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in T-cell immunity. Current opinion in immunology. 2007;19(3):309-14.
6. Dinesh RK, Hahn BH, Singh RP. PD-1, gender, and autoimmunity. Autoimmunity reviews. 2010;9(8):583-7.
7. Kroner A, Mehling M, Hemmer B, Rieckmann P, Toyka KV, Mäurer M, et al. A PD-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis. Annals of neurology. 2005;58(1):50-7.
8. Okazaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. International immunology. 2007;19(7):813-24.
9. Carter LL, Fouser LA, Jussif J, Fitz L, Deng B, Wood CR, et al. PD-1: PD-L inhibitory pathway affects both CD4+ and CD8+ T cells and is overcome by IL-2. European journal of immunology. 2002;32(3):634-43.
10. Pittet CL, Newcombe J, Prat A, Arbour N. Human brain endothelial cells endeavor to immunoregulate CD8 T cells via PD-1 ligand expression in multiple sclerosis. Journal of neuroinflammation. 2011;8(1):155.
11. Liang SC, Latchman YE, Buhlmann JE, Tomczak MF, Horwitz BH, Freeman GJ, et al. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. European journal of immunology. 2003;33(10):2706-16.
12. Pawlak-Adamska E, Nowak O, Karabon L, Pokryszko-Dragan A, Partyka A, Tomkiewicz A, et al. PD-1 gene polymorphic variation is linked with first symptom of disease and severity of relapsing-remitting form of MS. Journal of neuroimmunology. 2017;305:115-27.
13. Kroner A, Schwab N, Ip CW, Ortler S, Göbel K, Nave K-A, et al. Accelerated course of experimental autoimmune encephalomyelitis in PD-1-deficient central nervous system myelin mutants. The American journal of pathology. 2009;174(6):2290-9.
14. Javan MR, Aslani S, Zamani MR, Rostamnejad J, Asadi M, Farhoodi M, et al. Downregulation of immunosuppressive molecules, PD-1 and PD-L1 but not PD-L2, in the patients with multiple sclerosis. Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology. 2016;15(4):296-302.
15. Jazayeri MH, Barzaman K, Nedaeinia R, Aghaie T, Motallebnezhad M. Human placental extract attenuates neurological symptoms in the experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis-a putative approach in MS disease? Auto Immun Highlights. 2020;11(1):14.
16. Aghaie T, Jazayeri MH, Avan A, Anissian A, Salari

AA. Gold nanoparticles and polyethylene glycol alleviate clinical symptoms and alter cytokine secretion in a mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis. IUBMB Life. 2019;71(9):1313-21.

17. Aghaie T, Jazayeri MH, Manian M, Khani L, Erfani M, Rezayi M, et al. Gold nanoparticle and polyethylene glycol in neural regeneration in the treatment of neurodegenerative diseases. J Cell Biochem. 2019;120(3):2749-55.
18. Cencioni MT. The immune regulation of PD-1/PDL-1 axis, a potential biomarker in multiple sclerosis. Neuroimmunology and Neuroinflammation. 2020;7(3):277-90
19. Saheki T, Imachi H, Ibata T, Fukunaga K, Yoshioka Y, Kobayashi T, et al. A Case of Co-existing of Neuromyelitis Optica and Fulminant Type 1 Diabetes. Internal Medicine. 2019:2353-18.
20. Asgari N, Nielsen C, Stenager E, Kyvik KO, Lillevang ST. HLA, PTPN22 and PD-1 associations as markers of autoimmunity in neuromyelitis optica. Multiple Sclerosis Journal. 2012;18(1):23-30.
21. Asgari N. Epidemiological, clinical and immunological aspects of neuromyelitis optica (NMO). Dan Med J. 2013;60(10):B4730.
22. Gontika MP, Anagnostouli MC. Human leukocyte antigens-immunogenetics of neuromyelitis optica or Devic's disease and the impact on the immunopathogenesis, diagnosis and treatment: a critical review. Neuroimmunology and Neuroinflammation. 2014;1(2):44.
23. Alonso VR, de Jesus Flores Rivera J, Garci YR, Granados J, Sánchez T, Mena-Hernández L, et al. Neuromyelitis optica (NMO IgG+) and genetic susceptibility, potential ethnic influences. Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents). 2018;18(1):4-7.
24. Juryńczyk M, Craner M, Palace J. Overlapping CNS inflammatory diseases: differentiating features of NMO and MS. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2015;86(1):20-5.
25. Fan X, Jiang Y, Han J, Liu J, Wei Y, Jiang X, et al. Circulating memory T follicular helper cells in patients with neuromyelitis optica/neuromyelitis optica spectrum disorders. Mediators of inflammation. 2016;2016.
26. Kim H, Lee Y, Kim YH, Lim YM, Lee JS, Woo J, et al. Deep Learning-Based Method to Differentiate Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder From Multiple Sclerosis. Front Neurol. 2020;11:599042.
27. Khimani K, Patel SP, Whyte A, Al-Zubidi N. Case Report: Neuromyelitis Optica After Treatment of Uveal Melanoma With Nivolumab and Ipilimumab. Front Oncol. 2022;12:806501.
28. Jazayeri MH, Barzaman K, Nedaeinia R, Aghaie T, Motallebnezhad M. Human placental extract attenuates neurological symptoms in the experimental autoimmune encephalomyelitis model of multiple sclerosis-a putative approach in MS disease? Auto Immun Highlights. 2020;11(1):14.
29. Ibañez-Vega J, Vilchez C, Jimenez K, Guevara C, Burgos PI, Naves R. Cellular and molecular regulation of the programmed death-1/programmed death ligand system and its role in multiple sclerosis and other autoimmune diseases. Journal of Autoimmunity. 2021;123:102702.
30. Machcińska M, Kierasińska M, Michniowska M, Maruszewska-Cheruiyot M, Szewczak L, Rola R, et al. Reduced Expression of PD-1 in Circulating CD4+ and CD8+ Tregs Is an Early Feature of RRMS. International journal of molecular sciences. 2022;23(6):3185.
31. Li H, Zheng C, Han J, Zhu J, Liu S, Jin T. PD-1/PD-L1 Axis as a Potential Therapeutic Target for Multiple Sclerosis: AT Cell Perspective. Frontiers in Cellular Neuroscience. 2021:267.
32. Xue Q, Li X, Gu Y, Wang X, Wang M, Tian J, et al. Unbalanced Expression of ICOS and PD-1 in Patients with Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. Scientific Reports. 2019;9(1):14130.

AUMJ Journal Alborz University of Medical Sciences
Alborz University of Medical Sciences Journal, February 2024, Vol. 13, No 1: 9-16 *Original Article*

Comparison of the PD-1 expression level in peripheral blood of Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica patients

Received: 01 Mar 2023 ; Accepted: 18 Jul 2023

Tayebe Aghaie[1,2]
Melika Gorgani[1,2]
Morteza Motallebnezhad[1,2]
Mir Hadi Jazayeri[1,2*]

1- Department of Immunology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2- Immunology Research Center, Institute of Immunology and Infectious Disease, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

* Correspondence:
Department of Immunology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Tel: +989123541067
Email: hoohadi@yahoo.com

Abstract

Programmed cell death-1 (PD-1) is one of the important co-inhibitory receptors in maintaining tolerance and inhibiting the proliferation and activity of activated immune cells. PD-1: PD-L pathway enhances regulatory T cells proliferation and inhibition of autoreactive T cells and regulates central and peripheral tolerance. This pathway has affected various aspects of the immune system and is of particular importance in a variety of diseases, such as autoimmune diseases. Multiple sclerosis (MS) and Neuromyelitis Optica (NMO) are neurological disorders characterized by inflammation, demyelination by the immune system, and axonal and neuronal damage in the CNS. The clinical manifestations of NMO are very similar to MS and lead to a misdiagnosis. Therefore, the existence of specific diagnostic markers is of particular importance for correct diagnosis. Here, we examined the expression of the PD-1 gene in 40 MS patients, 20 NMO patients, and 15 healthy individuals. Thus, after RNA extraction from human blood and cDNA synthesis, gene expression of PD-1 was investigated using quantitative real-time PCR technique. The results show that the PD-1 mRNA expression in the peripheral blood of the MS group was significantly increased in comparison to that of the NMO group and healthy group ($p= 0.0008$, $p= 0.0024$, respectively). However, there was no significant difference in PD-1 mRNA expression between the NMO group and the healthy group.

Keywords: Multiple sclerosis, Neuromyelitis Optica, Misdiagnosis, PD-1, PD-L, T cell, Gene expression