www.mums.ac.ir
Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol. 64, No.4 P: 3652-3660
Sep-Nov 2021

مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
سال ۶۴، شماره ۴
مهر-آبان ۱۴۰۰، صفحه ۳۶۶۰-۳۶۵۲

مقاله اصلی

بررسی اثر تعدیل ایمنی آنتی ژن مارشالاژیا مارشالی بر سلول های دندرتیک جهت درمان بیماران آسمی

تاریخ دریافت: ۹۹/۱۰/۱۷- تاریخ پذیرش:۱۴۰۰/۰۸/۱۵

رویا براتیان[۱]
مجید میرصدرایی[۲]
هادی محب علیان[۳]
حسن برجی[۴*]

[۱] *گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران*
[۲] *گروه علوم بالینی، دانشگاه آزاد علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران*
[۳] *استادیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد*
[۴] *استاد گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد*

Email: hborji@um.ac.ir

خلاصه

مقدمه: هدف این مطالعه استفاده از سلول های دندرتیک در تعدیل پاسخ های ایمنی به سمت محافظتی با استفاده از آنتی ژن های مارشالاژیا مارشالی می باشد که می تواند منجر به تولید لنفوسیت های T تنظیمی گردند و علایم آسم را کاهش دهند.

روش کار: جهت انجام این آزمایش، سلول های تک هسته ای خون محیطی از تعداد ۱۵ بیمار آسمی و ۱۰ فرد سالم جدا شد و کشت گردید. سپس این سلول های تک هسته ای خون محیطی در مجاورت GM-CSF, IL-4 و آنتی ژن *مارشالاژیا مارشالی* به سلول های دندرتیک تعدیل کننده تبدیل شدند. سپس، این سلول های دندرتیک تعدیل کننده در مجاورت لنفوسیت های Tاین افراد به مدت ۵ روز قرار گرفتند و در نهایت غلظت سایتوکاین تنظیمی IL-10 در این محیط با روش الایزا اندازه گیری شد.

نتایج: میانگین غلظت این سایتوکاین در افراد آسمی و افراد سالم به ترتیب ۶,۸ ± ۱۴۳,۲ و ۱۳۵,۴±۵,۳ پیکوگرم در میلی لیتر بود. نتایج این مطالعه نشان داد که میزان غلظت این سایتوکاین در هر دو گروه به طور معنی داری افزایش پیدا کرده است. هم چنین غلظت این سایتوکاین در گروه آسمی بیشتر از گروه سالم بود ولی این اختلاف معنی دار نبود.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که آنتی ژن مارشالاژیا مارشالی توانایی تبدیل سلول تک هسته‌ای به سلول دندرتیک تعدیل کننده با افزایش سایتوکاین *IL-10* را دارد که این سلول‌ها درتبدیل لنفوسیت‌های *T* به سلول‌های نوع تنظیم کننده ایمنی توانمند می‌گردند. .بنابراین آنتی ژن این انگل می‌تواند در درمان بیماران آسمی با سلول‌های دندرتیک کاربرد داشته باشد.

کلمات کلیدی: مارشالاژیا مارشالی، سلول دندرتیک، لنفوسیت T، آسم

مقدمه

آسم آلرژیک، بیماری التهابی مزمن با مشخصه التهاب ائوزینوفیلی و انسداد مجاری هوایی می‌باشد و به‌وسیله سه ویژگی شناسایی می‌شود: انسداد برگشت‌پذیر مجاری هوایی، افزایش پاسخ‌پذیری برونش‌ها و التهاب برونش‌ها که سبب بروز علائم می‌شود (۱و۲). شایع‌ترین علائم آن سرفه، تنگی نفس و خس‌خس سینه می‌باشد. بیماران مبتلابه آسم به‌طور مشخصی علائم را به‌صورت تدریجی بروز می‌دهند. تخمین زده شده است که بیشتر از سیصد میلیون نفر در سراسر جهان از بیماری آسم رنج می‌برند و این تعداد در حال افزایش است (۳و۴و۵و۶). میزان شیوع آسم در کودکان (۳ تا ۳۸ درصد) بیشتر از بزرگسالان (۲ تا ۱۲ درصد) می‌باشد و نیمی از افراد مبتلابه این بیماری کودکان زیر ده سال هستند که در میان کودکان دختر شایع‌تر است. شیوع این بیماری در ایران در حدود ۱۰ تا ۱۵ درصد است (۷و۸).

شیوع آسم در کشورهای پیشرفته و همچنین شهرهای بزرگ با سطح بهداشت بالا، بسیار بیشتر از سایر کشورها می‌باشد. دراین‌ارتباط فرضیه بهداشت مطرح می‌شود که ارتباط معکوس میان شیوع آلرژی و بیماری‌های انگلی در کشورهای پیشرفته وجود دارد. افزایش مصرف آنتی‌بیوتیک و کاهش تماس با پاتوژن های باکتریال منجر به عدم تعادل ایمنی ذاتی و اکتسابی و افزایش بیماری‌های آلرژیک و آسم می‌گردد (۹).

در کشورهای درحال‌توسعه عفونت‌های کرمی شیوع زیادی دارند (۱). هم‌زمانی آلودگی با انگل‌های کرمی و کاهش میزان شیوع بیماری‌های آلرژیک در انسان باعث شده است تا تحقیقاتی درزمینه‌ی جست‌وجوی مولکول‌های کرمی با خاصیت ضدحساسیت و ضدالتهابی بالقوه به وجود بیاید. در مطالعات بر روی انسان و داده‌های تجربی از مدل‌های حیوانی شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد که عفونت با انگل‌های کرمی، با پاسخ‌های ایمنی التهابی رابطه معکوس دارد (۲, ۳).

روند رو به رشد بیماری آسم و افزایش مرگ‌ومیر ناشی از این بیماری مهلک و همچنین اثرات جانبی روش‌های درمانی متداول و بازگشت علائم پس از دوره درمان و درواقع ناکارآمدی این نوع درمان، دانشمندان را بر آن داشت تا از طرق دیگری به فکر درمان این بیماری باشند. یکی از راهکارهای امیدبخش در این زمینه، تحریک سیستم ایمنی خود بیماران برای مقابله با بیماری‌های آلرژیک می‌باشد. در این راستا تلاش‌های بسیاری به انجام رسیده است که استفاده از سلول‌های دندریتیک یکی از مهم‌ترین راهکارها است، چراکه این سلول‌ها قادر به تحریک ایمنی فعال در دفاع از میزبان هستند. پتانسیل بالای سلول‌های دندریتیک در عرضه آنتی‌ژن و نقش آن‌ها به‌عنوان یک ادجوانت سلولی و از همه مهم‌تر قابلیت تولید و دست‌کاری آن‌ها در شرایط محیط کشت، این فرصت را به وجود آورده که محققین از آن‌ها در ایمونوتراپی سرطان، جلوگیری از رد پیوند، درمان آلرژی و بیماری‌های خود ایمن و درمان برخی بیماری‌های عفونی استفاده کنند. در دهه ۱۹۹۰ کشف این نکته که می‌توان این سلول‌های ارزشمند را در شرایط آزمایشگاه از مونوسیت های خون محیطی تمایز داد، اصول کاربرد درمانگاهی سلول‌های دندریتیک را در درمان بیماری‌ها پی‌ریزی نمود؛ ازآن‌پس دانشمندان تمام تلاش خود را به تولید بهینه این سلول‌ها و اصلاح روش‌های القاء تمایز و بلوغ سلول‌های دندریتیک اختصاص دادند.

مطالعات گذشته مشخص نموده‌اند که کرم‌ها دارای مواد تنظیم‌کننده ایمنی می‌باشند و احتمالاً چندین عامل مرتبط با این انگل‌ها پاسخ‌های آلرژیک را تعدیل می‌نمایند (۱۲). به همین منظور در این مطالعه از آنتی‌ژن‌های کرم *مارشالائریا مارشالی* به‌منظور ایجاد سلول‌های دندرتیک تنظیمی استفاده شد. هدف از این پژوهش تولید سلول‌های دندریتیک کارآمد جهت استفاده در ایمونوتراپی و سلول درمانی در جهت درمان آسم می‌باشد؛ به این نحو که به‌منظور تبدیل سلول‌های دندریتیک افراد آسمی به سلول‌های دندریتیک تنظیمی، از آنتی‌ژن‌های سوماتیک کرم *مارشالائریا مارشالی* استفاده گردید.

روش کار

نمونه گیری: جهت انجام این آزمایش ، از تعداد ۱۵ بیمار آسمی و ۱۰ فرد سالم از یک بیمارستان مستقر در شهرستان

مشهد در فاصله زمانی بین مهرماه تا اسفند ماه ۱۳۹۷ استفاده شد .تشخیص افراد آسمی بر اساس معاینات بالینی با کمک پزشک متخصص آسم و آلرژی انجام گرفت.بیمارانی که دارای سابقه بیماری های خود ایمن،نقص ایمنی،اختلالات ژنتیکی،سرطان و بیماری های ویروسی بودند از مطالعه خارج شدند.قبل از شروع مطالعه رضایت کتبی از بیماران اخذ گردید.سپس ۵میلی لیتر خون محیطی از هر نفر اخذ گردید و بعد از جداسازی سلول های تک هسته ای خون محیطی با استفاده از فایکول،سلول های مونوسیت در یک فلاسک ۲۵ میلی لیتری کشت داده شد.

استخراج و آماده سازی آنتی ژن سوماتیک کرم *مارشالاژیا مارشالی:* در ابتدا تعداد زیادی شیردان آلوده از کشتارگاه صنعتی مشهد جمع آوری گردید و به آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد انتقال یافت.سپس بر اساس پروتکل ها ی موجود کرم های شیردان از محتویات شیردان جدا شد و یر طبق کلیدهای ریخت شناسی موجود نماتود مارشالاژیا مارشالی شناسایی و جدا شد.کرم ها در طی ۴ مرحله با استفاده از بافر سالین فسفات استریل شستشو گردید.در ادامه کلیه کرم ها با کمک اسکالپل داخل یک پتریدیش استریل قطعه قطعه گردید و داخل میکروتیوب استریل قرار داده شد.سپس قطعات کرم با هموژنایزر مدل W130 چندین بار و هر بار به مدت ۳۰ ثانیه در مجاورت یخ هموژن گردید.محلول رویی برداشت شد و محلول زیرین و رسوبی دور ریخته شد.

تولید سلول دندرتیک بالغ: بعد از کشت ،سلول های مونوسیت با اضافه کردن سایتوکاین های IL4 و GM-CSFدر طی ۳ روز به سلول دندرتیک تبدیل شدند.بعد از کشت اولیه سلول های تک هسته ای خون محیطی،این سلول ها در یک فلاسک جدید استریل حاوی RPMI و FBS 10% و در انکوباتور Co2 دار برای مدت ۲ ساعت پاساژ داده شدند.فلاسک از انکوباتور خارج شد و محلول رویی دور ریخته شد و ۱۰ میکرولیتر GM-CSF و ۱۰ میکرولیتر IL10 اضافه گردید.در روز سوم مجددا ۱۰ میکرولیتر GM-CSF و ۱۰ میکرولیتر IL10 به سلول ها اضافه گردید.

برای تبدیل سلول های دندرتیک به سلول های دندرتیک تولروژن پروتکل زیر استفاده شد.در روز چهارم، ۱۵ میکرولیتر آنتی ژن سوماتیک مارشالاژیا مارسالی با غلظت ۲۸۹,۹۱ میکروگرم در میلی لیتر به فلاسک سلو ل های دندرتیک اضافه شد.بعد از گذشت ۲۴ ساعت از اضافه نمودن آنتی ژن مارشالاژیا مارشالی ،میزان ۱۰ میکرولیتر لیپوپلی ساکارید به فلاسک اضافه شد.نهایتا بعد از ۲ روز ،بلوغ سلول های دندرتیک با مشاهده پاهای کاذب در زیر میکروسکوپ تایید شد و فلاسک حاوی سلول دندرتیک بالغ به یک فالکون استریل انتقال داده شد.

تولید لنفوسیتهای T اتولوگ: یک قسمت از سلول های تک هسته ای خون محیطی از کشت اولیه جدا شد و به یک فلاسک جدید استریل حاوی RPMI و FBS 10% انتقال داده شد و برای مدت ۲ ساعت در انکوباتور Co2 دار قرار داده شد.بعد از گذشت ۲ ساعت ،این فلاسک از انکوباتور خارج شد و محتویات آن که حاوی لنفوسیت T می باشند در یک فالکون استریل ریخته شدند.

سنجش کمی سایتوکاین IL10: سلول‌های دندرتیک بالغ به نسبت ۱ به ۱۰و لنفوسیت‌های T با ۱ به ۵ به یک میکروپلیت استریل حاوی RPMI و FBS 10% انتقال داده شد و برای مدت ۵ روز کشت داده شدند.پس از گذشت ۵ روز از کشت توامان سلول دندرتیک و لنفوسیت T ،محتویات این پلیت به یک میکروتیوب انتقال داده شد (۱۳). سپس این محتویات برای مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند و محلول رویی جدا شد و در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد تا زمان سنجش سایتوکاین IL10 نگهداری شد.نهایتا غلظت سایتوکاین IL10 با روش الیزا (کیت الیزای انسانی شرکت ebioscience) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده مورد سنجش قرار گرفت.حساسیت این کیت ۲ پیکوگرم در میلی لیتر بود.

تجزیه و تحلیل آماری: نتایج این مطالعه با استفاده از برنامه SPSS 16 مورد تجزیه و تحلیل اماری قرار گرفت.مقایسه بین

دو گروه با استفاده از آزمون T غیر وابسته و آزمون مربع کای انجام گرفت.شاخص معنی داری $P<0.05$در نظر گرفته شد.

نتایج

در مجموع این مطالعه ۲۵ نمونه شامل ۱۵ بیمار آسمی و ۱۰ فرد سالم به عنوان کنترل استفاده شد.در گروه بیمار ۸ نفر مرد(۵۳,۳ درصد) و ۷ نفر زن (۴۶,۷ درصد) بودند و در گروه کنترل ۵ نفر(۵۰ درصد) مرد و ۵ نفر(۵۰ درصد) زن بودند.میانگین سن افراد در گروه بیمار ۹±۴۴ و در گروه سالم ۱۰±۳۹ بود. نتایج نشان داد که اختلاف معنی داری بین دو گروه از نظر سن و جنس وجود ندارد.

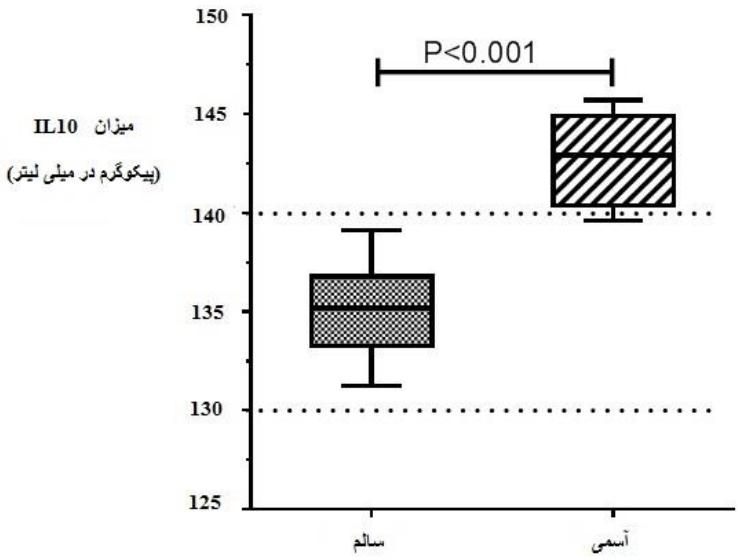
در معاینات بالینی افراد آسمی همه نمونه ها از سختی تنفس و سرفه رنج می بردند.علایم بالینی در ۸۰ درصد موارد عطسه،۶۶,۷ درصد تنگی قفسه سینه و در ۶۰ درصد احساس خفگی داشتند.علاوه بر این ،۵۳,۳ درصد افراد اظهار کردند که سرفه همراه با ترشحات داشتند. افراد بیمار علاوه بر آسم از بیماری های آلرژیک دیگری از جمله ۶۶,۶ درصد رینیت آلرژیک،۲۰ درصد اگزما،۲۶,۶ درصد کهیر،۲۶,۶ درصد آلرژی پوست،۳۳,۳ درصد آلرژی غذایی و ۱۳,۳درصد آلرژی دارویی رنج می بردند (جدول ۱).

جدول ۱-خصوصیات بالینی و دموگرافیک افراد سالم و آسمی

متغیر	افراد آسمی	افراد سالم	P-value
جنس			۰,۰۸۹
مرد	۸ (۵۳,۳)	۵ (۵۰)	
زن	۷ (۴۶,۷)	۵ (۵۰)	
سن	۹ ± ۴۴	۱۰ ± ۳۹	۰,۰۶۱
سابقه خانوادگی			<۰,۰۵
والدین	۸ (۵۳,۳)		
خواهر و برادر	۷ (۴۶,۷)		
نسل دوم و سوم	۱۳ (۸۶,۶)		
نشانه‌های درمانگاهی			<۰,۰۵
سختی تنفس	۱۱ (۷۳,۳)		
سرفه	۱۵ (۱۰۰)		
عطسه	۱۲ (۸۰)		
تنگی قفسه سینه	۱۰ (۶۶,۷)		
احساس خفگی	۹ (۶۰)		
احتقان بینی	۹ (۶۰)		
رینیت	۱۱ (۷۳,۳)		
جمع کل	۱۵	۱۰	

بعد از تولید سلول های دندرتیک بالغ ، این سلول ها با استفاده از آنتی ژن سوماتیک *مارشالاژیا مارشالی* به سلول های تولروژن تبدیل شدند و سپس در مواجهه با لنفوسیت های T برای مدت ۵ روزتحریک این سلول ها مورد آزمایش قرار گرفت. جهت بررسی تحریک لنفوسیت های T توسط سلول های دندرتیک تولروژن سایتوکاین IL10 مورد سنجش قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که میزان میانگین غلظت این سایتوکاین در افراد آسمی و افراد سالم به ترتیب ۶,۸ ± ۱۴۳,۲ و ۵,۳±۱۳۵,۴ پیکوگرم در میلی لیتر بود.علاوه بر این میزان میانگین غلظت این سایتوکاین در افراد بیمار و سالم قبل از مواجهه با آنتی ژن سوماتیک *مارشالاژیا مارشالی* به ترتیب ۲,۴ ± ۱۵,۶ و ۱,۶±۹,۴ پیکوگرم در میلی لیتر بود. .نتایج این مطالعه نشان داد که میزان غلظت این سایتوکاین در هر دو گروه به طور معنی داری افزایش پیدا کرده

است .هم چنین غلظت این سایتوکاین در گروه آسمی بیشتر از گروه سالم بود ولی این اختلاف معنی دار نبود (P<0.001) (شکل ۱).



شکل ۱– مقادیر میانگین (Mean±SD) سایتوکاین IL10 در افراد آسمی و سالم

نتایج آماری نشان داد که هیچ گونه ارتباط معنی داری بین سن و جنس و میزان سایتوکاین IL10 در گروه آسمی و کنترل وجود ندارد (P>0.05). علاوه بر این ، بین علایم بالینی در گروه آسمی و میزان سایتوکاین IL10 اختلاف معنی داری وجود نداشت.هم چنین، بین سابقه خانوادگی و میزان سایتوکاین IL10 در گروه آسمی اختلاف معنی داری وجود نداشت.(P>0.05).اما بین میزان سایتوکاین IL10 در گروه آسم با رینیت آلرژیک (P=0.006) ،آلرژی پوست (P=0.028)، آلرژی غذایی (P=0.004)، و اگزما (P=0.034) اختلاف معنی داری وجود داشت (جدول ۲).

جدول ۲– ارتباط بین میزان سایتوکاین IL10 در بیماران آسمی همراه با سایر بیماری های آلرژیک

سابقه بیماری آلرژیک		تعداد (درصد)	میزان IL10 (پیکوگرم در میلی لیتر)	P-value
اگزما	بله	3 (20%)	143.43±0.7	0.034
	خیر	12 (80%)	137.12±3.91	
رینیت آلرژیک	بله	10 (66.6%)	144.91±2.8	0.006
	خیر	5 (33.4%)	135.34±0.98	
کهیر	بله	4 (26.6%)	146.52±5.22	0.656
	خیر	11 (73.4%)	144.97±4.2	
آلرژی پوستی	بله	4 (26.6%)	145.5±1.04	0.028
	خیر	11 (73.4%)	140.52±3.45	
آلرژی غذایی	بله	5 (33.4%)	147.36±0.95	0.004
	خیر	10 (66.6%)	139.9±2.91	
آلرژی دارویی	بله	2 (13.3%)	141.0±3.95	0.544
	خیر	13 (86.7%)	143.75±4.44	

بحث و نتیجه گیری

آسم یکی از مهمترین بیماری‌های آلرژیک است که به واسطه تولید بیش از اندازه سایتوکاین های مترشحه از لنفوسیت Th2 از قبیل IL13, IL5, IL4 و تجمع ائوزینوفیل‌ها در لایه زیر مخاطی مشخص می‌گردد (۱۴). درمان با سلول دندرتیک که به عنوان واکسن دندرتیک نام دارد یک روش ایمونوتراپی جدید است که برای درمان برخی از بیماری‌ها از جمله سرطان استفاده می‌شود (۱۵). با توجه به اثرات تنظیم کنندگی کرم‌ها از جمله کرم *مارشالاژیا مارشالی* در درمان آسم آلرژیک (۱۶و۱۷)، لذا در این مطالعه سعی شد با استفاده از آنتی ژن‌های سوماتیک این کرم برای تبدیل سلول‌های دندرتیک به سمت سلول‌های تولروژن در بیماران آسمی استفاده گردد.

برخی از مطالعات نشان داده است که نماتودهای انگلی از قبیل *مارشالاژیا مارشالی* ممکن است با تغییر پاسخ‌های ایمنی به سمت تنظیمی بقای خود را در بدن میزبان افزایش دهند (۱۶و۱۷). این نماتودها با تغییر در تعدیل پاسخ‌های Th2/Th1 منجر به تولید سایتوکاین‌های تعدیل کننده ایمنی از قبیل IL10 و TGF-β می‌گردند و پاسخ های ایمنی به سمت تحمل تغییر می‌یابد (۱۸). بنابراین عفونت‌های مزمن کرمی به دلیل سرکوب پاسخ‌های ایمنی ممکن است میزبان را در مقابل بیماری‌های آلرژیک محافظت نمایند. به طور کلی سرکوب وسیع پاسخ‌های ایمنی می‌تواند منجر به کاهش پاسخ‌های لنفوسیت‌های T از طریق فعال کردن لنفوسیت‌های T تنظیمی گردد که این سلول‌ها از طریق تنظیم سلول‌های ماکروفاژ و سلول‌های دندرتیک صورت می‌گیرد و در نهایت به واسطه ترشح سایتوکاین‌های IL10 و TGF-β در بدن میزبان محیط غیر التهابی ایجاد می‌گردد (۱۹). به طور معمول این سایتوکاین‌ها منجر به مهار پاسخ‌های ایمنی توسط لنفوسیت‌های T و B می‌گردند.

نتایج این مطالعه حاکی از آن بود که میزان سایتوکاین IL10 در افراد آسمی و سالم به دنبال مواجهه با آنتی‌ژن‌های سوماتیک *مارشالاژیا مارشالی* با لنفوسیت‌ها افزایش یافت. این نتایج به این معنی است که آنتی‌ژن‌های سوماتیک *مارشالاژیا مارشالی* می‌تواند لنفوسیت‌ها را در افراد آسمی و سالم به سمت لنفوسیت های تنظیمی سوق دهد و یک پایه‌ای را برای درمان و کنترل آسم در آینده فراهم نماید. هم چنین، نتایج این مطالعه نشان داد

که در افراد آسمی با سایر بیماری‌های آلرژیک میزان این سایتوکاین به طور معنی داری افزایش می‌یابد.

مطالعات مشابه نتایج مطالعه ما را تایید می کند.بر طبق مطالعه جباری و همکاران(۱۶) اثرات آنتی ژن های دفعی ترشحی نماتود *مارشالاژیا مارشالی* بر روی سلول های خون محیطی در ۲۵ فرد آسمی و ۲۵ فرد سالم بررسی گردید.نتایج این مطالعه بیانگر افزایش بیان ژن سایتوکاین IL10 از لنفوسیت های تنظیمی در محیط کشت این سلول ها به دنبال مواجهه با انتی ژن های دفعی ترشحی *مارشالاژیا مارشالی* در افراد آسمی و سالم بود. علاوه بر این ،بر طبق مطالعه پرنده و همکاران(۱۷) در یک مطالعه برون تنی اثرات آنتی ژن های سوماتیک و دفعی ترشحی نماتود *مارشالاژیا مارشالی* با بررسی نفوذ سلول های التهابی به داخل مایعات ترشح شده در برونش،تغییرات آسیب شناسی ریه و پاسخ IgE بررسی شد و مشخص گردید که پاسخ های التهابی در ریه موش های حساس شده با اوآلبومین به دنبال تزریق زیر پوستی انتی ژن های دفعی ترشحی و سوماتیک نماتود *مارشالاژیا مارشالی* کاهش پیدا کرد.علاوه بر این،میزان سایتوکاین مهاری IL10 در سرم و بافت هموژن ریه به طور معنی داری افزایش پیدا کرده بود(۱۷).

هم چنین،مطالعات زیادی با استفاده از سایر آنتی ژن های انگلی بر روی سیستم ایمنی انجام شده است.جین و همکاران(۲۰) سلول های دندرتیک موشی و سلول دندرتیک نابالغ جدا شده از مغز استخوان را در مجاورت آنتی ژن کرم *کلونورکیس سینسیس* قرار دادند.نتایج این مطالعه بیانگر افزایش معنا دار سایتوکاین IL10 بود(۲۰).

در مطالعه رمو و همکاران(۲۱) اثرات آنتی ژن های کرم *شیستوزوما مانسونی* بر روی سلول های تک هسته ای خون محیطی بررسی نمود.نتایج این مطالعه بیانگر افزایش سایتوکاین IL10 در سلول های آزمایش شده می باشد. هم چنین یانگ و همکاران اثرات آنتی ژن های کرم *شیستوزوما ژاپونیکوم* را در افزایش لنفوسیت های T تنظیمی در موش نشان دادند (۲۲). نتایج مطالعه این افراد نشان داد که آنتی ژن های کرم *شیستوزوما ژاپونیکوم* منجر به افزایش سایتوکاین IL10 و کاهش بیان سایتوکاین های Th2 و درنهایت مهار پیشرفت آسم می گردد (۲۲).

دتریچ و همکاران (۲۳) اثر نماتود فیلری موش به نام *لیتوموزوئیدس سیگموندونتیس* را در مدل آسم موش مطالعه کردند و نشان دادند که آلودگی با این نماتود منجر به کاهش معنی دار علایم آسم از جمله ائوزینوفیلی و ترشح سایتوکاین های Th2در موش های آسمی می گردد. جمع آوری و کشت سلول های تک هسته ای طحالی منجر به افزایش معنی دار سایتوکاین ضد التهابی IL10 گردید.

نتایج این مطالعه بیان کرد که مواجهه با آنتی‌ژن‌های سوماتیک *مارشالاژیا مارشالی* در تعدیل سلول های تک هسته ای به سلول های دندرتیک تعدیل کننده و افزایش تولید سایتوکاین IL10 موثر می باشد.. اما تغییر مشاهده شده اگرچه معنی دار بود ولی میزان این اختلاف پایین بود (کمتر از ۱۵ پیکوگرم در میلی لیتر) و آزمایش های بیشتری لازم است تا مشخص کند که آیا این تغییر کم سایتوکاین IL10 اثرات عملکرد ی روی بافت های ریه افراد آسمی دارد یا خیر.هم چنین با توجه به منابع مختلف ترشح سایتوکاین IL10 لازم است مطالعات بیشتری بر روی میزان لنفوسیت های T تنظیمی با روش فلوسایتومتری و سنجش سایر سایتوکاین ها برای درمان آسم با این روش در آینده صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

این پایان نامه با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد انجام گرفت و نویسندگان این تحقیق ازمعاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به دلیل حمایت مالی این پایان نامه تشـکر وقدردانی می نمایند.

References

1. Gregory Morosco; James Kiley. Expert Panel Report 3 (EPR-3): Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma. J Allergy Clin Immunol. 2008; 121(6):1330.

2. Blackwell DL LJ, Clarke TC. Summary health statistics for U.S. adults: National Health Interview Survey, 2012. National Center for Health Statistics. Vital Health Stat. 2014; 10.
3. Heymann PW, Carper HT, Murphy DD, Platts-Mills TA, Patrie J, McLaughlin AP, et al. Viral infections in relation to age, atopy, and season of admission among children hospitalized for wheezing. J Allergy Clin Immunol. 2004;114:239–47.
4. McMeen V SM, Gern J, Carper H,Murphy D, Vrtis R, Platts-Mills T, Heymann, PW. Viral load assessments of rhinovirus (RV) by quantitative RT-PCR in nasal washes from children treated in the emergency department (ED) for asthma. J Allergy Clin Immunol 2008; 121.
5. Soto-Quiros M, Avila L, Platts-Mills TA, Hunt JF, Erdman DD, Carper H, et al. High titers of IgE antibody to dust mite allergen and risk for wheezing among asthmatic children infected with rhinovirus. J Allergy Clin Immunol. 2012;129:1499–505 e5.
6. Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. NatureMed 2012;18(5):673–683.
7. Kudo M, Ishigatsubo Y, Aoki I. Pathology of asthma. Frontiers in microbiology. 2013;4:263. PubMed PMID: 24032029. Pubmed Central PMCID: PMC3768124. Epub 2013/09/14. Eng.
8. Entezari A, Mehrabi Y, Varesvazirian M, Pourpak Z, Moin M. A systematic review of recent asthma symptom surveys in Iranian children. Chronic respiratory disease. 2009;6(2):109-14.
9. Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, Van Ree R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. Science. 2002;296(5567):490-4.
10. Maizels RM. Infections and allergy helminths, hygiene and host immune regulation. Current opinion in immunology. 2005;17(6):656-61.
11. Schnoeller C, Rausch S, Pillai S, Avagyan A, Wittig BM, Loddenkemper C, et al. A helminth immunomodulator reduces allergic and inflammatory responses by induction of IL-10-producing macrophages. The Journal of Immunology. 2008;180(6):4265-72.
12-Akdis M. Immune tolerance in allergy. Current opinion in immunology. 2009;21(6):700-7.
13. Inaba K, Metlay JP, Crowley MT, Steinman RM. Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ. J Exp Med. 1990;172(2):631-40.
14-Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of asthma. Nature Immunol. 2015;16(1):45.
15. Palucka K, Banchereau J. Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines. Immunity. 2013;39(1):38-48
16- Jabbari Azad F, Kiaee F, Rezaei A, Farid Hosseini R, Soleimani N, Borji H. Downregulation of immune responses in asthmatic humans by ES products of Marshallagia marshalli. Clin Respir J T. 2017;11(1):83-9.
17- Shirvan SP, Ebrahimby A, Dousty A, Maleki M, Movassaghi A, Borji H, et al. Somatic extracts of Marshallagia marshalli downregulate the Th2 associated immune responses in ovalbumin-induced airway inflammation in BALB/c mice. Parasites & vectors. 2017;10(1):233.
18- Hagel I, Cabrera M, Di Prisco MC. Helminthic Infections and Asthma: Still a Challenge for Developing Countries. Respiratory Disease and Infection-A New Insight: InTech; 2013.
19-Sojka DK, Huang YH, Fowell DJ. Mechanisms of regulatory T-cell suppression–a diverse arsenal for a moving target. Immunol. 2008;124(1):13-22.
20- Jin Y, Wi HJ, Choi M-H, Hong S-T, Bae YM. Regulation of anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF-β in mouse dendritic cells through treatment with Clonorchis sinensis crude antigen. Exp Mol Med. 2014;46(1):e74
21. Remoue F, To Van D, Schacht AM, Picquet M, Garraud O, Vercruysse J, et al. Gender-dependent specific immune response during chronic human Schistosomiasis haematobia. Clin Exp Immunol. 2001;124(1):62-8.
22- Yang J, Zhao J, Yang Y, Zhang L, Yang X, Zhu X, et al. Schistosoma japonicum egg antigens stimulate CD4+ CD25+ T cells and modulate airway inflammation in a murine model of asthma. Immunol. 2007;120(1):8-18.
23. Dittrich AM, Erbacher A, Specht S, Diesner F, Krokowski M, Avagyan A, et al. Helminth infection with Litomosoides sigmodontis induces regulatory T cells and inhibits allergic sensitization, airway inflammation, and hyperreactivity in a murine asthma model. J Immunol. 2008;180(3):1792-9.

Original Article

Immunoregulatory evaluation of *Marshallagia marshalli* antigen on dendritic cells for treatment of asthmatic patients

Received: 06/01/2021 - Accepted: 06/11/2021

Roya Baratian[1]
Majid Mirsadraie[2]
Hadi Mohebalian[3]
Hassan Borji[4*]

[1] *Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran*
[2] *Department of clinical science, Mashhad Azad University of Medical science, Mashhad, Iran*
[3] *Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran*
[4] *Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.*

Email: hborji@um.ac.ir

Abstract

Introduction: This study aimed at using of dendritic cells for polarization of immune response to protective one using *Marshallagia marshalli* antigen, which can result in production of regulatory Tcell; so that these cells could suppress Th2 immune response and then alleviate the symptom of diseases.

Material and Methods: In this experimental study, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from 15 patients with asthma and 10 healthy controls and were cultured. PBMCs were then converted to tolerogenic DCs through exposure to GM-CSF, IL-4 and *Marshallagia marshalli* antigen. Then, tolerogenic DCs were exposed to autologous T cells for five days and finally, the level of secreted IL-10 was measured.

Results: The mean IL-10 level in the asthmatic and control groups was 143.2 ± 6.8, 135.4± 5.3 pq/ml, respectively. The results showed that IL-10 levels in both groups increased significantly ($P \leq 0.001$). Moreover, IL-10 levels in the asthmatic group were higher than the control group but this is not significant ($P \geq 0.001$).

Conclusion: These results indicate that *M. marshalli* antigen can create antigen-regulating dendritic cells that increase the level of IL-10 and shift T lymphocytes to the regulatory type. It seems that this antigen parasite can be used in dendritic cell therapy to control allergic diseases.

Keywords: *Marshallagia marshalli*, Dendritic Cells, T-Lymphocytes, Asthma