

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

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 علائم 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 T این افراد به مدت ۵ روز قرار گرفتند و در نهایت غلظت سایتوکاین تنظیمی IL-10 در این محیط با روش ایزا اندازه گیری شد.

نتایج: میانگین غلظت این سایتوکاین در افراد آسمی و افراد سالم به ترتیب 6.8 ± 143.2 و 135.4 ± 5.3 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.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که آنتی ژن مارشالاژیا مارشالی توانایی تبدیل سلول تک هسته ای به سلول دندرتیک تعدیل کننده با افزایش سایتوکاین IL-10 را دارد که این سلول ها در تبدیل لنفوسیت های T به سلول های نوع تنظیم کننده ایمنی توانمند می گردند. بنابراین آنتی ژن این انگل می تواند در درمان بیماران آسمی با سلول های دندرتیک کاربرد داشته باشد.

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

رویا براتیان^۱

مجید میرصدرایی^۲

هادی محب علیان^۳

حسن برجی^{۴*}

^۱گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی

مشهد، مشهد، ایران

^۲گروه علوم بالینی، دانشگاه آزاد علوم پزشکی مشهد، مشهد،

ایران

^۳استادیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد

^۴استاد گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه

فردوسی مشهد

Email: hborji@um.ac.ir

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 (۱ و ۲). 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 (۳ و ۴ و ۵ و ۶). 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 (۷ و ۸).

شیوع آسم در کشورهای پیشرفته و همچنین شهرهای بزرگ با سطح بهداشت بالا، بسیار بیشتر از سایر کشورها می‌باشد. در این ارتباط 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 پاتوژن‌های باکتریال منجر به عدم تعادل ایمنی ذاتی و اکتسابی و افزایش بیماری‌های آلرژیک و آسم می‌گردد (۹).

در کشورهای در حال توسعه عفونت‌های کرمی شیوع زیادی دارند (۱). هم‌زمانی آلودگی با انگل‌های کرمی و کاهش میزان شیوع بیماری‌های آلرژیک در انسان باعث شده است تا تحقیقاتی در زمینه‌ی جست‌وجوی مولکول‌های کرمی با خاصیت ضد حساسیت و ضد التهابی 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 در واقع

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 مونسیت‌های خون محیطی تمایز داد، اصول کاربرد درمانگاهی سلول‌های دندریتیک را در درمان بیماری‌ها پی‌ریزی نمود؛ از آن‌پس 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 مارشالائیا مارشالی به‌منظور ایجاد سلول‌های دندریتیک 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 مارشالائیا 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

برای تبدیل سلول های دندرتیک به سلول های دندرتیک تولوژن پروتکل زیر استفاده شد. در روز چهارم، ۱۵ میکرولیتر آنتی ژن سوماتیک مارشالاژیا مارشالی با غلظت ۲۸۹,۹۱ میکروگرم در میلی لیتر به فلاسک سلول های دندرتیک اضافه شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از اضافه نمودن آنتی ژن مارشالاژیا مارشالی، میزان ۱۰ میکرولیتر لیوپلی ساکارید به فلاسک اضافه شد. نهایتاً 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 فالكون استریل انتقال داده شد.

تولید لنفوسیت های 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 10% FBS 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 فالكون استریل ریخته شدند.

سنجش کمی سایتوکاین IL10: سلول های دندرتیک بالغ به نسبت ۱ به ۱۰ و لنفوسیت های T با ۱ به ۵ به یک میکروپلیت استریل حاوی RPMI و 10% FBS 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. نهایتاً 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 آماری قرار گرفت. مقایسه بین

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. بیماران 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 ۵ میلی 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 های موجود کرم های شیردان از محتویات شیردان جدا شد و بر 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 پتريدش 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-CSF در 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 10% FBS 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 مجدداً ۱۰ میکرولیتر GM-CSF و ۱۰ میکرولیتر IL10 به سلول ها اضافه گردید.

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،۳ درصد آلرژی دارویی رنج می بردند (جدول ۱).

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 44 ± 9 و در گروه سالم 39 ± 10 بود. نتایج نشان داد که اختلاف معنی داری بین دو گروه از نظر سن و جنس وجود ندارد.

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	44 ± 9	39 ± 10	۰,۰۶۱
سابقه خانوادگی			< ۰,۰۵
والدین	۸ (۵۳,۳)		
خواهر و برادر	۷ (۴۶,۷)		
نسل دوم و سوم	۱۳ (۸۶,۶)		
نشانه های 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	

این سایتوکاین در افراد آسمی و افراد سالم به ترتیب 6.8 ± 143.2 و 5.3 ± 135.4 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 2.4 ± 15.6 و 1.6 ± 9.4 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

بعد از تولید سلول های دندریتیک بالغ، این سلول ها با استفاده از آنتی ژن سوماتیک مارشالاژیا مارشالی به سلول های تلوژن تبدیل شدند و سپس در مواجهه با لئوسیت های T برای مدت ۵ روز تحریک این سلول ها مورد آزمایش قرار گرفت. جهت بررسی تحریک لئوسیت های T توسط سلول های دندریتیک تلوژن سایتوکاین IL10 مورد سنجش قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که میزان میانگین غلظت

بیشتر از

گروه سالم

بود ولی این

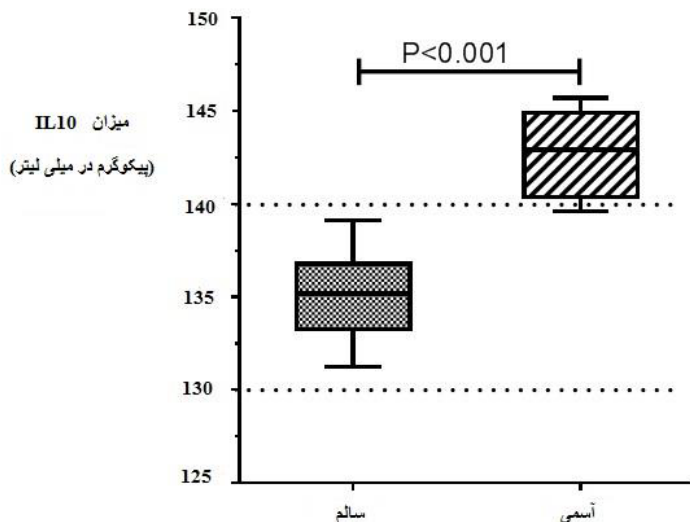
اختلاف

معنی دار

نبود

(P<0.00
1) (شکل

۱).



است

هم

چنین

غلطت

این

سایتوکاین

ن در

گروه

آسمی

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

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).

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

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

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

بحث و نتیجه گیری

بنابراین عفونت‌های مزمن کرمی به دلیل سرکوب پاسخ‌های ایمنی ممکن است میزان 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 دندریتیک صورت می‌گیرد و در نهایت به واسطه ترشح سایتوکاین‌های IL10 و TGF-β در بدن میزان 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 لنفوسیت‌های تنظیمی سوق دهد و یک پایه‌ای را برای درمان و کنترل آسم در آینده فراهم نماید. هم‌چنین، نتایج این مطالعه نشان داد

آسم یکی از مهمترین بیماری‌های آلرژیک است که به واسطه تولید بیش از اندازه سایتوکاین‌های مترشحه از لنفوسیت Th2 از قبیل IL13, IL5, IL4 و تجمع ائوزینوفیل‌ها در لایه زیر مخاطی مشخص می‌گردد (۱۴). درمان با سلول دندریتیک که به عنوان واکسن دندریتیک نام دارد یک روش ایمونوتراپی جدید است که برای درمان برخی از بیماری‌ها از جمله سرطان استفاده می‌شود (۱۵). با توجه به اثرات تنظیم‌کنندگی کرم‌ها از جمله کرم مارشالاژیا مارشالی در درمان آسم آلرژیک (۱۶ و ۱۷)، لذا در این مطالعه سعی شد با استفاده از آنتی‌ژن‌های سوماتیک این کرم برای تبدیل سلول‌های دندریتیک 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 میزان افزایش دهند (۱۶ و ۱۷). این نماتودها با تغییر در تعدیل پاسخ‌های Th2/Th1 منجر به تولید سایتوکاین‌های تعدیل‌کننده ایمنی از قبیل IL10 و TGF-β می‌گردند و پاسخ‌های ایمنی به سمت تحمل تغییر می‌یابد (۱۸).

افزایش لنفوسیت های T تنظیمی در موش نشان دادند (۲۲). نتایج مطالعه این افراد نشان داد که آنتی ژن های کرم شیستوزوما *Th1* و *Th2* سایتوکاین ها و کاهش بیان سایتوکاین های *Th2* و در نهایت مهار پیشرفت آسم می گردد (۲۲).

دتریچ و همکاران (۲۳) اثر نماتود فیلری موش به نام *لیموموزوئیدس سیگموندوتیس* را در مدل آسم موش مطالعه کردند و نشان دادند که آلودگی با این نماتود منجر به کاهش معنی دار علائم آسم از جمله ائوزینوفیلی و ترشح سایتوکاین های *Th2* در 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 آنتی ژن های سوماتیک مارشالازیا 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 عملکردی 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 از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به دلیل حمایت مالی این پایان نامه تشکر و قدردانی می نمایند.

که در افراد آسمی با سایر بیماری های آلرژیک میزان این سایتوکاین به طور معنی داری افزایش می یابد. مطالعات مشابه نتایج مطالعه ما را تایید می کند. بر طبق مطالعه جباری و همکاران (۱۶) اثرات آنتی ژن های دفعی ترشحي نماتود مارشالازیا 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 آنتی ژن های دفعی ترشحي مارشالازیا مارشالی در افراد آسمی و سالم بود. علاوه بر این، بر طبق مطالعه پرند و همکاران (۱۷) در یک مطالعه برون تنی اثرات آنتی ژن های سوماتیک و دفعی ترشحي نماتود مارشالازیا 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 آنتی ژن های دفعی ترشحي و سوماتیک نماتود مارشالازیا مارشالی کاهش پیدا کرد. علاوه بر این، میزان سایتوکاین مهاري *IL10* در سرم و بافت هموزن 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 *Th1* و *Th2* را در

References

- 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. *Nature Med* 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, Dusty 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, Vercruyysse 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 Baratian¹
Majid Mirsadraie²
Hadi Mohebalian³
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