

# مطالعه نقش الیگونوکلئوتیدهای حاوی سیتوزین - گوانین در تولید اینترفرون گاما و ایمونوگلوبولین - ای در پاسخ به آلرژن کنوپودیوم آلبوم در مدل موشی آسم

## چکیده

زمینه و هدف: در حال حاضر افزایش شیوع بیماری‌های آلرژیک در جوامع مختلف، یکی از مهم‌ترین مشکلات بهداشتی جهان است و تحقیقات بسیار زیادی در سراسر دنیا جهت دستیابی به روش‌های مطمئن پیشگیری و درمان این بیماری‌ها در حال انجام می‌باشد. یکی از این روش‌ها، استفاده از ردیف‌های نوکلئوتیدی حاوی سیتوزین - گوانین (CpG-ODNs) است که با مکانیسم‌های متعدد منجر به تعدیل پاسخ‌های ایمنی و تغییر الگوی سائتوکاینی در سیستم ایمنی می‌شود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی یا مداخله‌ای (experimental) نقش ترکیبات حاوی بازهای سیتوزین - گوانین در تعدیل پاسخ‌های ایمنی نسبت به یکی از شایع‌ترین آلرژن‌های ایران یعنی گرده گیاه کنوپودیوم آلبوم مورد مطالعه قرار گرفته است. برای اینکار عصاره آلرژن‌زای گرده گیاه فوق، تهیه و به همراه ردیف‌های نوکلئوتیدی حاوی سیتوزین - گوانین در موش Balb/C به عنوان مدل حیوانی آسم آزمایش شد. به منظور ارزیابی آثار این نوکلئوتیدها، تعدادی از پارامترهای ایمنی شامل میزان اینترفرون گاما ( $\text{IFN-}\gamma$ ) و ایمونوگلوبولین - ای (Immunoglobulin E=IgE) در مایع کشت سلولهای طحالی و بافت ریه موشها و همچنین ایمونوگلوبولین - ای سرمی مورد آزمایش قرار گرفتند. از طرف دیگر برخی خصوصیات بافت‌شناسی از قبیل ائوزینوفیلی و تجمع سلولهای التهابی نیز در ریه حیوانات مطالعه شد. در خاتمه، نتایج حاصل از این آزمون‌ها در گروه‌های مورد مطالعه با تست ANOVA مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که هر چند ردیف‌های نوکلئوتیدی حاوی سیتوزین - گوانین نمی‌توانند میزان ایمونوگلوبولین - ای را تا حد طبیعی کاهش دهند ولی در مقایسه با آلرژن، تا ۸۰٪ از میزان سرمی این آنتی‌بادی می‌کاهند. علاوه بر این ردیف‌های نوکلئوتیدی حاوی سیتوزین - گوانین می‌توانند باعث افزایش شدید مقدار اینترفرون گامای سیستمیک و موضعی شده و تظاهرات واکنش‌های التهابی ریه را کاهش دهند ( $P < 0.01$ ).

نتیجه‌گیری: با توجه به نقش ترکیبات حاوی سیتوزین - گوانین در تغییر جهت پاسخ سائتوکاین‌ها و کاهش پاسخ‌های التهابی ریه در مورد آلرژن شایع کنوپودیوم آلبوم، به نظر می‌رسد بتوان از این ترکیبات در تعدیل پاسخ‌های التهابی نسبت به سایر آلرژن‌ها نیز استفاده کرده و مقدمات کاربرد آنها را در انسان فراهم نمود.

کلیدواژه‌ها: ۱- آسم ۲- الیگونوکلئوتیدهای حاوی گوانین و سیتوزین ۳- کنوپودیوم آلبوم  
۴- ایمونوگلوبولین - ای ۵- اینترفرون گاما

\*دکتر طاهره موسوی I

دکتر علیرضا سالک مقدم II

رضا فلک III

دکتر علیرضا صادقی پور IV

مهدی حجازی V

## مقدمه

در حال حاضر ایمونوتراپی یکی از روش‌های متداول در درمان بیماری‌های آلرژیک محسوب می‌شود ولی از آنجا که این روشها با مخاطراتی همراه می‌باشند، محققین تلاش می‌کنند تا روش‌های مطمئن و مناسبی را که با کمترین اثرات

(I) دانشیار و متخصص ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران، ایران\* مؤلف مسؤول.

(II) استاد و متخصص ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران، ایران.

(III) کارشناس ارشد ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران، ایران.

(IV) استادیار و متخصص آسیب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران، ایران.

(V) کارشناس آزمایشگاه، مؤسسه رازی، تهران، ایران.

پاسخ‌های التهابی انسان نیز اخیراً توسط برخی از محققین گزارش شده است.<sup>(۹، ۱۰)</sup> در رابطه با نحوه استفاده از این ترکیبات، روشهای متفاوتی توسط پژوهشگران مختلف گزارش شده است که از جمله آنها تجویز توام ردیفهای سیتوزین - گوانین با آنتی ژن، کاربرد فرم کونژوگه شده آن با آنتی ژن، مصرف ردیفهای سیتوزین - گوانین به تنهایی، تجویز سیستمیک و تجویز از طریق مخاط گوارش یا بینی می‌باشد.<sup>(۱۵)</sup>

<sup>(۱۱)</sup> علاوه بر این در برخی مطالعات از این مواد به عنوان پیشگیری کننده و در تعدادی دیگر، در ایمونوتراپی واکنش‌های آلرژیک و التهابی استفاده شده است.<sup>(۱۶، ۱۷)</sup> در این مطالعه نقش تجویز همزمان ردیفهای سیتوزین - گوانین و آنتی ژن در تعدیل پاسخ‌های آلرژیک موش Balb/C به عصاره آلرژیک زای گیاه کنوپودیوم آلبوم (سلمه تره) به عنوان یکی از گیاهان آلرژیک ایران بررسی شده است.

#### روش بررسی

در این مطالعه تعداد ۲۴ موش ماده و سالم Balb/C در سن ۶-۴ ماهگی از موسسه پاستور ایران خریداری شد. موشها به طور تصادفی در ۴ گروه ۶ تایی (یک گروه تست و سه گروه کنترل) قرار داده شدند.

عصاره آلرژیک زای مورد استفاده از این طرح مطابق با روش گزارش شده قبلی<sup>(۷)</sup> تهیه شد. پروتئین عصاره با روش لوری اندازه‌گیری شده و سپس عصاره استریل برای مصارف بعدی در مقادیر کم تقسیم‌بندی و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

نوکلوئوتیدهای حاوی ردیفهای سیتوزین - گوانین و کنترل منفی از شرکت Gen. USA، in vivo خریداری شدند، (ODN 1826) CPG ODN حاوی سکانس‌های CpG و کنترل منفی (ODN, 826 Control) فاقد این سکانس‌ها می‌باشد. ردیف نوکلئوتیدی این دو ماده به ترتیب به شرح زیر می‌باشد:

5'-tcc atg acg ttc etg acg tt-3'

5' tcc atg agc ttc etg agc tt-3'

در این مطالعه تجربی مداخله‌ای به منظور بررسی نقش پیشگیری کننده ردیفهای سیتوزین - گوانین، از تزریق داخل صفاقی آلرژن (روزهای ۱ و ۷) برای مرحله حساس کردن استفاده شد.

جهت حساس کردن موشها ۵۰ میکروگرم از محلول

جانبی مفید برای بیمار همراه باشند، معرفی نمایند. از آنجا که پاسخ‌های ایمن در بیماران آلرژیک از نوع پاسخ‌های وابسته به لنفوسیت T کمکی - دو است، لذا یکی از روشهای درمانی مفید، استفاده از موادی است که باعث تغییر جهت پاسخ‌های سیستم ایمنی از لنفوسیت T کمکی - دو به سمت لنفوسیت T کمکی - یک می‌گردد.<sup>(۱)</sup>

الیگونوکلوئوتیدهای حاوی ردیفهای سیتوزین - گوانین که در توالی‌های DNA باکتری‌ها وجود دارند، یکی از موثرترین موادی هستند که با القای پاسخ‌های وابسته به لنفوسیت T کمکی - یک، پاسخ‌های سلولی موجود در اختلالات اتوپیک را مهار می‌کنند.<sup>(۱)</sup> بطور کلی مکانیسم‌های متعددی را در نقش ایمنی ردیفهای سیتوزین - گوانین دخیل می‌دانند که مهم‌ترین آنها، تحریک و تقویت سیستم ایمنی ذاتی، فعال کردن سلولهای دندریتیک و وادار کردن آنها به ترشح اینترفرون گاما و اینترلوکین - ۱۲، تغییر کلاس آنتی‌بادی از ایمونوگلوبولین - ای به ایمونوگلوبولین - جی، فعال کردن سلولهای T تنظیم کننده و مهار سلولهای T کمکی - دو می‌باشند.<sup>(۲، ۳)</sup>

نقش ردیفهای سیتوزین - گوانین در تعدیل پاسخ‌های ایمنی از اواخر دهه ۱۹۸۰ بطور جدی مورد توجه ایمنی شناسان قرار گرفت. در سالهای اخیر کوشش‌های بسیاری برای استفاده از این مواد به عنوان ادجون در تحقیقات پزشکی انجام شده است و گزارش‌ها نشان می‌دهند که استفاده از آنها می‌تواند پاسخ‌های ناشی از آسم یا آلرژیک به بعضی از آلرژن‌ها را در موش آزمایشگاهی تا حدود زیادی کاهش دهد.<sup>(۴-۵)</sup> این اثر به دلیل توانایی ردیفهای سیتوزین - گوانین در افزایش تولید سایتوکاین‌های T کمکی - یک و پیش التهابی و همین‌طور فعال کردن سلولهای عرضه کننده آنتی ژن می‌باشد.

گرده گیاه کنوپودیوم آلبوم یا سلمه تره، یکی از شایع‌ترین عوامل آلرژیک در ایران محسوب می‌شود. مطالعاتی که راجع به فراوانی عوامل حساسیت‌زا در نواحی مختلف ایران صورت گرفته، نشان می‌دهد که این گیاه در برخی مناطق مثل تهران و کرج در ردیف شایع‌ترین این عوامل قرار دارد.<sup>(۶)</sup> مطالعات قبلی ما نیز در خصوص گرده گیاه سلمه تره نشان داد که با استفاده از عصاره گرده این گیاه می‌توان در موش Balb/C، واکنش‌های مربوط به آسم را ایجاد کرده و از آن به عنوان یک مدل آزمایشگاهی در تحقیقات مربوط به آسم و آلرژیک استفاده کرد.<sup>(۷، ۸)</sup> استفاده از ردیفهای سیتوزین - گوانین در تعدیل

شد(منهای حفره‌های مربوط به گروه کنترل منفی). پلیت‌های حاوی سلولهای کشت شده به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵٪ فشار Co2 قرار داده شدند. بافت ریه نیز پس از شستشو به دو قسمت تقسیم شد و یک قسمت آن به قطعات کوچک ۱×۱ میلی‌متر خرد شد و در میکروپلیت‌های جداگانه کشت داده شد(شرایط کشت مشابه با سلولهای طحالی بود).

پس از ۷۲ ساعت کشت سلولهای طحالی و بافت ریه، مایع رویی حفرات مشابه، جمع‌آوری و پس از سانتریفوژ در ویال‌های کوچک، تقسیم و جهت آزمایش‌های بعدی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. نمونه‌های سرمی نیز از خونی که قبل از بیهوشی از حیوانات گرفته شده بود، جدا شده و در مقادیر کم، تقسیم و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. قسمت دوم بافت ریه نیز جهت بافت‌شناسی در فرمالین ۴٪ فیکس شده و به آزمایشگاه پاتولوژی ارسال گردید. در آزمایشگاه، بافت ریه به قطعات با ضخامت ۳ میکرومتر بریده شده و پس از رنگ‌آمیزی با هماتوکسین و ائوزین از نظر وجود ائوزینوفیلی و سلولهای التهابی مورد مطالعه قرار گرفت.

ایمونوگلوبولین - ای در نمونه‌های سرمی و مایع رویی کشت بافت ریه با روش الایزا اندازه‌گیری شد. در این آزمایش از آنتی‌بادی منوکلونال ضد ایمونوگلوبولین - ای موشی جهت پوشاندن پلیت و از آنتی‌بادی کونژوگه با

آنتی‌ژن ۲ بار بصورت داخل صفاقی و به فاصله یک هفته تزریق گردید. در موشهای گروه یک(تست)، همراه با آنتی‌ژن مقدار ۵ میکروگرم CpG ODN و در موشهای گروه چهار(کنترل CpG منفی)، ۵ میکروگرم الیگونوکلوئوتید فاقد CpG تزریق شد.

پس از حساس کردن موشها، در روزهای ۲۱ و ۲۴ دو چالش آنتی‌ژنی با محلول آنتی‌ژن انجام گرفت. در گروه کنترل منفی بجای آنتی‌ژن در تمام مراحل از بافر فسفات نمکی استفاده شد(PBS=phosphate buffered saline). برای چالش آنتی‌ژنی، محلول ۱٪ آنتی‌ژن در آب مقطر، تهیه و در فضای بسته‌ای که موشها در آن قرار داده شده بودند، اسپری گردید. بدین ترتیب حیوانات ۲ بار و هر بار به مدت نیم ساعت در معرض استنشاق آنتی‌ژن قرار گرفتند. سپس در تمام موشها در روز ۲۷، نمونه‌گیری از خون، طحال و ریه انجام گرفت.

برنامه کامل تزریقات جهت حساس کردن و چالش با آنتی‌ژن در تمام گروه‌های مورد آزمایش در جدول شماره ۱ خلاصه شده است.

در روز ۲۷ آزمایش، تمام موشها توسط گاز Co2 بیهوش شدند و سپس طحال و ریه آنها جدا گردید. از سلولهای طحالی پس از شستشو، سوسپانسیون سلولی ۱۰<sup>۶</sup>×۵ میلی‌لیتر، تهیه و در میکروپلیت‌های ۲۴ خانه‌ای کشت داده شد(۵۰۰۰۰۰ در هر حفره). جهت کشت سلولی از محیط

جدول شماره ۱- برنامه حساس کردن و چالش آنتی‌ژنی موشهای مورد آزمایش

شماره	گروه	ماده مورد استفاده برای حساس کردن (تزریق داخل صفاقی در روزهای ۱ و ۷)	ماده مورد استفاده برای چالش (استنشاق در روزهای ۲۱ و ۲۴)
۱	تست	CpG+Ag	محلول آنتی‌ژن
۲	کنترل منفی	PBS	PBS
۳	کنترف آنتی‌ژن	Ag	محلول آنتی‌ژن
۴	کنترل CpG	ODN + Ag	محلول آنتی‌ژن

بیوتین جهت ردیابی نمونه استفاده شد. کلیه مواد لازم برای این تست از شرکت BD Bioscience, USA خریداری شد و مراحل انجام آزمایش مطابق با دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده کیت صورت گرفت. به منظور کنترل کیفی آزمایش، سرم ۱۵ موش طبیعی مخلوط شده و

1640 RPML، گلوتامین (۲ میلی‌مول)، سرم جنین گاوی (۱۰٪)، بافر هپس (۲۵ میلی‌مول)، پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) استفاده شد. به منظور تحریک آنتی‌ژنی نیز به هر یک از خانه‌های میکروپلیت مقدار ۵۰ میکروگرم آنتی‌ژن اضافه

اندازه‌گیری ایمونوگلوبولین - ای سرم حیوانات مورد آزمایش با روش الیزا نشان داد که هر چند مقدار این آنتی‌بادی در خون موشهای دریافت‌کننده ردیفهای سیتوزین - گوانین نسبت به موشهای گروه کنترل منفی، افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته است ولی این افزایش معنی‌دار در موشهای تمام گروه‌های دیگر نیز مشاهده می‌گردد. نکته قابل توجه این است که مقایسه بین گروه‌های تست و کنترل آنتی‌ژن نشان دهنده تفاوت قابل ملاحظه بین دو گروه فوق می‌باشد ( $P \leq 0.01$ ). مقدار ایمونوگلوبولین - ای تام ترشح شده در محیط کشت بافت ریه نیز در موشهای تحت درمان با ردیفهای سیتوزین - گوانین در مقایسه با گروه کنترل منفی افزایش معنی‌داری دارد ( $P \leq 0.05$ ). ولی همانند آنتی‌بادی سرمی کمتر از گروه کنترل آنتی‌ژن می‌باشد. نتایج حاصل از مقادیر این آنتی‌بادی در سرم و مایع‌رویی کشت بافت ریه موشهای تحت آزمایش در جدول شماره ۳ آورده شده است.

**جدول شماره ۳** - نتایج حاصل از اندازه‌گیری آنتی‌بادی IgE در سرم و کشت بافت ریه موشهای تحت آزمایش با روش الیزا

ردیف	گروه	غلظت IgE تام ( $\mu\text{g/mL}$ )	
		سرم (mean $\pm$ SD)	ریه (mean $\pm$ SD)
۱	تست	۲۶۳۳/۳ $\pm$ ۱۳۶/۳	۱۳/۱ $\pm$ ۱/۴
۲	کنترل منفی	۶۱۰ $\pm$ ۲۸/۹	۸ $\pm$ ۰/۸
۳	کنترل آنتی‌ژن	۴۰۳۳ $\pm$ ۲۵۰/۳	۲۴/۸ $\pm$ ۲/۴
۴	کنترل ODN	۴۳۵۰ $\pm$ ۳۰۸/۲	۱۵ $\pm$ ۱/۴

پس از مقطع‌گیری و رنگ‌آمیزی بافت فیکس شده ریه موشهای تحت آزمایش، مقاطع بافتی توسط میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند. در این آزمایش تعداد ائوزینوفیل‌ها در ۱۰ میدان میکروسکوپی با قدرت بالا (high power field) و همچنین نمای کلی بافت، مشاهده و گزارش شد. در جدول شماره ۴ نتایج حاصل از تست هیستولوژی آورده شده است. علاوه بر این، تصویر میکروسکوپی نمونه‌ای از مقاطع بافتی گروه تست نیز در شکل شماره ۱ مشاهده می‌شود.

از آن سرم نرمال تهیه شد و در تمام آزمایش‌های الیزا بکار رفت.

اینترفرون گاما در تمام نمونه‌های مورد آزمایش با روش الیزا اندازه‌گیری شد. برای این آزمایش از کیت الیازی BD (BD Bioscience) OPTeia استفاده شد و تمام مراحل انجام آزمایش مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. مقادیر حاصل از اندازه‌گیری سایتوکاین‌ها و ایمونوگلوبولین - ای در موشهای هر گروه براساس فرمول  $\text{mean} \pm \text{SEM}$  محاسبه شده و با استفاده از تست ANOVA مورد ارزیابی قرار گرفت.

### یافته‌ها

نتایج حاصل از اندازه‌گیری اینترفرون گاما در مایع‌رویی کشت سلولهای طحال موشهای تحت آزمایش نشان داد که تزریق همزمان آنتی‌ژن و ردیفهای سیتوزین - گوانین می‌تواند تولید این سایتوکاین را در مقایسه با گروه کنترل منفی به شدت بالا برده و آن را تا حدود ۴۰ برابر افزایش دهد. البته تولید این سایتوکاین در اثر تزریق آنتی‌ژن به تنهایی و همچنین ردیفهای نوکلئوتیدی فاقد سیتوزین - گوانین (کنترل CpG منفی) نیز بالا می‌رود ولی میزان آن بسیار کمتر از گروه تست می‌باشد ( $P \leq 0.05$ ). بر خلاف سلولهای طحالی، در مایع‌رویی کشت بافت ریه بین گروه‌های مختلف تحت آزمایش، تفاوت قابل ملاحظه‌ای در مقدار اینترفرون گاما مشاهده نشد ( $P \leq 0.05$ ). در جدول شماره ۲ مقادیر این سایتوکاین در گروه‌های مورد آزمایش آورده شده است.

**جدول شماره ۲** - نتایج حاصل از اندازه‌گیری سایتوکاین‌های ترشح شده در محیط کشت سلولهای طحالی و بافت ریه موشهای تحت آزمایش با روش الیزا

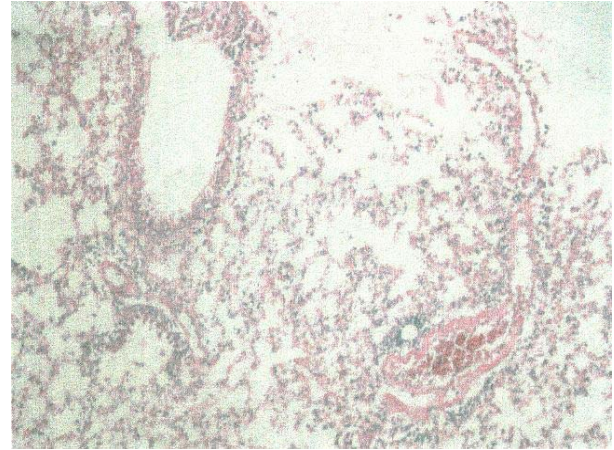
ردیف	گروه	غلظت اینترفرون گاما (پیکوگرم در میلی‌لیتر)	
		کشت سلولهای طحال (mean $\pm$ SD)	کشت بافت ریه (mean $\pm$ SD)
۱	تست	۵۰۹۲ $\pm$ ۲۰۲/۳۳	۱۱/۵۸ $\pm$ ۱/۶۶
۲	کنترل منفی	۱۲۴/۱۷ $\pm$ ۱۰/۶۸	۷/۳۳ $\pm$ ۰/۹۳
۳	کنترل آنتی‌ژن	۱۹۸/۳۳ $\pm$ ۲۰/۱۷	۸/۲۵ $\pm$ ۲/۱۹
۴	کنترل CpG منفی	۲۴۸۶/۶۷ $\pm$ ۱۸۲/۹۴	۸ $\pm$ ۱/۱

از آنجا که تاثیر مثبت این مواد در کاهش یا درمان واکنش‌های التهابی ناشی از آنتی‌ژن‌هایی مثل آلومین و همینطور برخی از آلرژن‌های شایع مثل رگ وید قبلاً تأیید شده است<sup>(۱)</sup>، در این مطالعه نقش تعدیل‌کنندگی آن در کنترل واکنش‌های التهابی ناشی از عصاره آلرژیک گیاه سلمه‌تره در مدل آزمایشگاهی آسم بررسی شد. برای این کار روش تزریق همزمان ردیف‌های سیتوزین - گوانین و آنتی‌ژن از طریق داخل صفاقی انتخاب شد. موش‌های تحت آزمایش پس از حساس شدن با آنتی‌ژن (گروه کنترل آنتی‌ژن)، مخلوط آنتی‌ژن و ردیف‌های سیتوزین - گوانین (گروه تست)، بافر (گروه کنترل منفی) و یا نوکلئوتیدهای فاقد ردیف‌های سیتوزین - گوانین (کنترل CpG منفی) که با ۲ بار تزریق داخل صفاقی به فاصله یک هفته صورت گرفت، در معرض برخورد با آنتی‌ژن بصورت استنشاقی قرار گرفتند.

به منظور بررسی نتایج آزمایش نیز تعدادی از پارامترهای ایمونولوژیک که نشان دهنده فعالیت لنفوسیت T کمکی می‌باشند، انتخاب شدند. برای این کار مقدار اینترفرون گاما سیستمیک به عنوان شاخص فعالیت لنفوسیت T کمکی - یک و مقدار ایمونوگلوبولین - ای سرمی و میزان انفیلتراسیون سلولهای ائوزینوفیل و التهابی در ریه به عنوان شاخص فعالیت لنفوسیت T کمکی - دو اندازه‌گیری شدند.

از طرف دیگر با توجه به گزارش‌هایی که اخیراً در خصوص پاسخ‌های التهابی موضعی و تولید سایتوکاین‌ها توسط سلولهای ایمنی موجود در بافت مخاطی ارایه شده‌اند<sup>(۲۰)</sup>، در این مطالعه علاوه بر اندازه‌گیری میزان سایتوکاین‌ها و مقدار ایمونوگلوبولین - ای سیستمیک، مقدار این مواد در محیط کشت بافت ریه موش‌های تحت آزمایش نیز مورد مطالعه قرار گرفتند.

همان طور که نتایج حاصل از پارامترهای فوق در جداول شماره ۲-۴ نشان می‌دهند، به نظر می‌رسد الیگونوکلئوتیدهای حاوی ردیف‌های سیتوزین - گوانین می‌توانند یک نقش پیشگیری کننده در بروز آسم توسط گیاه آلرژیک سلمه‌تره داشته باشند که این نتایج مشابه یافته‌های برخی مطالعات دیگر می‌باشند.<sup>(۱۴)</sup> مطالعه حاضر نشان داد که هر چند میزان تولید سیستمیک گاما اینترفرون در موش‌های گروه دریافت کننده آنتی‌ژن در مقایسه با گروه کنترل منفی (تحت درمان با بافر فسفات نمکی) افزایش داشته



شکل شماره ۱- تصویر میکروسکوپی برش بافت ریه رنگ‌آمیزی شده با ائوزینوفیل - همتوکسین در موش حساس شده با ردیف‌های سیتوزین - گوانین/آنتی‌ژن

جدول شماره ۴- نتایج حاصل از مطالعات بافت‌شناسی ریه موش‌های تحت آزمایش. تعداد ائوزینوفیل‌ها در ۱۰ میدان میکروسکوپی با قدرت بالا گزارش شده است.

شماره	گروه	تعداد ائوزینوفیل در ۱۰ میدان میکروسکوپی	شمای کلی بافت
۱	تست	۰ ± ۰	طبیعی
۲	کنترل منفی	۰/۱۷ ± ۰/۴۱	طبیعی
۳	کنترل آنتی‌ژن	۱/۵ ± ۱/۰۵	انفیلتراسیون لنفوپلازما سیتیک
۴	کنترل ODN	۰ ± ۰	طبیعی

## بحث

روی هم رفته گزارش‌های مختلف نشان می‌دهند که استفاده از ترکیبات حاوی ردیف‌های سیتوزین - گوانین می‌تواند آثار متعددی در تعدیل پاسخ‌های التهابی و بخصوص تغییر الگوی سایتوکاینی از لنفوسیت T کمکی - دو به سمت لنفوسیت T کمکی - یک داشته باشد که تمامی آنها تایید کننده آثار مثبت این ترکیبات در کاهش پاسخ‌های التهابی و آلرژیک در حیوانات آزمایشگاهی و انسان می‌باشند.<sup>(۱۸ و ۴۰)</sup> در حال حاضر این ترکیبات به عنوان یکی از کاندیداهای مورد استفاده در تهیه واکنش‌های ضد آسم و آلرژیک مطرح بوده و در برخی مطالعات بالینی تحت بررسی می‌باشند.<sup>(۱۹ و ۱۳)</sup>

حیوانی آسم انجام شده است ولی همانند برخی گزارش‌های دیگر، به نظر می‌رسد تجربه آن در انسان توسط متخصصین بالینی می‌تواند یک روش ایمن و مودولتوری مفید در پیشگیری از بروز علائم آسم و همچنین درمان آن را معرفی نماید.<sup>(۱)</sup> با این حال محدودیت این مطالعه در این بود که فقط مقدار ایمونوگلوبولین - ای مورد مطالعه قرار گرفته است در صورتی که برخی گزارش‌ها نشان می‌دهند که آنتی‌بادی‌های - جی و زیر کلاس‌های آن در ارزیابی پاسخهای التهابی موش اهمیت بیشتری دارند<sup>(۲۳ و ۲۴)</sup>؛ به نظر می‌رسد که اندازه‌گیری این زیر کلاس‌ها به همراه مقدار ایمونوگلوبولین - ای در مطالعه حاضر می‌توانست نتایج دقیق‌تری داشته باشد، لذا انجام آن در مطالعات بعدی پیشنهاد می‌شود.

#### نتیجه‌گیری

آزمایش‌های انجام شده بر روی مدل آزمایشگاهی آسم نشان دادند که این ترکیبات می‌توانند پاسخ‌های ایمنی التهابی را بخصوص در ریه تعدیل کرده و نقش پیشگیری کننده در بروز علائم آسم آلرژیک ایفا نمایند، لذا با توجه به اهمیت نقش گیاه فوق در آلرژی‌زایی جمعیت ایرانی، پیشنهاد می‌شود کاربرد این ترکیبات در بیماران نیز توسط همکاران متخصص آلرژی مورد بررسی قرار بگیرد و در صورتی که مانند برخی از تحقیقات گزارش شده نتایج مفید آن تأیید گردید، بتوان از این مواد در پیشگیری و درمان بیماران آلرژیک استفاده نمود.

#### تقدیر و تشکر

این تحقیق با استفاده از حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران در قالب طرح تحقیقاتی (شماره ثبت: ۵۷۷) انجام گردیده است که بدین وسیله نویسندگان مقاله، مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسؤولین آن مرکز و سرکار خانم دکتر حسینی مشاور محترم آماری، دکتر سهیلا اژدری به جهت در اختیار گذاشتن برخی مواد آزمایشگاهی، خانم ثریا رفیعی به جهت امور تایپ و هماهنگی و خانم پریوش دانش به جهت کمک در اجرای امور آزمایشگاهی، ابراز می‌دارند.

است، ولی این افزایش در گروه دریافت کننده الیگونوکلئوتیدها، بخصوص گروه دریافت کننده ردیفهای سیتوزین - گوانین، بسیار بیش‌تر و در حدود ۴۰ برابر بوده است. همانطور که در برخی گزارش‌ها آمده<sup>(۲۱ و ۲۲)</sup>، نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که ردیفهای فاقد سیتوزین - گوانین نیز احتمالاً با مکانیسم‌های متفاوتی می‌توانند دارای آثار مثبت ضدالتهابی و تعدیل‌کنندگی باشند، بطوری که نتایج حاصل از دو گروه تست و کنترل الیگونوکلئوتید، بیش‌تر از سایر گروه‌ها به یکدیگر نزدیک است.

علاوه بر این همانند سایر گزارش‌ها در خصوص غلظت مقدار ایمونوگلوبولین - ای تام سرمی<sup>(۲۲ و ۲۳)</sup>، مطالعه حاضر نیز نشان داد که تماس با آنتی‌ژن موجب افزایش شدید این آنتی‌بادی می‌گردد (بیش از ۷ برابر) ولی تجویز توام آن با الیگونوکلئوتیدهای حاوی ردیفهای سیتوزین - گوانین این مقدار را به میزان ۸۰٪ کاهش می‌دهد. روی هم رفته با توجه به گزارش‌های متفاوتی که در خصوص این آنتی‌بادی ارابه شده‌اند، به نظر می‌رسد که اندازه‌گیری این مارکر در ارزیابی نقش سی - پی - جی در پاسخ‌های ایمنی چندان مناسب نبوده و نتایج یکدستی ارائه نمی‌دهد. در عوض پیشنهاد می‌شود بجای بررسی مقدار ایمونوگلوبولین - ای تام سرمی به تنهایی، از مطالعات هیستولوژیک بافت ریه و شمارش ائوزینوفیل‌ها و سلولهای التهابی موضعی نیز جهت ارزیابی دقیق‌تر شرایط التهابی و تعدیل پاسخ‌های ایمنی کمک گرفته شود. در این مطالعه، بررسی بافت‌شناسی ریه موش‌های تحت آزمایش نشان داد هر چند میزان ایمونوگلوبولین - ای سرم در گروه دریافت کننده الیگونوکلئوتیدهای حاوی ردیفهای سیتوزین - گوانین همچنان بالاتر از گروه کنترل منفی بود، ولی آثار مثبت این ترکیبات در جلوگیری از بروز واکنش‌های التهابی موضعی در بافت ریه کاملاً مشهود است، بطوریکه هیچ‌گونه آثار ائوزینوفیلی و التهابی در ریه این موش‌ها ملاحظه نشد. بنابراین یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان می‌دهند که استفاده از الیگونوکلئوتیدهای حاوی ردیفهای سیتوزین - گوانین می‌تواند در جلوگیری از بروز واکنش‌های التهابی و آسم نسبت به یکی از شایع‌ترین آلرژن‌های ایران یعنی گرده گیاه سلمه تره موثر باشد.

بطور کلی می‌توان گفت که هر چند این مطالعه در مدل

asthma induced by repeated antigen exposure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 285: L1137-L1146.

14- Suzuki M, Matsumoto T, Ohta N, Min WP, Murakami S. Intranasal CPG DDNA therapy during allergen exposure in allergic rhinitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2007; 139(2): 246-51.

15- Suzuki M, Matsumoto T, Ohta N, Min R, Murakami S, Zhang X, et al. Immunotherapy with CPG DNA conjugated with T-cell epitope peptide of an allergenic Cry j 2 protein is useful for control of allergic conditions in mice. *Int Immunopharmacology* 2007; (1): 46-52.

16- Waag D, McCluskie M, Zhang N, Krieg A. A CpG Oligonucleotide Can Protect Mice from a Low Aerosol Challenge Dose of *Burkholderia malle*. *Infection and Immunity* 2006 march; 74(3): 1944-8.

17- Jain VV, Kline JN. CpG DNA. immunomodulation and remodelling of the asthmatic airway. *Expert Opin Biol Ther* 2004 Sep; 4 (9): 1533-40.

18- Kline JN. Effects of CPG DNA on Th1/Th2 balance in asthma. *Curr Top Microbiol* 2000; 247:211-15.

19- Mo JH, Park SW, Rhee CS, Takabayashi K, Lee SS, Quan SH, et al. Suppression of allergic response by CPG motif oligodeoxy nucleotide-house dust mite conjugate in animal model of allergic rhinitis. *Am J Rhinol* 2006; 20(2): 212-8.

20- Banerjee B, Kelly KJ, Fink J, James D. Henderson J, Bansal NK, et al. Modulation of Airway Inflammation by Immunostimulatory CpG Oligodeoxynucleotides in a Murine Model of Allergic Aspergillosis. *Infection and Immunity* 2004 october; 72(10): 6087-94.

21- Gould HJ, Takhar P, Harries H, Durham TR, Corrigan Ch. Germinal center reaction in allergic inflammation. *TRENDS in immunology* 2006; 27(10): 446-52.

22- Vollmer J, Weeratan RD, Jurk M, Samuelowitz U, McCluskie MJ. Oligodeoxynucleotides lacking CpG dinucleotides mediate Toll-like receptor 9 dependent T helper type 2 biased immune stimulation. *Immunology* 2004; 113: 212-23.

23- Kitagaki K, Jain V, Businga TR, Hussain I, Kline JN. Immunomodulatory Effects of CpG Oligodeoxynucleotides on Established Th2 Responses. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2002 November; 9: 1260-9.

24- Jahn-Schmid B, Wiedermann U, Bohle B, Ropa A, Ebner C. Oligonucleotides containing CpG motifs modulate the allergic TH2 response of BALB/c mice to Bet V 1, the major birch pollen allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104(5):1015-23.

1- Hussain I, Kline JN. CpG oligodeoxynucleotides: a novel therapeutic approach for atopic disorders. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2003; 2(3): 199-205.

2- Sano K, Shirota H. CpG oligodeoxynucleotides as a future vaccine for allergic diseases. *Allergy International* 2005; 54: 17-28.

3- Kline JN, Kitagaki K, Businga TR, Jain V. Treatment of established asthma in a murine model using CpG oligodeoxynucleotides. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283: L170-L179.

4- Wild JS, Sigounas A, Sur N, Siddiqui MS, Jurimoto M, et al. IFN-Inducing factor(IL-18) Increases Allergic sensitization, Serum IgE, Th2 Cytokines, and Airway Eosinophilia in a Mouse Model of Allergic Asthma. *The Journal of Immunology* 2000; 164: 2701-10.

5- Santeliz JV, Nest GV, Traquina P, Larsen E. A mbal 1-linked CPG ODN reverse established airway hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 109(3): 455-61.

6- Ahmadi Afshar A. Use of *Chenopodium*, an extract in prick testing. Post doc. Tesis, Tehran University; 1381: 53-60.

7- Mousavi T, Asadi N, Movahedi M. The comparison of conventional and WHO methods for protein determination of allergic extracts. *Journal of Allergy, Asthma and Immunology* 2003; 2(2): 107-9.

8- Mousavi T, Asadi N, Tebiyanian M. Study of *Chenopodium album* allergenic extract to induce allergic asthma in mouse. *Iranian Journal of Immunology* 2005; 2(3): 56-9.

9- Dennis M. Klinman Adjuvant activity of CPG oligodeoxynucleotides. *International Reviews of Immunology* 2006; 25: 135-53.

10- Racila DM, Kline JN. Perspectives in asthma: molecular use of microbial products in asthma prevention and treatment. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 116(6): 1202-5.

11- Kitagaki K, Businga TR, Kline JN. Oral administration of CPG-ODNs suppresses antigen-induced asthma in mice. *Clin Exp Immunol* 2006; 143(2): 249-59.

12- Inoue J, Yotsumoto S, Sakamoto T, Tsuchiya S, Aramaki Y. Changes in immune responses to mite antigen sensitized through barrier-disrupted skin with CPG-ODN in mice. *Biol Pharm Bull* 2006; 29(2): 385-7.

13- Jain VV, Businga TR, Kitagaki K, George CL, O'Shaughnessy PT, Kline JN. Mucosal immunotherapy with CpG oligodeoxynucleotides reverses a murine model of chronic

# Study of the Effects of CpG Oligonucleotides on IFN- $\gamma$ and IgE Responses to *Chenopodium Album* Allergen in Murine Model of Asthma

\* T. Mousavi, MD<sup>I</sup>      A. R. Salek Moghaddam, MD<sup>II</sup>      R. Falak, MS<sup>III</sup>  
 A.R. Sadeghipoor, MD<sup>IV</sup>      M. Hejazi, BS<sup>V</sup>

## Abstract

**Background & Aim:** Worldwide increasing number of allergic disorders is one of the most important health challenges, and achieving safe prophylactic and therapeutic procedures is the main aim of the investigators. CpG oligodeoxynucleotides (CpG ODN) which modulate the immune responses and change the cytokine patterns by several mechanisms are among these procedures.

**Material and Method:** In this experimental study we investigated the effects of CpG motif on immune responses to *Chenopodium album* (CH.a), a common allergenic plant in Iran, in a murine model of asthma. We used CH.a pollen extract with CpG to sensitize the mice and compared a number of immunologic parameters such as interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) and IgE levels between case and control groups. To do this, IFN- $\gamma$  and IgE levels were measured in splenocyte and lung culture supernatants. Histological studies were also conducted to identify inflammatory cells in lung airways. ANOVA test was used to analyze the data.

**Results:** The study showed although CpG ODN cannot reduce IgE levels to the normal range, they can lower IgE levels by 80% and have a potent influence to augment both systemic and local levels of IFN- $\gamma$  as a Th1 activity marker ( $P < 0.01$ )

**Conclusion:** The results of the study have consistency with other reports and confirm the benefits of CpG motifs in reducing lung inflammatory responses. Since CpG components have potency to shift immune activity from Th2 to Th1 responses, it seems that co-administration of CpG/antigen can modulate inflammatory responses to different allergenic antigens.

**Key Words:** 1) Asthma 2) CpG-ODN 3) *Chenopodium Album* 4) IgE 5) IFN- $\gamma$

**I)** Associate Professor of Immunology. Immunology Department. Faculty of Medicine. Shahid Hemmat Expressway. Shahid Chamran Crossroads. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran. (\* Corresponding Author)

**II)** Professor of Immunology. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.

**III)** MS in Immunology. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.

**IV)** Assistant Professor of Pathology. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.

**V)** BS in Laboratory Sciences. Razi Institute. Tehran, Iran.