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

***دکتر طاهره موسوی** I

دکتر علیرضا سالک‌مقدم II

رضا فلک III

دکتر علیرضا صادقی‌پور IV

مهدی حجازی V

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 ـ گوانین(CpG-ODNs) است که با مکانیسم‌های متعدد منجر به تعدیل پاسخ‌های ایمنی و تغییر الگوی سایتوکاینی در سیستم ایمنی می‌شود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی یا مداخله‌ای(experimental) نقش ترکیبات حاوی بازهای سیتوزین ـ 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 آلرژی‌زای گرده گیاه فوق، تهیه و به همراه ردیف‌های نوکلئوتیدی حاوی سیتوزین ـ 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(Interferon-γ=IFN-γ) و ایمونوگلبولین ـ ای(Immunoglobulin E=IgE) در مایع کشت سلولهای طحالی و بافت ریه موشها و همچنین ایمونوگلوبولین ـ 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 ـ گوانین نمی‌توانند میزان ایمونوگلوبولین ـ 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 ـ 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 ـ گوانین در تغییر جهت پاسخ سایتوکاین‌ها 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 ـ ای ۵ – اینترفرون گاما

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 ـ درمانی ایران، تهران، ایران(*مؤلف مسؤول).

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

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

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

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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-01-28]

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

الیگونوکلئوتیدهای حاوی ردیفهای سیتوزین ـ گوانین که در توالی‌های DNA باکتری‌ها وجود دارند، یکی از موثرترین موادی هستند که با القای پاسخ‌های وابسته به لنفوسیت T کمکی ـ یک، پاسخ‌های سلولی موجود در اختلالات اتوپیک را مهار می‌کنند.[۱] بطور کلی مکانیسم‌های متعددی را در نقش ایمنی ردیفهای سیتوزین ـ 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 ـ ۱۲، تغییر کلاس آنتی‌بادی از ایمونوگلوبولین ـ ای به ایمونوگلبولین ـ جی، فعال کردن سلولهای T تنظیم کننده و مهار سلولهای T کمکی ـ دو می‌باشند.[۱و ۲]

نقش ردیفهای سیتوزین ـ 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 آلرژی به بعضی از آلرژن‌ها را در موش آزمایشگاهی تا حدود زیادی کاهش دهد.[۳-۵] این اثر به دلیل توانایی ردیفهای سیتوزین ـ گوانین در افزایش تولید سایتوکاین‌های T کمکی ـ یک و پیش التهابی و همین‌طور فعال کردن سلولهای عرضه کننده آنتی‌ژن می‌باشد.

گرده گیاه کنوپودیوم آلبوم یا سلمه تره، یکی از شایع‌ترین عوامل آلرژی‌زا 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.[۶] مطالعات قبلی ما نیز در خصوص گرده گیاه سلمه‌تره 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 آلرژی استفاده کرد.[۷و ۸] استفاده از ردیفهای سیتوزین ـ گوانین در تعدیل پاسخ‌های التهابی انسان نیز اخیراً توسط برخی از محققین گزارش شده است.[۹و ۱۰] در رابطه با نحوه استفاده از این ترکیبات، روشهای متفاوتی توسط پژوهشگران مختلف گزارش شده است که از جمله آنها تجویز توام ردیفهای سیتوزین ـ گوانین با آنتی‌ژن، کاربرد فرم کونژوگه شده آن با آنتی‌ژن، مصرف ردیفهای سیتوزین ـ گوانین به تنهایی، تجویز سیستمیک و تجویز از طریق مخاط گوارش یا بینی می‌باشد.[۱۱-۱۵] 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.[۱۶و ۱۷] در این مطالعه نقش تجویز همزمان ردیفهای سیتوزین ـ گوانین و آنتی‌ژن در تعدیل پاسخ‌های آلرژیک موش Balb/C به عصاره آلرژی‌زای گیاه کنوپودیوم آلبوم(سلمه تره) به عنوان یکی از گیاهان آلرژی‌زای 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 آلرژی‌زای مورد استفاده از این طرح مطابق با روش گزارش شده قبلی[۷] 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.

نوکلئوتیدهای حاوی ردیفهای سیتوزین ـ گوانین و کنترل منفی از شرکت in vivo Gen ،USA 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 ـ گوانین، از تزریق داخل صفاقی آلرژن(روزهای ۱ و ۷) برای مرحله حساس کردن استفاده شد.

جهت حساس کردن موشها ۵۰ میکروگرم از محلول

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-01-28]

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 الیگونوکلئوتید 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(phosphate buffered saline=PBS). 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 ۵×۱۰^{۶} میلی‌لیتر، تهیه و در میکروپلیت‌های ۲۴ خانه‌ای کشت داده شد(۵۰۰۰۰۰۰ در هر حفره). جهت کشت سلولی از محیط RPML 1640، 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 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 هماتوکسیلن و ائوزین از نظر وجود ائوزینوفیلی و سلولهای التهابی مورد مطالعه قرار گرفت.

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

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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-01-28]

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

اینترفرون گاما در تمام نمونه‌های مورد آزمایش با روش الایزا اندازه‌گیری شد. برای این آزمایش از کیت الایزای BD OPTEIA(BD Bioscience) استفاده شد و تمام مراحل انجام آزمایش مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت.

مقادیر حاصل از اندازه‌گیری سایتوکاین‌ها و ایمونوگلوبولین ـ ای در موشهای هر گروه براساس فرمول mean±SEM محاسبه شده و با استفاده از تست ANOVA مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها

نتایج حاصل از اندازه‌گیری اینترفرون گاما در مایع رویی کشت سلولهای طحال موشهای تحت آزمایش نشان داد که تزریق همزمان آنتی‌ژن و ردیفهای سیتوزین ـ 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 ـ گوانین(کنترل CpG منفی) نیز بالا می‌رود ولی میزان آن بسیار کمتر از گروه تست می‌باشد($P\leq ۰/۰۵$). بر خلاف سلولهای طحالی، در مایع رویی کشت بافت ریه بین گروه‌های مختلف تحت آزمایش، تفاوت قابل ملاحظه‌ای در مقدار اینترفرون گاما مشاهده نشد($P\leq ۰/۰۵$). 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 الایزا

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

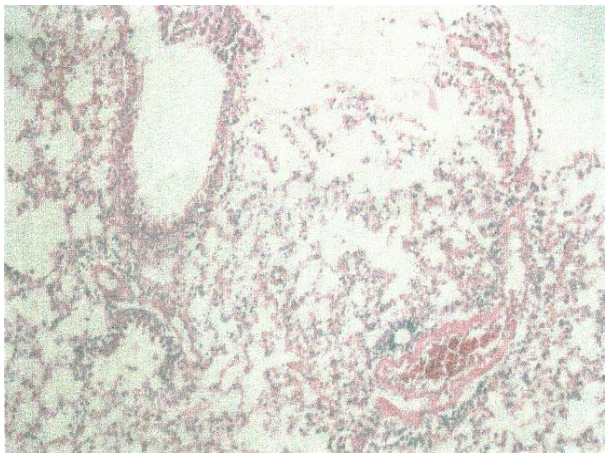
اندازه‌گیری ایمونوگلبولین ـ ای سرم حیوانات مورد آزمایش با روش الایزا نشان داد که هر چند مقدار این آنتی‌بادی در خون موشهای دریافت کننده ردیفهای سیتوزین ـ گوانین نسبت به موشهای گروه کنترل منفی، افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته است ولی این افزایش معنی‌دار در موشهای تمام گروه‌های دیگر نیز مشاهده می‌گردد. نکته قابل توجه این است که مقایسه بین گروه‌های تست و کنترل آنتی‌ژن نشان دهنده تفاوت قابل ملاحظه بین دو گروه فوق می‌باشد($P\leq ۰/۰۱$). مقدار ایمونوگلوبولین ـ ای تام ترشح شده در محیط کشت بافت ریه نیز در موشهای تحت درمان با ردیفهای سیتوزین ـ گوانین در مقایسه با گروه کنترل منفی افزایش معنی‌داری دارد($P\leq ۰/۰۵$). 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 الایزا

شماره	گروه	غلظت IgE تام(µg/mL)	
		سرم (mean±SD)	ریه (mean±SD)
۱	تست	۲۶۳۳/۳ ± ۱۳۶/۳	۱۳/۱ ± ۱/۴
۲	کنترل منفی	۶۱۰ ± ۲۸/۹	۸ ± ۰/۸
۳	کنترل آنتی‌ژن	۴۰۳۳ ± ۲۵۰/۳	۲۴/۸ ± ۲/۴
۴	کنترل ODN	۴۳۵۰ ± ۳۰۸/۲	۱۵ ± 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.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-01-28]



شکل شماره ۱- تصویر میکروسکوپی برش بافت ریه رنگ‌آمیزی شده با ائوزینوفیل ـ هماتوکسیلن در موش حساس شده با ردیفهای سیتوزین ـ 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 لنفوپلاسما سیتیک
۴	کنترل ODN	۰ ± ۰	طبیعی

بحث

روی هم رفته گزارش‌های مختلف نشان می‌دهند که استفاده از ترکیبات حاوی ردیفهای سیتوزین ـ گوانین می‌تواند آثار متعددی در تعدیل پاسخ‌های التهابی و بخصوص تغییر الگوی سایتوکاینی از لنفوسیت T کمکی ـ دو به سمت لنفوسیت T کمکی ـ یک داشته باشد که تمامی آنها تایید کننده آثار مثبت این ترکیبات در کاهش پاسخ‌های التهابی و آلرژیک در حیوانات آزمایشگاهی و انسان می‌باشند.[۱، ۴و ۱۸] در حال حاضر این ترکیبات به عنوان یکی از کاندیداهای مورد استفاده در تهیه واکسن‌های ضد آسم و آلرژی مطرح بوده و در برخی مطالعات بالینی تحت بررسی می‌باشند.[۱۳و ۱۹]

از آنجا که تاثیر مثبت این مواد در کاهش یا درمان واکنش‌های التهابی ناشی از آنتی‌ژن‌هایی مثل آلبومین و همینطور برخی از آلرژن‌های شایع مثل رگ ویید قبلا تائید شده است[۱]، در این مطالعه نقش تعدیل کنندگی آن در کنترل واکنش‌های التهابی ناشی از عصاره آلرژی‌زای گیاه سلمه‌تره در مدل آزمایشگاهی آسم بررسی شد. برای این کار روش تزریق همزمان ردیفهای سیتوزین ـ 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 ـ گوانین(گروه تست)، بافر(گروه کنترل منفی) و یا نوکلئوتیدهای فاقد ردیفهای سیتوزین ـ 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 گامای سیستمیک به عنوان شاخص فعالیت لنفوسیت T کمکی ـ یک و مقدار ایمونوگلبولین ـ ای سرمی و میزان انفیلتراسیون سلولهای ائوزینوفیل و التهابی در ریه به عنوان شاخص فعالیت لنفوسیت T کمکی ـ 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[۲۰]، در این مطالعه علاوه بر اندازه‌گیری میزان سایتوکاین‌ها و مقدار ایمونوگلوبولین ـ 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 ۴-۲ نشان می‌دهند، به نظر می‌رسد الیگونوکلئوتیدهای حاوی ردیفهای سیتوزین ـ گوانین می‌توانند یک نقش پیشگیری کننده در بروز آسم توسط گیاه آلرژی‌زای سلمه تره داشته باشند که این نتایج مشابه یافته‌های برخی مطالعات دیگر می‌باشند.[۱۴] 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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-01-28]

است، ولی این افزایش در گروه دریافت کننده الیگونوکلئوتیدها، بخصوص گروه دریافت کننده ردیفهای سیتوزین ـ گوانین، بسیار بیش‌تر و در حدود ۴۰ برابر بوده است. همانطور که در برخی گزارش‌ها آمده[۲۱و ۲۲]، نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که ردیفهای فاقد سیتوزین ـ گوانین نیز احتمالاً با مکانیسم‌های متفاوتی می‌توانند دارای آثار مثبت ضدالتهابی و تعدیل کنندگی 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 ـ ای تام سرمی[۱۵و ۲۲]، 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 ـ گوانین این مقدار را به میزان ۸۰٪ کاهش می‌دهد. روی هم رفته با توجه به گزارش‌های متفاوتی که در خصوص این آنتی‌بادی ارایه شده‌اند، به نظر می‌رسد که اندازه‌گیری این مارکر در ارزیابی نقش سی ـ پی ـ جی در پاسخ‌های ایمنی چندان مناسب نبوده و نتایج یکدستی ارائه نمی‌دهد. در عوض پیشنهاد می‌شود بجای بررسی مقدار ایمونوگلبولین ـ 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 بافت شناسی ریه موشهای تحت آزمایش نشان داد هر چند میزان ایمونوگلبولین ـ ای سرم در گروه دریافت کننده الیگونوکلئوتیدهای حاوی ردیفهای سیتوزین ـ 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 هیچ گونه 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 ـ 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 حیوانی آسم انجام شده است ولی همانند برخی گزارش‌های دیگر، به نظر می‌رسد تجربه آن در انسان توسط متخصصین بالینی می‌تواند یک روش ایمونومدولاتوری مفید در پیشگیری از بروز علائم آسم و همچنین درمان آن را معرفی نماید.[۱] با این حال محدودیت این مطالعه در این بود که فقط مقدار ایمونوگلبولین ـ ای مورد مطالعه قرار گرفته است در صورتی که برخی گزارش‌ها نشان می‌دهند که آنتی‌بادی‌های ـ جی و زیر کلاس‌های آن در ارزیابی پاسخهای التهابی موش اهمیت بیش‌تری دارند[۲۳و ۲۴]؛ به نظر می‌رسد که اندازه‌گیری این زیر کلاس‌ها به همراه مقدار ایمونوگلوبولین ـ 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 تائید 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 ـ 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.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-01-28]

فهرست منابع

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. Allergology 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. Amba 1-linked CPG ODN reverse established airway hyperresponsivveness in a murine model off asthma. J Allergy Clin Immunol 2004; 109(3): 455-61.

6- Ahmadi Afshar A. Use of Chenopodium, a 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 Adjuant 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-indduced asthma in mice. Cli 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-disruped skin with CPG-ODN in mice. Biol Pharm Bull 2006; 29(2): 385-7.

13- Jain VV, Businga TR, Kitagak K, George CL, O'Shaughnessy PT, Kline JN. Mucosal immunotherapy with CpG oligodeoxynucleotides reverses a murine model of chronic asthma induced by repeated antigen exposure. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2003, 285: L1137-L11 46.

14- Suzuki M, Matsumoto T, Ohta N, Min WP, Murakami S. Internasal 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 Immunopharmacolo 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 oligoddeoxy nucleotide-house –ddust 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- Gouldd 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 T R, 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.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-01-28]

Study of the Effects of CpG Oligonucleotides on IFN-γ and IgE Responses to Chenopodium Album Allergen in Murine Model of Asthma

**** T. Mousavi, MD***[I] ***A. R. Salek Moghaddam,MD***[II] ***R.Falak, MS***[III]
A.R. Sadeghipoor, MD[IV] ***M.Hejazi, BS***[V]

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-γ) and IgE levels between case and control groups. To do this, IFN-γ 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-γ 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-γ

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.*

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-01-28]