Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 3:13 IRDT on Sunday June 16th 2019

تاثیر عصاره سیتوزولی قارچ *آلترناریا آلترناتا* بر بلوغ سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیت و پلاریزاسیون پاسخ لنفوسیت‌های T در حضور پروتیین بازی میلین

علیرضا لقمانی*، نوروز دلیرژ
عبدالغفار اونق، هادی محب علیان

گروه ایمونولوژی، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، ارومیه، ایران.

چکیده

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۴/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۸/۳۰

زمینه و هدف: اسکلروز متعدد (Multiple sclerosis, MS) یک بیماری خود ایمن توام با اختلال در سیستم اعصاب مرکزی می‌باشد که ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک نقش مهمی در تعدیل یا پیشرفت این بیماری ایفا می‌کنند. تاثیر عصاره قارچ در بلوغ سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیت و تعدیل پاسخ لنفوسیت‌های T را در حضور پروتیین بازی میلین (Myelin Basic Protein, MBP) که به عنوان مدل آزمایشگاهی اسکلروز متعدد در نظر گرفته شده بود بررسی گردید. هدف این مطالعه تولید سلول‌های دندریتیک مناسب برای ایمونوتراپی و کاهش بیماری MS می‌باشد.

روش بررسی: در این بررسی به‌وسیله سایتوکین‌های Granulocyte/ macrophage-Colony stimulate Factor (GM-CSF) و اینترلوکین ۴ (IL-4)، مونوسیت‌های خون محیطی به سمت سلول‌های دندریتیک هدایت شد. سپس با پروتیین بازی میلین مدل بیماری اسکلروز متعدد در سلول‌های دندریتیک القا گردید و با عصاره قارچی *آلترناریا آلترناتا* اقدام به تیمار سلول‌های دندریتیک گردید هم‌چنین پاسخ سلول‌های لنفوسیت T حاصل از آن نیز مطالعه شد.

یافته‌ها: با تاثیر عصاره قارچی بر سلول‌های دندریتیک مجاور شده با MBP میزان بیان مولکول‌های سطحی CD14 کاهش و در مقابل CD83 و Human Leukocyte Antigen-DR (HLA-DR) افزایش پیدا کرد. هم‌چنین میزان ترشح سایتوکین IL-10 بر IL-12 غالب شد و در لنفوسیت‌های T میزان ترشح سایتوکین‌های IL-17 و اینترفرون- β (INF-β) کاهش پیدا کرد و در مقابل IL-4 افزایش یافت. این داده‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار بوده (P<۰/۰۵) و این اثرات با افزایش دوز عصاره قارچی از ۵۰ به ۱۰۰mg/ml تشدید گردید (P<۰/۰۰۱).

نتیجه‌گیری: عصاره قارچی *آلترناریا آلترناتا* با بلوغ سلول‌های دندریتیک و تعویض پاسخ لنفوسیت‌های T، به سمت Th2 موجب اثرات سودمند درمانی می‌گردد.

کلمات کلیدی: *آلترناریا آلترناتا*، عصاره سیتوزولی، پروتیین بازی میلین، بلوغ، سلول دندریتیک، لنفوسیت T.

*نویسنده مسئول: ارومیه، جاده سرو، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه میکروبیولوژی
تلفن: ۰۴۴۱-۲۷۷۰۵۰۸
E-mail: Alireza_trtr@yahoo.com

مقدمه

مونوسیت‌ها (Monocytes) حدود ۷٪-۳ از لوکوسیت‌های خون محیطی را تشکیل می‌دهند که ویژگی قوی برای تمایز به سلول‌های دندریتیک و ماکروفاژ را دارند. اصلی‌ترین شاخص سطحی در مونوسیت‌ها CD14 می‌باشد که سطح بالایی از کمپلکس اصلی سازگاری بافتی نوع ۲ (Major Histocompatibility Complex II) را بیان می‌کند و در عین حال باعث بیان مقدار ناچیزی از اینترلوکین ۱۰ (IL-10) در پاسخ به لیپوپلی‌ساکارید (LPS) می‌شود. هم‌چنین توانایی ترشح بالقوه فاکتور نکروز دهنده تومور (Tumor Necrosis Factor-α, TNF-α) و آزاد کردن واسطه‌های فعال اکسیژن را دارند که همگی از عوامل مخرب در بیماری اسکلروز متعدد Multiple Sclerosis (MS) بوده که در صورت کسب کردن ویژگی دندریتیک بالغ از عوامل مخرب فوق کاسته می‌شود.[1] اسکلروز متعدد یک ناتوانی، التهاب و

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 3:13 IRDT on Sunday June 16th 2019

تخریب میلین در سیستم اعصاب مرکزی (Central Nervous System, CNS) بوده که شرط اول برای ایجاد آن افزایش لنفوسیت‌های کمکی ۱ (Th1) خود واکنش‌گر در خون و عبور آن از سد خونی مغزی می‌باشد. بنابراین می‌توان گفت که لنفوسیت‌های Th1 در ایجاد این بیماری نقش کلیدی دارند و کاهش آن‌ها می‌تواند به نفع بهبود بیماری باشد.[۲] با در نظر گرفتن این‌که ضایعات پیش‌رونده نورونی مغز در بیماری اسکلروز متعدد غیر قابل برگشت می‌باشد همواره یافتن راهی برای کاهش ضایعات نورونی مغز و نخاع از امیدهای درمانی بوده است.[۳]

بیماری اسکلروز متعدد ماهیت خود ایمن دارد و اساس درمان بیماری بر مبنای استفاده از ترکیبات تعدیل‌گر و یا مهار کننده سیستم ایمنی استوار است. امروزه دو داروی تعدیل‌گر سیستم ایمنی، اینترفرون بتا (INF-β) و گلاتیرآمر استات (Glatiramer acetate) به همراه دو داروی مهارگر سیستم ایمنی، ناتازیلوماب (Natalizumab) و ریتوکسی ماب (Rituximab) برای درمان بیماری استفاده می‌شود. INF-β یک داروی استاندارد تایید شده می‌باشد که در درمان MS به‌کار می‌رود این دارو اثرات درمانی خود را بیش‌تر از طریق جلوگیری از پاسخ ایمنی Th1 و هم‌چنین کاهش تحریک ترشح اینترفرون (IFN-γ)γ و IL-12 توسط سلول‌های دندریتیک اعمال می‌کند.[۴و۵] از ویژگی‌های بیماری MS افزایش IL-17 در CNS افراد بیمار می‌باشد و ثابت شده که نقش اصلی در شکستن سد خونی-مغزی و ایمونوپاتوژنز بیماری MS دارد.[۶]

پروتیین بازی میلین (Myelin Basic Protein, MBP) به عنوان شناخته شده‌ترین اتوآنتی‌ژن از پروتیین‌های میلین می‌باشد.[۷] در بیماری MS افزایش سایتوکین‌های پیش التهابی از قبیل INF-γ، (TNF) لنفوتوکسین α، IL-12 و هم‌چنین کاهش Tumor Grow Factor β (TGF-β) و IL-10 مشاهده می‌شود. مطالعات زیادی در زمینه درمان MS با سلول‌های دندریتیک تیمار شده در شرایط آزمایشگاهی و تزریق مجدد آن‌ها به همان بیماران انجام گرفته است مانند تزریق سلول‌های دندریتیک اتولوگ تیمار شده با IFN-γ به بدن بیمار می‌باشد و یا استفاده از داروهایی که با تاثیر بر سلول‌های دندریتیک، پلاریزاسیون سلول‌های لنفوسیت T را به سمت لنفوسیت‌های کمکی ۲ (Th2) هدایت می‌کند و جلوی روند پیشرفت بیماری را می‌گیرد و یا حداقل آن‌را کند می‌کند.[۸]

آلترناریا آلترناتا یک قارچ ساپروفیت و پاتوژن گیاهی می‌باشد که به ندرت در انسان ایجاد عوارض جلدی، مخاطی، پوستی و آسم می‌کند.[۹] از آنتی‌ژن Alt-a1 قارچ *آلترناریا آلترناتا* برای ایمونوتراپی و تعدیل ایمنی در بیماری‌های آسم و آلرژی استفاده می‌شود.[۱۰] در این مطالعه که به صورت مدل آزمایشگاهی پاسخ ایمنی بر علیه اتو آنتی‌ژن‌های موثر در بیماری MS طراحی شده است سلول‌های دندریتیک نابالغ پس از تولید از سلول‌های مونوسیت خون محیطی در مجاورت MBP (به عنوان آنتی‌ژن)، در حضور عصاره *آلترناریا آلترناتا* (عامل محرک بلوغ) به صورت بالغ در خواهند آمد. بعد از آن لنفوسیت‌های T اتولوگ در مجاورت سلول‌های دندریتیک بالغ تحریک شده و از نظر پاسخ پلاریزاسیون بررسی می‌شوند.

روش بررسی

هدف از این مطالعه پژوهشی و تحلیلی تولید سلول‌های دندریتیک مناسب برای استفاده ایمونوتراپی و کاهش حدت بیماری MS می‌باشد. این پژوهش از مهر تا اسفند ۱۳۹۰ در فضای پاک (Clean room) پژوهشکده زیست فن‌آوری دانشگاه ارومیه صورت گرفت. این آزمایشات در پنج تکرار صورت گرفت و به منظور سنجش فعالیت و بلوغ سلول‌های دندریتیک از تست‌های متفاوتی استفاده شد. در این خصوص برای سنجش فنوتیپ سلول‌ها از دستگاه فلوسایتومتری استفاده گردید و هم‌چنین مقدار سایتوکین‌های تولید شده از سلول‌های دندریتیک و لنفوسیت‌ها نیز به‌وسیله کیت الایزا اندازه‌گیری گشت.

۲-۱- تولید عصاره قارچی

قارچ لیوفیلیزه *آلترناریا آلترناتا* (۵۲۲۴) Persian Type Collection Culture, (PTCC) تهیه شده از کلکسیون قارچی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران در محیط سابرو دکستروز آگار و در دمای ۲۵ °C و به مدت پنج روز کشت داده شد. کشت مجدد قارچ رشد یافته در محیط چاپکس آگار جهت تولید انبوه اسپور قارچی صورت گرفت. سپس ۱×۱۰^{۶} اسپور قارچی با استفاده از بافر هنکس (Hanks Buffer, Sigma Co., USA) جمع‌آوری و بعد از عبور دادن اسپورها از تنضیف، به محیط مایع مخمر پایه نیتروژنی (Yeast Nitrogen Base) به منظور رشد ریسه‌های قارچی (Hypha)، در ۳۷ °C انکوباتور CO2

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 3:13 IRDT on Sunday June 16th 2019

و رطوبت ۵٪ به مدت ۱۸ ساعت انتقال داده شد. سپس کلافه‌های قارچی رشد یافته را بعد از سانتریفیوژ (۲۰۰۰g) به بافر Phosphate Buffered Saline (PBS) حاوی دو میلی‌لیتر Protease inhibitor, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)، ۵۰ میلی‌لیتر EDTA, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)، ۵۰ میلی‌لیتر Tris-HCl اضافه نموده و برای سونیکه کردن با شدت ۲۰۰۰۰AMP، فاصله ۱۰ ثانیه (دستگاه در حالت ۱۰ ثانیه روشن و۱۰ ثانیه خاموش قرار داده شد) و مدت زمان ۲۰ دقیقه آماده شد. بعد از سونیکه، هموژن به‌دست آمده در دمای $^{\circ}C$ ۴ و ۷۰۰۰g سانتریفیوژ شد. محلول پروتیینی رویی در کیسه دیالیز با Cut off ۱۰۰۰۰ در آب مقطر $^{\circ}C$ ۴ دیالیز و به منظور کاهش حجم آب ۲۴ ساعت لیوفیلیزه گردید. سپس از فیلتر ۰/۲mμ عبور داده شد و بعد از اندازه‌گیری پروتیین محلول به روش براد فورد، عصاره در دمای $^{\circ}C$ ۷۰- ذخیره شد.

۲-۲- تهیه سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC)

به منظور به دست آوردن PBMC، مقدار کافی خون هپارینه (۲۰۰U/ml) از افراد داوطلب در شرایط استریل اخذ شد و با مقدار هم حجم محیط کشت RPMI-1640, (Gibco-BRL, Paisley, UK) رقیق گردید و خون رقیق شده به آرامی بر روی فایکول که حجم آن برابر خون اولیه بود قرار گرفت. این ترکیب به مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت ۸۰۰g سانتریفیوژ گردید. سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی که در حد فاصل فایکول و خون رقیق شده بود به آرامی جمع‌آوری شد. PBMC به‌دست آمده به منظور حذف فایکول برابر هم حجم آن RPMI 1640 اضافه گردید و با سرعت ۴۸۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب سلول‌های حاصله مجددا به منظور حذف پلاکت‌ها با RPMI 1640 و با سرعت ۲۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه شستشو گردید. تعداد و میزان زنده بودن سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی به‌دست آمده با استفاده از رنگ تریپان بلو (Trypan blue) تعیین گردید.

۲-۳- تولید سلول‌های دتدریتیک القایی در حضور پروتیین بازی میلین (MBP) و تیمار آن با عصاره قارچ *آلترناریا آلترناتا*

تولید سلول‌های دندریتیک القایی در سه مرحله و تیمار آن در یک مرحله صورت پذیرفت. در مرحله اول و روز صفر کشت سلول، سلول‌های چسبنده بعد از اضافه کردن محیط کشت RPMI 1640 (۱۰۰۰ واحد/ میلی‌لیتر) تحت تاثیر سایتوکین‌های GM-CSF و IL4 (۵۰۰ واحد/ میلی‌لیتر) (Sigma Co, USA) به سلول‌های دندریتیک نابالغ تبدیل شدند. در مرحله دوم و روز سوم کشت سلول‌ها، مجددا از مقدار مشابهی IL4 و GM-CSF برای بالغ کردن سلول‌ها بهره‌گیری شد. در مرحله سوم و روز چهارم کشت سلول‌ها، MBP به منظور القاء سلول‌های دندریتیک خود واکنش‌گر (در شرایط آزمایشگاهی) اضافه گردید. در گروه تیمار مضاف بر این در روز پنج کشت سلول‌ها مقدار ۱۰۰μg/ml از عصاره قارچی *آلترناریا آلترناتا* و یا مایع رویی مونوسیت (Monocyte Conditioned Media, MCM) (۲۰ نانوگرم/ میلی‌لیتر) به آن اضافه گردید. اما در گروه کنترل فقط MCM به عنوان عامل بلوغ اضافه گردید.

تمامی این مراحل در شرایط استریل و گرم خانه‌گذاری در دمای $^{\circ}C$ ۳۷ و شرایط ۵٪ CO2 انجام شد. در روز هفتم سلول‌های دندریتیک برداشت شدند و از نظر مورفولوژی، فنوتیپ، میزان ترشح سایتوکین‌های IL-10 و IL-12 توسط سلول‌های دندریتیک و میزان ترشح سایتوکین‌های INF-γ، IL-4 و IL-17 توسط لنفوسیت‌های تحریک شده با سلول‌های دندریتیک به‌وسیله کیت الایزا (Peprotech, USA) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده مورد سنجش قرار گرفتند. برای تعیین فنوتیپ سلول‌های دندریتیک به‌دست آمده بعد از یک بار شستشوی سلول‌ها با بافر FACS، به مدت ۴۵ دقیقه در دمای $^{\circ}C$ ۴ با منوکلونال آنتی‌بادی Anti HLA-DR، Anti CD14، Anti CD83 و IgG موشی (برای کنترل ایزوتایپ) (Denmark, DAKO) به میزان ۱۰ میکرولیتر که همگی با Fluorescein Isothiocyanate (FITC) نشان‌دار شده بودند به طور جداگانه به همراه بافر Florescence Activated Cell Sorting, FACS) (۱۰۰μl) و سرم موشی دو درصد انکوبه گردید. سپس سلول‌ها دوباره به‌وسیله بافر FACS در دمای $^{\circ}C$ ۴ شسته شده و بلافاصله با دستگاه فلوسایتومتری FACSCalibor (Becton, USA) مورد تجزیه و بررسی قرار گرفت.

سنجش میزان ترشح سایتوکین‌های لنفوسیتی

پس از برداشت سلول‌های دندریتیک (کنترل و تیمار)، سوسپانسیون سلولی ۱×۱۰^{۵} از سلول‌های دندریتیک تهیه و به نسبت ۱/۱۰ از آن با لنفوسیت‌های T در پلت ۹۶ خانه‌ای ته گرد مجاورسازی شد، سلول‌های دندریتیک و لنفوسیت به مدت ۷۲ ساعت به ترتیب به نسبت ۱ به ۱۰ در دمای $^{\circ}C$ ۳۷ حاوی ۵٪ CO2 انکوبه گردید. سپس مایع رویی را برداشته و مقدار سایتوکین‌ها توسط

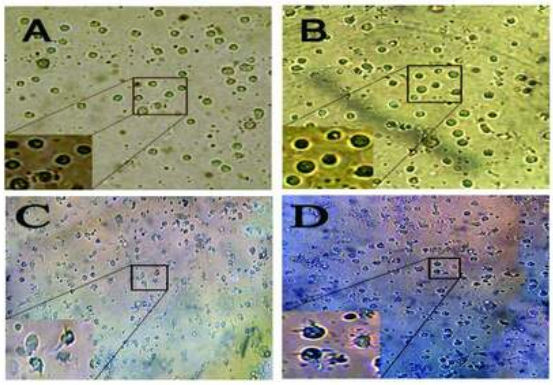
Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 3:13 IRDT on Sunday June 16th 2019

کیت الیزا اندازه‌گیری شد. در این تحقیق القا دندریتیک‌های خود واکنش‌گر توسط MBP بوده که به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد و تیمار آن به‌وسیله عصاره قارچی *آلترناریا آلترناتا* در دو دوز متفاوت ۵۰mg/ml و ۱۰۰mg/ml صورت پذیرفت و برای هر گروه پنج تکرار قرار داده شد. نتایج حاصله توسط برنامه SPSS ویراست ۱۷ تحلیل و مورد بررسی قرار گرفت. نتایج فنوتیپ توسط One Way ANOVA آنالیز شد. هم‌چنین نتایج تست الایزا توسط نرم‌افزار ۰/۷ CureXpert مورد آنالیز قرار گرفت.

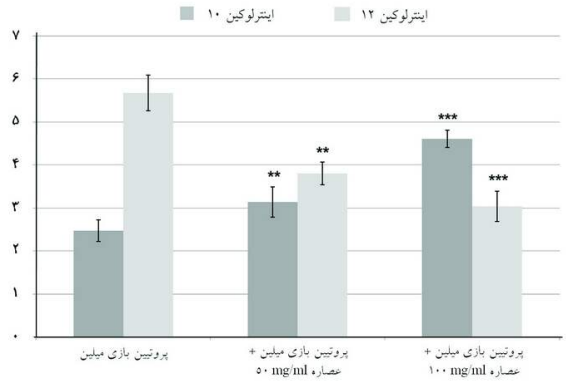
یافته‌ها

۳-۱- مورفولوژی: بررسی مورفولوژی سلول‌های دندریتیک با میکروسکوپ فاز معکوس (Invert) با بزرگ‌نمایی‌های مختلف انجام شد و نشان داد که سلول‌های دندریتیک تیمار شده با عصاره قارچی، در مقایسه با گروه کنترل، کشیده و دارای زواید سیتوپلاسمی بوده است. هم‌چنین در گروه کنترل اکثریت سلول‌ها درون فلاسک چسبیده بودند و با PBS+EDTA سرد جدا گردید. از نظر مورفولوژی بین سلول‌های دندریتیک تیمار شده با عصاره ۵۰mg/ml و عصاره ۱۰۰mg/ml اختلاف محسوس نبود (شکل ۱).

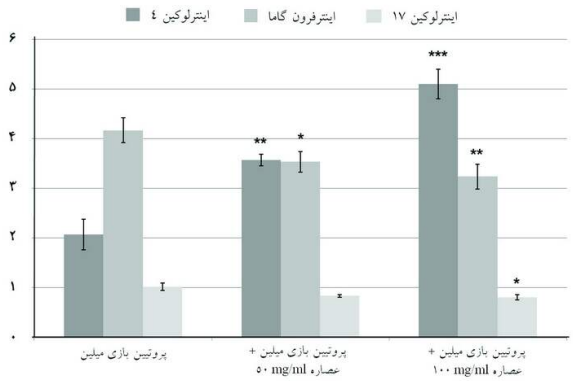
۳-۲- فنوتیپ: بررسی درصد نشان‌گرهای سطحی در سلول‌های دندریتیک با دستگاه فلوسایتومتری انجام شد. (نمودار ۲) و درصدهایی که به طور میانگین از پنج نمونه به‌دست آمد بدین قرار است: در مورد مولکول سطحی CD14، در گروه کنترل ۶±۴۳/۱٪، در گروه تیمار شده با عصاره (۵۰mg/ml)، ۴/۱±۲۴/۹ و در گروه تیمار شده با عصاره (۱۰۰mg/ml) این مقدار به ۱/۱±۱۴/۴ کاهش یافت. از لحاظ آماری با در نظر گرفتن P<۰/۰۱ بین گروه کنترل و تیمار اختلاف معنی‌داری وجود دارد اما در بین دو گروه تیمار (عصاره ۱۰۰mg/ml و ۵۰mg/ml) با وجود کاهش درصد CD14 در عصاره ۱۰۰mg/ml اختلاف معنی‌دار نمی‌باشد. در مورد شاخص CD83، میزان بیان این مولکول در گروه کنترل ۳/۹±۱۹/۷٪ بود و با به کار



شکل ۱: عکس‌برداری سلول‌های کنترل و تیمار با میکروسکوپ معکوس (۲۰۰x) A: سلول‌های مونوسیت جدا شده از خون محیطی B: سلول‌های دندریتیک بلوغ نیافته در حضور MCM و MBP (کنترل) C: سلول‌های دندریتیک تیمار با عصاره قارچی ۵۰mg/ml D: سلول‌های دندریتیک تیمار با عصاره قارچی ۱۰۰mg/ml.

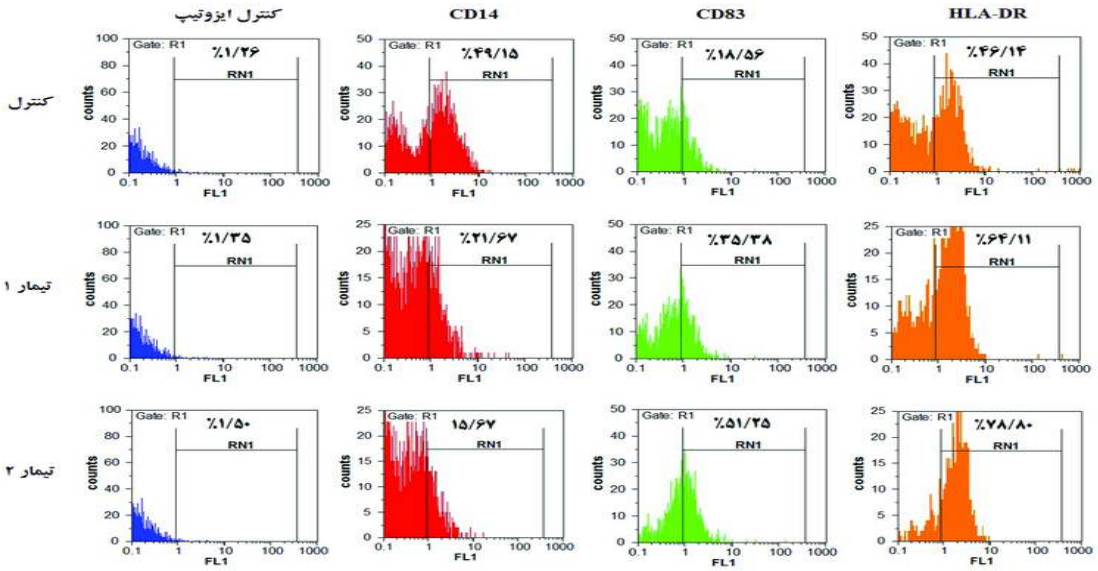


نمودار ۱: مقایسه میانگین سایتوکین‌های مترشحه از سلول‌های دندریتیک بر مقیاس ng/ml. (**P<۰/۰۱ معنی‌دار بود و ***P<۰/۰۰۱ معنی‌دار بود).

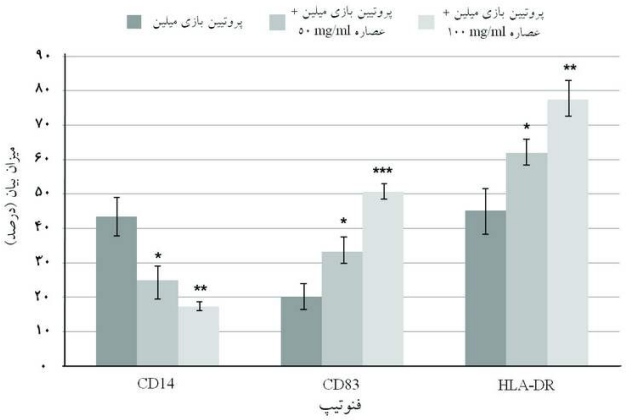


نمودار ۲: مقایسه میانگین سایتوکین‌های مترشحه از سلول‌های لنفوسیت T بر مقیاس ng/ml. (*P<۰/۰۵ معنی‌دار بود، **P<۰/۰۱ معنی‌دار بود و ***P<۰/۰۰۱ معنی‌دار بود).

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 3:13 IRDT on Sunday June 16th 2019



شکل ۲: نمونه‌هایی از نتایج فلوسایتومتری به‌دست آمده در هر سه گروه کنترل، تیمار با عصاره ۵۰mg/ml (تیمار ۱) و ۱۰۰mg/ml (تیمار ۲). ایندکس ایجاد شده در RN1 نشان‌دهنده درصد فراوانی مولکول‌های مربوطه در یک نمونه می‌باشد.



نمودار ۳: میزان بیان نشان‌گرهای سطحی CD14، CD83 و HLA-DR در سه گروه کنترل، تیمار با عصاره ۵۰mg/ml و ۱۰۰mg/ml. (*نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار P<۰/۰۵، **نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار P<۰/۰۱ و ***نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار P<۰/۰۰۱).

بردن عصاره ۵۰mg/ml این مقدار به ۳۳/۲±۴/۱ افزایش یافت، هم‌چنین این سیر افزایش در گروه تیمار شده با عصاره ۱۰۰mg/ml به مقدار ۵۰/۴±۲/۵٪ رسید. که این اختلاف بین گروه کنترل و تیمار و هم‌چنین بین گروه تیمار در دو دوز مختلف نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (P<۰/۰۱). در رابطه با بیان شاخص HLA-DR در گروه کنترل، تیمار با عصاره ۵۰mg/ml و تیمار شده با عصاره ۱۰۰mg/ml به ترتیب مقادیر ۶/۱±۴۵/۵، ۳/۸±۶۲/۱ و ۵/۳±۷۷/۶ حاصل گردید. بررسی آماری گروه کنترل با عصاره ۵۰mg/ml و عصاره ۱۰۰mg/ml به ترتیب با در نظر گرفتن P<۰/۰۵ و P<۰/۰۱ دارای اختلاف معنی‌دار بوده هم‌چنین بین عصاره ۱۰۰mg/ml و عصاره ۵۰mg/ml نیز اختلاف معنی‌دار بوده است (P<۰/۰۵) (نمودار ۳).

۳-۳- سنجش سایتوکین: در این تحقیق مشخص شد میزان تولید IL-10 به ترتیب از گروه کنترل به عصاره ۵۰mg/ml و عصاره ۱۰۰mg/ml افزایش و بر عکس میزان تولید IL-12 کاهش پیدا می‌کند این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود (P<۰/۰۱) (نمودار ۴). در مرحله بعدی میزان تولید INF-γ، IL-4 و IL-17 به عنوان شاخص سایتوکینی لنفوسیت‌های Th1، Th2 و Th17 مترشحه از لنفوسیت‌های T تحریک شده با سلول‌های دندریتیک سنجیده شد. میزان تولید IL-4 به ترتیب از گروه کنترل به عصاره ۵۰mg/ml و عصاره ۱۰۰mg/ml افزایش و بر عکس میزان تولید IFN-γ کاهش پیدا می‌کند این تفاوت

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 3:13 IRDT on Sunday June 16th 2019

از نظر آماری معنی‌دار بود (P<۰/۰۱). با این‌که میزان تولید IL-17 در عصاره ۵۰mg/ml کاهش پیدا کرده بود، این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نبود و در عصاره ۱۰۰mg/ml کاهش IL-17 معنی‌دار نشان داد (P<۰/۰۵) (نمودار ۵).

بحث

نتایج مورفولوژیک و فنوتیپی به‌دست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که MBP به تنهایی باعث افزایش بیان شاخص سطحی CD14 و کاهش بیان HLA-DR و CD83 می‌شود که تحت این شرایط قادر به بالغ کردن سلول‌های دندریتیک نمی‌باشند. در سال ۲۰۱۰ Gredler تلاش کرد تا با استفاده از میلین در سلول‌های دندریتیک القا بلوغ نمایند که نتیجه آن بیان پایین CD80 و CD83 و افزایش بیان HLA-DR بوده است. آن‌ها چنین نتیجه گرفتند که میلین باعث بلوغ نسبی (Semi maturation) سلول‌های دندریتیک می‌شود.[۱۱] مطالعات ۲۰۰۷ Jacques نشان می‌دهد که حالت بلوغ سلول‌های دندریتیک بر توانایی این سلول‌ها در عرضه آنتی‌ژن و مهار یا تحریک پاسخ‌های خود ایمنی با واسطه سلول‌های T تاثیرگذار می‌باشند.[۱۲] پس نمی‌توان گفت که این حالت نیمه بالغ به سود بیمار مبتلا به MS می‌باشد بلکه می‌بایست سلول‌های دندریتیکی تولید کرد که ضمن بلوغ کامل، پاسخ سلول‌های T تنظیم کننده را به نفع کنترل بیماری القا نماید[۱۳و۱۴] که البته بررسی ما نیز با MBP تنها، منجر به بلوغ ناکافی سلول‌های دندریتیک گردید به همین خاطر با استفاده از عصاره قارچ *آلترناریا آلترناتا* روند بلوغ در سلول‌های دندریتیک تولید شده در حضور MBP تسریع گردید. نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که عصاره *آلترناریا آلترناتا* با کاهش شاخص سطحی CD14 و در مقابل افزایش شاخص‌های CD83 و HLA-DR قادر است سلول‌های دندریتیک را به صورت کامل بالغ نماید که با افزایش غلظت عصاره قارچی این اثر پر رنگ‌تر می‌شود. در سال ۲۰۰۹ Kobayashi در بررسی‌های خود نشان داد که آنتی‌ژن Alt-a1 قارچ آلترناریا می‌تواند یک آنتی‌ژن قوی برای مهاجرت، بلوغ و عرضه آنتی‌ژن توسط سلول‌های دندریتیک در شرایط آزمایشگاه و طبیعی بدن باشد. هم‌چنین نشان داده شده که قارچ *آلترناریا آلترناتا* در مقایسه با دیگر آنتی‌ژن‌های قارچی بیش‌ترین تحریک را در بیان OX40L و CCR7 دارد که همراه با LPS این اثرات افزایش می‌یابد.[۹و۱۴] اما از آن‌جایی که LPS پاسخ لنفوسیت‌های T را در مواجه با سلول‌های دندریتیک بالغ به ضرر بیماری MS پیش می‌برد استفاده از آن برای بالغ کردن سلول‌های دندریتیک مناسب نمی‌باشد.[۱۵-۱۷] با بررسی ترکیبات استاتین‌ها در روند بالغ‌سازی سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیت‌های خون محیطی افراد مبتلا به بیماری MS بر بیان مولکول‌های کمک محرک و MHC II اثر مهاری داشته و منجر به تولید سلول‌های دندریتیک نابالغ می‌شوند که آن‌ها نیز به نوبه خود در مواجهه با لنفوسیت‌های T القای تولرانس می‌کنند.[۱۸و۱۹] پس می‌توان گفت سلول‌های دندریتیک بالغ (با کاهش فعالیت فاگوسیتوز و القای سایتوکین‌های ضد التهابی در لنفوسیت‌های T) و سلول‌های دندریتیک نابالغ (با القا تولرانس در مواجه با لنفوسیت‌های T) می‌تواند در کاهش روند پیشرفت بیماری MS موثر اما باید شرایط پاسخ لنفوسیت‌های T را در نظر گرفت.[۱۲و۱۳] در سال ۲۰۰۴ Then Bergh نیز بالغ سازی سلول دندریتیک افراد مبتلا به MS به وسیله INF-β که یک داروی استاندارد در درمان MS می‌باشد، بررسی کرد که نتایج بلوغ سلول‌های دندریتیک، با گروه تیمار شده به وسیله عصاره قارچی ۵۰ قابل مقایسه است.[۱]

در رابطه با سایتوکین‌های مترشحه از سلول‌های دندریتیک مجاور شده با MBP (گروه کنترل) نشان داده شد که MBP به تنهایی با القا تولید سایتوکین‌های IFN-γ، IL-12 و IL-17 به روند پیشرفت بیماری کمک می‌کند، در صورتی که عصاره قارچ *آلترناریا آلترناتا* با القای افزایش تولید سایتوکین‌های IL-4، IL-10 و کاهش تولید IL-17 شرایط را به طرف بهبود روند بیماری هدایت می‌کند. سلول‌های دندریتیک بالغ شده با *آلترناریا آلترناتا* این پاسخ قوی به سمت Th2 را از طریق واکنش بین OX40L ایجاد شده بر روی سلول‌های دندریتیک و OX40 بر روی لنفوسیت‌های T ایجاد می‌کند.[۲۰و۲۱] هم‌چنین جلوگیری از تولید IL-12 که یک فاکتور پیش التهابی و قوی در قطبی کردن به طرف Th1 می‌باشد نیز به این فرایند کمک می‌کند.[۲۲] تجویز IL-10 نیز به منظور اثرات درمانی در مدل آزمایشگاهی آرتریت روماتویید و EAE انجام شده که نشان از تاثیر مثبت این سایتوکین در امر درمان بوده است.[۱۹] این تغییر قطبیت و بر هم زدن توازن سایتوکینی در بیماری MS یکی از مکانیسم‌های اصلی ترکیبات استاتین، گلاتیرآمراستات و INF-β در درمان حمایتی بیماران MS می‌باشد.[۲۳-۲۵]

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 3:13 IRDT on Sunday June 16th 2019

سرین پروتئازهای موجود در عصاره قارچی از طریق القا گیرنده (Protease Activation Receptor, PAR2) در سلول‌های دندریتیک و واکنش متقابل این گیرنده‌ها با لنفوسیت‌های T باعث افزایش تولید IL-17 توسط سلول‌های T تحریک شده می‌گردند، در صورتی که در این مطالعه استفاده از مهار کننده پروتئاز از این فرآیند جلوگیری و از آن طریق موجب کاهش میزان تولید IL-17 شده است.[۶و۲۶] در این مطالعه نشان داده شد که استفاده از عصاره قارچ *آلترناریا آلترناتا* باعث افزایش میزان تولید IL-10 به صورت وابسته به دوز می‌گردد. از طرفی فسفوریلاسیون STAT3 از طریق القای IL-10 موجب مهار تمایز Th17 می‌شود. IL-10 با تحریک ترشح IL-27 نیز به طور غیر مستقیم این اثر را القا می‌کند.[۲۷و۲۸]

فاکتورهای دیگر مانند سطح IL-6، TGF-β و IL-23 نیز در این روند تاثیرگذار می‌باشد که نیاز به بررسی‌های بیش‌تر دارد.[۶]

از نتایج به‌دست آمده می‌توان چنین نتیجه گرفت که عصاره قارچ *آلترناریا آلترناتا* در شرایط آزمایشگاهی از طریق تولید سلول‌های دندریتیک نوع دو (DC2) و القا Th2 و سایتوکین‌های مربوطه به نفع بهبودی بیماری MS عمل می‌نماید. نکته جالب این‌که با افزایش دوز عصاره قارچی این اثرات تشدید می‌گردد. ارزیابی خواص آپوپتوتیک و سایتوتوکسیک عصاره قارچی *آلترناریا آلترناتا* بر روی سلول‌های ایمنی می‌تواند افق جدیدی را برای درک بهتر این ترکیب هموار سازد.

سپاسگزاری: نویسندگان از معاونین محترم پژوهشی دانشگاه ارومیه و دانشکده دامپزشکی به‌خاطر حمایت‌های مالی و معنوی این تحقیق تشکر می‌نمایند. هم‌چنین از کارشناسان محترم بخش ایمونولوژی و میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی و پژوهشکده زیست فن‌آوری دانشگاه ارومیه آقایان حیدر ثانی، اصغر علیاری، علی کاظم نیا، سید عبدالمجید عزیزی و هم‌چنین آقای دکتر میثم ابطحی دانشجوی دکترای تخصصی ایمونولوژی دانشکده دامپزشکی ارومیه کمال تقدیر و تشکر را ابراز می‌دارند. این مقاله بخشی از نتایج پایان‌نامه تحت عنوان "تاثیر عصاره سیتوزولی قارچ *آلترناریا آلترناتا* بر بلوغ سلول‌های دندریتیک مجاور شده با پروتیین بازی میلین و پاسخ لنفوسیت‌های T حاصل از آن در شرایط آزمایشگاهی" در مقطع کارشناسی ارشد ایمنی‌شناسی در سال ۱۳۹۱ با کد ۴۲۲-۲-ک بوده که با حمایت دانشگاه ارومیه انجام شده است.

References

1. Then Bergh F, Dayyani F, Ziegler-Heitbrock L. Impact of type-I-interferon on monocyte subsets and their differentiation to dendritic cells. An in vivo and ex vivo study in multiple sclerosis patients treated with interferon-beta. *J Neuroimmunol* 2004; 146(1-2):176-88.
2. Martin R, McFarland HF, McFarlin DE. Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu Rev Immunol* 1992;10:153-87.
3. Ziemann U, Wahl M, Hattingen E, Tumani H. Development of biomarkers for multiple sclerosis as a neurodegenerative disorder. *Prog Neurobiol* 2011;95(4):670-85.
4. Mao P, Reddy PH. Is multiple sclerosis a mitochondrial disease? *Biochim Biophys Acta* 2010;1802(1):66-79.
5. McRae BL, Semnani RT, Hayes MP, van Seventer GA. Type I IFNs inhibit human dendritic cell IL-12 production and Th1 cell development. *J Immunol* 1998;160(9):4298-304.
6. Ramgolam VS, Sha Y, Jin J, Zhang X, Markovic-Plese S. IFN-beta inhibits human Th17 cell differentiation. *J Immunol* 2009; 183(8):5418-27.
7. Meloni F, Accapezzato D, Agresti C, Aloisi F, Ristori G, Salvetti M, et al. Dendritic cells loaded with apoptotic oligodendrocytes as a source of myelin T-cell epitopes in multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2008;129(2):286-94.
8. Huang YM, Yang JS, Xu LY, Link H, Xiao BG. Autoantigen-pulsed dendritic cells induce tolerance to experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in Lewis rats. *Clin Exp Immunol* 2000; 122(3):437-44.
9. Kobayashi T, Iijima K, Radhakrishnan S, Mehta V, Vassallo R, Lawrence CB, et al. Asthma-related environmental fungus, Alternaria, activates dendritic cells and produces potent Th2 adjuvant activity. *J Immunol* 2009;182(4):2502-10.
10. Kurup VP, Vijay HM, Kumar V, Castillo L, Elms N. IgE bind-ing synthetic peptides of Alt a 1, a major allergen of Alternaria alternata. *Peptides* 2003;24(2):179-85.
11. Gredler V, Ebner S, Schanda K, Forstner M, Berger T, Romani N, et al. Impact of human myelin on the maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Clin Immunol* 2010;134(3):296-304.
12. Brimnes MK, Bonifaz L, Steinman RM, Moran TM. Influenza virus-induced dendritic cell maturation is associated with the induction of strong T cell immunity to a coadministered, normally nonimmunogenic protein. *J Exp Med* 2003;198(1):133-44.
13. López C, Comabella M, Al-zayat H, Tintoré M, Montalban X. Altered maturation of circulating dendritic cells in primary progressive MS patients. *J Neuroimmunol* 2006;175(1-2):183-91.
14. Kobayashi T, Radhakrishnan S, Pease RH, Kita H. An environmental fungus, Alternaria, Stimulates OX40L and CCR7 expression by Dendritic Cells (DCs). *J Allergy Clin Immunol* 2007;119(1):S48-S57.
15. Comabella M, Balashov K, Issazadeh S, Smith D, Weiner HL, Khoury SJ. Elevated interleukin-12 in progressive multiple sclerosis correlates with disease activity and is normalized by pulse cyclophosphamide therapy. *J Clin Invest* 1998;102(4):671-8.

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 3:13 IRDT on Sunday June 16th 2019

16. Makhlouf K, Weiner HL, Khoury SJ. Increased percentage of IL-12+ monocytes in the blood correlates with the presence of active MRI lesions in MS. *J Neuroimmunol* 2001;119(1):145-9.
17. Windhagen A, Newcombe J, Dangond F, Strand C, Woodroofe MN, Cuzner ML, et al. Expression of costimulatory molecules B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), and interleukin 12 cytokine in multiple sclerosis lesions. *J Exp Med* 1995;182(6):1985-96.
18. Gottenberg JE, Chiocchia G. Dendritic cells and interferon-mediated autoimmunity. *Biochimie* 2007;89(6-7):856-71.
19. Neuhaus O, Strasser-Fuchs S, Fazekas F, Kieseier BC, Niederwieser G, Hartung HP, et al. Statins as immunomodulators: comparison with interferon-beta 1b in MS. *Neurology* 2002;59(7):990-7.
20. Flynn S, Toellner KM, Raykundalia C, Goodall M, Lane P. CD4 T cell cytokine differentiation: the B cell activation molecule, OX40 ligand, instructs CD4 T cells to express interleukin 4 and upregulates expression of the chemokine receptor, Blr-1. *J Exp Med* 1998;188(2):297-304.
21. Ohshima Y, Yang LP, Uchiyama T, Tanaka Y, Baum P, Sergerie M, et al. OX40 costimulation enhances interleukin-4 (IL-4) expression at priming and promotes the differentiation of naive human CD4(+) T cells into high IL-4-producing effectors. *Blood* 1998;92(9):3338-45.
22. Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 2003;3(12):984-93.
23. Nagai T, Devergne O, Mueller TF, Perkins DL, van Seventer JM, van Seventer GA. Timing of IFN-beta exposure during human dendritic cell maturation and naive Th cell stimulation has contrasting effects on Th1 subset generation: a role for IFN-beta-mediated regulation of IL-12 family cytokines and IL-18 in naive Th cell differentiation. *J Immunol* 2003;171(10):5233-43.
24. Vieira PL, Heystek HC, Wormmeester J, Wierenga EA, Kapsenberg ML. Glatiramer acetate (copolymer-1, copaxone) promotes Th2 cell development and increased IL-10 production through modulation of dendritic cells. *J Immunol* 2003;170(9):4483-8.
25. Wiesemann E, Klatt J, Sönmez D, Blasczyk R, Heidenreich F, Windhagen A. Glatiramer acetate (GA) induces IL-13/IL-5 secretion in naive T cells. *J Neuroimmunol* 2001;119(1):137-44.
26. Zhao Y, Yang J, Gao YD, Guo W. Th17 immunity in patients with allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2010;151(4):297-307.
27. Graber JJ, Ford D, Zhan M, Francis G, Panitch H, Dhib-Jalbut S. Cytokine changes during interferon-beta therapy in multiple sclerosis: correlations with interferon dose and MRI response. *J Neuroimmunol* 2007;185(1-2):168-74.
28. Stumhofer JS, Silver JS, Laurence A, Porrett PM, Harris TH, Turka LA, et al. Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat Immunol* 2007;8(12):1363-71.

TUMJ Tehran University Medical Journal, March 2013; Vol. 70, No. 12: 751-759 Original Article

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 3:13 IRDT on Sunday June 16th 2019

The effect of cytosolic extract of *Alternaria aternata* fungus on Monocyte-derived dendritic cell maturation and T-lymphocyte polarization in the presence of myelin basic protein

Alireza Loghmanni M.Sc.*
Nowruz Delirezha Ph.D.
Abdolghaffar Ownagh Ph.D.
Hadi Mohebalianc Ph.D.

Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

Received: July 04, 2012 Accepted: November 20, 2012

Abstract

***Background*:** Multiple Sclerosis (MS) is an autoimmune disease with impairment in function of central nervous system. Macrophages and dendritic cells play important roles in alleviating or progression of the disease. These cells can cause inflammation and damage to the myelin of nerve cells by realizing of harmful substances when these cells get matured. We studied the effect of *Alternaria alternata* extract on maturation of monocyte- derived dendritic cell (modc) and T-cell responses in the presence of Myelin Basic Protein (MBP) as a laboratory model of multiple sclerosis (MS). The purpose of this study is suitable dendritic cells production for usage in MS immunotherapy.

***Methods*:** For this study plastic adherent monocytes were cultured with granulocyte/ macrophage- colony stimulating factor (GM-CSF) and interleukin -4 for converting these cells to modc and pulsed with MBP and matured in the presence of monocyte-conditioned medium (MCM) in control group and MCM + *Alternaria alternata* extract in treatment groups. Anti-CD14, anti-CD83, anti-human leukocyte antigen-DR (anti HLA-DR) monoclonal antibody were carried out for phenotyping. Autologos T cell responses and cytokine production were evaluated.

***Results*:** The results showed that the expression of CD14 decreased and CD83, HLA-DR increased in treatment groups in comparison with control groups. The production amount of IL-10 overcame IL-12 and in T cell the production of cytokines, IL-17 and Interferon-γ (IFN-γ) decreased and IL-4 was increased ($P<0.05$). These effects escalated with increasing of dosage from 50 to 100 (mg/ml) ($P<0.001$).

Conclusion: *Alternaria alternata* extract can cause maturation of MBP-pulsed modc and skewing of T- lymphocyte toward Th2 and thereby can evolve into a new strategy in immunotherapy of MS.

Keywords: *Alternaria alternate,* cytosolic extract, dendritic cells, maturation, myelin basic protein (MBP), T- lymphocyte.

*Corresponding author: Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Sarv Road, Urmia, Iran.
Tel: +98- 441- 2770508
E-mail: Alireza_trtr@yahoo.com