

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

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

حکیمہ

زمینه و هدف: اسکلروز متعدد (Multiple sclerosis, MS) یک بیماری خود ایمن توان با اختلال در سیستم اعصاب مرکزی می‌باشد که ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک نقش مهمی در تعديل یا پیشرفت این بیماری ایفا می‌کنند. تاثیر عصاره قارچ در بلوغ سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوپیت و تعديل پاسخ لغوسیت‌های T را در حضور پروتئین 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 ایمنوتراپی و کاهش بیماری MS می‌باشد.

روش بررسی: در این بررسی به وسیله سایتوکین های Granulocyte/ macrophage-Colony stimulate Factor (GM-CSF) و ایترلوكین ۴ (IL-4)، مونوپویتیک خون محیطی به سمت سلول های دندانیک هدایت شد. سپس با پرتوین بازی میلین مدل بیماری اسکلروز متعدد در سلول های دندانیک القا گردید و با عصاره قارچی آلتزنا ریا آلتزنا ت اقدام به تیمار سلول های دندانیک گردید هم چنین یاخت سلول های لنفوپیت T حاصل از آن نیز مطالعه شد.

یافته ها: با تاثیر عصاره قارچی بر سلول های دندریتیک مجاور شده با MBP میزان بیان مولکول های سطحی CD14 کاهش و در مقابل CD83 و IL-12 غالب شد و در لغوسیت های T میزان ترشح سایتوکین های IL-17 و ایترفرون- β (INF- β) کاهش پیدا کرد و در مقابل IL-4 افزایش یافت. این داده ها از لحاظ آماری معنی دار بوده ($P < 0.05$) و این اشارات با افزایش دوز عصاره قارچی، از 50 mg/ml تا 100 mg/ml تشدید گر دید ($P < 0.01$).

نتیجه‌گیری: عصاره فارچی آلترناریا آلترناتا با بلوغ سلول‌های دندانیک و تعبیض پاسخ لنفوسيت‌های آ، به سمت مو جب اثرات سودمند درمانی، ممکن است Th2

كلمات كليلي: آلترياريا آلترياتا، عصاره سیتوزولی، پروتینین بازی میلین، بلوغ، سلول دندریتیک، لفوسیت T.

یک می‌کند و در عین حال باعث بیان مقدار ناچیزی از ایترولوکین ۱۰ (IL-10) در پاسخ به لیپوپلی‌ساقارید (LPS) می‌شود. هم‌چنین توانایی ترشح بالقوه فاکتور نکروز دهنده تومور (Tumor Necrosis Factor- α) و آزاد کردن واسطه‌های فعال اکسیژن را دارند که همگی از TNF- α و عوامل مخرب در بیماری اسکلروز متعدد (MS) بوده که در صورت کسب کردن ویژگی دندانیتیک بالغ از عوامل مخرب فوق کاسته می‌شود.^۱ اسکلروز متعدد بک ناتوانه، التهاب و

مونوسيت‌ها (Monocytes) حدود ۳-۷٪ از لوکوسیت‌های خون محیطی را تشکیل می‌دهند که ویژگی قوی برای تمایز به سلول‌های ناندربیتیک و ماکروفاز را دارند. اصلی‌ترین شاخص سطحی در مونوسيت‌ها CD14 می‌باشد که سطح بالایی از کمپلکس اصلی سازگاری، یافته، نوع ۲ (Major Histocompatibility Complex II)،

مقدمة

آلتزناريا آلتزناتا یک قارچ ساپروفیت و پاتوژن گیاهی می‌باشد که به ندرت در انسان ایجاد عوارض جلدی، مخاطی، پوستی و آسم می‌کند.^۹ از آنتی زن Alt-a1 قارچ آلتزناريا آلتزناتا برای ایمونوتراپی و تعديل اینمنی در بیماری‌های آسم و الربوی استفاده می‌شود.^{۱۰} در این مطالعه که به صورت مدل آزمایشگاهی پاسخ اینمنی بر علیه اتو آنتی زن‌های موثر در بیماری MS طراحی شده است سلول‌های دندانیتیک تابلغ پس از تولید از سلول‌های مونوسیت خون محیطی در مجاورت MBP (به عنوان آنتی زن)، در حضور عصاره آلتزناريا آلتزناتا (عامل محرك بلوغ) به صورت بالغ در خواهد آمد. بعد از آن لفوسیت‌های T اтолوگ در مجاورت سلول‌های دندانیتیک بالغ تحریک شده و از نظر پاسخ پلاریزاسیون بررسی می‌شوند.

روش بررسی

هدف از این مطالعه پژوهشی و تحلیلی تولید سلول‌های دندانیتیک 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 دندانیتیک از تست‌های متفاوتی استفاده شد. در این خصوص برای سنجش فنتیپ سلول‌ها از دستگاه فلوسایتومتری استفاده گردید و هم‌چنین مقدار سایتوکین‌های تولید شده از سلول‌های دندانیتیک و لفوسیت‌ها نیز به‌وسیله کیت الایزا اندازه‌گیری گشت.

۱-۱- تولید عصاره قارچی

قارچ لیوفیلیزه آلتزناريا آلتزناتا (۵۲۲۴) Persian Type Collection تهیه شده از کلکسیون قارچی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران در محیط ساپر و 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 ۱۰×۱۰ Buffer, Sigma Co., USA (Hanks) می‌داند اسپورها از تنضیف، به محیط مایع مخمر پایه نیتروژنی (Yeast Nitrogen Base) در ۳۷°C انکوباتور به منظور رشد ریسه‌های قارچی (Hypha) در CO₂ دارد.

تخریب میلین در سیستم اعصاب مرکزی (Central Nervous System, CNS) بوده که شرط اول برای ایجاد آن افزایش لفوسیت‌های کمکی (Th1) خود واکنش‌گر در خون و عبور آن از سد خونی مغزی می‌باشد. بنابراین می‌توان گفت که لفوسیت‌های 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 تعديل گر یا مهار کننده سیستم ایمنی استوار است. امروزه دو داروی تعديل گر سیستم ایمنی، ایترفرون بتا (INF-β) و گلاتیرامر استات (Glatiramer acetate) (به همراه دو داروی مهار گر سیستم ایمنی، ناتالیزوماب (Natalizumab) و ریتوکسی ماب (Rituximab) برای درمان بیماری استفاده می‌شود. INF-β یک داروی استاندارد تایید شده می‌باشد که در درمان MS به کار می‌رود این دارو اثرات درمانی خود را بیشتر از طریق جلوگیری از پاسخ ایمنی Th1 و هم‌چنین کاهش تحریک ترشح ایترفرون (IFN-γ) و IL-12 توسط سلول‌های دندانیتیک اعمال می‌کند.^۴ از ویژگی‌های بیماری MS افزایش IL-17 در CNS در افراد بیمار می‌باشد و ثابت شده که نقش اصلی در شکستن سد خونی-مغزی و ایمونوپاتوژن بیماری MS دارد.^۶

پروتئین بازی میلین (Myelin Basic Protein, MBP) به عنوان شناخته شده‌ترین اتوآنتی زن از پروتئین‌های میلین می‌باشد.^۷ در بیماری MS افزایش سایتوکین‌های پیش التهابی از قبیل γ-INF، TNF، Tumor Grow Factor α، IL-12 و هم‌چنین کاهش Lفوتوكسین، IL-10 و هم‌چنین TGF-β مشاهده می‌شود. مطالعات زیادی در زمینه درمان MS با سلول‌های دندانیتیک تیمار شده در شرایط آزمایشگاهی و تزریق مجدد آن‌ها به همان بیماران انجام گرفته است مانند تزریق سلول‌های دندانیتیک اтолوگ تیمار شده با γ-INF به بدن بیمار می‌باشد و یا استفاده از داروهایی که با تاثیر بر سلول‌های دندانیتیک، پلاریزاسیون سلول‌های لفوسیت T را به سمت لفوسیت‌های کمکی (Th2) هدایت می‌کند و جلوی روند پیشرفت بیماری را می‌گیرد و یا حداقل آن را کند می‌کند.^۸

(۵۰۰ واحد/ میلی لیتر) (Sigma Co, USA) به سلول‌های دندریتیک نابالغ تبدیل شدند. در مرحله دوم و روز سوم کشت سلول‌ها، مجدداً 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 شد. در گروه تیمار مضاف بر این در روز پنجم کشت سلول‌ها مقدار گردید. در گروه تیمار مضاف بر این در روز پنجم کشت سلول‌ها مقدار ۱۰۰ µg/ml از عصاره قارچی آلترناریا آلترناتا و یا مایع رویی مونوکویت (Monocyte Conditioned Media, MCM) به عنوان میلی لیتر) 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 ۳۷°C و شرایط CO2 ۵٪ انجام شد. در روز هفتم سلول‌های دندریتیک برداشت شدند و از نظر مورفولوژی، فنتوپ، میزان ترشح سایتوکین‌های IL-10 و IL-12 توسط سلول‌های دندریتیک و میزان ترشح سایتوکین‌های INF-γ، IL-4 و IL-17 توسط لنفوسیت‌های (Peprotech, USA) تحریک شده با سلول‌های دندریتیک به وسیله کیت الایزا (Anti CD83, Anti CD14, Anti HLA-DR و IgG موشی (برای کنترل ایزوتاپ) (Denmark, DAKO) به میزان ۱۰۰ µl) و Fluorescein Isothiocyanate (FITC) میکرولیتر که همگی با Florescence Activated Cell Sorting, FACS) پس از برداشت سلول‌های دندریتیک (کنترل و تیمار)، سرمه موشی (۱۰۰ µl) در درصد انکوبه گردید. سپس سلول‌ها دوباره به وسیله بافر FACS در دمای ۴°C شسته شده و بالاصله با دستگاه فلوسایتو متري FACSCalibor (Becton, USA) مورد تجزیه و بررسی قرار گرفت.

سنجش میزان ترشح سایتوکین‌های لنفوسیتی

پس از برداشت سلول‌های دندریتیک (کنترل و تیمار)، سوسپانسیون سلولی 1×10^5 از سلول‌های دندریتیک تهیه و به نسبت ۱/۱۰ از آن با لنفوسیت‌های T در پلت ۹۶ خانه‌ای ته گرد ۷۲ مجاورسازی شد، سلول‌های دندریتیک و لنفوسیت به مدت ساعت به ترتیب به نسبت ۱ به ۱۰ در دمای ۳۷°C حاوی ۵٪ CO2 انکوبه گردید. سپس مایع رویی را برداشته و مقدار سایتوکین‌ها توسط

و رطوبت ۵٪ به مدت ۱۸ ساعت انتقال داده شد. سپس کلافه‌های Phosphate Protease inhibitor, EDTA، (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) حاوی دو میلی لیتر Buffered Saline (PBS) (۵۰ میلی لیتر Tris-HCl اضافه نموده و برای سونیکه کردن با شدت ۲۰۰۰۰ AMP، فاصله ۱۰ ثانیه (دستگاه در حالت ۱۰ ثانیه روشن و ۱۰ ثانیه خاموش قرار داده شد) و مدت زمان ۲۰ دقیقه آماده شد. بعد از سونیکه، هموژن به دست آمده در دمای ۴°C و ۷۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. محلول پروتئینی رویی در کیسه دیالیز با Cut off ۱۰۰۰۰ در آب مقطر ۴°C دیالیز و به منظور کاهش حجم آب ۲۴ ساعت لیوپلیزه گردید. سپس از فیلتر $0.2\text{ }\mu\text{m}$ عبور داده شد و بعد از اندازه‌گیری پروتئین محلول به روش براد فورده، عصاره در دمای ۷۰°C ذخیره شد.

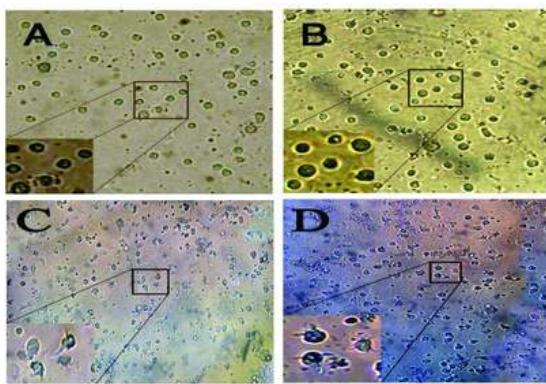
-۲- تهیه سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC) به منظور به دست آوردن PBMC، مقدار کافی خون هپارینه (۲۰۰ U/ml) از افراد داوطلب در شرایط استریل اخذ شد و با مقدار هم حجم محیط کشت RPMI-1640، (Gibco-BRL, Paisley, UK) رفیق گردید و خون رفیق شده به آرامی بر روی فایکول که حجم آن برابر خون اولیه بود قرار گرفت. این ترکیب به مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت ۸۰۰ g سانتریفیوژ گردید. سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی که در حد فاصل فایکول و خون رفیق شده بود به آرامی جمع‌آوری شد. RPMI به دست آمده به منظور حذف فایکول برابر هم حجم آن PBMC ۱۶۴۰ اضافه گردید و با سرعت ۴۸۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب سلول‌های حاصله مجدداً به منظور حذف پلاکت‌ها با RPMI ۱۶۴۰ و با سرعت ۲۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه شستشو گردید. تعداد و میزان زنده بودن سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی به دست آمده با استفاده از رنگ ترپیان بلو (Trypan blue) تعیین گردید.

-۳- تولید سلول‌های دندریتیک القایی در حضور پروتئین 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/ میلی لیتر) تحت تاثیر سایتوکین‌های IL4 و GM-CSF

است: در مورد مولکول سطحی CD14، در گروه کنترل $1\pm 6/43$ ٪، در گروه تیمار شده با عصاره (۵۰ mg/ml) $4/1\pm 4/24$ ٪ و در گروه تیمار شده با عصاره (۱۰۰ mg/ml) $1/1\pm 1/14$ ٪ کاهش یافت. از لحاظ آماری با در نظر گرفتن $P<0.01$ بین گروه کنترل و تیمار اختلاف معنی داری وجود دارد اما در بین دو گروه تیمار (عصاره CD14 در عصاره ۱۰۰ mg/ml و ۵۰ mg/ml) با وجود کاهش درصد $CD14$ در عصاره 100 mg/ml 100 mg/ml اختلاف معنی دار نمی باشد. در مورد شاخص $CD83$ میزان بیان این مولکول در گروه کنترل $3/9\pm 3/19$ ٪ بود و با به کار

کیت الیزا اندازه گیری شد. در این تحقیق الیزا دندانیتیک های خود واکنش گر تو سط MBP بود که به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد و تیمار آن به وسیله عصاره قارچی آلتیناریا آلتینات در دو دوز متفاوت 50 mg/ml و 100 mg/ml صورت پذیرفت و برای هر گروه پنج تکرار قرار داده شد. نتایج حاصله تو سط برنامه SPSS ویراست One Way تحلیل و مورد بررسی قرار گرفت. نتایج فنوتیپ تو سط ANOVA آنالیز شد. همچنین نتایج تست الیزا تو سط نرم افزار CureXpert مورد آنالیز قرار گرفت.

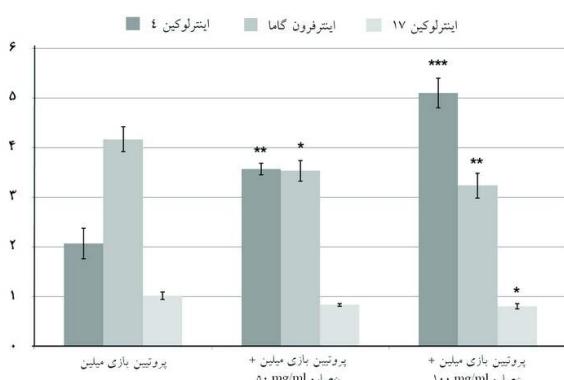
یافته ها



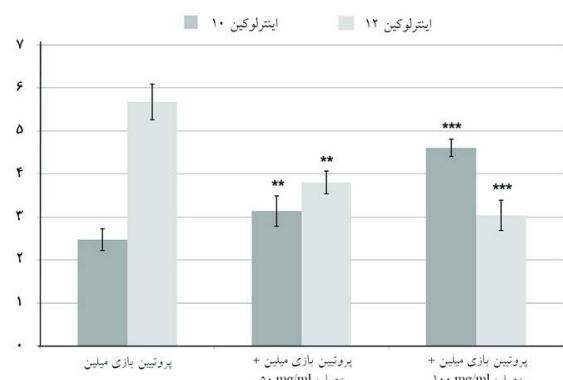
شکل ۱: عکس برداری سلول های کنترل و تیمار با میکروسکوپ معکوس (۲۰۰x). A: سلول های مونو سیت جدا شده از خون محیطی. B: سلول های دندانیتیک بلوغ نیافرته در حضور MCM و MBP (کنترل). C: سلول های دندانیتیک تیمار با عصاره قارچی 50 mg/ml . D: سلول های دندانیتیک تیمار با عصاره قارچی 100 mg/ml .

۱-۳- مورفولوژی: بررسی مورفولوژی سلول های دندانیتیک با میکروسکوپ فاز معکوس (Invert) با بزرگ نمایی های مختلف انجام شد و نشان داد که سلول های دندانیتیک تیمار شده با عصاره قارچی، در مقایسه با گروه کنترل، کشیده و دارای زواید سیتوپلاسمی بوده است. همچنین در گروه کنترل اکثربیت سلول ها درون فلاسک چسبیده بودند و با PBS+EDTA سرد جدا گردید. از نظر مورفولوژی بین سلول های دندانیتیک تیمار شده با عصاره 50 mg/ml و عصاره 100 mg/ml اختلاف محسوس نبود (شکل ۱).

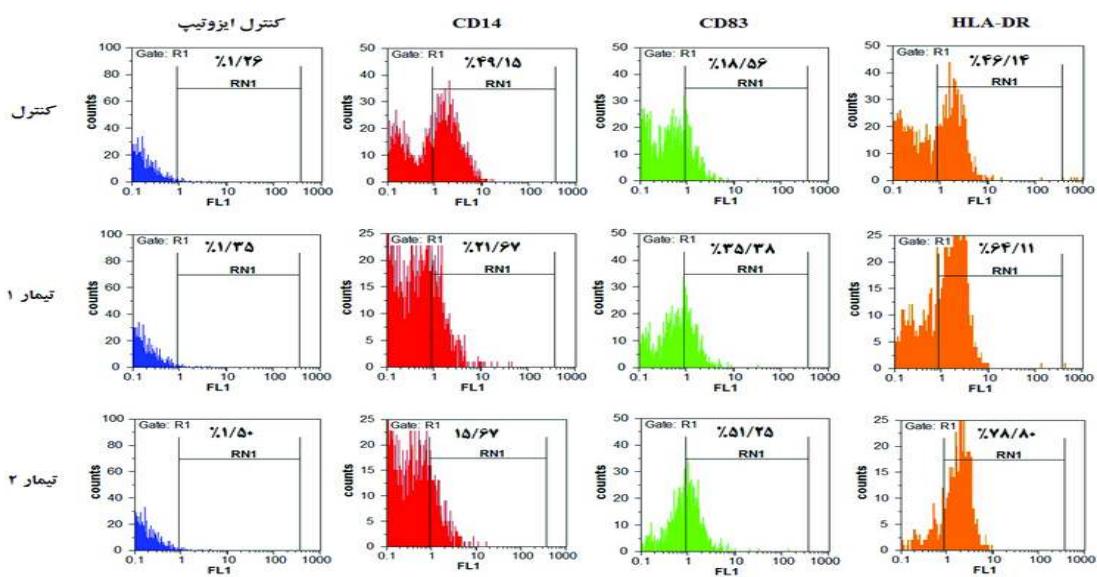
۲-۳- فنوتیپ: بررسی درصد نشان گر های سطحی در سلول های دندانیتیک با دستگاه فلوسایتومتری انجام شد. (نمودار ۲) و درصد هایی که به طور میانگین از پنج نمونه به دست آمد بدین قرار



نمودار ۲: مقایسه میانگین سایتوکین های مترشحه از سلول های لنفو سیت T بر مقیاس ng/ml . $P<0.05$ معنی دار بود، $P<0.01$ *** معنی دار بود و $P<0.001$ *** معنی دار بود.



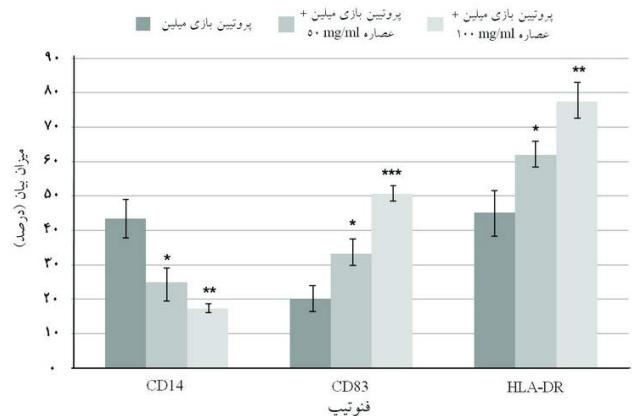
نمودار ۱: مقایسه میانگین سایتوکین های مترشحه از سلول های دندانیتیک بر مقیاس ng/ml . $P<0.01$ *** معنی دار بود و $P<0.001$ *** معنی دار بود.



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

هم‌چنین بین گروه تیمار در دو دوز مختلف نیز اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ($P<0.01$). در رابطه با بیان شاخص HLA-DR در گروه ۱۰۰ mg/ml، تیمار با عصاره ۵۰ mg/ml و تیمار شده با عصاره ۱۰۰ mg/ml کنترل، تیمار با عصاره ۵۰ mg/ml و تیمار شده با عصاره ۱۰۰ mg/ml به ترتیب مقادیر $45/5\pm 6/1$ ، $45/5\pm 6/1$ و $62/1\pm 3/8$ و $77/6\pm 5/3$ حاصل گردید. بررسی آماری گروه کنترل با عصاره ۵۰ mg/ml و عصاره ۱۰۰ mg/ml به ترتیب با در نظر گرفتن $P<0.05$ و $P<0.01$ دارای اختلاف معنی‌دار بوده هم‌چنین بین عصاره ۱۰۰ mg/ml و عصاره ۵۰ mg/ml نیز اختلاف معنی‌دار بوده است ($P<0.05$) (نمودار ۳).

۳-۳- سنجش سایتوکین: در این تحقیق مشخص شد میزان تولید IL-10 به ترتیب از گروه کنترل به عصاره ۵۰ mg/ml و عصاره ۱۰۰ mg/ml افزایش و بر عکس میزان تولید IL-12 کاهش پیدا می‌کند این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود ($P<0.01$) (نمودار ۴). در مرحله بعدی میزان تولید γ-INF-4 و IL-17 به عنوان شاخص سایتوکینی لنفوسيت‌های Th1 و Th17 مترشحه از لنفوسيت‌های T تحریک شده با سلول‌های دندریتیک سنجیده شد. میزان تولید IL-4 به ترتیب از گروه کنترل به عصاره ۵۰ mg/ml و عصاره ۱۰۰ mg/ml افزایش و بر عکس میزان تولید γ-INF-4 کاهش پیدا می‌کند این تفاوت



نمودار ۳: میزان بیان نشانگرهای سطحی CD14، CD83 و HLA-DR در سه گروه کنترل، تیمار با عصاره ۵۰ mg/ml و ۱۰۰ mg/ml. (**نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار $P<0.01$ ، *نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار $P<0.05$ و ***نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار $P<0.001$).

بردن عصاره ۵۰ mg/ml این مقدار به $33/2\pm 4/1$ افزایش یافت، هم‌چنین این سیر افزایش در گروه تیمار شده با عصاره ۱۰۰ mg/ml به مقدار $4\pm 2/5$ ، رسانید. که این اختلاف بین گروه کنترل و تیمار و

دارد که همراه با LPS این اثرات افزایش می‌یابد.^۹ اما از آنجایی که LPS پاسخ لنفوسيت‌های T را در مواجهه با سلول‌های دندربیتیک بالغ به ضرر بیماری MS پیش می‌برد استفاده از آن برای بالغ کردن سلول‌های دندربیتیک مناسب نمی‌باشد.^{۱۵-۱۷} با بررسی ترکیبات استاتین‌ها در روند بالغ‌سازی سلول‌های دندربیتیک مشتق از مونوسيت‌های خون محیطی افراد مبتلا به بیماری MS بر بیان مولکول‌های کمک محرک و MHC II اثر مهاری داشته و منجر به تولید سلول‌های دندربیتیک نابالغ می‌شوند که آن‌ها نیز به نوبه خود در مواجهه با لنفوسيت‌های T القای تولرانس می‌کنند.^{۱۸-۱۹} پس می‌توان گفت سلول‌های دندربیتیک بالغ (با کاهش فعالیت فاگوسیتوز و القای سایتوکین‌های ضد التهابی در لنفوسيت‌های T) و سلول‌های دندربیتیک نابالغ (با القای تولرانس در مواجهه با لنفوسيت‌های T) می‌تواند در کاهش روند پیشرفت بیماری MS موثر اما باید شرایط پاسخ لنفوسيت‌های T را در نظر گرفت.^{۲۰} در سال ۲۰۰۴ Then Bergh نیز می‌تواند در نظر گرفت.^{۲۱} در سال ۲۰۰۴ در نظر گرفت.^{۲۲} در سال ۲۰۰۷ نیز بارگاه سایتوکین‌های دندربیتیک افراد مبتلا به MS به وسیله INF-β که یک سلول‌های دندربیتیک، با گروه تیمار شده به وسیله عصاره قارچی ۵۰ قابل مقایسه است.^{۲۳}

در رابطه با سایتوکین‌های مترشحه از سلول‌های دندربیتیک مجاور شده با MBP (گروه کترل) نشان داده شد که MBP به تنها یک سلول‌های T تولید سایتوکین‌های IL-12 و IL-17 می‌کند، در صورتی که عصاره قارچ آلترناریا آلترناتا با القای کمک می‌کند، در صورتی که عصاره قارچ آلترناریا آلترناتا با القای افزایش تولید سایتوکین‌های IL-4 و IL-10 و کاهش تولید IL-17 شرایط را به طرف بهبود روند بیماری هدایت می‌کند. سلول‌های دندربیتیک بالغ شده با آلترناریا آلترناتا این پاسخ قوی به سمت Th2 را از طریق واکنش بین OX40L ایجاد شده بر روی سلول‌های دندربیتیک و OX40 بر روی لنفوسيت‌های T ایجاد می‌کند.^{۲۰-۲۱} 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 آرتربیت روماتویید و EAE انجام شده که نشان از تاثیر مثبت این سایتوکین در امر درمان بوده است.^{۲۴} این تغییر قطبیت و بر هم زدن توازن سایتوکینی در بیماری MS یکی از مکانیسم‌های اصلی ترکیبات استاتین، گلاتیرامرات و INF-β در درمان حمایتی بیماران MS می‌باشد.^{۲۳-۲۵}

از نظر آماری معنی دار بود ($P < 0.01$). با این‌که میزان تولید IL-17 در عصاره ۵۰mg/ml کاهش پیدا کرده بود، این کاهش از نظر آماری معنی دار نبود و در عصاره ۱۰۰mg/ml IL-17 کاهش ۱۰۰ معنی دار نشان داد (نمودار ۵).

بحث

نتایج مورفولوژیک و فتوتیپی به دست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که MBP به تنها یک سلول شناختی سطحی CD14 و کاهش بیان HLA-DR و CD83 می‌شود که تحت این شرایط قادر به بالغ کردن سلول‌های دندربیتیک نمی‌باشند. در سال ۲۰۱۰ Gredler تلاش کرد تا با استفاده از میلین در سلول‌های دندربیتیک القا بالوغ HLA-DR و افزایش بیان CD80 و CD83 نمایند که نتیجه آن بیان پایین نسبی بوده است. آن‌ها چنین نتیجه گرفتند که میلین باعث بالوغ نسبی ۲۰۰۷ (Semi maturation) سلول‌های دندربیتیک می‌شود.^{۱۱} مطالعات Jacques نشان می‌دهد که حالت بالوغ سلول‌های دندربیتیک 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 دندربیتیک تولید کرد که ضمن بالوغ کامل، پاسخ سلول‌های T تنظیم کننده را به نفع کترول بیماری القا نماید^{۱۳-۱۴} که البته بررسی ما نیز با MBP تنها، منجر به بالوغ ناکافی سلول‌های دندربیتیک گردید به همین خاطر با استفاده از عصاره قارچ آلترناریا آلترناتا روند بالوغ در سلول‌های دندربیتیک تولید شده در حضور MBP تسريع گردید. نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که عصاره آلترناریا آلترناتا با کاهش شناختی سطحی CD14 و در مقابل افزایش شناختی سطحی CD83 و HLA-DR قادر است سلول‌های دندربیتیک را به صورت کامل بالغ نماید که با افزایش غلظت عصاره قارچی این اثر پر رنگ‌تر می‌شود. در سال ۲۰۰۹ در Kobayashi این اثر بررسی‌های خود نشان داد که آنتیژن Alt-a1 قارچ آلترناریا می‌تواند یک آنتیژن قوی برای مهاجرت، بالوغ و عرضه آنتیژن توسط سلول‌های دندربیتیک 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

عصاره قارچی این اثرات تشدید می‌گردد. ارزیابی خواص آپوپتوتیک و سایتو توکسیک عصاره قارچی آلترناریا آلترناتا بر روی سلول‌های ایمنی می‌تواند افق جدیدی را برای درک بهتر این ترکیب هموار سازد.

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

سرین پروتازهای موجود در عصاره قارچی از طریق القا گیرنده (Protease Activation Receptor, PAR2) در سلول‌های دندریتیک و واکنش متقابل این گیرنده‌ها با لنفوسيت‌های T باعث افزایش تولید IL-17 توسط سلول‌های T تحریک شده می‌گردد، در صورتی که در این مطالعه استفاده از مهار کننده پروتاز از این فرآیند جلوگیری و از آن طریق موجب کاهش میزان تولید IL-17 شده است.^{۲۶} 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 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.^{۲۷, ۲۸}

فاکتورهای دیگر مانند سطح TGF- β , IL-6 و IL-23 نیز در این روند تأثیرگذار می‌باشد که نیاز به بررسی‌های بیشتر دارد.^۹ از نتایج به دست آمده می‌توان چنین نتیجه گرفت که عصاره قارچ آلترناریا آلترناتا در شرایط آزمایشگاهی از طریق تولید سلول‌های دندریتیک نوع دو (DC2) و القا 2 (Th2) و سایتوکین‌های مربوطه به نفع بهبودی بیماری MS عمل می‌نماید. نکته جالب این‌که با افزایش دوز

References

- 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.
- Martin R, McFarland HF, McFarlin DE. Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu Rev Immunol* 1992;10:153-87.
- 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.
- Mao P, Reddy PH. Is multiple sclerosis a mitochondrial disease? *Biochim Biophys Acta* 2010;1802(1):66-79.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Kurup VP, Vijay HM, Kumar V, Castillo L, Elms N. IgE binding synthetic peptides of Alt a 1, a major allergen of Alternaria alternata. *Peptides* 2003;24(2):179-85.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

16. Makhlouf K, Weiner HL, Khouri 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, Woodrooffe 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, Dhhib-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.

The effect of cytosolic extract of *Alternaria alternata* 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.

Abstract

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

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 (mode) 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 mode 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 mode and skewing of T- lymphocyte toward Th2 and thereby can evolve into a new strategy in immunotherapy of MS.

Keywords: *Alternaria alternata*, 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_trr@yahoo.com