نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران؛ ۱۴۰۱؛ ۱۶(۲):۸۷-۹۴.
https://doi.org/ 10.22034/IJVCS.2022.13899.1020

مقایسه‌ی غلظت اینترلوکین۴، اینترلوکین۱۰،اینترفرون گاما و ایمنوگلوبولین E اختصاصی در نمونه‌ی بافت هموژن ریه با نمونه‌های رایج در آسم آلرژیک تجربی در موش Balb/c

تهمینه تاجیک[۱]، محسن ملکی[۱*]، زهرا موسوی[۱]، علیرضا حق‌پرست[۱]

۱. گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد،مشهد- ایران.

دریافت: ۲۸ خرداد ۱۴۰۱ **پذیرش:** ۱۴ شهریورماه ۱۴۰۱

چکید

هدف پژوهش حاضر مقایسه‌ی سطوح سایتوکاین‌های IL-4، IL-10 و IFN- γ در نمونه‌های بافت هموژن ریه با نمونه‌های به‌دست آمده از مایع لاواژ برونکوآلوئولار و نیز مقایسه‌ی سطح IgE اختصاصی اوالبومین در بافت هموژن ریه و سرم در القای آسم آلرژیک در موش به منظور یافتن بهترین نمونه برای پژوهش‌های مشابه است. در این پژوهش ۱۴ سر موش Balb/c ماده ۶ هفته‌ای استفاده شدند. در گروه آسم، به منظور القای آسم دو تزریق داخل صفاقی با اوالبومین و ادجوانت هیدروکسیدآلومینیوم در روزهای صفر و ۷ پژوهش و سپس سه بار استنشاق اوالبومین در روزهای ۱۴تا۱۶ پژوهش انجام شد. در روز ۱۷ نمونه‌گیری از مایع لاواژ برونکوآلوئولار، بافت ریه و خون انجام شد. در گروه کنترل از بافر فسفات به جای اوالبومین استفاده شد. در آسیب‌شناسی، نفوذ سلول‌های آماسی به ویژه ائوزینوفیل در گروه آسم مشاهده شد. در آزمون الایزا، در گروه آسم میانگین غلظت سایتوکاین‌های IL-4و IL-10 در نمونه‌های بافت هموژن ریه به‌طور معنی‌داری بیشتر از مایع برونکوآلوئولار بود($P<۰/۰۵$). بین میانگین میزان IgE اختصاصی اوالبومین در نمونه‌های بافت هموژن ریه و سرم در گروه آسم هم‌بستگی معنی‌داری مشاهده شد(ضریب هم‌بستگی۰/۹۴۲ و $P<۰/۰۵$). در گروه کنترل، IgE اختصاصی اوالبومین در سرم بر خلاف بافت هموژن ریه ردیابی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که بافت هموژن ریه برای ردیابی سایتوکاین‌های IL-4، IL-10 و IgE اختصاصی در مطالعات مشابه بسیار ارزشمند است. پیشنهاد می‌شود پژوهش‌های بیشتری برای بررسی سایر سایتوکاین‌ها و اجزای ایمنی انجام شود.

واژه‌های کلیدی: تعادل Th1-Th2 ، اوالبومین، مایع لاواژ برونکوآلوئولار، بافت هموژن ریه، IgE اختصاصی اوالبومین

مقدمه

آسم به عنوان یک اختلال ناهمگون شناخته می‌شود که با انسداد، افزایش حساسیت و التهاب در مجاری هوایی همراه است. بر اساس پژوهش‌های انجام شده به هم خوردن تعادل بین لنفوسیت‌های Th1 و Th2 و در نتیجه افزایش تولید سایتوکاین‌های Th2 منجر به فعال شدن ماست‌سل‌ها، تولید IgE، فراخوانی سلول‌های التهابی به ویژه ائوزینوفیل‌ها و وقوع التهاب در مجاری هوایی می‌شود(۲۰و۲۴). در این میان، IL-4 با القای تمایز در لنفوسیت‌های Th2، تغییر کلاس ایمنوگلوبولین به کلاس E در لنفوسیت‌های B، بلوغ ماست‌سل‌ها و تسهیل فراخوانی نفوذ ائوزینوفیل‌ها به ریه، یکی از سایتوکاین‌های مهم دخیل در روند وقوع آسم محسوب می‌شود(۵).IL-10 یکی دیگر از سایتوکاین‌های مترشحه از Th2 است که یک سایتوکاین ضد التهابی محسوب می‌شود. در طی روند ایجاد آسم آلرژیک با اوالبومین، افزایش معنی‌دار در سطوح IL-10 تا چندین روز پس از ایجاد آسم مشاهده شده است، همچنین مشخص شده که افزایش تولید IL-10 نقش مهمی در القای پاسخ‌های Th2 در طی روند ایجاد آسم دارد(۱۴). IFN- γ سایتوکاین اصلی مترشحه از Th1 محسوب می‌شود که روی تمایز لنفوسیت‌های Th2 اثر مهارکنندگی دارد. مشاهدات متعددی نشان می‌دهد که ممکن است بتوان از IFN- γ برای تغییر تعادل Th2-Th1 به نفع Th1 به منظور محافظت در برابر بیماری‌های مرتبط با افزایش پاسخ لنفوسیت‌های Th2، استفاده کرد؛ اگرچه نقش Th1 در التهاب آلرژیک مجاری هوایی مبهم است و برخی یافته‌ها استفاده از سایتوکاین‌های مترشحه از Th1 برای درمان آسم را بی‌تأثیر دانسته‌اند (۱۱).

*پست الکترونیک نویسنده مسئول: maleki@um.ac.ir

آسم به عنوان یک بیماری آلرژیک مجاری هوایی، به طور گسترده در گونه‌های موش مدل‌سازی شده است و موش رایج‌ترین گونه مورد پژوهش در مدل‌های حیوانی آسم است(۱۰)؛ در همین راستا، مدل‌هایی که در آن‌ها از ایجاد حساسیت (sensitization) و سپس چالش(challenge) با آنتی‌ژنهایی نظیر اوالبومین بهره گرفته شده است به درک ما از الگوی تغییرات در تعادل T1/T2، و به ویژه نقش سایتوکاین‌های Th2، کمک کرده‌اند. در این مدل‌ها بسیاری از ویژگی‌های دیده شده در افراد مبتلا به آسم از جمله التهاب، نفوذ ائوزینوفیل‌ها، تولید سایتوکاین‌ها، افزایش IgE سرم و واکنش بیش از حد راه‌های هوایی (AHR) دیده می شود (۳).

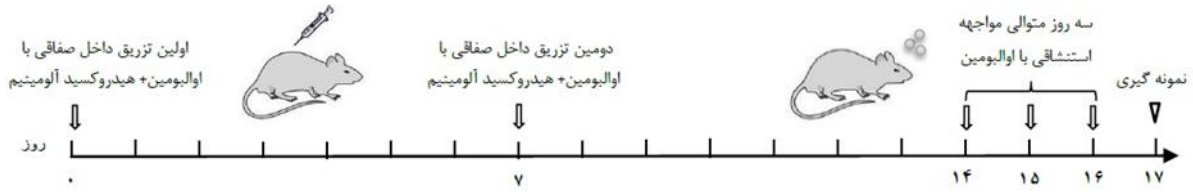
به هر حال با وجود پیشرفت‌های قابل توجه در شناخت روند ایجاد بیماری و نیز ابداع درمان‌های دارویی متنوع، هنوز در زمینه‌ی پیش‌گیری و کنترل آسم نتایج قابل قبولی به دست نیامده است (۶)، بنابراین انجام مطالعات گسترده در مدل‌های تجربی آسم آلرژیک هم‌چنان ادامه دارد. با توجه به این که از اوالبومین به طور گسترده برای القای پاسخ‌های مشابه آسم آلرژیک در مدل‌های موشی استفاده می‌شود، دست‌رسی به نمونه‌ای که بتواند به طور کامل تغییرات ایمنی ناشی از ایجاد آسم و اثر روش‌های درمانی روی این تغییرات را نشان دهد ضروری به نظر می‌رسد، از این رو در این پژوهش غلظت‌های سایتوکان‌های مهم در روند وقوع آسم آلرژیک و نیز غلظت IgE اختصاصی اوالبومین در بافت هموژن ریه با غلظت آن‌ها در سایر نمونه‌های رایج در پژوهش‌های مشابه (مایع لاواژ برونکوآلوئولار و سرم) مقایسه شده است.

مواد و روش کار

۱۴ عدد موش ماده نژاد Balb/c در سن ۶ هفته از موسسه‌ی واکسن و سرم‌سازی رازی مشهد تهیه شد و در شرایط نوردهی مناسب (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) قرار گرفتند. پس از ۵ روز دوره‌ی انطباق، موش‌ها به صورت تصادفی در دو گروه کنترل (تعداد=۵) و آسم (تعداد=۹) توزیع شدند. در تمامی مراحل نگه‌داری و انجام آزمایش روی حیوانات، اصول اخلاقی مطابق قوانین کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه فردوسی مشهد رعایت شد (کد IR.UM.REC.1401.030).

القای التهاب آلرژیک مجاری هوایی بر اساس دستورالعمل عنوان شده از سوی Smits و همکاران در سال ۲۰۰۹ صورت گرفت(۲۲). در روزهای صفر و ۷ پژوهش تزریق داخل صفاقی اوالبومین (۱۰ میکروگرم اوالبومین به ازای هر موش) (ورثینگتون، آمریکا) حل شده در محلول بافر فسفات استریل حاوی هیدروکسید آلومینیوم (پیرس، آمریکا) انجام شد، سپس در روزهای ۱۴،۱۵و۱۶ پژوهش ،موش‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در معرض اوالبومین استنشاقی ۱٪ (سیگما، آمریکا) قرار گرفتند. برای تولید قطرات استنشاقی از دستگاه نبولایزر (امرون، ژاپن) استفاده شد. در روز ۱۷ نمونه‌گیری انجام شد(شکل۱). در گروه کنترل تزریق داخل صفاقی و تولید قطره‌های استنشاقی با بافر فسفات استریل انجام شد.

۲۴ساعت پس از آخرین مواجهه استنشاقی، با کتامین و آسپرومازین (به ترتیب ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بی‌هوشی عمیق در موش‌ها ایجاد شد. به منظور جمع‌آوری مایع لاواژ برونکوآلوئولار (broncoalveolar lavage: BAL) در هر موش، با آنژیوکت، عمل تراکستومی انجام شد و در سه مرحله به میزان ۰/۴ میلی لیتر محلول بافر فسفات استریل (PBS) با سرنگ انسولینی به داخل ریه تزریق شده و مجدداً جمع‌آوری شد. مایع جمع‌آوری شده برای هر موش سانتریفیوژ شد و مایع رویی برای انجام الایزا جداسازی شد. پس از گرفتن مایع BAL، قفسه سینه حیوان باز شده وخون‌گیری از قلب با سرنگ انسولینی انجام شد و سرم آن جدا شد. با گرفتن خون از قلب به زندگی حیوان پایان داده شد و ریه خارج گردید. در هر موش قسمتی از لوب قدامی ریه سمت چپ برای رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین برای بررسی آسیب‌شناسی در فرمالین بافر ۱۰ درصد قرار داده شد. به منظور تهیه‌ی بافت هموژن ریه، باقی‌مانده‌ی بافت ریه در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد.



شکل۱- نحوه‌ی القای آسم آلرژیک با استفاده از اوالبومین در موش Balb/c. به دنبال تزریق داخل صفاقی اوالبومین و هیدروکسید آلومینیم در روز صفر و۷ و سپس استنشاق اوالبومین در روزهای ۱۴تا۱۶ نمونه‌گیری از ریه در روز ۱۷ انجام شد.

نمونه‌های فریز شده به دمای محیط رسانده شد و پس از وزن‌کشی به ازای هر ۱۰۰ گرم بافت ریه یک میلی‌لیتر بافر هموژنیزه کننده (حاوی ۰/۵ KCl مولار، ۱ Tris-Cl مولار، ۱۰۰=Triton x) اضافه شد و از دستگاه هموژنیزه کننده استفاده شد. مخلوط هموژن به دست آمده با دور ۱۰۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی برای انجام الایزا جمع‌آوری شد.

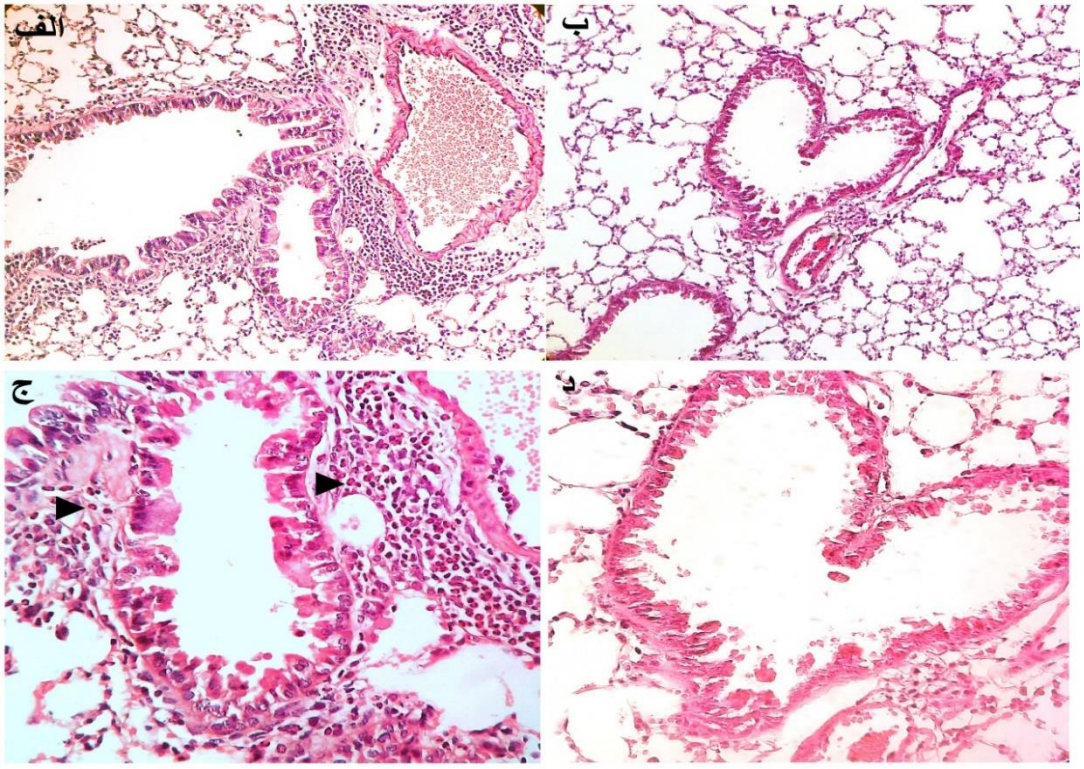
غلظت‌های IL-4، IL-10وγ -IFN در مایع فاقد سلول حاصل از سانتریفیوژ مایع BAL و هموژن بافت ریه با روش الایزای ساندویچ اندازه‌گیری شد (آراندی، آمریکا). غلظت IgE اختصاصی اوالبومین نیز با روش الایزای ساندویچ در سرم و مایع حاصل از سانتریفیوژ هموژن بافت ریه سنجیده شد (بایولجند، آمریکا).

آنالیز آماری با برنامه SPSS 21 انجام شد. از آزمون Paired-Samples T Test برای تحلیل داده‌ها استفاده شد و مقادیر P<۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

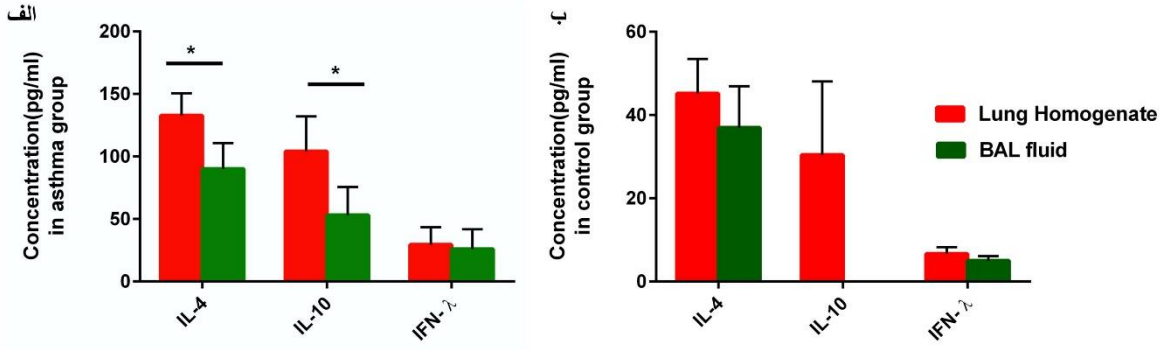
نتایج

در بررسی مقاطع آسیب‌شناسی تهیه شده از بافت ریه، نفوذ شدید سلول‌های آماسی به ویژه ائوزینوفیل‌ها در اطراف مجاری هوایی و عروق در ریه در گروه آسم بیان‌گر وقوع التهاب آلرژیک شدید در ریه بود (شکل۲). در بررسی نتایج حاصل از الایزا مشخص شد که در هر دو گروه آسم و کنترل مقدار میانگین غلظت سایتوکاین‌های IL-4، IL-10و γ -IFN در نمونه‌های بافت هموژن ریه نسبت به نمونه‌های مایع BAL بیشتر بود که در IL-4و IL-10 مربوط به گروه آسم این افزایش معنی‌دار بود (به ترتیب P=۰/۰۰۴ و P=۰/۰۰۱) (شکل ۳).

در آنالیز غلظت IgE اختصاصی اوالبومین در گروه کنترل غلظت IgE اختصاصی در نمونه‌ی بافت هموژن ریه کمتر از مقادیر قابل اندازه‌گیری بوده و صفر در نظر گرفته شد در حالی‌که در نمونه‌های سرم IgE اختصاصی اوالبومین قابل اندازه‌گیری و میانگین غلظت± انحراف معیار ۱/۱۹±۰/۵ پیکوگرم بر میلی‌لیتر بود. در گروه آسم در نمونه‌های بافت هموژن ریه و نمونه‌های سرم در میانگین غلظت‌ها± انحراف معیار به ترتیب ۷/۷۸±۱۴/۳۵و۸/۰۷±۱۴/۰۲ پیکوگرم بر میلی‌لیتر بود و هم‌بستگی معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده شد (ضریب هم‌بستگی برابر۹۴۲ /۰و P<۰/۰۰۱).



شکل۲- بافت ریه .الف و ج) التهاب در اطراف مجاری هوایی به دنبال تزریق داخل صفاقی اووالبومین و هیدروکسید آلومینیم در روز صفر و۷ و سپس استنشاق اوالبومین در روزهای ۱۴تا۱۶ در گروه آسم. نفوذ سلول‌های آماسی با هسته‌ی چند قسمتی به ویژه ائوزینوفیل (نوک پیکان) در اطراف برونشیول‌ها و رگ خونی اطراف برونشیول دیده می شود .ب و د) در گروه کنترل هیچ‌گونه نفوذ سلول آماسی در اطراف برونشیول‌ها و رگ خونی مشاهده نشد. (H&E، الف و ب ۲۰۰×، ج و د ۴۰۰×)



شکل ۳- مقایسه‌ی غلظت سایتوکاین‌های IL-4، IL-10 و IFN-γ در بافت هموژن ریه و مایع لاواژ برونکوآلوئولار بر حسب پیکوگرم بر میلی‌لیتر(pg/ml) با روش الایزای ساندویچ در دو گروه آسم (الف) و کنترل (ب). به طور خلاصه تزریق داخل صفاقی اوالبومین و هیدروکسید آلومینیم در روز صفر و۷ و سپس استنشاق اوالبومین در روزهای ۱۴تا۱۶ و در نهایت نمونه‌گیری در روز ۱۷ انجام شد. در گروه کنترل از بافر فسفات استفاده شد. مقدار IL-10 در مایع برونکوآلوئولار گروه کنترل کمتر از مقدار قابل اندازه‌گیری بود. ستون‌ها نشان دهنده‌ی mean±SD هستند. آزمون Paired samples T-test. * P <۰/۰۵

بحث

در روند وقوع آسم آلرژیک، تغییرات در غلظت سایتوکاین‌های مترشحه از Th1 و Th2 در نهایت منجر به افزایش تولید ایمنوگلوبولین E، افزایش تکثیر و فعال شدن ماست‌سل‌ها و در نهایت افزایش پاسخ ایمنی در ریه

می‌شود که از این میان تغییر در غلظت سایتوکاین‌های IL-4، IL-10و IFN- γ اهمیت ویژه‌ای دارد(۸). مدل‌های ایجاد حساسیت و سپس چالش با اوالبومین در موش فرصت‌های زیادی را برای افزایش درک ما از سازوکارهای پاتوژنتیک این بیماری فراهم می‌کنند(۱۰).

روش‌های جمع‌آوری مایع لاواژ ریه به عنوان وسیله‌ای برای شناسایی تغییرات بافت تنفسی در انسان و حیوان‌های مختلف از جمله موش توصیف شده‌اند. تغییر در اجزای مختلف مایع لاواژ برونکوآلوئولار (BAL) را می‌توان برای شناسایی زود هنگام تغییرات بافت ریه به کار برد(۱۳)، اما یکی از محدودیت‌های مایع BAL وسیع بودن رنج طبیعی برای مولفه‌های مختلف آن است(۱۷). نمونه‌گیری از مایع BAL بهتر است در حیوان زنده و پیش از، از کار افتادن قلب انجام شود؛ چراکه اکثر شاخص‌های اندازه‌گیری شده در پژوهش Henderson و همکاران در سال ۱۹۸۷در نمونه‌های مایع BAL که از حیوان زنده تهیه شده بودند، مقادیر بالاتری نسبت به نمونه‌های لاواژ تهیه شده از ریه‌ی جدا شده از بدن حیوان داشتند(۷) اگرچه بنا بر تجربه‌ی نویسندگان در پژوهش حاضر، تهیه‌ی مایع BAL در موش به علت ظرافت نای نیاز به دقت و سرعت عمل بالا و صرف زمان بیشتری دارد. یکی دیگر از محدودیت‌های مهم در اطلاعات به دست آمده از آزمایش مایع BAL این است که امکان مقایسه بین پژوهش‌های مختلف وجود ندارد. تفاوت‌های بسیاری در روش‌های لاواژ و تهیه و آماده‌سازی وجود دارد، از جمله نوع مایع استفاده شده برای لاواژ، محل تزریق و تعداد دفعات تزریق مایع لاواژ که بین ۱ تا ۱۴ بار متفاوت است، همچنین این که سنجش بخش سلولی و غیرسلولی روی کدام یک از این ۱ تا ۱۴ بخش انجام بگیرد نیز بین پژوهش‌ها یکسان نیست(۲۳)، به علاوه در پژوهش‌های McSorely و همکاران در سال‌های ۲۰۱۲و۲۰۱۴ مشخص شد که تغییرات سایتوکاینی در مایع BAL وابسته به گذر زمان است و در نتیجه زمان نمونه‌گیری یک مولفه‌ی اساسی در ردیابی سایتوکاین‌ها محسوب می‌گردد(۱۵و ۱۶).

از هموژن بافت ریه نیز به طور گسترده در پژوهش‌های مربوط به تغییرات بافت تنفسی و اندازه‌گیری غلظت مولکول‌های مختلف از جمله سایتوکاین‌ها استفاده می‌شود. در این روش قسمتی از بافت ریه تحت تاثیر روش‌های مکانیکی و نیز محلول‌های لیزکننده قرار می‌گیرد تا غشای سلول‌ها یک‌پارچگی خود را از دست دهد و محتویات آن‌ها برای سنجش‌های آزمایشگاهی خارج شود. بدین ترتیب دسترسی به غلظت بالاتری از پروتئین‌ها و محتویات مورد پژوهش میسر خواهد شد(۲۱). میزان جمع‌آوری مایع BAL با توجه به حجم اندک ریه در موش بسیار محدود است و اگرچه مایع BAL در پژوهش‌های آسم در انسان اهمیت ویژه‌ای دارد، بررسی هموژن بافت ریه در موش نسبت به انسان در دسترس‌تر به نظر می‌رسد(۴).

در پژوهشی که روی عفونت ریه با پنوموسیستیس کارینی(Pneumocystis carinii) انجام شد، با توجه به نتایج به دست آمده و به بیان صریح نویسنده در متن مقاله، نمونه‌های بافت هموژن ریه نسبت به نمونه‌های مایع BAL برای بررسی پاسخ سلولی و سایتوکاینی در برابر این عفونت در ریه مناسب‌تر هستند(۹)، همچنین در بررسی نمودارهای پژوهش‌هایی که در آن‌ها از نمونه‌های بافت هموژن ریه و مایع BAL برای اندازه‌گیری برخی سایتوکاین‌ها و شاخص‌های استرس اکسیداتیو در التهاب ریوی استفاده شده بود، به نظر می‌رسد در اکثر موارد غلظت مواد مورد اندازه‌گیری در بافت هموژن ریه بسیار بالاتر از مایع BAL است، اما به علت نبود مقایسه‌ی آماری، غلظت‌های به دست آمده از بافت هموژن ریه با غلظت‌های به دست آمده در مایع BAL تنها می توان به وجود تفاوت در غلظت‌ها به نفع بافت هموژن ریه اشاره کرد(۱۲و۱۸و۱۹). در پژوهش شیروان و همکاران در سال ۲۰۱۷ با وجود مقادیر بسیار بالای IL-4 در هموژن بافت ریه به دنبال ایجاد آسم آلرژیک در موش با استفاده از اوالبومین، این سایتوکاین در مایع BAL قابل ردیابی نبود، همچنین تفاوت معنی‌دار در افزایش سایتوکاین‌ها به دنبال ایجاد آسم آلرژیک فقط در بافت هموژن ریه مشاهده شد و نتایج به دست آمده از آنالیز مایع BAL هیچ‌گونه تغییر معنی‌داری را نشان ندادند(۲۰).

اندازه‌گیری IgE رایج‌ترین شاخص برای سنجش حساسیت‌زایی است. در مدل‌های حیوانی IgE تام یا اختصاصی عامل حساسیت‌زا عموماً با روش الایزا اندازه‌گیری می‌شود و هم‌بستگی قوی بین مقادیر IgE تام با مقادیر IgE اختصاصی عامل حساسیت‌زا در گونه‌های

مختلف موش دیده شده است(۲). اندازه‌گیری مقادیر IgE اختصاصی آنتی‌ژن در نمونه‌های مختلف انجام شده است از جمله سرم، مایع BAL، لاواژ بینی و هموژن بافت ریه که از این میان در بسیاری از پژوهش‌ها اندازه‌گیری‌ها در سرم صورت گرفته است(۱). در پژوهش حاضر مقادیر اندازه‌گیری شده برای IgE اختصاصی اوالبومین در سرم و هموژن بافت ریه گروه آسم نزدیک به هم بود و تفاوت معنی‌داری نداشتند، از سویی در آزمون Paired samples T- test در بررسی هم‌بستگی بین نمونه‌ها مشخص شد که این مقادیر دارای هم‌بستگی با رابطه‌ی بسیار قوی (ضریب هم‌بستگی ۰/۹۴۲) هستند، همچنین در گروه کنترل که تحت مواجهه با بافرفسفات به جای اوالبومین بودند، برخلاف هموژن بافت ریه، IgE اختصاصی اوالبومین در سرم ردیابی شد که می تواند به علت واکنش متقاطع ایمنوگلوبولین نشان‌دار با سایر پروتئین‌های داخل سرم باشد و منجر به وقوع پاسخ مثبت کاذب شود، بنابراین به نظر می‌رسد در پژوهش‌های مشابه در موش، استفاده از هموژن بافت ریه برای ردیابی IgE اختصاصی اوالبومین نمونه‌ی قابل اعتمادی باشد.

به علت تفاوت در کینتیک و سرعت ترشح سایتوکاین‌های مختلف به داخل مایع BAL و به دلیل سهولت نمونه‌گیری از ریه و همچنین بالاتر بودن غلظت‌های اندازه‌گیری شده در بافت هموژن ریه پیشنهاد می‌شود از نمونه‌ای استفاده شود که بتوان حضور و نسبت سایتوکاین‌ها را در همان لحظه در بالاترین غلظت سنجید. با توجه به پژوهش‌های گسترده در زمینه‌ی آسم آلرژیک و استفاده از مدل‌های حیوانی به‌ویژه موش بسیاری از پژوهش‌ها به بررسی تغییرات مولفه‌های ایمنی در مایع BAL اکتفا می‌کنند و به این ترتیب نمونه بسیار ارزشمندی به نام هموژن بافت ریه را نادیده می‌گیرند، در حالی‌که طبق نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر هموژن بافت ریه ارزش بسیار بالایی در ارزیابی‌های عملکرد سیستم ایمنی در آسیب‌های ریه دارد.

با توجه به این‌که در این پژوهش نمونه‌گیری در ۲۴ ساعت پس از آخرین مواجهه با اوالبومین انجام شده و با توجه به وابسته به زمان بودن غلظت سایتوکاین‌ها در مایع BAL، پیشنهاد می شود نمونه‌گیری از بافت ریه و مایع BAL در زمان‌های مختلف پس از آخرین مواجهه اسنشاقی با اوالبومین انجام شود، همچنین مقایسه بین غلظت‌های دو نمونه برای طیف گسترده‌تری از سایتوکاین‌ها انجام شود تا اطلاعات جامع‌تری درباره‌ی بهترین نمونه برای سنجش سایتوکاین‌ها در پژوهش‌های مشابه به دست آید.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که برای اندازه‌گیری سایتوکاین‌های IL-4، IL-10، IFN- γ و IgE اختصاصی اوالبومین در مدل تجربی آسم آلرژیک با برنامه‌ی زمانی مشابه پژوهش حاضر، نمونه‌های بافت هموژن ریه دارای غلظت بالاتر و یا متناسبی از مولفه‌های ذکر شده بود و توصیه می‌شود به منظور افزایش احتمال و دقت ردیابی مولفه‌های مذکور در پژوهش‌های مشابه در موش به نمونه‌برداری از بافت ریه نیز پرداخت و تنها به نتایج حاصل از مایع BAL که در پژوهش‌های انسانی تنها نمونه‌ی در دسترس تلقی می‌شود، اکتفا نکرد.

قدردانی و تشکر

نویسندگان مقاله از خانم دکتر سیما پرنده شیروان که در انجام مراحل عملی پایان‌نامه، نقش به‌سزایی داشتند تشکر می‌کنند. هزینه‌های این پژوهش از سوی معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد در قالب طرح شماره ۴۰۳۶۰ تامین شد. نویسندگان اعلام می‌کنندکه در انجام این پژوهش و اعلام نتایج به دست آمده هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود نداشته است.

منابع

1- Alexis N.E and Carlsten C; Interplay of air pollution and asthma immunopathogenesis: a focused review of diesel exhaust and ozone. Int Immunopharmacology. 2014; 23(1): 347-355.

2- Aldemir H; Bars R and Herouet-Guicheney C; Murine models for evaluating the allergenicity of novel proteins and foods. Regul Toxicol Pharmacol; 2009; 54(3): S52-S7.

3- Azman, S; Sekar, M; Bonam, S.R; Gan, S.H; Wahidin, S; Lum, P.T and et al; Traditional medicinal plants conferring protection against ovalbumin-induced asthma in experimental animals: a review. J Asthma Allergy; 2021; 14: 641.

4- Baker J.M; Hinkle K.J; McDonald R.A; Brown C.A; Falkowski N.R; Huffnagle G.B and et al;

Whole lung tissue is the preferred sampling method for amplicon-based characterization of murine lung microbiota. Microbiome; 2021; 9(1): 1-14.

5- Barrios, R.J; Kheradmand, F; Batts, L.K and Corry, D.B; Asthma: pathology and pathophysiology. Arch Pathol Laborator Med; 2006; 130(4):447-51.

6- Erkekol, F.Ö; Çelik, G.E; Keskin, Ö; Güllü, E; Mungan, D and Mısırlıgil Z; Fasting: an important issue in asthma management compliance. Ann Allergy Asthma Immunol; 2006;97(3):370-4.

7- Henderson R; Mauderly J; Pickrell J; Hahn F; Muhle H and Rebar A; Comparative study of bronchoalveolar lavage fluid: effect of species, age, and method of lavage. Experimen Lung Research; 1987;13(3):329-42.

8- Holgate, S.T; Innate and adaptive immune responses in asthma. Nature Medicine. 2012;18(5):673.

9- Ishimine T; Kawakami K; Nakamoto A and Saito A; Analysis of cellular response and gamma interferon synthesis in bronchoalveolar lavage fluid and lung homogenate of mice infected with Pneumocystis carinii. Microbiol Immunol; 1995;39(1):49-58.

10- Kianmeher, M; Ghorani, V and Boskabady, M.H; Animal model of asthma, various methods and measured parameters: a methodological review. Iran J Allergy Asthma Immunol; 2016:445-65.

11- Koch, S and Finotto, S; Role of interferon-λ in allergic asthma. J Innate Immun; 2015;7(3):224-30.

12- Madouri F; Barada O; Kervoaze G; Trottein F; Pichavant M and Gosset P; Production of Interleukin-20 cytokines limits bacterial clearance and lung inflammation during infection by Streptococcus pneumoniae. EBioMedicine; 2018;37:417-27.

13- Mathers R; Evans G; Bleby J and Tornow T; Total and differential leucocyte counts in rat and mouse bronchoalveolar lavage fluids using the Sysmex XT-2000iV. Comp Clin Path; 2007;16(1):29-39.

14- Matsumoto, K; Inoue, H; Tsuda, M; Honda, Y; Kibe, A; Machida, K and et al; Different roles of interleukin-10 in onset and resolution of asthmatic responses in allergen-challenged mice. Respirol; 2005;10(1):18-26.

15- McSorley H.J; Blair N.F; Smith K.A; McKenzie A.N and Maizels R.M; Blockade of IL-33 release and suppression of type 2 innate lymphoid cell responses by helminth secreted products in airway allergy. Mucosal Immunol; 2014;7(5):1068.

16- McSorley H.J; O'Gorman M.T; Blair N; Sutherland T.E; Filbey K.J and Maizels R.M; Suppression of type 2 immunity and allergic airway inflammation by secreted products of the helminth H eligmosomoides polygyrus. Eur J Immunol; 2012;42(10):2667-82.

17- Radha S; Afroz T; Prasad S and Ravindra N; Diagnostic utility of bronchoalveolar lavage. J Cytol; 2014;31(3):136.

18- Samarghandian S; Afshari R; Sadati A; Evaluation of lung and bronchoalveolar lavage fluid oxidative stress indices for assessing the preventing effects of safranal on respiratory distress in diabetic rats. Sci World J; 2014;2014.

19- Samarghandian S; Borji A; Afshari R; Delkhosh M,B; Gholami A; The effect of lead acetate on oxidative stress and antioxidant status in rat bronchoalveolar lavage fluid and lung tissue. Toxicol Mechanisms Methods;2013;23(6):432-6.

20- Shirvan, S.P; Ebrahimby, A; Dousty, A; Maleki, M; Movassaghi, A; Borji, H and et al; Somatic extracts of Marshallagia marshalli downregulate the Th2 associated immune responses in ovalbumin-induced airway inflammation in BALB/c mice. Parasites Vectors; 2017;10(1):1-10.

21- Simpson R.J; Homogenization of mammalian tissue. Cold Spring Harbor Protocols; 2010;2010(7):pdb. prot5455.

22- Smits, H; Gloudemans, A; van Nimwegen, M; Willart, M;Soullié, T; Muskens, F and et al; Cholera toxin B suppresses allergic inflammation through induction of secretory IgA. Mucosal Immunol; 2009; 2(4): 331.

23- Van Hoecke L; Job E.R; Saelens X and Roose K; Bronchoalveolar lavage of murine lungs to analyze inflammatory cell infiltration. JoVE; 2017(123): e55398.

24- Walsh, G.M; Targeting airway inflammation: novel therapies for the treatment of asthma. Curr Med Chem; 2006; 13(25): 3105-3111.

Vol.16/No.2
Fall-Winter 2022-2023

Iran. J. Vet. Clin. Sci.; 2023; 16(2): 87-94.
https://doi.org/ 10.22034/IJVCS.2022.13899.1020

Comparison of IL-4, IL-10, IFN-γ and Specific IgE Concentration in Lung Homogenate Specimens with Other Common Specimens in Experimental Allergic Asthma in Balb/c Mice

Tahmineh Tajik[1]; Mohsen Maleki[1*]; Zahra Moosavi[1]; Alireza Haghparast[1]

1. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad- Iran.

Summary

Received: 18 June 2022 ***Accepted:*** 5 September 2022

The aim of this study was to compare levels of IL-4, IL-10 and IFN- γ in lung homogenates with their concentrations in bronchoalveolar lavage fluid, as well as levels of ovalbumin-specific IgE in lung homogenates with its concentrations in serum following induction of allergic asthma in mice to determine the best specimen in similar studies. In this investigation, 14 six-week female Balb/c mice were sensitized to Ovalbumin+ Aluminum hydroxide (on days 0 and 7) and challenged with Ovalbumin aerosols (on days 14 to 16). Specimens were obtained from bronchoalveolar lavage fluid, lung tissue and serum on day 17. Ovalbumin was replaced by phosphate buffer solution in the control group. Infiltration of inflammatory cells especially eosinophils revealed inflammation in lung. ELISA results showed that in the asthma group levels of IL-4 and IL-10 were significantly higher in lung homogenates in comparison to bronchoalveolar lavage fluid ($P<0.05$). In the asthma group, levels of Ovalbumin-specific IgE in lung homogenates and seum specimens correlated to a high degree ($r=0.942$, $P<0.05$). In the control group, Ovalbumin-specific IgE was undetectable in lung homogenate while it was detected in serum. Based on our findings, lung homogenate is a valuable specimen to evaluate levels of IL-4, IL-10 and ovalbumin-specific IgE in similar studies. More investigations are needed to evaluate other cytokines and immune components.

***Keywords*:** Th1-Th2 balance, Ovalbumin, Lung homogenates, Broncoalveolar lavage fluid, Ovalbumin-specific IgE

***Corresponding Author Email:** maleki@um.ac.ir