جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله‌ی علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد زمستان ۱۳۸۸، سال پنجم، شماره ۴ (پیاپی ۲۰)، صفحه ۲۳۷-۲۲۹

کاهش سطح گیرنده‌ی محلول شبه Toll-2 در بیماران مبتلا به آسم

محمدرضا خاکزاد
کارشناس ارشد ایمنولوژی، عضو هیئت علمی دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد

مجید میرصدرایی
متخصص داخلی و فوق تخصص ریه، دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد

لیدا جدی
پزشک عمومی ، دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد

محسن تهرانی
دکتری ایمنولوژی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی مشهد، پژوهشکده بوعلی

مجتبی سنکیان
دکتری ایمنولوژی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی مشهد، پژوهشکده بوعلی

نگارنده پاسخگو: دکتر مجید میرصدرایی
آدرس: مشهد، خیابان آزادی، کوچه سراب، دانشکده پزشکی استاد شاهین‌فر
تلفن: ۰۹۱۵۱۱۱۵۸۶۰
نمابر: ۰۵۱۱-۸۸۱۶۹۶۵
پست الکترونیک:
majidmirsadraee@mshdiau.ac.ir

تاریخ وصول: ۱۳۸۹/۲/۲۷
تاریخ تایید: ۱۳۸۹/۵/۱۹

مقدمه

تحریک گیرنده‌ی شبه Toll-۲ محلول (sTLR-2=Soluble Toll-like receptor-2) می‌تواند منجر به فعال شدن هر دو مکانیسم‌های سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی گردد. اخیرا گزارشاتی وجود دارد که نقش مولکول‌های Toll-۲ را در پاتوژنزآسم نشان می‌دهد.

هدف

هدف از این مطالعه بررسی سطح sTLR در سرم و خلط بیماران مبتلا به آسم در مقایسه با افراد نرمال بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه توصیفی- مقطعی بر روی بیماران با اختلالات ریوی مراجعه کننده به کلینیک فوق تخصصی ریه انجام شد. ۳۳ بیمار با تشخیص آسم و ۱۹ نفر از افراد سالم به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. بیماران آسمی مطابق با معیارهای Global Initiative for Asthma (GINA) به ۴ گروه آسم خفیف، خفیف پایدار، متوسط و شدید تقسیم شدند.گروه شاهد از بین افراد داوطلب سالم که خود و اطرافیان‌شان سیگاری نبودند و هیچ‌گونه سابقه‌ی بیماری‌های ریوی و آلرژیک را نیز نداشته و از نظر سن و جنس مشابه گروه آزمون بودند انتخاب و وارد مطالعه شدند. پس از گرفتن شرح حال و معاینه‌ی بالینی، به طور همزمان خون‌گیری وریدی و نمونه‌گیری خلط (تحریک شده با سالین‌هایپرتونیک ۵٪) انجام شد. برای اندازه‌گیری سطح sTLR-۲ از روش الایزای ساندویچ استفاده گردید. شمارش ائوزینوفیل‌های خون محیطی و شمارش افتراقی سلول‌های التهابی خلط در بیماران و گروه شاهد نیز انجام شد. هم‌چنین غلظت IgE کل سرم وخلط با استفاده از روش الایزا در تمام نمونه‌ها نیز اندازه‌گیری شد.

نتایج

میانگین جذب نوری sTLR-۲ در سرم بیماران مبتلا به آسم به طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه شاهد بود (۰/۴۴±۰/۱۲ در مقابل ۰/۷۲±۰/۱۵، P=۰/۰۰۳). میانگین جذب نوری sTLR-۲ در مایه رویی خلط بیمارن قابل اندازه‌گیری نبود. نتایج ما نشان داد که کاهش میانگین جذب نوری sTLR-۲ به طور همزمان با افزایش شدت و مرحله‌ی آسم ارتباط داشت، اگرچه این تفاوت معنی‌دار نبود.

نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج ما نشان داد که سطح sTLR-۲ در سرم و خلط بیماران مبتلا به آسم به طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه شاهد است.

واژه‌های کلیدی

Asthma, Soluble TLR2, Serum , Sputum, Innate immunity

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

طی دهه‌های اخیر شیوع آسم و بیماری‌های آلرژیک در کشورهای صنعتی به طور چشم‌گیری افزایش پیدا کرده که نمی‌تواند تنها به دلیل تغییر در زمینه‌ی ژنتیکی افراد باشد (۱). عفونت‌های تنفسی می‌تواند هم نقش تشدید کننده و هم نقش پیش‌گیری کننده‌ای در آسم داشته باشند (۲). بنا بر این بررسی سیستمی که به طور اولیه پاتوژن‌های سیستم تنفسی را شناسایی می‌کند، برای درک بیماری‌های التهابی ضروری به نظر می‌رسد. ایمنی ذاتی اولین خط دفاعی بدن در مقابل عوامل عفونی باکتریال و ویروسی است. اخیرا گزارشاتی وجود دارد که نقش مکانیسم‌های ایمنی ذاتی را در تنظیم واکنش‌های آلرژیک نشان می‌دهد (۳). یکی از ابزار پاسخ‌های ایمنی ذاتی، مولکول‌های شبیه Toll-۲ (Toll-like receptor) هستند که البته نقش آن‌ها در آسم آلرژیک مشخصا تایید نشده است. مولکول Toll-۲ به عنوان یک گیرنده‌ی شناسایی الگو نقش مهمی را در شناسایی طیف وسیعی از ترکیبات باکتریال دارد (۴). گیرنده‌های مولکولیTLR پروتئین‌های داخل غشایی هستند که جزو خانواده‌ی پروتینی با عنوان" گیرنده‌های شناسایی کننده‌ی الگو" (pattern recognition receptors) می‌باشند و عمل شناسایی و پاسخ‌گویی به لیگاندهای میکروبی را بر عهده دارند (۵). اخیرا نشان داده شده که مولکول Toll-۲ نقش مهمی را هم در پیش‌گیری و هم تشدید آسم سایر التهاب‌های آلرژیک برعهده دارد.

بررسی پلی‌مورفیسم ژن Toll-۲ در بچه‌های کشاورزان آلمانی نشان داده است که این مولکول نقش مستعدکننده‌ای در آسم و آلرژی دارد (۶). بررسی‌های دیگر افزایش بیان mRNA-TLR- ۲ را در سلول‌های عضلات صاف راه‌های هوایی نشان می‌دهد (۷). هم‌چنین افزایش بیان ژن Toll-۲در بیماران مبتلا به آسم نوتروفیلی در مقایسه با سایرگروه‌های آسمی وگروه شاهد نشان داده شده است (۸). شکل محلول مولکول Toll- ۲ (sTLR) مشتق از منوسیت‌ها را در پلاسما و شیر انسان نیز پیدا کردند. در این گزارشات پیشنهاد شده است که کاهش مولکول Toll-۲ محلول (که لیگاند مولکول Toll-۲ است) در سرم ناشی از افزایش پاسخ‌های سیستم ایمنی سلولی به لیپوپروتئین‌های باکتریایی است (۹). در بررسی‌های دیگری که در استرالیا وآلمان انجام شد، ارتباط مولکولToll-۲ با آسم گزارش گردید (۶). ولی یک گزارش دیگر از ژاپن چنین نقشی را تایید نمی‌کند (۱۰). دیگر بررسی‌ها نشان داد که شیوع آسم در فرزندان کشاورزان کمتر از فرزندان افراد غیرکشاورز است. این مطالعه هم‌چنین نشان داد که بیان مولکول Toll- ۲ وCD۱۴ در این کودکان بیشتر از کودکان افراد غیرکشاورز است (۱۱).گزارشات دیگری نیز وجود دارد که نشان می‌دهد مولکول Toll-۲ محلول ممکن است اثر تنظیمی بر روی سیستم ایمنی داشته باشد (۱۲). با بررسی مطالب بالا مشاهده می‌شود که درباره‌ی اثر مولکول Toll-۲ در آسم و بیماری‌های خودایمنی یافته‌های متناقضی وجود دارد.

هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی، پاسخ به این سئوال است که آیا مجموعه پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی در ریه بیماران مبتلا به آسم ممکن است با سطح Toll-۲ محلول در سرم و خلط بیماران مبتلا به آسم ارتباط داشته باشد؟ چنان‌چه این ارتباط وجود داشته باشد چگونگی ارتباط هدف دوم ما در این تحقیق بوده است.

روش کار

۳۳ بیمار که به تازگی آسم برونشیال در آن‌ها تشخیص داده شده بود و هیچ داروی کوروتیکواستروئیدی دریافت نکرده بودند در کنار ۱۹ نفر از افراد سالم بدون سابقه‌ی بیماری‌های تنفسی در این تحقیق مورد ارزیابی قرار گرفتند. افراد گروه مورد از بین مراجعه‌کنندگان به مطب فوق تخصصی ریه پس از انجام معاینات بالینی وگرفتن شرح حال انتخاب شدند. انتخاب بیماران آسمی بر اساس یافته‌های زیر بوده است ۱- بیماران با علایم ریوی شامل سرفه یا تنگی نفس ۲- علایم به طور گهگیر بوده و با دارو یا خوبخودی بهبود داشته ۳- با آلودگی هوا تحریک می‌شود ۴- FEV1 کمتر از ۸۰

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

درصد با پترن انسدادی و جواب بیشتر از ۱۲ درصد به برنکودیلاتور یا در موارد خفیف تست متاکولین مثبت مبتلا به آسم تشخیص داده شدند. هم‌چنین بیمارانی که دارای سابقه‌ی یکی از بیماری‌های آلرژیک را داشتند و یا غلظت سرمی IgE توتال آن‌ها بیش از ۱۰۰ IU/ml بود به عنوان آسم آلرژیک ارزیابی شدند. سپس با انجام تست‌های تنفسی و بر اساس طبقه‌بندی GINA (۱۳) بیماران درچهار گروه مبتلایان به آسم خفیف گهگیر و خفیف پایدار، متوسط پایدار و شدید پایدار تقسیم‌بندی شدند.

گروه شاهد از نظر سن و جنس با گروه آزمون یکسان انتخاب شدند و تحت معاینات کلینیکی از نظر وجود بیماری‌های سیستمیک و ریوی قرار گرفتند و در صورت داشتن هر نوع بیماری ریوی و یا مصرف سیگار از مطالعه‌ی ما حذف شدند. هم‌چنین در گروه شاهد افرادی که دارای ائوزینوفیلی و یا سطح IgE توتال افزایش یافته بودند از مطالعه حذف شدند. هم‌چنین افرادی که همکاری لازم برای انجام صحیح تست‌های عملکرد ریوی را نداشتند نیز از مطالعه حذف شدند. پس از اخذ رضایت‌نامه از بیماران خون‌گیری وریدی انجام شد. سپس سرم بیمار را جدا کرده و به لوله‌های میکروتیوب دربدار منتقل و تا زمان انجام آزمایشات در فریزر ۲۰- درجه نگهداری کردیم.

تهیه‌ی خلط: پس از تعیین شدت آسم با استفاده از دستگاه بخور (نبولایزر) Omeron CX3 اقدام به جمع‌آوری خلط بیمار گردید. قبل از انجام این عمل به هر بیمار ۲۰۰µg اسپری سالبوتامول تجویز کردیم تا بیمار دچار حمله‌ی تنفسی نشود. برای تحریک ریه و القای خلط، از بخور ۲ میلی‌لیتر محلول استریل سالین هایپرتونیک ۵ درصد و به مدت ۱۰ دقیقه استفاده گردید. به بیمار آموزش داده شدکه از مخلوط شدن نمونه‌ی خلط با آب دهان جلوگیری کند و نمونه را در داخل یک لوله‌ی دربدار استریل جمع‌آوری کند. سپس در آزمایشگاه و با استفاده از متد Fhay (۱۴) اقدام به تهیه نمونه مورد آزمایش از خلط بیماران کردیم. با استفاده از اسکالپل مقادیر احتمالی آب دهان آمیخته شده با خلط را جدا کرده و بیرون ریختیم. سپس حجم نمونه را دقیقا اندازه‌گیری کرده و نمونه را به یک پلیت استریل منتقل کرده و چهار برابر حجم نمونه به آن محلول ۰/۱ درصد- DTT(دی‌تیوتریول) اضافه کردیم و به مدت ۱۵ دقیقه در حرارت اتاق بر روی روتاتور قرار دادیم تا کاملا نمونه‌ی خلط با محلول فوق هوموژنیزه شود. نمونه‌ی هوموژنیزه‌ی به دست آمده را از یک گاز استریل دو لایه عبور دادیم تا موکوس موجود در خلط گرفته شود. مایع فوق را در یک لوله آزمایش دربدار جمع‌آوری کرده و لوله‌های حاوی مایع به دست آمده را با استفاده از سانتریفوژ یخچال‌دار در دمای ۴ درجه و در دور ۳۶۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کردیم. به این ترتیب سلول‌ها در ته لوله جمع شدند و مایعی نیمه کدر در بالای لوله به دست آمد. مایع رویی را به یک میکروتیوب دربدار استریل منتقل و تا زمان انجام آزمایشات در فریزر۲۰- درجه نگهداری کردیم.

به منظور تهیه گسترش سلولی از سلول‌های خلط، ابتدا یک قطره به ته‌نشین فوق سرم آلبومین گاوی ۰/۱ درصد اضافه کردیم تا از چسبندگی و تجمع سلول‌ها جلوگیری شود. از ته‌نشین به‌دست آمده یک قطره بر روی لام قرار داده و بعد از خشک شدن در مجاورت دمای محیط گسترش فوق را با متانول فیکس و با رنگ آمیزی پاپانیکولائو رنگ آمیزی و از نظر درصد سلول‌های التهابی با بزرگنمایی ۱۰۰ برابر میکروسکوپ مطالعه کردیم. هم‌چنین با استفاده از لام نئوبایر شمارش کل گلبول های سفید را محاسبه کردیم.

اندازه گیری سطح IgE-total در سرم و خلط: سطح IgE Total سرم و خلط بیماران مبتلا به آسم و گروه شاهد با استفاده از روش الایزا و کیت تجاری کمپانی Radim (با حساسیت ۰/۴ IU/ml) اندازه‌گیری گردید. (IgE سرم بالاتر از ۱۰۰ IU/ml به عنوان مبتلایان به آسم آلرژیک شناسایی شدند). در این طرح از دستگاه الایزا ریدر مدل STAT Fax استفاده شد.

تعیین درصد ائوزینوفیل‌های خون محیطی و خلط: در بیماران مبتلا به آسم و گروه شاهد، تعداد کل گلبول‌های

سفید و درصد ائوزینوفیل‌های خون محیطی را با استفاده از دستگاه سل کانترمدل sys-mex تعیین گردید. به علاوه از خون محیطی گسترش خونی تهیه و پس از رنگ‌آمیزی با گیمسا درصد ائوزینوفیل‌های خون محیطی مجددا به کمک میکروسکوپ نوری بررسی گردید. شمارش کل گلبول‌های سفید خلط از لام هموسیتومتر استفاده شد. بررسی ارتشاح ائوزینو فیل ها و سایرسلول‌های التهابی در ته نشین نمونه خلط به وسیله تهیه گسترش و رنگ‌آمیزی با رنگ گیمسا و شمارش ۳۰۰ سلول در دو نوبت جداگانه استفاده شد و میانگین گزارش‌ها برای آنالیز آماری استفاده گردید.

اندازه گیری TLR- ۲ محلول سرم و خلط: سطح Toll-۲ محلول درسرم و خلط بیماران مبتلا به آسم و گروه کنترل با استفاده از روش الایزا با استفاده از آنتی بادی منو کلونال ضد Toll-۲ شرکت HyCult - Biotechnology کیت اندازه‌گیری Toll-۲ را به روش ساندویچ الایزا طراحی کرده و سطح Toll-۲ را در سرم و مایع رویی خلط بیمار اندازه‌گیری کردیم. ازآن‌جاکه امکان اندازه‌گیری کمی و تعیین غلظت این پروتئین وجود نداشت واز این رو اطلاعات به دست آمده ازاین اندیس در این طرح به صورت میانگین جذب نوری ذکرگردیده است.

تهیه کیت ELISA: به این منظور ۰/۲ µg از آنتی‌هیومن mAb Toll-۲ را در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر کربنات با (pH= ۹/۳) حل کرده ودر میکروپلیت‌های ۹۶ تایی الایزا (Nunc MaxiSorp™, Fisher Scientific, Pittsburg, PA) – ریخته و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه‌روز قرار دادیم. سپس هر کدام از چاهک‌ها با ۱۵۰ µl سرم آلبومین گاوی 2% Bovine Serum Albumin (BSA) حل شده در بافر PBS به مدت یک‌ساعت بلوک شد. سپس محتویات چاهک‌ها را چهار نوبت با ۳۰۰ µl بافر PBS شستشو دادیم و ۱۰۰ µl از سرم یا مایع رویی خلط بیماران و گروه کنترل را داخل هر چاهک ریخته و مدت یک‌ساعت در حرات اتاق به صورت ثابت قرار دادیم. در مرحله بعد هر کدام از چاهک‌ها را چهار نوبت و هر بارµl ۱۰۰ بافر PBS شستشو دادیم. سپس به هر کدام از چاهک‌ها ۱۰۰ µl از محلول BSA ۱ درصدکه دارای ۰/۲µg آنتی‌هیومن Toll- ۲ کنژوگه شده با بیوتین بود اضافه کردیم و یک‌ساعت در دمای اتاق قرار دادیم. پس از شستشو، به هر کدام از چاهک‌ها ۱۰۰ µl از محلولHRP کنژوگه شده با استرپتاویدینHRP-conjugated streptavidin با رقت یک به ۵۰۰ تهیه شده از کمپانی (Bio-Rad, USA) اضافه کردیم و مجدد یک‌ساعت در دمای اتاق قرار دادیم. متعاقبا چهار نوبت و هر بار ۳۰۰ µl بافر شستشو دادیم و سپس۱۰۰ µl از محلول سوبسترای کروموژن به هر چاهک ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار دادیم. پس از زمان فوق با اضافه کردن ۲۰ µl اسید کلریدریک ۳ نرمال، شدت رنگ واکنش را در پلیت با کمک دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۴۵۰nm قرائت کردیم.

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها: نتایج کلی به طور توصیفی با استفاده از جداول و محاسبه میانگین‌ها ارایه شده است. برای نشان دادن اختلاف بین دو گروه از آزمون تست تی استفاده گردید. هم‌چنین برای مقایسه گروه‌ها از آنالیز واریانس و آزمون Tukey استفاده شده است.P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان نتایج معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

نتایج

مشخصات بیماران: میانگین سنی بیماران مبتلا به آسم ۱۴/۶ ± ۴۱/۳ سال و گروه کنترل ۱۶/۵±۳۷ سال بود که اختلاف آماری بین دو گروه وجود نداشت (جدول ۱). ۳۳/۳ درصد از بیماران دارای آسم شدید (مرحله ۴) severe persistent asthma و ۳۳/۳ درصد آسم متوسط Moderate persistent asthma (مرحله ۳) و ۲۱/۲ درصد آسم خفیف پایدار (مرحله۲) mild persistent asthma و ۹/۴ درصد دارای آسم خفیف گه‌گیر mild intermittent asthma (مرحله۱) بودند. غلظت IgE کل سرم بیماران مبتلا به آسم به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود (P<۰/۰۰۱) (جدول۱)، هرچند در بین بیماران، هیچ اختلاف معنی‌داری بین IgE کل سرم و ائوزینوفیل‌های خون محیطی در شدت‌های مختلف آسم دیده نشد (جدول ۲).

جدول ۱: مقایسه‌ی یافته‌های دموگرافیک و آزمایش‌های خون و خلط، در گروه بیماران آسمی و کنترل

بیماران	گروه شاهد	بیماران آسمی
سن	۳۷±۱۶/۵	۴۱/۳ ± ۱۴/۶
	(۲۲-۵۷)	(۹-۷۶)
مرد/زن	۱۲/۷	۶/۵
آتوپی (٪)	۱/۱۹*	۱۵/۳۳*
خون		
ائوزینوفیل (٪)	۰/۲±۱/۲	۳/۱±۲/۶
	(۰/۸-۱/۶)	(۱-۱۲)
TLR2 محلول (OD)	۰/۷۲**	۰/۴۴**
IgE کل (Iu/ml)	۴۹/۷±۴۱/۸*	۱۷۴/۴±۱۶/۲*
	(۸/۳-۹۵/۷)	(۴۰-۵۱۴)
خلط		
WBC (سلول در سی سی×۱۰۰۰)	۱/۸± ۰/۵ *	۳/۱±۰/۵ *
	(۰/۴-۳/۶)	(۱/۸-۸/۵)
٪ ائوزینوفیل ها	۰/۵-۰/۲*	۳/۲±۱*
TLR2 محلول(OD)	۰/۱۵± ۰/۰۵	۰/۱۷± ۰/۰۶
IgE کل (Iu/ml)	۰/۲۷±۰/۰۲	۰/۷۴±۰/۶۷
	(۰/۱-۰/۵)	(۰/۱-۱/۳)

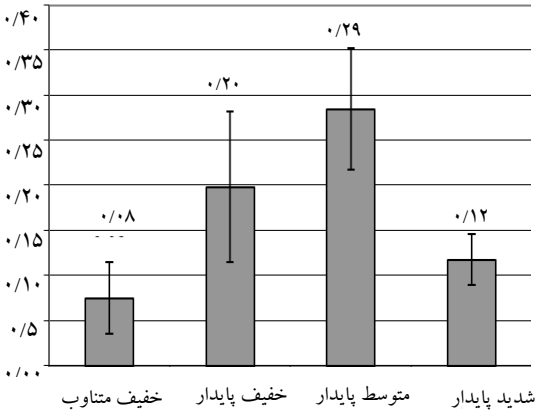
اطلاعات به صورت میانگین ± SD و دامنه نشان داده شده است. *P<۰/۰۵ **P<۰/۰۱

جدول ۲: مقایسه‌ی فراوانی ارتشاح سلول‌های التهابی در خلط بیماران و گروه شاهد

	گروه شاهد	کل بیماران آسمی	آسم خفیف متناوب	آسم خفیف پایدار	آسم متوسط پایدار	آسم شدید پایدار
Total cell (cells/ml×10^3)	۱/۸ ±۰/۵*	۳/۱±۰/۵*	۲/۵±۹/۱	۲/۸± ۱/۵	۳/۵±۲/۳	۳/۳±۱/۹
Macrophages (%)	۶۸±۱۰	۵۰/۲±۴/۳	۵۶/۸±۵/۵	۴۸/۹±۱۴/۴	۴۴/۰±۷/۲	۴۷/۶±۹/۷
Lymphocytes (%)	۲/۰±۱/۵	۱/۵±۰/۵	۰/۹±۰/۵	۱/۱±۰/۳	۱/۱±۰/۳	۱/۲±۰/۴
Eosinophils (%)	۰/۵±۰/۲*	۳/۲±۱*	۲/۴±۰/۸	۲/۴±۱/۱	۳/۳±۱/۴	۱/۶±۰/۵
Neutrophils (%)	۲۷/۷±۱۲ **	۴۵/۶± ۵**	۳۶/۷±۴/۲	۵۴/۴±۷/۷	۴۹/۶±۶/۵	۴۶/۳±۶/۱

*P<۰/۱ **P<۰/۰۱

سطح sTLR-2 در سرم و خلط: سطح سرمی sTLR-2 برای هر بیمار دو بار اندازه‌گیری شد و میانگین جذب نوری sTLR-2 (mean Optical Density) در سرم بیماران مبتلا به آسم به طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه شاهد بود (۰/۴۴±۰/۱۲ در مقابل ۰/۷۲۰±۰/۱۵، P=۰/۰۰۳). نتایج آنالیز آماری انجام شده بین گروه‌های آسمی نشان داد که کاهش میانگین جذب نوری s Toll-۲ سرم در گروه آسم پایدار شدید بسیار پایین‌تر از گروه متوسط و خفیف بود، اما این تفاوت معنی‌دار نبود. (نمودار ۱)، هم‌چنین هیچ تفاوت معنی‌داری در میانگین جذب نوری سطح s Toll-۲ سرم بین گروه‌های آسم آلرژیک و غیرآلرژیک دیده نشد (میانگین جذب نوری به ترتیب ۰/۱۰ ± ۰/۳۸ و ۰/۱۲ ± ۰/۵ بود).



نمودار ۱: مقایسه‌ی میانگین میانگین جذب نوری سرمی s Toll-۲ در چهار گروه بیماران مبتلا به آسم

s Toll-۲ در مایع رویی به دست آمده از خلط ۶ درصد از بیماران مبتلا به آسم قابل اندازه‌گیری بود (۰/۱۷±۰/۶).

هم‌چنین میانگین جذب نوری s Toll-۲ در خلط بیمارانی که میانگین جذب نوری سرمی s Toll-۲ آن‌ها متوسط یا پایین بود، غیرقابل اندازه‌گیری بود. در تمام بیمارانی که میانگین جذب نوری s Toll-۲ در خلط آن‌ها قابل اندازه‌گیری بود (۶٪ بیماران این گروه)، میانگین جذب نوری سرمی Toll- s۲ آن‌ها نیز بالا به دست آمد (۰/۵۸±۰/۲۲). در حالی که در ۴۷ درصد از افراد گروه شاهد s Toll-۲ در مایع رویی خلط قابل اندازه‌گیری بود (۰/۱۵ ±۰/۰۵). اختلاف s Toll-۲ خلط در دو گروه معنی‌دار نبود و هیچ ارتباط معنی‌داری بین میانگین جذب نوری s Toll-۲ در خلط و تعداد لکوسیت‌های التهابی ارتشاح یافته به خلط دیده نشد (P=۰/۹۸۴).

بحث

حداقل بخشی از افزایش شیوع آسم در دنیا ممکن است به دلیل عدم تماس با میکروب‌های سودمند و عفونت در سال‌های اول زندگی باشد (فرضیه‌ی بهداشت). TLRها گیرنده‌های ایمنی ذاتی هستند که به عنوان الگوی شناسایی میکروبی در القای پاسخ‌های ایمنی و التهابی در مقابل میکرب‌ها نقش دارند. این نقش ممکن است توازن بیماری‌های آلرژیک را بهم بزند. برخلاف پاسخ‌های ایمنی اکتسابی که با گسترش کلونال لنفوسیت‌های اختصاصی یک آنتی‌ژن و صرف زمان کافی برای شناسایی آن همراه است، ایمنی ذاتی با پاسخ‌های غیراختصاصی برای عامل پاتوژن اما در زمانی کوتاه القا می‌شوند. مولکول‌های TLR از ابزار شناسایی عوامل پاتوژن در ایمنی ذاتی به شمار می‌آیند.

اخیرا گزارشاتی مبنی بر نقش احتمالی مولکول Toll-۲ در پیش‌گیری یا تشدید آسم و سایر بیماری‌های آلرژیک راه‌های تنفسی ارایه شده است. Eder و همکاران گزارش کردند که در فرزندان کشاورزان آلمانی، پلی‌مورفیسم Toll-۲ به عنوان یک عامل در استعداد به آسم و بیماری‌های آلرژیک مطرح است (۶). سایر گزارشات نیز وجود عملکرد فعال مولکول Toll-۲ را بر روی سلول‌های اپی‌تلیال آلوئولار نوع II تایید می‌کند (۱۵). هم‌چنین گزارشاتی مبنی بر افزایش بیان Toll-۲ در بیماران مبتلا به آسم آلرژیک در مقایسه با سایر موارد آسم و افراد سالم وجود دارد (۱۶). LeBouder و همکاران (۱۲) دریافتند که منوسیت‌های خون محیطی اشکال محلول Toll-۲ را در خون و شیر انسان آزاد می‌کنند و کینتیک آن به دنبال فعالیت سلول افزایش می‌یابد. آن‌ها نشان دادند که کاهش فرم محلول Toll-۲ در سرم، منجر به افزایش پاسخ‌های سلولی به لیپوپپتیدهای باکتریال که لیگاندهای Toll-۲ هستند، می‌گردد. آن‌ها هم‌چنین نشان دادند که Toll-۲ اثر تنظیمی بر پاسخ‌های سیستم ایمنی دارند.

عدم تنظیم ایمنی ذاتی ممکن است نقش مهمی در استعداد ابتلای به بیماری‌های راه‌های هوایی به ویژه آسم آلرژیک داشته باشد. تجویز BCG در یک کودکان مبتلا به بیماری‌های آلرژیک منجر به کاهش سطح IgE در آن‌ها شد (۷). نکته‌ی قابل تعمق این‌جا است که شناسایی BCG از طریق TLR2 انجام می‌شود. این شناسایی منجر به تولید IL-12 می‌گردد که نهایتا باعث توفق زیر گروه Th1 می‌گردد. مطالعات اپیدومیولوژیک نیز نشان داده‌اند که افزایش ابتلای به سل با کاهش بیماری‌های آلرژیک همراه می‌باشند (۲۶). بنا بر این هم بررسی‌های مولکولی و هم اپیدومیولوژیک نشان می‌دهند که کاهش سطح TLR2 از طریق کاهش فعالیت ایمنی ذاتی می‌تواند در بروز آسم به ویژه آسم آلرژیک نقش داشته باشد.

در این مطالعه ما پرسشی را بیان کردیم که آیا مجموعه پاسخ‌های سلولی و هومورال در محیط ریه بیماران مبتلا به آسم متاثر از تغییر در سطح مولکول Toll-۲ در لکوسیت‌های خون محیطی و آلوئولار است؟ به منظور پاسخ به این فرضیه ما سطح Toll-۲ را در سرم و خلط بیماران مبتلا به آسم و گروه شاهد اندازه‌گیری کردیم.

یافته‌های ما نشان می‌دهد که آسم به طور معنی‌داری با سطوح پایین‌تر s Toll-۲ ارتباط دارد و این نتایج موافق با مشاهدات دیگری است که نشان دادند، بیان mRNA Toll-۲ در بیماران مبتلا به کونژکتیویت آلرژیک و رینیت موکوسال مزمن کاهش داشته است (۱۸،۱۷).

با بررسی سایتوکاین‌ها در ریه نشان داده شده که با کاهش بیان Toll-۲ انحراف بیشتری به سمت آزادشدن سایتوکاین‌های TH2 دیده می شود (۲۱-۱۹). این زیر گروه از لنفوسیت‌ها نقش بارزی در آسم دارند.

Pype و همکاران ثابت کردند که IL-1β می‌تواند سلول‌های عضله صاف راههای هوایی انسان را تحریک کند. هم‌چنین آن‌ها نشان دادند که IL-1β توانایی بیان و تولید کموکاین‌هایی شامل eotaxin و MCP-1 را در شرایطIn Vivo از طریق مسیر سیگنالینگ MAP-کیناز دارد (۲۳،۲۲). جالب این است که این مسیر سیگنالی، همان مسیری است که اثر منفی بر بیان Toll-۲ دارد و موجب کاهش بیان آن می‌گردد (۲۴). مفهوم این اطلاعات این است که IL-1β هم‌چنان که باعث افزایش بیان eotaxin (که نقش آن در آسم ثابت شده است) می‌گردد موجب کاهش بیان Toll-۲ نیز می‌شود.

در مطالعه‌ی حاضر نیز ما شواهدی را به دست آوردیم که نشان داد میانگین جذب نوری s Toll- ۲ در سرم کاهش معنی‌داری را در مقایسه با افراد نرمال دارد. ما معتقدیم اگر در مطالعات آینده وابستگی کلینیکی در بیان ژن Toll-۲ در بیماران آسمی تایید شود، اندازه‌گیری سطح sToll-۲ می‌تواند مارکر برجسته‌ای برای تعیین شدت آسم از طریق آزمایشات خونی باشد.

هرچند این مسئله هنوز برای ما به صورت ناشناخته باقی مانده است که آیا غلظت پایین‌تر s Toll- ۲ در بروز شدت آسم، دخالت دارد یا برعکس شدت بیشتر آسم منجر به پایین آمدن غلظت s Toll- ۲ می‌گردد. بنا بر این ما با توجه به نتایج به دست آمده که نشان داد،آسم به طور معنی‌داری با سطوح پایین s Toll- ۲ ارتباط دارد، مکانیسم فرضی ما برای این پدیده به این ترتیب می‌باشد که در افراد مبتلا به آسم به طور ذاتی s Toll- ۲ کم تولید می‌شود و این مسئله منجر به ناتوانی در شناسایی به موقع عوامل عفونی می‌شود و به دنبال آن سیستم ایمنی کمتر به طرف سیستم وابسته به T Helper 1 رفته و Interferon γ ترشح شده که این مطلب منجر به جریان یافتن سیستم T Helper 2 شده و مکانیسم آسم تشدید می‌یابد. پیشنهاد می‌کنیم که در آینده بررسی شدت بیان Toll- ۲ mRNA با تکنیک Real Time PCR در بیماران مبتلا به آسم بررسی گردد.

هم‌چنین پیشنهاد می‌کنیم اندازه‌گیری سایر عواملی که در ایمنی ذاتی دخالت دارند مانند hs-CRP در کنار ارزیابی فوق بررسی شود. هم‌چنین کنکاش هم‌زمان آسم و مسیرهای التهاب که به تازگی شناسایی شده‌اند و امروزه به عنوان مولکول‌های موثر در ایمنی ذاتی و القای التهاب نقش‌شان به طور جدی مورد بحث می‌باشد، می‌تواند در راستای هدف ما در تحقیق انجام شده توسط محققین و علاقمند به چالش‌های آسم و ایمنی ذاتی بررسی شود.

نتیجه‌گیری

به طور کلی این مطالعه برای اولین بار نشان داد که میانگین جذب نوری s Toll- ۲ در نمونه‌های سرم و خلط بیماران مبتلا به آسم در مقایسه با افراد نرمال، کاهش دارد. کاهش میانگین جذب نوری TLR2 با کاهش فعالیت پاسخ‌های ایمنی ذاتی ممکن است عامل تشدید کننده‌ی آسم به ویژه آسم آلرژیک باشد.

یافته‌های نوین	کاربرد بالینی
گیرنده‌های Toll like 2 در سرم و خلط بیماران آسمی کاهش می‌یابد.	با تحریک این گیرنده‌ها مثلا واکسن BCG می‌توان پیدایش آسم را کم کرد.

References

1. Umetsu DT, McIntire JJ, Akbari O , Macaubas, C, DeKruyff, RH.Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. Nat Immunol. 2002; 3(8):715-20.

2. McKeever TM, Lewis SA, Smith C, Collins J, Heatlie H, Frischer M, et,al: Early exposure to infections and antibiotics and the incidence of allergic disease: a birth cohort study with the West Midlands General Practice Research Database. J Allergy Clin Immunol. 2002; 109(1):43-50.

3. Lauener RP, Birchler T, Adamski J, Braun-Fahrlander C, Bufe A, Herz U, et al. Expression of CD14 and Toll-like receptor 2 in farmers' and non-farmers' children. Lancet. 2002; 360(9331):465-6.

4. Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW, et al: Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. J Biol Chem. 1999; 74: 33419-25.

5. Kyung Leea S, Josenhansa C.Helicobacter pylori and the innate immune system. International Journal of Medical Microbiology. 2005; 295: 325–34.

6. Eder W, Klimecki W, Yu L, von Mutius E, Riedler J, Braun-Fahrlander C, et al. Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in Children of European farmers. J. Allergy Clin. Immunol .2004;113(3):482–8.

7. Barlan IB, Tükenmez F, Bahçeciler NN, Başaran MM. The impact of in vivo Calmette-Guerin bacillus administration on in vitro IgE secretion in atopic children. J. Asthma 2002;39(3):239–46.

8. Simpson JL, Grissell TG, Douwes J, Scott RJ, Boyle MJ. Innate immune activation in neutrophilic asthma and bronchiectasis. Thorax. 2007; 62(3):211-18.

9. LeBouder E, Rey-Nores JE, Rushmere NK, Grigorov M, Lawn SD, Affolter M, et al. Soluble forms of toll-like receptor (tlr)2 capable of modulating tlr2 signaling are present in human plasma and breast milk. J Immunol .2003; 171(12):6680-9.

10. Noguchi, E. An association study of asthma and total serum immunoglobin E levels for Toll-like receptor polymorphisms in a Japanese population. Clin. Exp. Allergy.2004; 34(2): 177–83.

11. LeBouder E, Rey-Nores JE, Rushmere NK, Grigorov M, Lawn SD, Affolter M, et al. Soluble forms of toll-like receptor (tlr)2 capable of modulating tlr2 signaling are present in human plasma and breast milk. J Immunol .2003; 171(12):6680-9.

12. lauener RP, Birchler T, Adamski J, Braun-Fahrländer C, Bufe A, Herz U, et al. Expression of CD14 and Toll-like receptor 2 In farmers’ and nonfarmers’ Childien. Lancet. 2002; 360(9331): 465-6.

13. Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, Bousquet J, Drazen JM, FitzGerald M, et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary.Eur Respir J 2008; 31(1):143-78.

14. Grebski E, Peterson C, Medici TC. Effect of physical and chemical methods of homogenization on inflammatory mediators in sputum of asthma patients. Chest. 2001; 119(5):1521-5.

15. Armstrong L, Medford AR, Uppington KM. Expression of functional toll-like receptor-2 and -4 on alveolar epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol.2004; 31:241-5.

16. Simpson JL, Grissell TV, Douwes J, Scott RJ, Boyle MJ. Innate immune activation in neutrophilic asthma and bronchiectasis. Thorax. 2007; 62(3):211-18.

17. Vanhinsbergh L, Powe DG, Jones NS. Reduced TLR2 gene expression is a feature of chronic rhinitic mucosa supporting the hygiene hypothesis. Clinical Otolaryngology.2007; 32: 511-511.

18. Bonini S, Micera A, Iovieno A, Lambiase Al. Expression of Toll-like receptors in healthy and allergic conjunctiva. Ophthalmology.2005; 112(9) :1548-1529.

19. Broide DH, Firestein GS. Endobronchial allergen challenge in asthma. Demonstration of cellular source of granulocyte macrophage colony-stimulating factor by in situ hybridization. J Clin Invest.1991; 88:1048-53.

20. Hamid Q, Azzawi M, Ying S, Moqbel R, Wardlaw AJ, Corrigan CJ, et al. Expression of mRNA for interleukin-5 in mucosal bronchial biopsies from asthma. J Clin Invest.1991; 87(5):1541-6.

21. Robinson DS, Tsicopoulos A, Meng Q, Durham S, Kay AB, Hamid Q. Increased interleukin-10 messenger RNA expression in atopic allergy and asthma. Am J Respir Cell Mol Biol.1996; 14:113-17.

22. Pype JL, Dupont LJ, Menten P, Van Coillie E, Opdenakker G, Van Damme J, et al. Expression of monocyte chemotactic protein (MCP)-1, MCP-2, and MCP-3 by human airway smooth-muscle cells. Modulation by corticosteroids and T-helper 2 cytokines. Am J Respir Cell Mol Biol.1999; 21(4):528-36.

23. Pype JL, Xu H, Schuermans M, Dupont LJ, Wuyts W, Mak JC, et al. Mechanisms of interleukin 1beta-induced human airway smooth muscle hyporesponsiveness to histamine. Involvement of p38 MAPK NF-kappaB. Am J Respir Crit Care Med.2001; 163(4):1010-17.

24. Imasato A, Desbois-Mouthon C, Han J, Kai H, Cato AC, Akira S, et al. Inhibition of p38 MAPK by glucocorticoids via induction of MAPK phosphatase-1 enhances nontypeable Haemophilus influenzae-induced expression of toll-like receptor 2. J Biol Chem.2002; 277:47444-50.

25. Williams LK, Peterson EL, Ownby DR, Johnson CC, Schwartz DA, Thorne PS, et al. The role of endotoxin and its receptors in allergic disease. Ann Allergy Asthma Immunol. 2005; 94(3):323-32.

26. Barlan IB, Bahceciler N, Akdis M, Akdis CA. Role of bacillus Calmette-Guerin as an immunomodulator for the prevention and treatment of allergy and asthma. Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 2005; 5(6):552–7.