

# Effect of Air Pollution on the Number, Expansion, and Suppressory Function of Cord Blood Regulatory T cells

Samira Ghobadzadeh<sup>1</sup>, Masomeh Ebtekar<sup>\*1</sup>, Soheila Ajdari<sup>2</sup>

Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Department of Immunology, Pasteur Institute of Iran, Pasteur Ave., Tehran-IRAN

(Received: 2019/01/27

Accept: 2019/07/1)

## Abstract

**Background:** Air pollution is one of the main causes of escalating allergies, especially in children. Genetic factors, along with environmental factors, affect the development and maturity of the immune system during the fetal period in the uterus and the early stages of life. Regulatory T cells play an essential role in maintaining the balance for the immune system when exposed to environmental pollutants.

**Methods:** Cord blood sampling was performed on 10 neonates born from mothers living in pollutant areas of Tehran and 10 neonates born from mothers living in Damavand city. Cord Blood Mononuclear Cells were separated via density gradient centrifugation. Flow cytometric staining of CD4, CD25, CD127, and FoxP3 cell markers, as well as intracellular staining of regulatory T cell cytokines IL-10 and TGF- $\beta$ 1 were performed. Isolation and purification of CD4 +, CD25 + T cells with MACS were done and culture of regulatory T cells in the presence of anti-CD3/CD28 coated beads in 1/1 bead-to-cell ratio were performed. T-cell suppression assay was evaluated through Measurement of Teff proliferation.

**Results:** In the present study, the percentages of T-regulatory IL-10 + and TGF- $\beta$ 1 + in infants born in clean air regions were higher than those in contaminated air. The T-cell suppressory function in *in vitro* Teff / Treg ratio (1:1) was significantly lower in infants born in airborne contamination than in newborns born in clean air. The rate of proliferation of Treg cells in the presence of IL-2 and anti-CD3 / CD28 mice was higher in two-week cultures in newborns born in clean air than those born in contaminated air.

**Conclusion:** The results of the present study showed that the contractile function of T cells in umbilical cord blood in newborns born of mothers living in infected areas of Tehran was lower than those born to mothers living in Damavand. Overall, the chronic exposure of mothers to airborne particulate matter before pregnancy and during pregnancy may reduce the function of the regulatory T cells and increase the risk of an increased allergy to newborns throughout life.

**Keywords:** Air pollution; PM2.5; Particulate matter; Cord blood; Regulatory T cell; FoxP3

\* Corresponding: Masomeh Ebtekar  
Email: ebtekar@modares.ac.ir

# بررسی آثار آلودگی هوا بر تعداد، میزان تکثیر و عملکرد سرکوبگری سلول‌های T تنظیمی خون بندناف

سمیرا قبادزاده<sup>۱</sup>، معصومه ابتکار<sup>۲\*</sup>، سهیلا اژدری<sup>۲</sup>

۱- گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران  
۲- گروه ایمنی‌شناسی، انستیتو پاستور، تهران، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۴/۱۰

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۱۱/۱۷

## چکیده:

**سابقه و هدف:** آلودگی هوایی از عوامل اصلی تشدیدکننده آلرژی به ویژه در کودکان است. عوامل ژنتیکی به همراه فاکتورهای محیطی در طول دوره جنینی در رحم و مراحل ابتدایی زندگی بر تکامل و بلوغ سیستم ایمنی اثرگذارند. سلول‌های T تنظیمی نقش اساسی در حفظ تعادل سیستم ایمنی در مواجهه با آلاینده‌های محیطی دارند. **مواد و روش‌ها:** خونگیری بند ناف ۱۰ نوزاد متولد شده از مادران ساکن در مناطق آلوده تهران و ۱۰ نوزاد متولد شده از مادران ساکن در شهر دماوند انجام شد. سلول‌های تک هسته‌ای با روش سانتریفیوژ گرادین چگالی جدا شد. رنگآمیزی فلوسیتومتری مارکرهای سطح سلولی  $CD4$ ,  $CD25$ ,  $CD127$  و درون سلولی  $FoxP3$  و رنگ آمیزی درون سلولی سیتوکین‌های سلول T تنظیمی  $IL-10$  و  $TGF-\beta 1$  انجام شد. جداسازی تخلیص سلول‌های T تنظیمی  $CD4^+$ ,  $CD25^+$  MACS و کشت سلول‌های T تنظیمی در حضور بیدهای کوت شده با آنتیبادی علیه  $CD3/CD28$  به نسبت بید / سلول ۱/۱ انجام شد. فعالیت سرکوبگری سلول‌های T تنظیمی از طریق سنجش مهار تکثیر  $Teff$  ارزیابی شد.

**یافته‌ها:** در مطالعه حاضر درصد سلول‌های T تنظیمی  $IL-10^+$  و  $TGF-\beta 1^+$  در نوزادان متولد شده در مناطق هوای پاک نسبت به هوای آلوده بالاتر بود. عملکرد سرکوبگری سلول‌های T تنظیمی در شرایط  $In vitro$  در نسبت  $Teff/Treg$  (۱/۱) در نوزادان متولد شده در هوای آلوده نسبت به نوزادان به دنیا آمده در هوای پاک به طور معناداری کاهش یافته است. میزان تکثیر سلول‌های  $Treg$  در حضور  $IL-2$  و بیدهای  $anti-CD3/CD28$  در کشت دو هفته‌ای در نوزادان متولد شده در مناطق هوای پاک نسبت به هوای آلوده بالاتر بود.

**نتیجه‌گیری:** نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد عملکرد سرکوبگری سلول‌های T تنظیمی در خون بند ناف در نوزادان متولد شده از مادران ساکن در مناطق آلوده تهران نسبت به نوزادان متولد شده از مادران ساکن دماوند کاهش یافته است. در مجموع مواجهه مزمن مادران با آلاینده ذرات معلق در هوا قبل از حاملگی و در طول دوره بارداری ممکن است سبب کاهش عملکرد سلول‌های T تنظیمی شود و ریسک تشدید ابتلا به آلرژی نوزاد را در طول زندگی افزایش دهد.

**واژگان کلیدی:** آلودگی هوا، ذرات معلق  $PM_{2.5}$ ، خون بند ناف، سلول T تنظیمی،  $FoxP3$

## مقدمه:

محیط زیست سازمان ملل متحد، ذرات معلق مهم‌ترین آلاینده هوا در شهرهای بزرگ جهان از جمله کلان‌شهر تهران هستند (۳). سازمان جهانی بهداشت برآورد کرده است که سالانه ۵۰۰ هزار نفر بر اثر مواجهه با ذرات معلق موجود در هوای آزاد دچار مرگ زودرس می‌شوند، همچنین طبق بررسی‌های این سازمان، به ازای افزایش هر ۱۰ میکروگرم ذرات معلق، میزان مرگ و میر یک تا ۳ درصد افزایش می‌یابد (۴).

شهر تهران نیز به دلیل رشد بی‌رویه جمعیت، مهاجرت، نبود برنامه‌ریزی صحیح در سال‌های قبل و نیز بی‌توجهی به مسائل زیست‌محیطی در گسترش و توسعه شهری یکی از هشت شهر آلوده دنیا محسوب می‌شود. چالش برانگیزترین آلاینده شهر تهران، ذرات معلق با قطر کمتر از ۲.۵ میکرومتر است. این گروه از ذرات معلق قدرت نفوذ به قسمت‌های انتهایی ریه را دارند و در نتیجه ورود

بدون شک یکی از بزرگ‌ترین معضله‌های سال‌های اخیر شهر تهران و دیگر شهرهای بزرگ کشور، مساله آلودگی هواست. معضلی که نقش مهمی در کیفیت زندگی شهروندان ایفا می‌کند. عوامل متعددی در کیفیت هوا تاثیر دارند که از آن جمله می‌توان به استاندارد و کیفیت ساخت خودروها و موتورسیکلت‌ها، کیفیت سوخت، ترافیک، کیفیت و کمیت وسایل نقلیه عمومی، شرایط جوی و اقلیمی و استفاده از تکنولوژی‌های نوین و توسعه شهری اشاره کرد (۱). بر اساس اعلام سازمان بهداشت جهانی، در سال ۲۰۱۳ آلودگی هوا پنجمین علل مرگ و میر در دنیا و عامل مرگ زودرس ۴.۲ میلیون نفر در جهان است (۲). عمده‌ترین و سمی‌ترین آلاینده‌های هوا شامل مونوکسیدکربن، انیدرید سولفور، کل ذرات معلق، اکسیدهای ازن و ازن هستند. براساس گزارش برنامه

نویسنده مسئول: ناهید عسکری  
ناکیداسکری@gmail.com  
n.askari@kgut.ac.ir

حائز اهمیت است (۶). شاید وضعیت مادر در طول حاملگی از نظر مواجهه با هوای آلوده، دود سیگار و ... جدای از زمینه ژنتیکی می‌تواند به عنوان یکی از عوامل تشدید ابتلا نوزاد به حساسیت به آلرژن‌ها و آلاینده‌ها باشد. یکی از مهم‌ترین سلول‌های بررسی شده در زمینه تشدید بروز آسم و حساسیت‌های حاد در مواجهه با هوای آلوده بدون پیش‌زمینه ژنتیک سلول T تنظیمی است. متأسفانه نتایج بررسی درصد این سلول در افراد بالغ مبتلا به آسم و آلرژی بسیار ضد و نقیض است. روش ارزیابی سلولی فلوسیتومتری است و نتایج به دست آمده در این زمینه به دلیل استراتژی‌های گیتینگ متفاوت، بررسی مارکرهای مختلف و گروه‌های بررسی شده متفاوت و تعداد کم شرکت‌کنندگان در آزمایش‌های، مقادیر کم خون محیطی و ... بحث برانگیز است (۱۰). تاکنون مطالعه‌های اندکی پیرامون بررسی عملکرد سلول‌های T تنظیمی خون بند ناف و تشدید ابتلا به آلرژی در مواجهه مزمن با آلاینده‌های محیطی از جمله ذرات معلق PM<sub>2.5</sub> در کشور ما انجام شده است. در این تحقیق ما فرض کردیم که عملکرد سلول T تنظیمی خون بند ناف در جنین‌های متولد شده از مادران ساکن در مناطق آلوده هوای شهر تهران از نظر مواجهه با ذرات معلق با قطر کمتر از ۲٫۵ میکرومتر در مقایسه با عملکرد سلول T تنظیمی خون بند ناف در جنین‌های متولد شده از مادران ساکن هوای پاک (شهر دماوند) کاهش می‌یابد و متعاقب آن کاهش عملکرد سلول‌های T تنظیمی در بروز پاسخ‌های آلرژیک پس از تولد موثر است. درصد سلول‌های T تنظیمی، میانگین شدت فلورسنت پروتئین foxp3، درصد سلول‌های T تنظیمی با بیان داخل سلولی IL-10، درصد سلول‌های T تنظیمی با بیان داخل سلولی TGF- $\beta$ 1، میزان تکثیر سلول T تنظیمی و درصد عملکرد سرکوبگری در دو گروه مورد مقایسه قرار گرفتند. هدف اصلی این تحقیق تعیین و مقایسه آثار آلودگی هوا بر عملکرد مهار سلول‌های T تنظیمی خون بند نوزادهای متولد شده در دو منطقه با سطح آلودگی متفاوت بود.

#### مواد و روش‌ها:

انتخاب مناطق آلوده از لحاظ آلاینده ذرات معلق PM<sub>2.5</sub> با استفاده از داده‌های مرتبط با میانگین سالانه آلاینده ذرات معلق PM<sub>2.5</sub> در سه سال ۹۴، ۹۵ و ۹۶ در ۱۶ ایستگاه سنجش کیفیت هوا، متعلق به شرکت کنترل کیفیت هوای تهران انجام شد. اسامی ایستگاه‌ها در جدول شماره ۱ آمده است. برای تعیین مکان‌هایی با بیشترین آلودگی در تهران، در ابتدا وضعیت شاخص ذرات معلق از منظر استاندارد ایران بررسی شد. اطلاعات ایستگاه‌های مجهز به تجهیزات سنجش آلاینده مزبور جمع‌آوری شد. نمودار بررسی و مقایسه میانگین سالانه شاخص آلودگی هوا ایران برای آلاینده PM<sub>2.5</sub> به تفکیک ایستگاه‌ها برای سه سال ۹۴، ۹۵ و ۹۶ ترسیم شد. مناطق دارای ایستگاه این سنجش آلاینده با مقادیر آلودگی بالاتر از ۸۰ واحد AQI برای آلاینده ذرات معلق PM<sub>2.5</sub> در هر سه سال انتخاب شدند. ایستگاه‌های منتخب شامل ایستگاه شریف،

جدول ۱- اسامی ایستگاه‌های سنجش آلاینده PM<sub>2.5</sub> با مقادیر آلودگی بالاتر از ۸۰ واحد AQI برای این آلاینده در سه سال ۹۴، ۹۵ و ۹۶

| نام ایستگاه‌های سنجش آلاینده PM <sub>2.5</sub> در سه سال ۹۴، ۹۵ و ۹۶ |                    |
|----------------------------------------------------------------------|--------------------|
| ایستگاه شریف منطقه ۲                                                 | شهر ری منطقه ۲۰    |
| پیروزی منطقه ۲                                                       | پارک رز منطقه ۲۲   |
| اقدسیه-منطقه ۱                                                       | ستاد بحران منطقه ۷ |
| یونک-منطقه ۲                                                         | شهرداری منطقه ۱۰   |
| شهرداری منطقه ۲                                                      | شهرداری منطقه ۱۱   |
| گلبرگ-منطقه ۸                                                        | شهرداری منطقه ۲۱   |
| مسعودیه-منطقه ۱۵                                                     | شادآباد منطقه ۱۸   |
| شهرداری منطقه ۴                                                      | تربیت مدرس منطقه ۶ |

به گردش خون قادرند آثار مخربی بر بدن داشته باشند (۵) امروزه تحقیق‌های بسیار حاکی از ارتباط مستقیم آلودگی هوا از منظر مواجهه مزمن ذرات معلق با قطر کمتر از ۲٫۵ با تحریک سیستم ایمنی و بروز تشدید یافته افزایش حساسیت است. آسم با انسداد قابل برگشت و التهاب راه‌های هوایی تشخیص داده می‌شود، از مهم‌ترین و فراوان‌ترین بیماری‌های مزمن کودکان به شمار می‌آید. کودکان مبتلا به آسم در مواجهه با آلودگی هوا علائم شدیدتری از بیماری را نشان می‌دهند و از طرف دیگر مطالعه‌های جدید نشان می‌دهند که مواجهه کودکان با آلاینده‌های محیطی به ویژه ذرات معلق با قطر کمتر از ۲٫۵ احتمال تشدید آسم ناشی از آلودگی هوا را افزایش می‌دهد (۶). یک فرضیه بسیار مهم در زمینه بروز آلرژی فرضیه بهداشت است که بیانگر این مطلب است که مواجهه مزمن و دوز پایین با عوامل میکروبی یا عوامل آلاینده محیطی در کشورهای توسعه یافته، تکامل سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی را از دوره جنینی تا بزرگسالی دستخوش تغییرهای متعددی می‌کند (۷).

در دوره تکامل سیستم ایمنی جنینی در حاملگی، تحمل ایمنی نسبت به آنتی‌ژن‌های خودی نظیر آنتی‌ژن‌های مادری که از جفت عبور می‌کنند، آغاز می‌شود (۸). ریز محیط رحم‌مادر بیشترین تلاقی با سیستم ایمنی جنین در حال تکامل را دارد (۹) یکی از مهم‌ترین سلول‌های سیستم ایمنی اکتسابی که در ایجاد تعادل ایمونولوژیک بین پاسخ‌های مختلف سیستم ایمنی از کمی پیش از تولد در رحم مادر ( دوره جنینی ) تا آخر عمر نقش ایفا می‌کند، سلول‌های T تنظیمی طبیعی با فنوتیپ CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, FOXP3<sup>+</sup> , CD127low هستند. سلول‌های T تنظیمی به دو دسته طبیعی و القایی تقسیم می‌شوند. فعالیت سرکوب‌کننده سلول‌های T تنظیمی از طریق تولید سیتوکین‌های مهار کننده مانند TGF- $\beta$  و IL-10 و سیتوتوکسیسیته ( مهار تکثیر ) مستقیم مقابل سلول‌های T افکتور و همچنین اختلال در متابولیک و تنظیم عملکرد APC انجام می‌شود (۸، ۱۰) در دوره جنینی، در ریز محیط رحم برای جلوگیری از واکنش سیستم ایمنی علیه ساختار متفاوت آنتی‌ژنتیکی مادری پاسخ‌های لنفوسیت Th2 غالب است اما بعد از تولد نوزاد، تعادل ایمونولوژیک جدید پس از برخورد با محیط خارجی، به طور طبیعی تکامل می‌یابد. پاسخ‌های Th2 سبب بروز آلرژی و پاسخ‌های Th1 , Th17 که در مواجهه با عوامل عفونی اهمیت دارند، در صورت ادامه سبب بروز اتوایمیونیتی می‌شوند. بنابراین لازم به ذکر است که تنظیم سیستم ایمنی پس از تولد نوزاد در تشدید استعداد ابتلا نوزاد به انواع اختلال‌های سیستم ایمنی موثر است (۸). در مطالعه‌های اخیر شواهدی مبنی بر ارتباط بین مواجهه جنین در رحم مادر با مولفه‌های مختلف محیطی نظیر عوامل میکروبی، آلرژن و آلاینده‌های محیطی و توسعه آتوپی در سه سال ابتدایی تولد نوزاد وجود دارد. گرچه نمی‌توان آلاینده‌های محیطی نظیر PM<sub>2.5</sub> را به عنوان آلرژن در نظر گرفت، ولی نقش ادجوانتی این ذرات در پیشبرد پاسخ‌های سیستم ایمنی به سمت Th2 و بروز تشدید یافته آسم و آلرژی مشخص شده است (۱۱).

بسیاری از محققان برخی از عوامل موثر در تکامل پاسخ‌های سیستم ایمنی به آلاینده‌ها و تشدید علائم آلرژی را در خون بند ناف جنین بررسی کرده‌اند. عواملی مانند تاریخچه خانوادگی، مواجهه پیش از تولد یا کمی پس از تولد با آلرژن یا آلاینده‌های محیطی به عنوان ادجوانت در بروز پاسخ‌های Th2 به عنوان عوامل اصلی و تاثیرگذار در بروز زود هنگام آلرژی معرفی شده‌اند. از طرفی سطح سرمی افزایش یافته IgE، کاهش نسبت Th1/Th2، افزایش تعداد بازوفیل و ائوزینوفیل و کاهش تعداد و عملکرد مهار سلول‌های T تنظیمی در خون بند ناف کودکان مبتلا به آلرژی زود هنگام مشاهده شده است (۱۲) بنابر آنچه ذکر شد شناخت فاکتورهای ریسک پیش از تولد آلرژی، می‌تواند گامی موثر برای بهبود کیفیت زندگی و کاهش هزینه‌های درمان این بیماری‌هاست. با توجه به افزایش ریسک ابتلا به آلرژی در اثر مواجهه با آلاینده ذرات معلق و همچنین استعداد ابتلا مورد جدید بدون پیش زمینه ارثی به آلرژی در اثر پیش مواجهه با آلاینده مذکور لزوم شناخت هرچه بیشتر فاکتورهای پیشگویی‌کننده در ارتباط با افزایش استعداد به ابتلا آلرژی و آلودگی هوا بسیار

تست ادرار برای بررسی متابولیت ۶-هیدروکسی ۱-نیتروپیرن و ۸-هیدروکسی ۱-نیتروپیرن  
مواد شیمیایی برای آماده‌سازی نمونه‌ها از شرکت (Sigma-Aldrich) خریداری شد. آنزیم بتا گلوکورونیداز/ سولفاتاز (Helix pomatia b-Glucuronidase/ arylsulfatase از شرکت (100,000 Fishman) units/ Roche Diagnostics. Blue Rayon 127 698, 800,000 Roy units/mL از شرکت (MP Biomedicals Alumina) A solid-phase clean-up cartridges از کمپانی (Waters, Millford, MA, USA.) تهیه شد. استاندارد داخلی دئوتراند دو متابولیت ادراری ۱-نیتروپیرن (INP) شامل (d8-6OHNP and d8-8OHNP) خریداری شده از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شد.

برای افزایش دقت، نمونه ادرار جمع شده بدون هیدرولیز آنزیمی در یک طول روز یا بین روزهای متوالی چندین با آنالیز شد. نمونه‌های ادرار در بطری‌های پلی‌اتیلن در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش نگهداری شدند. ۲۰ میلی‌لیتر از ادرار با فیلتر غشا نانولونی منافذ ۰٫۴۵ میکرولیتر فیلتر شد. pH نمونه‌های ادرار با ۵ میلی‌لیتر از سدیم استات ۴ مولار و ۷۵ میکرولیتر هیدروکلریک اسید ۱ مولار به ۵ رسانده شد. هر نمونه در چهار ویال الیکوت شد. برای بررسی هر متابولیت؛ دو ویال یکی برای نمونه اصلی و دیگری نمونه اصلی به علاوه مقدار مشخص از استاندارد داخلی اضافه شد. برای هیدرولیز متابولیت های ۱-نیتروپیرن ۷۵ میکرولیتر از کونژوگ آنزیمی بتا گلوکورونیداز / آرل سولفاتاز به هر نمونه اضافه شد. نمونه‌ها به مدت چهار ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از آنکوباسیون ۱۰۰ میلی‌گرم از (Blue Rayon) به هر نمونه اضافه شد و نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای اتاق در تاریکی برای خروج متابولیت‌های دکونژوگ از ادرار روی شیکر قرار داده شدند. ادرار از یک کارتریج یا فاز جامد Solid-phase extraction SPE پلی‌پروپیلن با یک فریت پلی‌پروپیلنی با تخلخل ۲۰ میکرومتر که به وکیوم چند منظوره (SPE) متصل شده است، عبور داده شد. Blue Rayon دو بار با ۵ میلی‌لیتر آب شسته و ادرار از نمونه حذف شد. متابولیت های ۱- نیتروپیرن با اضافه کردن ۲۰ میلی‌لیتر از متانول / آمونیاک (۵۰ به ۱) و ۳۰ دقیقه سونیکیشن از Blue Rayon حذف شد.

سپس عصاره متانول / آمونیاک به لوله‌های توربوپ Turbopap تزریق شد و ۵۰ میلی‌لیتر DMSO به عنوان یک حلال نگه‌دارنده اضافه شد. مخلوط مایع سپس تا مرز نزدیک به خشک شدن تحت جریان نیتروژن در یک کانسنتراتور تبخیر Turbopap در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد تبخیر شد. باقی‌مانده نمونه در ۵ میلی‌لیتر از مخلوط استات / اتانول به نسبت حجمی ۱/۱ دوباره به حالت محلول در آمد و سپس از یک کارتریج آلومینا Sep-Pak عبور داده شد. تیوب‌های Turbopap با اضافه کردن ۱۰ میلی‌لیتر مخلوط اتیل استات / متانول به نسبت ۱/۱ شست‌وشو داده شد و سپس با ۵ میلی‌لیتر از متانول دوباره شست‌وشو داده شد. باقی‌مانده حلال در کانسنتریتور تبخیرکننده Turbopap در ۴۵ درجه سانتی‌گراد دوباره تا نزدیک به خشک شدن تبخیر شد و سپس در ۳۰۰ میکرولیتر متانول به حالت محلول در آمد. ۳۰۰ میکرولیتر متانول با سرنگ پلی‌پروپیلن با قطر ۰/۴۵ میکرومتر و با فیلتر PTFE به بطری شیشه‌ای سیلانیزه انتقال داده شد. سپس حجم نمونه به ۵۰ میکرولیتر تحت جریان نیتروژن کاهش یافت، ۲۰ میکرولیتر آب مقطر به نمونه اضافه شد و حجم نهایی به ۷۰ میکرولیتر رسید. در پایان آماده‌سازی نمونه ۱۰ میکرولیتر از محلول حاوی عصاره نمونه به روش آشکار ساز طیف سنج جرمی MS/MS آنالیز شد.

در نهایت مقدار متابولیت‌های بررسی شده طبق روش Method of Standard addition (یعنی افزودن مقادیر مشخص استاندارد به هر نمونه) از فرمول  $X = SA / (S1 - S)$  به دست می‌آید. پارامترهای فرمول به شرح زیر است:  
مقدار آنالیت در نمونه = X  
مقدار مشخص آنالیت اضافه شده (استاندارد داخلی) = A

شهر ری منطقه ۲۰، ستاد بحران منطقه ۷، منطقه ۱۱، منطقه ۲۱ و منطقه ۱۸ بودند. در شهر تهران نمونه‌گیری از بیمارستان‌های دولتی نظیر شریعتی، فیروزآبادی شهر ری و بقیه‌الله انجام شد. شهر دماوند بر اساس اطلاعات شرکت کنترل کیفیت هوا در سه سال مزبور و انجام تحقیق‌های میدانی انجام شده با روش‌های دستی (بدون ایستگاه پایش ذرات معلق) در مقایسه با شهر تهران (از نظر آلودگی ذرات معلق PM2.5) هوای پاک) در نظر گرفته شد. نمونه‌گیری از بیمارستان دولتی سوم شعبان در شهر دماوند انجام شد.

مطالعه از نوع مورد-شاهدی (Case-Control) بود. گروه کنترل شامل ۱۰ نمونه خون بند ناف نوزادان متولد شده از مادران ساکن در شهر دماوند (بر طبق معیارهای پرسشنامه) و گروه مورد ۱۰ نمونه خون بند ناف نوزادان متولد شده از مادران ساکن شهر تهران بود. در این تحقیق متغیر مستقل مادران باردار مواجه با آلودگی هوا و متغیرهای وابسته تعداد، میزان تکثیر و عملکرد سلول‌های T تنظیمی خون بند ناف است. معیار ورود به مطالعه گروه کنترل و مورد شامل حضور زنان شرکت‌کننده یک سال قبل از بارداری و تمام طول مدت بارداری در شهرهای مزبور برای هر گروه بود. مادران باردار طبق معیارهای پرسشنامه از جمله مدت حضور مادران باردار در مواجهه با هوا در خارج از منزل، عدم مسافرت طولانی‌مدت به مناطق دیگر، عدم استعمال دخانیات و مواجهه با دود سیگار و غیره ... انتخاب شدند. تمامی داوطلبان با رضایت کامل و آگاهی از تحقیق و امضای فرم رضایتنامه تایید شده در کمیته اخلاق دانشکده پزشکی تربیت مدرس وارد مطالعه شدند. زنان باردار شرکت‌کننده در این تحقیق در هفته ۳۹-۴۰ بارداری تحت عمل جراحی سزارین نوزاد خود را به دنیا آوردند. فاکتورهایی نظیر سن، عدم ابتلا به انواع آلرژی‌ها، انواع بیماری‌های اتوایمن و انواع عفونت‌های حاد و مزمن، ساعت‌های مواجهه با هوای آزاد در طول روز، هفته زایمان، فصل زایمان، مرتبه زایمان مادران بین افراد دو گروه مورد-شاهدی از لحاظ آماری همسان‌سازی شدند. برای کاهش اثر متغیرهای زمینه‌ای از نظر مواجهه با مقادیر متفاوت ذرات معلق PM2.5 در فصول مختلف، نمونه‌گیری خون بند ناف از زایمان‌های دوره فصل تابستان انتخاب شدند و نمونه از متابولیت ۱-نیتروپیرن در ادرار به نام‌های ۶-هیدروکسی نیتروپیرن و ۸-هیدروکسی نیتروپیرن، به عنوان دو بیومارکر مواجهه مزمن با ذرات معلق PM2.5 در ادرار زنان باردار ۲۴ ساعت قبل از زایمان سنجش شد. حجم نمونه با توجه به مطالعه‌های مشابه ۱۰ نمونه در هر گروه در نظر گرفته شد. ویژگی‌های مادران باردار و متغیرهای زمینه‌ای در جدول شماره ۲ آمده است. گروه یک مادران ساکن تهران و گروه دو مادران ساکن دماوند در نظر گرفته شدند.

جدول - ۲ ویژگی‌های زایمان مادران باردار و متغیرهای زمینه‌ای

| ویژگی‌های زایمان مادران باردار و متغیرهای زمینه‌ای | گروه ۱ ساکن تهران                      | گروه ۲ ساکن دماوند                     |
|----------------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| Mean±SD سن (سال)                                   | ۲۸٫۱±۲٫۲۳                              | ۲۷٫۲±۱٫۹۸                              |
| ساعت مواجهه با هوای آزاد در طول روز                | ۳٫۴±۰٫۶۹                               | ۳٫۱±۱٫۱                                |
| هفته زایمان                                        | ۵۱ درصد هفته ۳۹-۴۹ درصد هفته ۴۰        | ۴۵ درصد هفته ۳۹-۵۵ درصد هفته ۴۰        |
| تعداد زایمان                                       | ۵۵ درصد زایمان اول- ۴۵ درصد زایمان دوم | ۴۹ درصد زایمان اول- ۵۱ درصد زایمان دوم |
| جنسیت نوزاد                                        | ۴۵ درصد پسر ۵۵ درصد دختر               | ۴۰ درصد پسر ۶۰ درصد دختر               |



عمل گیت کردن برای هر رنگ نمونه ایزوتیپ با استفاده آنتی بادی‌های ایزوتیپ کنترل برای هر فلوروکروم و همچنین نمونه بدون رنگ گذاشته شد. **رنگ‌آمیزی درون سلولی سیتوکین‌های سلول T تنظیمی IL-10 و TGF-β1**

پس از جدا کردن سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف 106 CBMNCs برای رنگ‌آمیزی فلوسیتومتری درون سلولی سیتوکین‌های سلول T تنظیمی IL-10 و TGF-β1 جدا شد. در این بخش پس از رنگ‌آمیزی سطح سلولی مارکرهای CD4, CD25, رنگ‌آمیزی درون سلولی IL-10 با آنتی‌بادی متصل به فلوروکروم (PE cat.no 506804) Biolegend, San Diego, CA, USA و رنگ‌آمیزی درون سلولی TGF-β1 با آنتی‌بادی متصل به فلوروکروم (human latency associated peptide (LAP) TGFβ1(PerCP)-Cy5.5, cat. no. 341803 anti-cat. no. 420801 cat. no. 421002) با بفر فیکس‌کننده cat. no. 420801 و بفر نفوذپذیرکننده غشا cat. no. 421002 هر دو خریداری شده از شرکت Biolegend طبق دستورالعمل استفاده شد. حداقل ۱۰۰۰۰۰ سلول برای هر نمونه لازم است.

**جداسازی، تخلیص و کشت سلول‌های T تنظیمی CD4+CD25+ خون بند ناف به روش MACS**

پس از جدا کردن سلول‌های مونونوکلئار با فایکول با روش سانتریفیوژ گرادیان غلظت از خون بند ناف، جداسازی تخلیص سلول‌های T تنظیمی CD4+CD25+ با استفاده از کیت جداسازی (MACS) خریداری شده از شرکت (Miltenyi biotech cat.no.130-091-301) طبق پروتوکل انجام شد. در مرحله اول سلول‌های TCD4+ با کوکتیل شامل آنتی‌بادهای انسانی مونوکلونال کونژوگه شده بیوتین برای مارکرهای CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCRγ/δ, CD235a LD در میدان مغناطیسی طبق دستورالعمل کیت غنی شدند (انتخاب منفی) و سپس در مرحله دوم از بین سلول‌های TCD4+ جمعیت سلولی CD25+ با میکروبیدهای کونژوگه به آنتی‌بادی علیه CD25 و عبور دادن از ستون MS جداسازی شدند (انتخاب مثبت). درصد خلوص سلول‌های T تنظیمی CD4+CD25+ با دستگاه فلوسیتومتری (FACSCalibur, BD) و رنگ‌آمیزی سه رنگ فلوسیتومتری برای مارکرهای CD4, CD25, FoxP3 85 درصد تایید شد.

به دلیل تعداد کم سلول‌های جدا شده، این سلول‌ها در حضور فاکتورهای رشد کشت داده شد (۱۳). سلول‌های T تنظیمی جدا شده با کیت MACS در غلظت  $5 \times 10^5$  سلول بر میلی‌لیتر در محیط کشت RPMI1640 (Invitrogen) ساکن شهر تهران و ساکن شهر دماوند، سلول‌های T تنظیمی CD4+CD25+ همراه سلول‌های T پاسخ‌دهنده CD4+CD25- با نسبت (۱/۱، ۱/۲، ۱/۴ و Tef/Treg (۱/۸) و نسبت میکروبیدهای متصل به آنتی‌بادی علیه CD3/CD28 (BioLegend, San Diego, CA, USA) به نسبت بید / سلول ۱/۱ در حضور IU/ml500 از سیتوکین، Rocky Hill, IL-2 Pepro Tech Inc., NJ, USA به مدت ۷-۱۴ روز کشت داده شد.

**بررسی فعالیت مهار تکثیر سلول فعالیت سرکوبگری T تنظیمی CD4+CD25+**

برای بررسی میانگین درصد فعالیت سرکوبگری سلول‌های T تنظیمی CD4+CD25+ جدا شده از خون بند ناف نوزادان متولد شده از مادران در هر دو گروه (ساکن شهر تهران و ساکن شهر دماوند)، سلول‌های T تنظیمی CD4+CD25+ همراه سلول‌های T پاسخ‌دهنده CD4+CD25- با نسبت (۱/۱، ۱/۲، ۱/۴ و Tef/Treg (۱/۸) و نسبت میکروبیدهای متصل به آنتی‌بادی علیه CD3/CD28 (BioLegend, San Diego, CA, USA) به نسبت بید / سلول ۱/۱ در حضور IU/ml500 از سیتوکین، Rocky Hill, IL-2 Pepro Tech Inc., NJ, USA به مدت ۷-۱۴ روز کشت داده شد.

برای بررسی میانگین درصد فعالیت سرکوبگری سلول‌های T تنظیمی CD4+CD25+ جدا شده از خون بند ناف نوزادان متولد شده از مادران در هر دو گروه (ساکن شهر تهران و ساکن شهر دماوند)، سلول‌های T تنظیمی CD4+CD25+ همراه سلول‌های T پاسخ‌دهنده CD4+CD25- با نسبت (۱/۱، ۱/۲، ۱/۴ و Tef/Treg (۱/۸) و نسبت میکروبیدهای متصل به آنتی‌بادی علیه CD3/CD28 (BioLegend, San Diego, CA, USA) به نسبت بید / سلول ۱/۱ در حضور IU/ml500 از سیتوکین، Rocky Hill, IL-2 Pepro Tech Inc., NJ, USA به مدت ۷-۱۴ روز کشت داده شد.

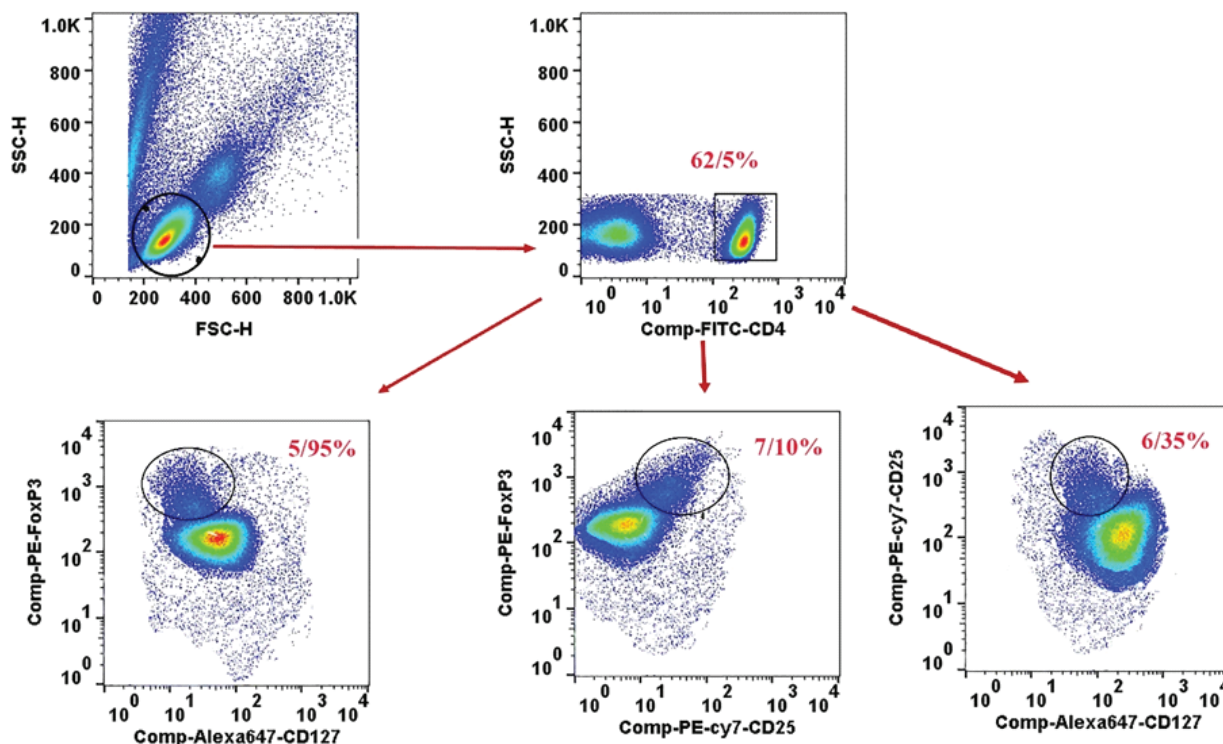
برای بررسی میانگین درصد فعالیت سرکوبگری سلول‌های T تنظیمی CD4+CD25+ جدا شده از خون بند ناف نوزادان متولد شده از مادران در هر دو گروه (ساکن شهر تهران و ساکن شهر دماوند)، سلول‌های T تنظیمی CD4+CD25+ همراه سلول‌های T پاسخ‌دهنده CD4+CD25- با نسبت (۱/۱، ۱/۲، ۱/۴ و Tef/Treg (۱/۸) و نسبت میکروبیدهای متصل به آنتی‌بادی علیه CD3/CD28 (BioLegend, San Diego, CA, USA) به نسبت بید / سلول ۱/۱ در حضور IU/ml500 از سیتوکین، Rocky Hill, IL-2 Pepro Tech Inc., NJ, USA به مدت ۷-۱۴ روز کشت داده شد.

سطح پیک قبل از اضافه کردن آنالیت (استاندارد داخلی) = S  
سطح پیک بعد از اضافه کردن آنالیت (استاندارد داخلی) = S1  
نرم‌افزار (version 1.4, Applied Biosystems) برای آنالیز داده‌ها استفاده شد. **خونگیری و جدا کردن سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف جنینی با روش سانتریفیوژ گرادیان چگالی فایکول**

نمونه‌گیری خون بند ناف توسط کارشناس مجرب اتاق زایمان انجام شد. کیسه خون مخصوص بند ناف جنین از شرکت ورمیل خریداری شد. کیسه خون بسیار اختصاصی، حاوی ضد انعقاد سیترات بود ۶۰-۷۰ سی‌سی خون بند ناف جنینی پس از زایمان از مادران داوطلب و حائز شرایط (طبق موارد مذکور در پرسشنامه) که در هفته ۳۹-۴۰ بارداری به روش سزارین زایمان کردند، جمع آوری شد. برای هر مرحله جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف جنینی (CBMNCs) ۳۵ میلی‌لیتر از خون بند ناف به آرامی و با دقت از کنار تیوب به وسیله پمپ پاستور روی ۱۵ میلی‌لیتر فایکول در تیوب ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. از تیوب ته مخروطی استفاده شد. سپس سانتریفیوژ در دور ۴۰۰ به مدت ۳۵ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد بدون شتاب انجام شد. لایه بافیکوت حاوی سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف جنینی جدا شد و پس از مرحله شست‌وشو، سانتریفیوژ با بفر PBS pH7.2 و EDTA 2 میلی‌مولار در دور ۳۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد، سلول‌ها با تریپان بلو شمارش و تعداد سلول‌های زنده محاسبه شد. در این روش به طور میانگین ۲۰۰ میلیون PBMC زنده از ۶۵ میلی‌لیتر خون بند ناف تهیه شد.

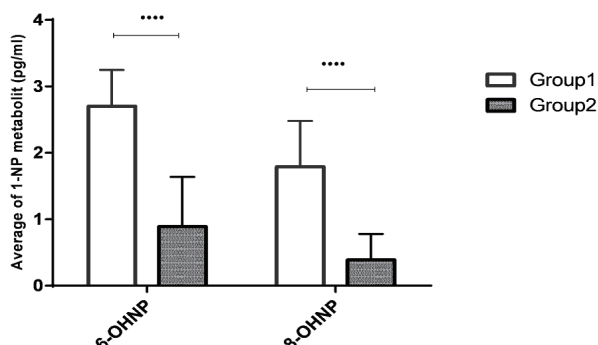
**رنگ‌آمیزی مارکرهای سطح سلولی CD4, CD25, CD127 و درون سلولی FoxP3، با فلوروکروم‌ها و خوانش با دستگاه فلوسیتومتری**

پس از شمارش سلولی ۱۰۶ سلول، برای انجام فلوسیتومتری جدا شد. برای رنگ‌آمیزی مارکرهای سطح سلولی CD4 و CD25 سلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه با ۵ میکرولیتر آنتی‌بادی انسانی علیه مارکر CD4 (0.125) (FITC) anti-CD4-FITC (cat.no 555346) نشاندار متصل به فلوروکروم (۵ میکرولیتر آنتی‌بادی انسانی علیه مارکر CD25 نشاندار متصل به فلوروکروم (PE-Cy7) (cat.no 557741) anti-CD25PE-cy7 و ۵ میکرولیتر آنتی‌بادی انسانی علیه مارکر CD127 نشاندار متصل به فلوروکروم Alexa 647, cat. no. 558598 anti-CD127 Alexa647) خریداری شده از شرکت Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA) در دمای یخچال ۲-۸ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی انکوبه شد. سپس با دو میلی‌لیتر از بفر رنگ‌آمیزی فلوسیتومتری (cat. no. 00-4222) در دور ۴۰۰-۶۰۰ به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق دوبار شست‌وشو داده شد برای فیکس کردن رنگ مارکرهای سطحی و تراوا کردن غشای سلولی یک میلی‌لیتر از بفر فیکساتیو/نفوذپذیرکننده به هر تیوب اضافه و ۳۰-۶۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه شد. سپس دو میلی‌لیتر از بفر 1X نفوذپذیرکننده به تیوب افزوده و در دور ۳۰۰-۴۰۰ به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی دور ریخته شد. پلیت سلولی در ۱۰۰ میکرولیتر بفر نفوذپذیرکننده به صورت سوسپانسیون در آمد و در مرحله بعد پنج میکرولیتر از آنتی‌بادی نشاندار انسانی علیه پروتئین درون سلولی FoxP3 متصل به فلوروکروم PE به تیوب اضافه شده و ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه شد. سرانجام پس از دو بار شست‌وشو با دو میلی‌لیتر بفر رنگ‌آمیزی فلوسیتومتری تیوب آماده خوانش توسط دستگاه FACSCalibur بود. از نرم‌افزار Flowjo V10 برای آنالیز داده‌ها استفاده شد. ابتدا گیت لنفوسیتی بر اساس (FCS-A-SSC-A) به ترتیب محور X و Y انتخاب شد. در مرحله بعد جمعیت لنفوسیت TCD4 از بین لنفوسیت‌ها گیت شد. مراحل بعدی آنالیز زیر جمعیت سلول‌های لنفوسیت‌های TCD4+ با استفاده از مارکرهای CD127, CD25, FoxP3 انجام شد. برای انجام آنالیز مناسب T تنظیمی با مارکرهای مذکور تعداد ۵۰۰ هزار سلول برای هر نمونه مناسب بود. لازم به ذکر است که برای انجام با دقت



شکل ۲- رنگ آمیزی چهار رنگ برای مارکرهای CD4, CD25, CD127, Foxp3 و خوانش با دستگاه فلوسیتومتری. به ترتیب از آنتی‌بادی‌های متصل به فلورکرم FITC, PE-cy7, Alexa647, PE برای رنگ آمیزی استفاده شد. ابتدا گیت لنفوسیتی بر اساس (FCS-A- SSC-A) به ترتیب محور Y و X انتخاب شد. در مرحله بعد جمعیت لنفوسیت TCD4 از بین لنفوسیت‌ها گیت شد. مراحل بعدی آنالیز زیر جمعیت سلول‌های لنفوسیت‌های TCD4 + با استفاده از مارکرهای CD25, CD127 و FoxP3 انجام شد.

مقایسه  $(0.89 \pm 0.75)$  pg/ml در گروه دوم با اختلاف معنادار از لحاظ آماری بالاتر بود ( $p=0.0001$ ). میانگین مقدار ۸ - هیدروکسی پیرن در ادرار مادران ساکن در تهران  $(1.79 \pm 0.69)$  pg/ml در مقایسه با مادران ساکن در ادرار مادران ساکن شهر دماوند با اختلاف آماری معنادار بالاتر بود ( $p=0.0001$ ). نتایج حاکی از تایید حضور مداوم و مزمن گروه اول در مواجهه با آلاینده PM2.5 در مقایسه با گروه دوم بود. شکل یک نشان‌دهنده این بخش است.



شکل ۱ - مقادیر میانگین دو متابولیت مواجهه مزمن با ذرات معلق PM2.5 را در ادرار دو گروه مادران ساکن در شهر تهران (گروه یک) و مادران ساکن شهر دماوند (گروه دو) بر حسب پیکوگرم بر میلی‌لیتر pg/ml نشان

بتا کانتور (LSC=liquid scintillation counter) شمارش شد. نتیجه به صورت شمارش در دقیقه (cpm) گزارش شد. نتایج میانگین درصد فعالیت سرکوبگری سلول‌های T تنظیمی CD4+CD25+ به صورت درصد مهار تکثیر سلول T پاسخ‌دهنده با استفاده از فرمول (۱۶).

$$[1 - (\text{mean cpm Treg} + \text{Teff}) / (\text{mean cpm Treg})] \times 100\%$$

#### آنالیز داده‌ها و آمار:

فلوسیتومتری با دستگاه FACSCalibur BD انجام شد. آنالیز داده‌های حاصل از فلوسیتومتری با نرم‌افزار FlowjoV10 انجام شد. تست Smirnov Kolmogorov برای تعیین نحوه داده‌ها به صورت نرمال یا غیر نرمال استفاده شد.  $p>0.05$  نشان دهنده توزیع نرمال داده‌ها بود. توزیع داده‌ها برای تمام متغیرها نرمال بود. برای آنالیز مقایسه‌ای بین دو گروه از تست unpaired Student's t-test برای بررسی داده‌های با توزیع نرمال استفاده شد. از نرم‌افزار GrapPad Prism نیز برای انجام آنالیز آماری و ترسیم نمودارها استفاده شد.  $P<0.05$  اختلاف آماری معنادار را نشان داد.

#### نتایج:

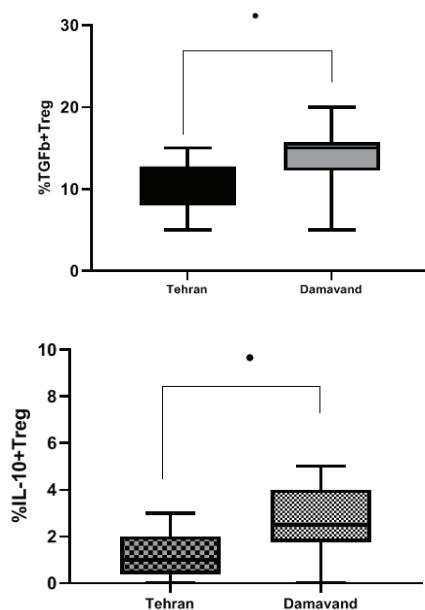
افزایش متابولیت حاصل از آلاینده ذرات معلق PM2.5 در ادرار مادران ساکن در مناطق آلوده شهر تهران (در مقایسه با) مادران ساکن در مناطق پاک شهر دماوند)

برای دستیابی به اطمینان از مواجهه مزمن مادران ساکن در شهر تهران، مقادیر دو متابولیت مهم ذرات معلق PM2.5، ۶-هیدروکسی نیترو پیرن و ۸-هیدروکسی پیرن در ادرار مادران ۲۴ ساعت قبل از زایمان با روش کروماتوگرافی 2D-HPLC-MS/MS ارزیابی شد. نتایج نشان داد که میانگین مقدار ۶-هیدروکسی نیتروپیرن در ادرار گروه اول  $(0.55 \pm 0.26)$  pg/ml در

و FOXP3 متصل به فلوروکروم‌های PE-Cy7، FITC و PE در دو گروه تهران و دماوند تعیین شد. ( $p=0.111$ ) در بخش B میانگین شدت فلورسنت پروتئین FoxP3 بین دو گروه نشان داده شده است. ( $p=0.119$ ) نحوه گزارش میانگین به صورت (Mean±SD) است.  $*p<0.05$ ،  $**p<0.01$ ،  $***p<0.001$ ،  $****p<0.0001$

افزایش درصد فراوانی سلول‌های لنفوسیت T تنظیمی  $IL-10+$  و  $TGFb1+$  در خون بند ناف جنینی نوزادان متولد شده از مادران ساکن در مناطق پاک (شهر دماوند) (در مقایسه با نوزادان متولد شده از مادران ساکن در مناطق آلوده) شهر تهران (درصد سلول‌های  $IL-10+$  T regulatory  $CD4+CD25+$  در خون بند ناف نوزادان متولد شده از مادران ساکن در مناطق پاک  $1.48\% \pm 0.03$ ) (۱،۴۸ درصد) (شهر تهران) با مادران ساکن در مناطق پاک (شهر دماوند) تعیین شد. میانگین درصد  $IL-10+$  T regulatory  $CD4+CD25+$  در خون بند ناف نوزادان متولد شده از مادران ساکن در مناطق پاک  $1.25\% \pm 0.08$  (۱،۲۵ درصد) (شهر تهران) در مقایسه با میانگین درصد این سلول‌ها در خون بند ناف نوزادان متولد شده از مادران ساکن در مناطق آلوده  $1.25\% \pm 0.08$  (۱،۲۵ درصد) به دست آمد ( $p=0.02$ ).

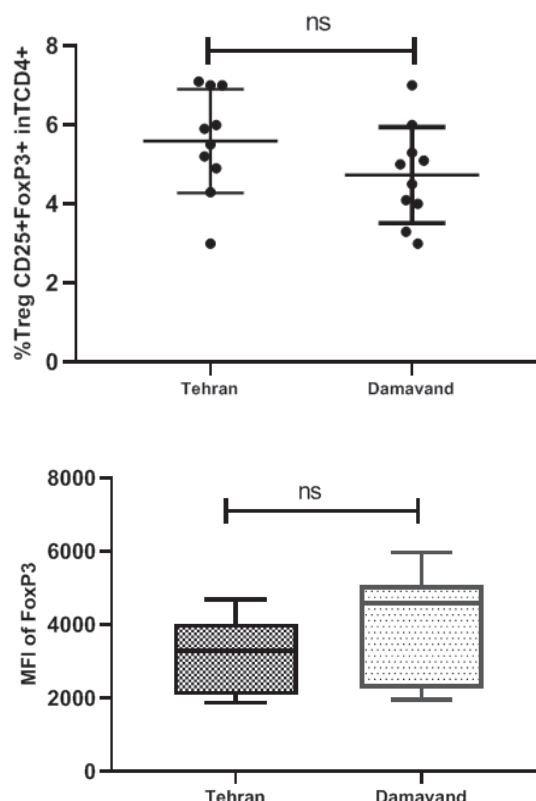
درصد سلول‌های  $T regulatory CD4+CD25+ TGFb1+$  خون بند ناف نوزادان متولد شده از مادران ساکن در مناطق آلوده با مادران ساکن در مناطق پاک تعیین شد. میانگین درصد  $T regulatory CD4+CD25+ TGFb1+$  در خون بند ناف نوزادان متولد شده از مادران ساکن در مناطق پاک  $4.3\% \pm 0.03$  (۴،۳ درصد) در مقایسه با میانگین درصد این سلول‌ها در خون بند ناف نوزادان متولد شده از مادران ساکن در مناطق آلوده  $0.03\% \pm 0.03$  (۰،۰۳ درصد) ( $p=0.03$ ) به دست آمد. نتایج این بخش در شکل چهار نشان داده شده است.



شکل ۵- بیان داخل سلولی  $TGFb1$  در سلول‌های T تنظیمی  $CD4+CD25+$  رنگ‌آمیزی فلوسیتومتری آنتی‌بادی‌های علیه  $IL-10$  و  $TGFb1$  داخل سلولی متصل به فلوروکروم‌های PE و  $PerCP-Cy5.5$  انجام شد. بخش A - درصد سلول‌های  $T regulatory CD4+CD25+ TGFb1+$  خون بند ناف نوزادان متولد شده در دو شهر تهران و دماوند را نشان می‌دهد ( $p=0.03$ ). بخش B درصد سلول‌های  $T regulatory CD4+CD25+ IL-10$  خون بند ناف نوزادان متولد شده در دو شهر تهران و دماوند را نشان می‌دهد ( $p=0.02$ ). نحوه گزارش میانگین به صورت (Mean±SD) است.  $*p<0.05$ ،  $**p<0.01$ ،  $***p<0.001$ ،  $****p<0.0001$

می‌دهد. نحوه گزارش میانگین به صورت (Mean±SD) است.  $*p<0.05$ ،  $**p<0.01$ ،  $***p<0.001$ ،  $****p<0.0001$

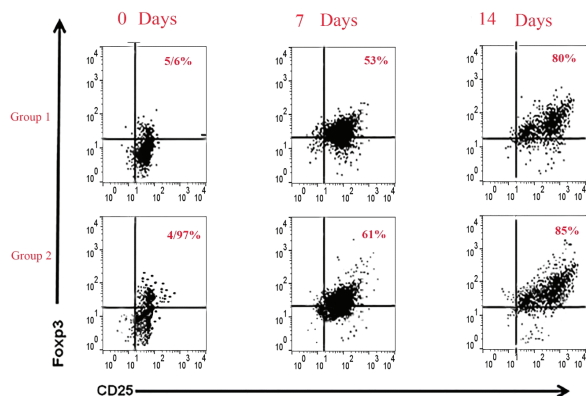
افزایش غیر معنادار درصد فراوانی سلول‌های T تنظیمی  $CD4+CD25+$  Foxp3 و کاهش میانگین شدت فلورسنت پروتئین FoxP3 در خون بند ناف نوزادان متولد شده از (مادران ساکن در مناطق آلوده شهر تهران) در مقایسه با نوزادان متولد شده از (مادران ساکن در مناطق پاک شهر دماوند) رنگ‌آمیزی چهار رنگ برای مارکرهای  $CD4$ ،  $CD25$ ،  $CD127$ ،  $Foxp3$  انجام شد به ترتیب از آنتی‌بادی‌های متصل به فلوروکروم FITC، PE-cy7، Alexa647، PE برای رنگ‌آمیزی استفاده شد. ابتدا گیت لنفوسیتی بر اساس (FCS-A-SSC-A) به ترتیب محور X و Y انتخاب شد. در مرحله بعد جمعیت لنفوسیت TCD4 از بین لنفوسیت‌ها گیت شد. مراحل بعدی آنالیز زیر جمعیت سلول‌های لنفوسیت‌های  $TCD4+$  با استفاده از مارکرهای  $CD25$ ،  $CD127$  و  $FoxP3$  انجام شد. نتایج این بخش در شکل ۲ آمده است. درصد فراوانی سلول‌های T تنظیمی  $CD4+CD25+$  Foxp3 در خون بند ناف دو گروه مقایسه شد. میانگین درصد فراوانی سلول‌های  $CD25+$  Foxp3 در سلول‌های  $CD4+$  در خون بند ناف نوزادان متولد شده از مادران در دو گروه ( $5.64\% \pm 1.21$ ) در شهر تهران در مقابل  $4.37\% \pm 1.2$  به دست آمد. ( $p=0.111$ ) میانگین شدت فلورسنت پروتئین (MFI) FoxP3 نیز در گروه بررسی شد. میانگین شدت فلورسنت پروتئین FoxP3 در خون بند ناف نوزادان متولد شده از مادران ساکن شهر دماوند ( $4124 \pm 1459$ ) در مقایسه با میانگین شدت فلورسنت پروتئین FoxP3 در خون بند ناف نوزادان متولد شده از مادران ساکن شهر تهران ( $3194 \pm 1045$ ) به دست آمد. ( $p=0.119$ ) نتایج این بخش در شکل ۳ نشان داده شده است.



شکل ۳- نسبت سلول‌های T تنظیمی در خون بند ناف جنینی. در بخش A - درصد سلول‌های T تنظیمی درصد سلول‌های T تنظیمی  $CD4+CD25+$  Foxp3 در سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف جنینی (CBMCs) جدا شده با فایکول، با رنگ‌آمیزی فلوسیتومتری آنتی‌بادی‌های علیه  $CD4$ ،  $CD25$

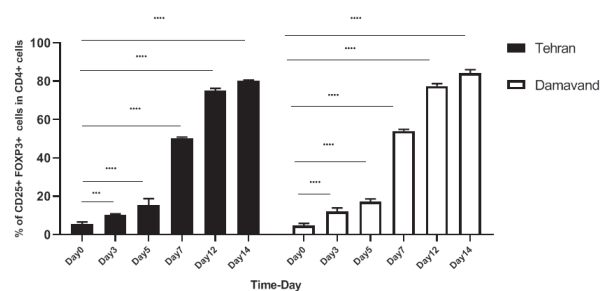
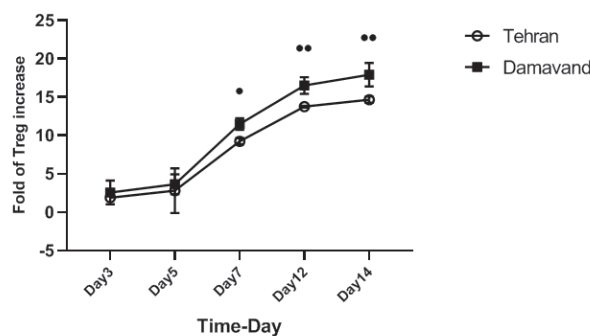
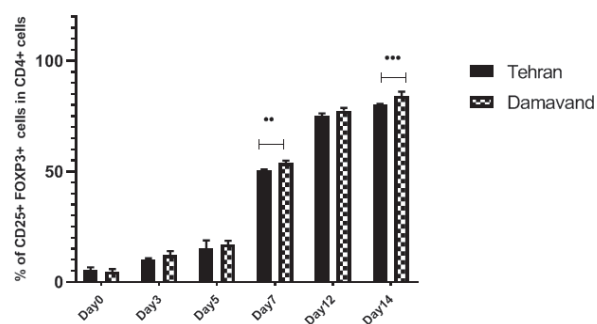
\*\*\*\*p<0.0001

مقایسه با درصد فراوانی این سلول‌ها در خون بند ناف نوزادان متولد شده از مادران ساکن در هوای آلوده در روزهای هفتم کشت سلول  $54 \pm 0.9\%$  در مقابل  $84.2 \pm 1.85\%$  و  $p=0.003$   $0.5 \pm 50.04$  و روز چهاردهم کشت سلول  $80.1 \pm 1.85\%$  در مقابل  $0.5 \pm 50.04$   $p=0.008$  به طور معناداری از لحاظ آماری بالاتر بود. نتایج این بخش در شکل ۷ آمده است.



کاهش میزان تکثیر سلول لنفوسیت T تنظیمی  $CD4+ CD25+$  خون بند ناف مادران ساکن در مناطق آلوده (شهر تهران) در مقایسه با میزان تکثیر این سلول‌ها در خون بند ناف مادران ساکن در مناطق پاک (شهر دماوند)

در این مطالعه میزان تکثیر سلول‌های T تنظیمی  $CD4+CD25+FoxP3+$  جدا شده با کیت (MACS Miltenyi biotec) از سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف نوزادان متولد شده از هر دو گروه کشت داده شد و میزان تکثیر این سلول‌ها در روزهای سوم، پنجم، هفتم، دوازدهم و چهاردهم آنالیز شد. سلول‌ها با میکروبیدهای anti-CD3/CD28 به صورت پلی کلونال به مدت ۱۴ روز در حضور IL-2 کشت داده شدند. توان تکثیر دو گروه مقایسه شد. میزان تکثیر سلول‌های T تنظیمی خون بند ناف نوزادان متولد شده از مادران ساکن شهر دماوند در حضور IL-2 در مقایسه با میزان تکثیر این سلول‌ها در خون بند ناف نوزادان متولد شده از مادران ساکن در شهر تهران در روز هفتم  $0.75 \pm 11.48$  در مقابل  $0.4 \pm 9.23$  و در روز دوازدهم  $1.53 \pm 17.91$  در مقابل  $1.08 \pm 16.54$  در مقابل  $0.1 \pm 13.75$  و در روز چهاردهم  $1.53 \pm 17.91$  در مقابل  $0.4 \pm 14.67$  اختلاف آماری معناداری نشان داد. به ترتیب  $p=0.047$ ،  $p=0.009$ ،  $p=0.001$ .



شکل ۶- سلول‌های لنفوسیت T تنظیمی  $CD4+CD25+$  خون بند ناف نوزادان متولد شده از مادران دو گروه (ساکن شهر تهران و ساکن شهر دماوند) در حضور IL-2 و با تحریک بیدهای متصل به آنتی‌بادی علیه مارکر سطحی CD3/CD28 به مدت دو هفته کشت داده شدند. تعداد سلول‌ها با تریپان بلو شمارش شد. میزان افزایش (چند برابر شدن تعداد سلول‌ها) در روزهای سوم، پنجم، هفتم، دوازدهم و چهاردهم نسبت به روز سوم محاسبه شد. به این صورت که تعداد سلول‌ها در هر روز بر تعداد سلول‌ها در روز صفر تقسیم شد. نحوه گزارش داده‌ها به صورت  $Mean \pm SD$  است. \*\*\*\*p<0.0001، \*\*\*p<0.001، \*\*p<0.01، \*p<0.05

شکل ۷ - بیان داخل سلولی پروتئین FoxP3 در لنفوسیت‌های T تنظیمی  $CD4+CD25+$  جدا شده با کین جداسازی MACS Miltenyi biotec در روز صفر در خون بند ناف نوزادان متولد شده از مادران دو گروه با فلوسیتومتری اندازه‌گیری شد. سپس سلول‌های مذکور در حضور IL-2 و با تحریک بیدهای متصل به آنتی‌بادی علیه CD3/CD28 کشت داده شدند. سلول‌ها در روز سوم، پنجم، هفتم، دوازدهم و چهاردهم با فلوسیتومتری بررسی شدند. رنگ‌آمیزی فلوسیتومتری با آنتی‌بادی‌های علیه CD4، CD25 و FoxP3 متصل به فلوروکروم‌های APC، PE-Cy7 و PE انجام شد و دستگاه خوانش FACSCalibur BD بود و از نرم‌افزار Flowjo V10 برای تفسیر نتایج استفاده شد. در بخش A یک نمونه از ۱۰ نمونه هر گروه برای مثال آمده است. در بخش B نمودار میانگین درصد سلول‌های T تنظیمی  $CD4+CD25+$  بیان‌کننده FoxP3 در ۱۰ نمونه بررسی شده در هر دو گروه آورده شده است. نتایج در هر

درصد فراوانی سلول‌های  $CD4+ TCD4+ CD25+FoxP3+$  در روزهای صفر، سوم، پنجم، هفتم، دوازدهم و چهاردهم کشت سلول بارنگ‌آمیزی سلول‌های T تنظیمی با فلوسیتومتری سه رنگ آنتی‌بادی‌های علیه CD25، CD4 و FoxP3 متصل به فلوروکروم‌های APC، PE-Cy7 و PE آنالیز شد. نتایج نشان داد که درصد فراوانی سلول‌های  $CD4+ TCD4+ CD25+FoxP3+$  در روز صفر کشت سلولی در خون بند ناف نوزادان متولد شده از مادران ساکن مناطق آلوده در مقایسه با درصد فراوانی این سلول‌ها در خون بند ناف نوزادان متولد شده از مادران ساکن مناطق پاک بالاتر بود. ( $5.64 \pm 1.21\%$  در مقابل  $4.37 \pm 1.2\%$   $p=0.111$ ) درصد فراوانی این سلول‌ها در هر دو گروه در روزهای سوم، پنجم، هفتم، دوازدهم و چهاردهم در کشت سلول روند افزایش دارد. لازم به ذکر است که درصد فراوانی سلول‌های  $CD4+ TCD4+ CD25+FoxP3+$  در خون بند ناف نوزادان متولد شده از مادران ساکن مناطق هوای پاک در



شکل ۸- برای بررسی میانگین درصد فعالیت سرکوبگری سلول‌های T تنظیمی CD4+CD25+ جدا شده از خون بند ناف نوزادان متولد شده از مادران در هر دو گروه (ساکن شهر تهران و ساکن شهر دماوند) سلول‌های T تنظیمی CD4+CD25+ همراه سلول‌های T پاسخ دهنده CD4+CD25- با نسبت‌های Treg/Teff (۱/۱، ۲/۱، ۴/۱، ۸/۱) نسبت میکروبیید متصل به آنتی‌بادی علیه CD3/CD28 به سلول (۱:۱) به مدت چهار روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO<sub>2</sub> و ۹۵ درصد رطوبت تحت اثر IL-2 کشت داده شد. پس از چهار روز، <sup>3</sup>H-thymidine [۳H] ۱۰۰ μCi یک به هر کدام از چاهک‌ها اضافه شد و بعد از ۱۶ ساعت، میزان تکثیر سلولی با شمارش در دقیقه توسط دستگاه counter-β خوانده شد. نتایج میانگین درصد فعالیت سرکوبگری سلول‌های T تنظیمی CD4+CD25+ به صورت درصد مهار تکثیر سلول T افکتور استفاده از فرمول [Teff co-culture/cpm of Teff alone] × ۱۰۰ محاسبه شد. در بخش A نتایج بین نسبت‌های Treg/Teff (۱/۱، ۲/۱، ۴/۱، ۸/۱) در هر گروه به صورت جداگانه آنالیز شد. در بخش B نتایج بین نسبت Treg/Teff (۱/۱، ۲/۱، ۴/۱، ۸/۱) بین دو گروه آنالیز شد. داده‌های نمودار حاصل بررسی ۱۰ نمونه از هر گروه (ساکن شهر تهران و ساکن شهر دماوند) به صورت Mean±SD گزارش شد. \*\*\*\*p<0.0001، \*\*\*p<0.001، \*\*p<0.01، \*p<0.05

#### بحث:

ما در این مطالعه، سلول T تنظیمی در خون بند ناف نوزادان متولد شده از مادران ساکن در دو منطقه هوای آلوده و پاک (از نظر آلاینده ذرات معلق بررسی کردیم. سلول‌های T تنظیمی CD4+FoxP3+، همچنین بیان دو سیتوکین مهم این سلول‌ها IL-10، IL-1، TGF-β1 در سطح داخل سلولی با رنگ‌آمیزی فلوسیتومتری مقایسه شد. نتایج به دست آمده از این مطالعه نشانگر این مطلب است که آثار مواجهه مزمن با آلودگی هوا می‌تواند بر میزان تکثیر لنفوسیت‌های T تنظیمی و عملکرد مهار تکثیر این سلول‌ها در نوزادان متولد شده اثر داشته باشد. نتایج نشان داد که عملکرد سرکوبگری در نوزادان به دنیا آمده از مادران ساکن شهر تهران نسبت به نوزادان به دنیا آمده از مادران ساکن در شهر دماوند کاهش یافته است.

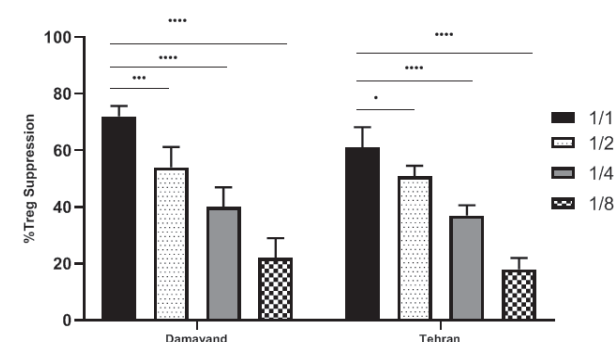
سلول T تنظیمی با فنوتیپ نقش CD4+CD25+CD127lowFoxP3+ نقش اساسی در تعدیل و تنظیم پاسخ‌های سیستم ایمنی و القای تحمل محیطی از ابتدای دوره جنینی نسبت به آنتی ژن‌های مادری و در بزرگسالی نسبت به آنتی ژن‌های بی ضرر خودی و محیطی و غذایی و ... دارد. (۱۷) نقص عملکرد یا نا کارآمدی سلول T تنظیمی می‌تواند به بروز اتوایمیونیتی یا بروز افزایش حساسیت منجر شود. در مطالعه حاضر سلول T تنظیمی نوزاد تازه متولد شده به عنوان مارکر پیش‌گویی کننده برای احتمال تشدید ابتلا به آلرژی در اثر مواجهه مزمن با آلاینده ذرات معلق در رحم مادر در نظر گرفته شد. در مطالعه‌های انجام شده این فرضیه محتمل است که استعداد تشدید بروز نوزادان به آلرژی در کودکی و بزرگسالی، پیش‌تر از بروز علایم کلینیکی تعیین می‌شود. (۱۸)

در مطالعه پیش‌رو درصد سلول‌های T تنظیمی سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف در نوزادان متولد شده از مادران متولد شده از مادران ساکن تهران بالاتر از نوزادان متولد شده از مادران ساکن دماوند بود، این افزایش گرچه محسوس نبود. (از لحاظ آماری معنادار نبود) اما در مطالعه مشابه دیگر توسط L. Prokesova و همکاران‌شان انجام شد و تعداد و عملکرد سلول‌های T تنظیمی خون بند ناف نوزادان به دنیا آمده از مادران مبتلا به آسم و سالم مقایسه شده بودند، عملکرد سلول‌های T تنظیمی در نوزادان به دنیا آمده از مادران مبتلا به آسم به طور معناداری در مقایسه با مادران سالم کاهش یافته بود، در حالیکه تعداد سلول‌های T تنظیمی در مادران مبتلا به آسم افزایش نشان داد (۱۹). به نظر می‌رسد از مقایسه نتایج به دست آمده از مطالعه ما و L. Prokesova شرایط مواجهه مادر با آلاینده PM2.5 می‌تواند شبیه ابتدای

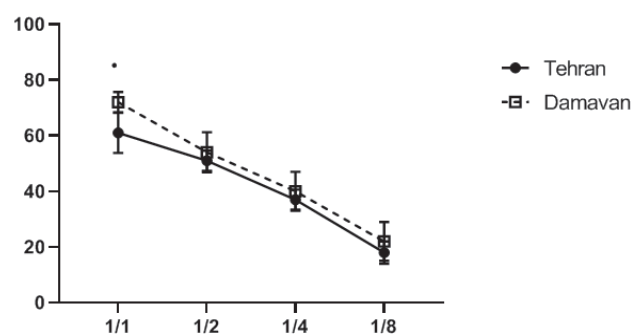
روز کشت سلولی با هم مقایسه شده و نتایج به صورت Mean±SD گزارش شده است. در بخش C میانگین درصد سلول‌های T تنظیمی CD4+CD25+ بیان کننده FoxP3 در ده نمونه در هر گروه جداگانه در روزهای سوم، پنجم، هفتم، دوازدهم و چهاردهم کشت سلولی با روز صفر مقایسه شده است. نتایج به صورت Mean±SD گزارش شده است. \*\*\*\*p<0.0001، \*\*\*p<0.001، \*\*p<0.01، \*p<0.05

کاهش میانگین درصد فعالیت سرکوبگری سلول‌های T تنظیمی خون بند ناف مادران ساکن در مناطق آلوده (شهر تهران) در مقایسه با میانگین درصد فعالیت سرکوبگری این سلول‌ها در خون بند ناف مادران ساکن در مناطق پاک (شهر دماوند)

برای بررسی درصد فعالیت سرکوبگری سلول‌های T تنظیمی CD4+CD25+ جدا شده از خون بند ناف نوزادان متولد شده از مادران در هر دو گروه، سلول‌های T تنظیمی CD4+CD25+ با سلول‌های T افکتور CD4+CD25- با نسبت‌های (۱/۱، ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸) و نسبت Treg/Teff و نسبت میکروبیید متصل به آنتی‌بادی علیه CD3/CD28 به سلول (۱:۱) به مدت چهار روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO<sub>2</sub> و ۹۵ درصد رطوبت کشت داده شد. پس از چهار روز <sup>3</sup>H-thymidine [۳H] ۱۰۰ μCi به هر کدام از چاهک‌ها اضافه شد و بعد از ۱۶ ساعت، میزان تکثیر سلولی با دستگاه counter-β خوانده شد. میزان مهار تکثیر سلول به صورت درصد فعالیت سرکوبگری گزارش و نتایج مقایسه شدند. نتایج به دست آمده در هر دو گروه نشان داد بیشترین فعالیت سرکوبگری سلول‌های T تنظیمی در نسبت Treg/Teff (۱/۱) به دست آمد. نتایج به تفصیل در شکل ۸ آمده است. میانگین درصد فعالیت سرکوبگر سلول‌های T تنظیمی CD4+CD25+ در نسبت Treg/Teff (۱/۱) خون بندناف نوزادان متولد شده از مادران ساکن در شهر تهران ۶۱±۷ درصد در مقابل میانگین درصد فعالیت سرکوبگر سلول‌های T تنظیمی CD4+CD25+ خون بند ناف نوزادان متولد شده از مادران ساکن در شهر دماوند کاهش یافته است (۴۵٪). (p=0.017، ۷۲± نتایج این بخش در شکل ۸ نشان داده شده است.



B



با آلودگی هوا (تا سه سال) احتمالاً به عملکرد کاهش یافته T تنظیمی نسبت داده می‌شود. آثار مذکور از طریق مکانیسم‌های اپی ژنتیک انجام می‌شود (۲۷). متیلاسیون ژن FoxP3 سبب کاهش بیان این پروتئین و در پی آن کاهش عملکرد سلول‌های T تنظیمی می‌شود. متیلاسیون این ژن در ارتباط با مواجهه با هوای آلوده، اسم و آلرژی مشاهده شده است. یکی از مکانیسم‌هایی که برای ارتباط کاهش عملکرد سلول T تنظیمی و بروز آسم و یا افزایش شدت آسم بیان می‌شود، نقش FoxP3 در بیان ژن ریسپتور کموکاین CCR4 و CCR8 در سطح سلول T تنظیمی است. لیگاند این کموکاین ریسپتورها از اپیتلیوم برونشیا تولید می‌شوند. مطالعه‌ها نشان داده که در افراد مبتلا به آسم ساکن در مناطق آلوده (مواجهه مزمن با آلایندگی‌های هوا) بیان FoxP3 کاهش یافته، در نتیجه بیان این ریسپتورهای کموکاینی هم در سطح سلول T تنظیمی کاهش یافته و مهاجرت T تنظیمی به ریه کاهش یافته است. در افراد سالم با عملکرد طبیعی سلول T تنظیمی، FoxP3 بیان می‌شود و سبب رونویسی ژن‌های CCR4, CCR8 بر سطح سلول T تنظیمی شده و در مواجهه با آلرژن یا آلایندگی‌های کموکاین مربوطه از سلول‌های اپی‌تلیوم ریه ترشح شده و سبب مهاجرت سلول T تنظیمی به ریه شده و در نتیجه مواجهه این سلول با سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن و تعدیل پاسخ‌های سیستم ایمنی در برابر آلرژن یا آلایندگی می‌شود. این نقص همراه با ناکارآمدی سلول T تنظیمی در عملکرد سرکوبگر تکثیر لنفوسیت TCD4+ در بروز و شدت پاسخ‌های التهابی ریه در افراد مبتلا به آسم در برابر آلودگی هوا موثرند (۲۸).

تحقیق‌ها در زمینه نوزادان متولد شده در مناطق شهرنشین و افزایش بروز آسم نشان داد که اگرچه دلیل اصلی بروز تشدید یافته آسم در مناطق شهری هنوز مشخص نشده است، ولی نوزادان در این مناطق متولد شده در مقایسه با مادران‌شان سلول‌های T تنظیمی با فنوتیپ نابالغ تر و بیان FoxP3 کاهش یافته‌تری دارند. همچنین کاهش عملکرد سرکوبگری تکثیر لنفوسیت‌های تحریک شده با PHA و کاهش تولید TGF- $\beta$  از این سلول‌ها نسبت به T تنظیمی خون محیطی مادران‌شان مشاهده شد (۲۸).

همچنین مطالعه‌های متعددی حاکی از این است که ریز محیط پیرامون سلول‌های T تنظیمی نقش مهمی در سرنوشت پاسخ‌های سیستم ایمنی دارد به این ترتیب که گفته می‌شود بیشترین تأثیر و نقش سلول T تنظیمی در تعدیل پاسخ‌های سیستم ایمنی از طریق پتانسیل تبدیل این سلول به سلول T افکتور صورت می‌گیرد. تفاوت در زیر مجموعه‌های سلول T تنظیمی ممکن است به این سوال پاسخ دهد که چرا آلودگی هوا بیش از اختلال سیستم ایمنی نظیر اتوایمیونیتی، اسم و افزایش حساسیت را تشدید می‌کند (۲۹). در تحقیق‌های اخیر، اثر آلایندگی‌های مختلف نظیر هیدروکربن‌های آروماتیک پلی‌سیکلیک بر لوکوس‌های مختلف ژنی FoxP3 بررسی شد. نتایج نشان داد که الگوی متیلاسیون CpG در لوکوس‌های مختلف ژن FoxP3 در انواع فنوتیپ‌های سلول‌های T تنظیمی متفاوت است که می‌تواند نقش عوامل برهم‌کنش انواع آلایندگی‌ها را با سلول T تنظیمی در بروز آلرژی نسبت به آلایندگی خاصی در زاده‌های انسان توجیه کند. بهترین فرضیه با توجه به مطالعه‌های مشابه انجام شده، این است که مواجهه با آلایندگی‌های هوا به خصوص ذرات معلق با افزایش متیلاسیون جزایر CpG در ژن FoxP3 همراه است که سبب نقص عملکرد سلول T تنظیمی و بروز پاسخ‌های سیستم ایمنی Th2 می‌شود. همچنین در برخی مطالعه‌ها نتایج نشان داد که نقص عملکرد سلول T تنظیمی و کاهش بیان ژن FoxP3 افزایش متیلاسیون جزایر CpG ژن FoxP3 به صورت وابسته به دوز تحت تأثیر آلایندگی‌ها قرار می‌گیرد (۳۰).

مطالعه‌های شواهد قوی پیرامون کاهش عملکرد T تنظیمی نشان می‌دهد که T تنظیمی خون بند ناف نوزادان متولد شده مادران مبتلا به آسم و مطالعه ما، مادران ساکن در مناطق آلوده، کاهش یافته ولی اختلاف آماری معنادار بین MFI پروتئین FoxP3 در دو گروه مورد و کنترل مشاهده نشد. با وجود اینکه در مطالعه‌های دیگری، کاهش عملکرد سلول T تنظیمی همراه با کاهش بیان FoxP3 همراه است. این تفاوت در نتایج به تعداد افراد بررسی شده در

مادران به آسم باشد. دلیل محتمل این افزایش تعداد سلول T تنظیمی در هر دو گروه نوزادان به دنیا آمده از مادران ساکن در مناطق آلوده یا مادران مبتلا به آسم در مقایسه با نوزادان به دنیا آمده از مادران ساکن در مناطق پاک یا مادران سالم جبران کاهش عملکرد سلول T تنظیمی در این گروه‌ها می‌تواند باشد. در مطالعه‌ای نشان داده شد که سلول‌های T تنظیمی CD4+CD25+ خون بند ناف نوزادان به دنیا آمده از مادران مبتلا به آسم آلرژیک در شرایط In vitro در حالت تحریک شده و تحریک نشده با آلرژن‌ها به یک میزان تکثیر می‌یابند و این می‌تواند دلیل افزایش درصد CD4+CD25+FoxP3 در خون بند ناف نوزادان به دنیا آمده از مادران ساکن در شهر آلوده که پر از عوامل محرک تکثیر است را توجیه کند (۳۰).

در مطالعه‌ای با نتایج متناقض با تحقیق کنونی ما که توسط D.Hinz انجام شد، نتایج حاکی از کاهش تعداد سلول‌های T تنظیمی در خون بند ناف و همچنین خون محیطی مادران و بروز پیش‌آگهی ابتلا به رینیت آلرژیک در نوزادان متولد شده بود (۳۱). همچنین تحقیق‌های پیرامون ابتلا زود هنگام کودکان به درماتیت آتوپیک و افزایش حساسیت غذایی نشان داد که تعداد سلول‌های T تنظیمی در خون بند ناف کاهش یافته است (۱۲).

فاکتور رونویسی FoxP3 مارکر مهم و اساسی در سلول‌های T تنظیمی و به ویژه پروتئین مورد نیاز برای اعمال فعالیت مهار تکثیر (فعالیت سرکوبگری) و القای بیان کموکاین ریسپتور CCR4 و CCR8 بر سطح این سلول‌هاست (۳۲). با توجه به اینکه سلول T تنظیمی نقش اساسی در سرکوب فعالیت سلول‌های درگیر در کنترل افزایش حساسیت‌ها نظیر ائوزینوفیل‌ها، بازاریفیل‌ها و سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن و ماست سل‌ها دارد، کاهش عملکرد این سلول‌ها در مواجهه با آلودگی هوا می‌تواند حاکی از نقش اساسی T تنظیمی در پیشروی آسم و آلرژی، بیماری‌های مزمن ریوی در اثر مواجهه با آلایندگی‌های هواست. سلول‌های CD25+FoxP3 T تنظیمی که بیان‌کننده پروتئین FoxP3 هستند در آلرژی‌های وابسته به آلودگی هوا نقش اساسی ایفا می‌کند (۳۳). در مطالعه‌ای مشابه به تحقیق ما که توسط Kari Nadeau و همکاران‌شان انجام شد، نتایج نشان داده که شدت بروز آسم در کودکان در معرض هوای آلوده با نقص عملکرد سلول‌های T تنظیمی در گردش خون ارتباط معناداری دارد و کاهش بیان پروتئین FoxP3 و نقص در عملکرد سلول‌های T تنظیمی، سبب پیشبرد پاسخ‌های ایمنولوژیکی به سمت Th2 و بروز آلرژی می‌شود. به طور دقیق این نتایج در افرادی که دچار آسم زود هنگام در سنین کودکی می‌شوند نیز قابل مشاهده است (۳۴). در مجموع از مقایسه مطالعه ما با دیگر مطالعه‌ها پیرامون بررسی ارتباط مواجهه مادران باردار با هوای آلوده و کاهش عملکرد سلول‌های سیستم ایمنی و به ویژه سلول‌های T تنظیمی این فرضیه مطرح می‌شود که مواجهه مزمن با آلودگی هوا ممکن است نقش اساسی در به هم خوردن تعادل ایمنولوژیکی نوزادان به دنیا آمده از مادران در معرض آلودگی داشته باشد. از آنجا که برهم خوردن تعادل ایمنولوژیکی و کاهش عملکرد سلول T تنظیمی در کودکان متولد شده از مادران مبتلا به آسم در مقایسه با مادران سالم مشاهده می‌شود، می‌توان بیان کرد که مواجهه جنین با آلایندگی ذرات معلق در رحم مادر می‌تواند آثاری مشابه برهم‌کنش سیستم ایمنی مادر آلرژیک با جنین را داشته باشد. بررسی الگوی متیلاسیون CpG در ژن‌های مختلف نظیر FoxP3 در کودکان به دنیا آمده از مادران مبتلا به آسم و ساکن در مناطق آلوده شهر، نشان‌دهنده ارتباط معنادار آماری بین ساعت‌های مواجهه روزانه مادر باردار با هوای آلوده و تعداد جایگاه‌های متیلاسیون ژن FoxP3 در فرزند به دنیا آمده از این مادران بود (۳۵). همچنین در کودکان مبتلا به آسم بین FEV1 و تعداد جایگاه‌های متیلاسیون FoxP3 ارتباط معنادار وجود داشت (۶). از طرف دیگر قابل ذکر است که کودکان متولد شده از مادران سیگاری یا مادران در معرض مزمن دود سیگار نیز به طور دقیق دچار کاهش عملکرد سلول T تنظیمی و کاهش بیان FoxP3 می‌شوند (۳۶). از نتایج این تحقیق‌ها می‌توان این گونه نتیجه‌گیری کرد که ایمنوپاتولوژی آسم (سابقه آسم تا هفت سال مادران و در معرض سیگار بودن یا در مواجهه

همه این عوامل لازم است تا نشان‌دهنده نقص عملکرد T تنظیمی باشد (۲۱). لازم به ذکر است که علاوه بر تغییرهای اپی‌ژنتیک اعمال شده، آلاینده‌های محیطی بر متیلاسیون و دمتیلاسیون توالی microRNAs، DNA نیز به عنوان سنسور قوی حساس به تغییرهای محیطی هستند. از طرفی microRNAs در تنظیم پاسخ‌های سیستم ایمنی و به خصوص در تمایز سلول‌های T تنظیمی نقش اساسی ایفا می‌کنند. در مطالعه‌ای که توسط Gunda herberth و همکاران‌شان بر کودکان متولد شده از مادران سیگاری انجام شد، نتایج حاکی از افزایش بیان mir-223 و کاهش تعداد سلول‌های T تنظیمی در خون محیطی مادر و در خون بند ناف بود و هر دو عامل با افزایش ریسک ابتلا به آتوپیک در ماتیت در سه سال ابتدایی زندگی کودکان ارتباط معنادار نشان داد (۳۶).

از محدودیت‌های مهم این مطالعه می‌توان به هتروژن بودن جمعیت سلول T تنظیمی اشاره کرد. تنوع مارکرهای سطح سلول T تنظیمی و روش‌های مختلف جداسازی آن‌ها با مارکرهای متفاوت می‌تواند به گزارش نتایج ضد و نقیض منجر شود. (۳۷) استراتژی‌های متفاوت گیتینگ (انتخاب جمعیت سلولی با نرم‌افزار) فلوسیتومتری برای ارزیابی سلول‌های  $TCD4+CD25+$  و  $CD4+CD25high$ ،  $CD127low$   $CD4+CD25high$  و  $Foxp3+$  وجود دارد که همین امر به ایجاد نتایج متفاوت در تحقیق‌های مختلف منجر می‌شود. روش گیتینگ فلوسیتومتری در این مطالعه انتخاب لنفوسیت و سپس انتخاب لنفوسیت‌های  $TCD4+$  سه استراتژی متفاوت گیت در سلول‌های  $TCD4+$  به کار گرفته شد. (۳۸-۴۰) همچنین به کار بردن کلون آنتی‌بادی  $Foxp3$  مختلف از شرکت‌های متفاوت به ارائه درصدهای متفاوت سلول T تنظیمی منجر می‌شود. موارد دیگر هم در ارتباط با ارزیابی عملکرد سلول‌های T تنظیمی با تست‌های مختلف سنجش می‌شود که می‌تواند نتایج متفاوت داشته باشد. علاوه بر این، همه سلول‌هایی که عملکرد سرکوبگری تکثیر سلول پاسخ‌دهنده را دارند،  $Foxp3$  را بیان نمی‌کنند. از طرف دیگر، فرآیند جداسازی سلول‌ها با ستون MACS هم می‌تواند با درصد خلوص متفاوت انجام شود. همچنین جداسازی T تنظیمی از خون کامل یا CBMNCs نیز می‌تواند بر نتایج نهایی و ارائه درصد سلولی تاثیر بگذارد (۴۱، ۴۲).

سلول T تنظیمی تعدیل سیستم ایمنی را در دوره درون رحم آغاز می‌کند. عملکرد سلول T تنظیمی در اوایل تولد نوزاد زمانی که سیستم ایمنی در حالت نابالغ است، بسیار اساسی است و نقص عملکرد سلول T تنظیمی به عنوان دلیلی برای تشدید ابتلا به آلرژی در کودکان متولد شده از مادران ساکن مناطق آلوده و همچنین مادران مبتلا به آسم باشد. در مجموع می‌توان این گونه نتیجه‌گیری کرد که نقص عملکرد سلول‌های T تنظیمی می‌تواند به تشدید بروز آلرژی در کودکان از پیش مستعد شده (در رحم مادر) منجر شود. به طور کلی با به دست آوردن اطلاعات جدید در زمینه سلول‌های T تنظیمی، روش‌های ارزیابی مواجهه با آلاینده‌های شهری و بررسی عوامل اپی ژنتیکی می‌تواند سبب تحول بزرگی در این زمینه تحقیقی باشد و در نهایت به تسریع ارائه استراتژی‌های جدید برای بروز و تشدید آسم و آلرژی مرتبط با آلاینده‌های شهری منجر شود. در مجموع مواجهه مزمن مادران با آلاینده ذرات معلق در هوا قبل از حاملگی و در طول دوره بارداری ممکن است سبب کاهش عملکرد سلول‌های T تنظیمی شود و ریسک تشدید ابتلا به آلرژی نوزاد را در زندگی بعد از زایمان افزایش دهد.

تحقیق‌ها، نوع و روش سنجش پروتئین  $Foxp3$  فلوسیتومتری، qPCR مرتبط است (۳۱). در مطالعه ما، بررسی  $Foxp3$  مانند مطالعه انجام شده بر خون بند ناف نوزادان متولد شده از مادران مبتلا به آسم با فلوسیتومتری مورد سنجش قرار گرفت.

علاوه بر موارد مذکور، طبق نظریه بهداشت اعتقاد بر این است که مواجهه کم با میکروب‌های غیر پاتوژن برای مثال عوامل غیر پاتوژن نظیر آلاینده‌های محیطی که سرشار از ترکیب‌های شیمیایی نظیر هیدروکربن‌های آروماتیک پلی‌سیکلیک هستند و توسط گیرنده‌های آریل هیدروکربن ریسپورها  $AhR$  شناسایی می‌شوند، سبب افزایش پاسخ‌های آلرژیک و برهم خوردن تعادل سیستم ایمنی می‌شوند. آریل هیدروکربن ریسپورها بر سطح طیف وسیعی از سلول‌های سیستم ایمنی از جمله سلول‌های T تنظیمی بیان می‌شوند. اتصال لیگاند به این ریسپورها در سطح سلول T تنظیمی سبب به راه افتادن مسیرهای مختلف سیگنالینگ در این سلول‌ها می‌شود که در نهایت به برهم خوردن تعادل  $Th1/Th2$  و تشدید بروز آلرژی منجر می‌شود. (۳۲، ۳۳)

سیتوکین‌های  $IL-10$  و  $TGF-b1$  نقش مهم و اساسی در عملکرد اجرایی سلول‌های T تنظیمی دارند. افزایش ترشح  $IL-10$  (روش سنجش ELISA) با افزایش بیان  $Foxp3$  و فعالیت مهار تکثیر لنفوسیتی T تنظیمی بعد از تحریک آنتی‌ژن در سلول T تنظیمی نوزادان به دنیا آمده از مادران سالم همراه است. (۳۴) برای درک بهتر ما، میزان تولید این سیتوکین‌ها  $IL-10$  و  $TGF-b1$  را در سطح پروتئین درون سلولی ارزیابی کردیم. در مطالعه ما، درصد سلول‌های  $TCD4+CD25+$  که  $IL-10+$  و یا  $TGF-b1+$  بودند در خون بند ناف نوزادان متولد شده از مادران ساکن در مناطق آلوده پایین‌تر از درصد سلول‌های  $TCD4+CD25+$  که  $IL-10+$  و یا  $TGF-b1+$  در خون بند ناف نوزادان متولد شده از مادران ساکن در مناطق پاک بود. در مطالعه‌ای با طراحی مشابه درصد سلول‌های  $TCD4+CD25+$  که  $IL-10+$  یا  $TGF-b1+$  بین نوزادان متولد شده از مادران مبتلا به آسم با نوزادان متولد شده از مادران سالم مورد مقایسه شد و نتایج حاکی از کاهش درصد سلول‌های  $TCD4+CD25+$  که  $IL-10+$  یا  $TGF-b1+$  در خون بند ناف نوزادان به دنیا آمده از مادران مبتلا به آسم بود. این نتایج نشان‌دهنده کاهش عملکرد سلول T تنظیمی در سرکوب فعالیت سیستم ایمنی نسبت به آلرژن‌ها در سنین بالاتر نوزادان باشد (۱۹). از آنجا که آلاینده‌های محیطی عوامل تشدیدکننده بروز پاسخ‌های  $Th2$  هستند، نتایج این تحقیق با مطالعه کنونی ما هم راستاست.

ارتباط عملکرد سیستم ایمنی و کاهش عملکرد T تنظیمی در مواجهه با آلاینده ذرات معلق و تشدید آلرژی یا احتمال ابتلا به آلرژی در نوزادان به دنیا آمده از مادران با ریسک مواجهه با آلاینده‌ها باید در مطالعه آینده‌نگر بررسی شود. برای مثال نوزادانی که خون بند ناف آن‌ها در این مطالعه بررسی شد در آینده از لحاظ ابتلا به آسم بررسی شوند و به این ترتیب نتایج دراز مدت این مطالعه بررسی شود. این عمل کمک می‌کند که عملکرد سلول T تنظیمی به عنوان مارکر پیش‌گویی‌کننده آسم و افزایش حساسیت در اثر مواجهه با آلاینده‌ها معرفی شود. همچنین لازم است در آینده علاوه بر  $Foxp3$  مارکرهای دیگر نظیر فاکتور رونویسی  $Helios$  یا سایر پروتئین‌هایی افتراق‌دهنده  $nTreg$ ،  $iTreg$ ، بررسی شوند. (۳۵) همچنین با توجه به اینکه بخش بزرگی انتقال فاکتورهای اپی‌ژنتیکی از طریق متیلاسیون و دمتیلاسیون مناطق خاصی از ژنوم سلول T تنظیمی (TSDR) انجام می‌شود، انجام مطالعه‌های جامع‌تری در این بخش را پیشنهاد می‌کند. مطالعه‌ای توسط Hinz و همکارانش نشان داد که نسبت دمتیلاسیون در  $Foxp3$  در کودکان به دنیا آمده از مادران مبتلا به انواع آلرژی‌ها نسبت به نوزادان به دنیا آمده از مادران سالم بیشتر است. برای معرفی سلول T تنظیمی به عنوان مارکر پیش‌گویی‌کننده بررسی

## منابع:

1. Na K, Farakhzad M, Hasti. Air Pollution in Tehran. Air and Waste Management. (2014, April):22-6.
2. Organization WH. Air quality guidelines: global. World Health Organization. 2006.
3. Martineau RA, DA. The Clean Air Act Handbook. Bar Association 2004.
4. USEPA U. The plain English Guide to Clean Air Act. Research Triangle Park Publication. No. 2007/456/K-07-001.
5. M A, Hosseini V, S, M. Z, Bigdeli M, Lai, A, & Schauer JJ. Seasonal trends, chemical speciation and source apportionment of fine PM in Tehran. Atmospheric Environment. 2017;153:70-82.
6. Nadeau K, McDonald-Hyman C, Noth EM, Pratt B, Hammond SK, Balmes J, et al. Ambient air pollution impairs regulatory T-cell function in asthma. The Journal of allergy and clinical immunology. 2010;126(4):845-52.e10.
7. Bauer RN, Diaz-Sanchez D, Jaspers I. Effects of air pollutants on innate immunity: the role of Toll-like receptors and nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors. The Journal of allergy and clinical immunology. 2012;129(1):14-24; quiz 5-6.
8. Jutel M, Akdis CA. T-cell subset regulation in atopy. Current allergy and asthma reports. 2011;11(2):139-45.
9. Tan L, Ou J, Tao Z, Kong Y, Xu Y. Neonatal Immune State Is Influenced by Maternal Allergic Rhinitis and Associated With Regulatory T cells. Allergy, asthma & immunology research. 2017;9(2):133-41.
10. Mold JE, Michaelsson J, Burt TD, Muench MO, Beckerman KP, Busch MP, et al. Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. Science (New York, NY). 2008;322(5907):1562-5.
11. Burbank AJ, Sood AK, Kesic MJ, Peden DB, Hernandez ML. Environmental determinants of allergy and asthma in early life. The Journal of allergy and clinical immunology. 2017;140(1):1-12.
12. Gallant MJ, Ellis AK. What can we learn about predictors of atopy from birth cohorts and cord blood biomarkers? Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology. 2018;120(2):138-44.
13. Lin SJ, Lu CH, Yan DC, Lee PT, Hsiao HS, Kuo ML. Expansion of regulatory T cells from umbilical cord blood and adult peripheral blood CD4(+)CD25 (+) T cells. Immunologic research. 2014;60(1):105-11.
14. Marin Morales JM, Munch N, Peter K, Freund D, Oelschlagel U, Holig K, et al. Automated Clinical Grade Expansion of Regulatory T Cells in a Fully Closed System. Frontiers in immunology. 2019;10:38.
15. Ward ST, Li KK, Curbishley SM. A method for conducting suppression assays using small numbers of tissue-isolated regulatory T cells. MethodsX. 2014;1:168-74.
16. George JF, Braun A, Brusko TM, Joseph R, Bolisetty S, Wasserfall CH, et al. Suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells is dependent on expression of heme oxygenase-1 in antigen-presenting cells. The American journal of pathology. 2008;173(1):154-60.
17. Luo B, Que ZJ, Zhou ZY, Wang Q, Dong CS, Jiang Y, et al. Feiji Recipe inhibits the growth of lung cancer by modulating T-cell immunity through indoleamine-2,3-dioxygenase pathway in an orthotopic implantation model. Journal of integrative medicine. 2018;16(4):283-9.
18. Dimeloe S, Nanzer A, Ryanna K, Hawrylowicz C. Regulatory T cells, inflammation and the allergic response-The role of glucocorticoids and Vitamin D. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology. 2010;120(2-3):86-95.
19. Hrdy J, Kocourkova I, Prokesova L. Impaired function of regulatory T cells in cord blood of children of allergic mothers. Clinical and experimental immunology. 2012;170(1):10-7.
20. Zizka J, Hrdy J, Lodinova-Zadnikova R, Kocourkova I, Novotna O, Sterzl I, et al. Effect of breast milk of healthy and allergic mothers on in vitro stimulation of cord blood lymphocytes. Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology. 2007;18(6):486-94.
21. Hinz D, Bauer M, Roder S, Olek S, Huehn J, Sack U, et al. Cord blood Tregs with stable FOXP3 expression are influenced by prenatal environment and associated with atopic dermatitis at the age of one year. Allergy. 2012;67(3):380-9.
22. Sekiya T, Yamada H, Yamaguchi M, Yamamoto K, Ishii A, Yoshie O, et al. Increased levels of a TH2-type CC chemokine thymus and activation-regulated chemokine (TARC) in serum and induced sputum of asthmatics. Allergy. 2002;57(2):173-7.
23. Nguyen KD, Fohner A, Booker JD, Dong C, Krensky AM, Nadeau KC. XCL1 enhances regulatory activities of CD4+ CD25(high) CD127(low/-) T cells in human allergic asthma. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 2008;181(8):5386-95.
24. Smith M, Tourigny MR, Noakes P, Thornton CA, Tulic MK, Prescott SL. Children with egg allergy have evidence of reduced neonatal CD4(+)CD25(+)CD127(lo/-) regulatory T cell function. The Journal of allergy and clinical immunology. 2008;121(6):1460-6, e1-7.
25. Patel MM, Miller RL. Rapid DNA methylation changes after exposure to traffic particles: the issue of spatio-temporal factors. American journal of respiratory and critical care medicine. 2009;180(10):1030; author reply -1.
26. Miller RL, Ho SM. Environmental epigenetics and asthma: current concepts and call for studies. American journal of respiratory and critical care medicine. 2008;177(6):567-73.
27. Gregoriano C, Dieterle T, Breitenstein A, Durr S, Baum A, Maier S, et al. Use and inhalation technique of inhaled medication in patients with asthma and COPD: data from a randomized controlled trial. Respiratory research. 2018;19(1):237.
28. Ly NP, Ruiz-Perez B, McLoughlin RM, Visness CM, Wallace PK, Cruikshank WW, et al. Characterization of regulatory T cells in urban newborns. Clinical and molecular allergy : CMA. 2009;7:8.
29. Huehn J, Beyer M. Epigenetic and transcriptional control of Foxp3+ regulatory T cells. Seminars in immunology. 2015;27(1):10-8.
30. Liu J, Zhang L, Winterroth LC, Garcia M, Weiman S, Wong JW,



- et al. Epigenetically mediated pathogenic effects of phenanthrene on regulatory T cells. *Journal of toxicology*. 2013;2013:967029.
31. Steinborn A, Engst M, Haensch GM, Mahnke K, Schmitt E, Meuer S, et al. Small for gestational age (SGA) neonates show reduced suppressive activity of their regulatory T cells. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2010;134(2):188-97.
32. Schaub B, Liu J, Hoppler S, Schleich I, Huehn J, Olek S, et al. Maternal farm exposure modulates neonatal immune mechanisms through regulatory T cells. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2009;123(4):774-82.e5.
33. Joerink M, Oortveld MA, Stenius F, Rindsjo E, Alm J, Scheynius A. Lifestyle and parental allergen sensitization are reflected in the intrauterine environment at gene expression level. *Allergy*. 2010;65(10):1282-9.
34. Schaub B, Campo M, He H, Perkins D, Gillman MW, Gold DR, et al. Neonatal immune responses to TLR2 stimulation: influence of maternal atopy on Foxp3 and IL-10 expression. *Respir Res*. 2006;7:40.
35. Liu J, Lluís A, Illi S, Layland L, Olek S, von Mutius E, et al. T regulatory cells in cord blood--FOXP3 demethylation as reliable quantitative marker. *PloS one*. 2010;5(10):e13267.
36. Herberth G, Bauer M, Gasch M, Hinz D, Roder S, Olek S, et al. Maternal and cord blood miR-223 expression associates with prenatal tobacco smoke exposure and low regulatory T-cell numbers. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2014;133(2):543-50.
37. Schaub B, Liu J, Hoppler S, Haug S, Sattler C, Lluís A, et al. Impairment of T-regulatory cells in cord blood of atopic mothers. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2008;121(6):1491-9, 9.e1-13.
38. van Amelsfort JM, Jacobs KM, Bijlsma JW, Lafeber FP, Taams LS. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral
39. Thunberg S, Gafvelin G, Nord M, Gronneberg R, Grunewald J, Eklund A, et al. Allergen provocation increases TH2-cytokines and FOXP3 expression in the asthmatic lung. *Allergy*. 2010;65(3):311-8.
40. Segundo DS, Fernandez-Fresnedo G, Gago M, Beares I, Ruiz-Criado J, Gonzalez M, et al. Kidney transplant recipients show an increase in the ratio of T-cell effector memory/central memory as compared to nontransplant recipients on the waiting list. *Transplantation proceedings*. 2010;42(8):2877-9.
41. Law JP, Hirschhorn DF, Owen RE, Biswas HH, Norris PJ, Lanteri MC. The importance of Foxp3 antibody and fixation/permeabilization buffer combinations in identifying CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2009;75(12):1040-50.
42. Presicce P, Moreno-Fernandez ME, Lages CS, Orsborn KI, Chougnet CA. Association of two clones allows for optimal detection of human FOXP3. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2010;77(6):571-9.