

کاهش تولید $IFN-\gamma$ همراه با افزایش تولید IL 12 در بیماران مبتلا به بروسلوز مزمن

علیرضا رفیعی (Ph.D.)^{*} آمینا کریمی نیا (Ph.D.)^{**}
 ابوالقاسم عجمی (Ph.D.)^{***} سوسن کبودانیان اردستانی (Ph.D.)^{****}

چکیده

سابقه و هدف: بیماری بروسلوز یک بیماری عفونی قابل انتقال بین انسان و دام در سراسر جهان می باشد که با عود فراوان و قابلیت مزمن شدن مشخص می شود. از آنجا که پاسخ های ایمنی در بروسلوز انسانی کم تر بررسی شده است، در این مطالعه تولید سیتوکاین ها در افراد مبتلا به این بیماری و افراد سالم ارزیابی شده است.

مواد و روش ها: ۲۷ بیمار مبتلا به فرم حاد (۱۴ نفر) یا مزمن (۱۳ نفر) بروسلوز (با میانگین سنی $18/2 \pm$ و $38/03$ و ۲۲ فرد سالم (با میانگین سنی $21 \pm 35/33$) که از نظر سنی و جنسی با بیماران انطباق داشتند، بررسی شدند. نمونه های خون کامل رقیق شده در حضور یا عدم حضور میتوژن یا باکتری های کشته شده بروسلای تنسیس سویه Rev-1 کشت داده شد. مقدار IL-12, IL-10, IL-13, $IFN-\gamma$ با استفاده از ELISA ساندویچی اختصاصی و پاسخ های بلاستوژنیک لنفوسیت ها نیز توسط روش سنتیلاسیون مایع (LTT) ارزیابی گردید.

یافته ها: تولید $IFN-\gamma$ و پاسخ های پرولیفراتیو سلول های اختصاصی سلول های بیماران با بروسلوز مزمن در مقایسه با بیماران حاد به طور معنی دار کاهش داشت ($P < 0/05$) در حالی که تولید IL-12 در سوپ کشت سلولی بیماران مزمن بیش تر از گروه حاد بود ($P < 0/05$). در بیماران مزمن، تولید IL-10 نیز افزایش نشان داد ولی با تولید $IFN-\gamma$ ارتباطی نداشت.

استنتاج: نتایج این مطالعه نشان می دهد الگوی سیتوکاینی سلول های T اختصاصی بروسلای بیماران مبتلا به بروسلوز بین مراحل حاد و مزمن بیماری متفاوت می باشد. این یافته ها همچنین بیان می نماید که کاهش تولید سیتوکاین های Th1 و پاسخ های بلاستوژنیک سلول های T ممکن است ناشی از عدم پاسخ گویی سلول های T افراد مبتلا به بروسلوز مزمن در برابر آنتی ژن های بروسلای باشد.

واژه های کلیدی: بروسلوز انسانی، اینترلوکین ها، اینترفرون نوع ۲ (بتا) اینترکولین ۱۲، اینترکولین ۱۰

* متخصص ایمونولوژی و عضو هیأت علمی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی مازندران
 ** متخصص ایمونولوژی، کشت سلولی (استادیار) انستیتو پاستور ایران
 *** متخصص ایمونولوژی، آزمایشگاه ایمونولوژی، گروه بیوشیمی IBB (استادیار) دانشگاه تهران
 **** تاریخ دریافت: ۱۳۸۲/۴/۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۸۲/۵/۱۹ تاریخ تصویب: ۱۳۸۲/۱۱/۲۹
 ✉ ساری: بلوار خزر، روبروی انبار برق، دانشکده پزشکی
 *** متخصص ایمونولوژی و عضو هیأت علمی (دانشیار) دانشگاه علوم پزشکی مازندران

مقدمه

گونه‌های بروسلا، باکتری‌های گرم منفی و داخل سلولی اختیاری هستند که موجب بیماری جدی در حیوانات و انسان می‌شوند (۱). بیماری بروسلوز در اکثر کشورهای در حال توسعه، بومی می‌باشد و باعث زیان‌های فراوان در تولیدات دامی و سلامت جوامع انسانی می‌گردد (۲،۳). باکتری‌های بروسلا اغلب به سلول‌های سیستم رتیکوآندوتلیال هجوم می‌برند و می‌توانند در ماکروفاژهای آلوده مستقر در نقاط مختلف بدن از جمله طحال، مغز، قلب، کبد و مغز استخوان باقی بمانند (۴). در بین گونه‌های بروسلا، *B. abortus*، *B. suis*، *B. canis*، *B. melitensis* در انسان بیماری‌زا هستند (۵). بعد از ابتلاء، بیش‌تر بیماران وارد فاز حاد بیماری همراه با تب مواج می‌شوند که به سمت بهبودی یا به طرف مزمن شدن پیش می‌روند. ابتلاء به بروسلوز باعث فعال شدن پاسخ‌های ایمنی سلولی می‌گردد (۶). مطالعات در موش نشان می‌دهد که حفاظت در این بیماری توسط سلول‌های CD_4^+ T و CD_8^+ صورت می‌گیرد؛ در حالی که پاسخ‌های Th_2 در تشدید وخامت بیماری موثرند (۷). نقش سیتوکاین‌ها در برقراری مقاومت در این بیماری بیش‌تر در موش مطالعه شده است (۸،۹). اینترلوکین ۱۲ ($IL-12$) نقش به سزایی در ایجاد پاسخ‌های نوع Th_1 از طریق اینترفرون گاما ($IFN-\gamma$) و در نهایت پیدایش مقاومت در برابر عفونت‌های داخل سلولی دارد (۹،۱۰). اینترلوکین ۱۰ ($IL-10$) آندوژن نیز نقش موثری در کاهش ایمنی حفاظت دهنده در طی آلودگی با *B. abortus* دارد (۱۱). اینترفرون گاما ($IFN-\gamma$) یکی از عوامل مهم کنترل عفونت با پاتوژن‌های میکروبی داخل سلولی می‌باشد (۱۲،۱۳). تجویز $IFN-\gamma$ نو ترکیب به موش‌های BALB/c موجب افزایش مقاومت در برابر آلودگی با *B. abortus* می‌گردد؛ به طوری که یک هفته بعد از آلودگی تعداد باکتری‌های موجود در طحال

۱۰ برابر کاهش می‌یابد (۱۴،۱۵). $IFN-\gamma$ از طریق فعال نمودن عملکرد ضد بروسلایی ماکروفاژ به واسطه تشدید تولید واسطه‌های واکنشگر اکسیژن (ROIs) موجب افزایش مقاومت می‌شود (۱۳). اینترلوکین ۱۳ همانند $IL-4$ موجب کاهش پاسخ‌های Th_1 می‌گردد (۱۵،۱۶). تحقیقات در موش نشان می‌دهند که $IL-13$ نقش بسزایی در افزایش وخامت عفونت جلدی لیشمانیازیس داشته و یکی از عوامل مهم در افزایش دوره ازمان بیماری می‌باشد (۱۶). علی‌رغم مطالعات نسبتاً زیاد در مورد نقش سیتوکاین‌ها در بروسلوز موشی، دانسته‌های بشر در مورد پاسخ‌های ایمنی سلولی در انسان بسیار اندک (۱۷،۱۸) و متناقض می‌باشد (۲،۱۴). در بیش‌تر بیماری‌های حاصل از باکتری‌های داخل سلولی تغییرات $IFN-\gamma$ و $IL-12$ همسو گزارش گردیده است؛ به طوری که در بیماری سل پیشرفته کاهش این دو سیتوکاین کلیدی با وخامت بیماری ارتباط نزدیک دارد (۱۹،۲۰). این مطالعه علاوه بر این که پاسخ‌های ایمنی سلولی Th_1 و Th_2 را در بیماران مبتلا به بروسلوز بررسی می‌نماید، تلاش دارد تا روشی ساده برای ارزیابی پاسخ‌های ایمنی در خون کامل معرفی نماید. استفاده از خون کامل به عنوان نمونه آغازین موجب می‌شود تا نتایج آزمایشگاهی (*In vitro*) قرابت بیش‌تری با وضعیت پاسخ‌ها در شرایط بدن داشته باشد (۲۱ تا ۲۳).

مواد و روش‌ها

کیت‌های $IFN-\gamma$ و $IL-13$ از شرکت Bender Med System اتریش تهیه گردید. پانسوربین (Pansorbin)، باکتری‌های کشته *Staphylococcus aureus* سویه Cowan-1، از شرکت Calbochem (دارمستات، آلمان) خریداری شد. کیت‌های OptEIA برای شناسایی $IL-12$ و $IL-10$ از

شرکت Pharmingen، سانتیاگو، آمریکا، پلیت‌های کشت سلولی ۲۴ و ۹۶ چاهکی و همین‌طور پلیت‌های الیزا از شرکت Maxisorp (Nunc دانمارک) خریداری شد. باکتری بروسلا ملی تنسیس سویه واکسنی Rev-1 توسط دکتر ذوقی از موسسه واکسن و سرم سازی رازی (حصارک، کرج) اهدا گردید.

این مطالعه بر روی ۲۷ بیمار (۱۲ نفر زن، ۱۵ نفر مرد) با میانگین سنی $18/2 \pm 38/03$ سال که ابتلای آن‌ها به بروسلاز از نظر آزمایشگاهی و بالینی محرز گردید، انجام شد. از این تعداد، ۱۴ نفر به بروسلاز حاد و ۱۳ نفر به بروسلاز مزمن مبتلا بودند. هیچ یک از بیماران مورد مطالعه شواهدی مبنی بر ابتلا به سایر بیماری‌های عفونی غیر از بروسلاز یا بیماری‌های التهابی قبل یا در طی مطالعه نداشتند. همچنین هیچ کدام از بیماران مورد نظر قبل از ورود به مطالعه تحت درمان با داروهای ضد التهاب مثل کورتیکواستروئیدها یا سایر آنتی بیوتیک‌ها غیر از داروهای انتخابی در درمان تب مالت قرار نداشتند. علاوه بر این ۲۲ نفر از داوطلبین سالم که از نظر سنی و جنسی با بیماران نزدیک بودند (۱۰ نفر زن و ۱۲ نفر مرد، با میانگین سنی $35/33 \pm 21$ سال و تحت هیچ درمانی قرار نداشتند، به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. ابتلا به بروسلاز براساس علائم و نشانه‌های بالینی و آزمایش‌های سرولوژی و باکتری شناسی تعیین گردید. تشخیص بروسلاز حاد براساس دوره بیماری (کم‌تر از شش ماه) و علائم و نشانه‌های بالینی و یافته‌های آزمایشگاهی (کشت خون مثبت و یا تیتراژ آنتی بادی برابر یا بیش‌تر از $\frac{1}{320}$ در آزمایش رایت (STA) یا افزایش دو برابر در تیتراژ STA یا 2-ME به فاصله دوهفته انجام شد (۱۷، ۱۸). مرحله ازمان بیماری نیز به واسطه تب پایین، علائم موضعی بیماری و خستگی و ضعف مفرط و دوره بیماری (بیش‌تر از شش ماه) و عدم پاسخ مناسب به درمان‌های رایج و یافته‌های

آزمایشگاهی مشخص گردید (۲۴). تمامی افراد مطالعه بعد از اطلاع یافتن از ماهیت و اهداف طرح، فرم رضایت‌نامه را که براساس دستورالعمل‌های کمیته اخلاق پزشکی وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی مبنی بر اجازه اخذ خون، تنظیم شده بود، امضاء کردند. نمونه‌های خون با استفاده از لوله‌های خلا دار استریل (venipuncture) دارای ماده ضد انعقاد هپارین سدیم (10 IU/ml) اخذ گردید. نمونه‌ها در کم‌تر از ۴ ساعت بعد از نمونه‌گیری، مورد آزمایش قرار گرفتند. سنجش پرولپراسیون لنفوسیتی در خون کامل براساس روش اصلاح شده Bloemena و piekoszew انجام گردید (۲۵، ۲۶). به طور خلاصه نمونه‌های خون کامل با استفاده از محیط کشت کامل RPMI1640 حاوی ۳ درصد سرم گوساله نوزاد (FCS) (سیگما، سدگس، فرانسه)، 2mM -L گلوتامین (سیگما، Cedex، فرانسه)، ۱۰۰ IU/ml پنی سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین (سیگما سدگس، فرانسه) در لوله‌های فالكون ۱۵ میلی لیتری استریل مخصوص کشت سلولی (مارتون، لندن، انگلستان) پنج برابر رقیق گردید.

نمونه‌های خون کامل رقیق شده در حضور یا عدم حضور فیتوهاگلوتنین (۲/۵ µg/ml, PHA) سیگما، سدگس، فرانسه) یا باکتری‌های کشته شده بروسلا ملی تنسیس سویه Rev-1 (1×10^6 CFU/ml) در پلیت‌های کشت سلولی ۹۶ چاهکی ته گرد به مدت ۷۲ ساعت در اتمسفر حاوی 5% CO₂ در دمای ۳۷°C کشت داده شد. ۱۸ ساعت قبل از اتمام زمان انکوباسیون به هر چاهک $0.5 \mu\text{Ci}$ از ^3H - تیمیدین نشان‌دار با فعالیت ویژه 5Ci/mMol (آمرشام، بوکینگ همشایر، انگلستان) موجود در ۲۰ µL محیط کشت اضافه گردید. سپس سلول‌ها توسط دستگاه هاروستر و با استفاده از آب مقطر به داخل فیلترهای پشم و شیشه‌ای شسته شده و بعد از خشک شدن فیلترها، مقدار تیمیدین نشان‌دار وارد شده

ضد IL-10, IL-12, IL-13 یا IFN- γ کونزوگه با بیوتین ارزیابی شد.

داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نمایش داده شده است. برای مقایسه بین گروه‌ها از آزمون یک طرفه One-Way ANOVA استفاده شد. بررسی ارتباط بین پارامترها با استفاده از ضریب همبستگی پیرسون انجام گرفت. اختلافات بیش‌تر از ۹۵٪ دامنه اطمینان در تمام آزمایشات با مقدار $P < 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد. برای آنالیز داده‌ها از نرم افزار SPSS استفاده گردید.

یافته‌ها

پاسخ ایمنی سلولی گروه‌های مختلف در مقابل آنتی ژن‌های (Ags) اختصاصی بروسلا در آزمایشگاه بررسی گردید. همان‌طور که در نمودار شماره یک A دیده می‌شود، اندیکس تحریک (SI) اختصاصی Ag‌های بروسلا در بیماران مبتلا به بروسلاز حاد $3 \pm 12/06$ می‌باشد که به طور معنی‌دار بیش از پاسخ بیماران با بروسلاز مزمن است ($2 \pm 3/95$). اختلاف در پاسخ‌های پرولیفراتیو به علت تفاوت در پاسخ‌های زمینه‌ای نمی‌باشد؛ به طوری که کشت‌های تحریک نشده (کنترل) در بین سه گروه اختلاف معنی‌داری نداشت (داده‌ها نشان داده نشده است). لنفوسیت‌های تمام گروه‌ها در پاسخ به میتوزن PHA تکثیر و تزايد می‌یابند، ولی پاسخ بیماران حاد نسبت به گروه مزمن و شاهد، بیش‌تر می‌باشد ($P < 0.05$) (نمودار شماره ۱ B). با این وجود لنفوسیت‌های افراد سالم در پاسخ به آنتی‌ژن‌های بروسلا تکثیر و تزايد نشان نمی‌دادند ($0.46 \pm 1/69$).

به منظور بررسی تاثیر اختلاف در الگوی ترشح سیتوکاینی در پاسخ سلولی بین بیماران مبتلا به فرم حاد و مزمن بروسلاز، مقادیر تولید اختصاصی (تحریک آنتی‌ژنی) و غیر اختصاصی (تحریک میتوزنیک)

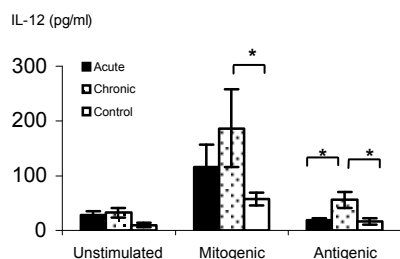
در DNA توسط دستگاه کانتر سنیتیلایسون مایع (بتاکانتر) (فارماسیا، گایترسبرگ، مریلند آمریکا) شمارش گردید. نتایج به صورت اندیکس تحریک (SI) ارائه شده است که به صورت زیر محاسبه گردید.

$$\text{شمارش در دقیقه (CPM) چاهک تحریک شده} = \frac{\text{شمارش در دقیقه (CPM) چاهک تحریک نشده}}{\text{اندکس تحریک}}$$

SI بیش‌تر از 2/5 به عنوان مثبت قلمداد شد. جهت بررسی تولید IL-12 نمونه‌های خون رقیق شده در حضور یا عدم حضور پانسورین ۱ درصد (pansorbin)، باکتری‌های کشته بروسلا ملی تنسیس سویه واکسنی Rev-1 (1×10^7 CFU/ml) یا محیط کشت تنها، در پلیت ۹۶ چاهگی ته گرد در اتمسفر حاوی CO₂ ۵ درصد در دمای ۳۷°C کشت داده شد. ۲۴ ساعت بعد سوپ هریک از چاهک‌ها جمع‌آوری شده و در فریزر ۷۰°C- تا زمان آزمایش نگهداری گردید. جهت بررسی تولید IL-10، IL-13، IFN- γ ، نمونه‌های خون رقیق شده در پلیت‌های کشت ۲۴ چاهگی پلی استیرنی ته صاف در حضور یا عدم حضور فیتوهاگلوتنین (PHA) $2/5 \mu\text{g/ml}$ ، باکتری‌های کشته بروسلا تنسیس سویه Rev-1 (1×10^7 CFU/ml) در اتمسفر مرطوب حاوی CO₂ ۵ درصد در دمای ۳۷°C کشت داده شد. سوپ کشت‌های سلولی بعد از گذشت ۷۲ ساعت جمع‌آوری و تا زمان آزمایش در فریزر ۷۰°C- نگهداری شد.

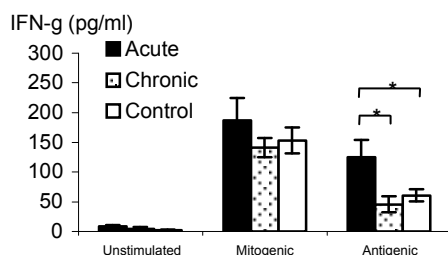
از روش ELISA ساندویچی برای اندازه‌گیری مقدار IL-10 و IL-12 (فارمیژین، هایدلبرگ، آلمان) و IFN- γ (شرکت Bender Med System اتریش) در سوپ کشت سلولی براساس دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. با استفاده از پروکسیداز کونزوگه با استروپتوویدین (Stereptavidin peroxidase) و سوپسترای ABTS (2,2-آزینوبیس(۳-اتیل بنزوتیازولین)-سولفونیک اسید) میزان اتصال آنتی بادی‌های

تنسیس سویه Rev-1 (نمودار B) * و ** به ترتیب نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با $P < 0.05$ و $P < 0.001$ می‌باشد)



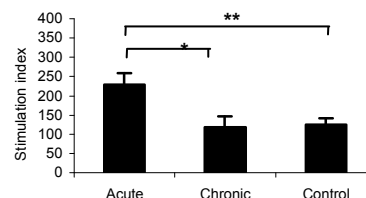
نمودار شماره ۲: IL-12 در سوپ کشت سلول‌های خون کامل بیماران مبتلا به بروسلوزیس حاد و مزمن و افراد شاهد سالم بر حسب تحریک غیراختصاصی با میتوژن پانسورین یا تحریک اختصاصی با باکتری‌های کشته پروسلا مالی تنسیس سویه Rev-1 (* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با $P < 0.05$ می‌باشد).

نمودار شماره ۳: نتایج تولید $\text{IFN-}\gamma$ را نشان می‌دهد. همان‌طور که انتظار می‌رفت PHA باعث تولید مقادیر زیاد $\text{IFN-}\gamma$ در تمامی گروه‌ها گردید. افراد شاهد نسبت به آنتی ژن پاسخ داده و میانگین تولید $\text{IFN-}\gamma$ در آن‌ها $10.43 \pm 6.91 \text{ pg/ml}$ است. تحریک آنتی‌ژنی باعث افزایش (Up-regulation) تولید $\text{IFN-}\gamma$ در بیماران مبتلا به بروسلوز حاد می‌شود. در حالی که تولید این سیتوکاین در بیماران مزمن کاهش معنی‌دار می‌یابد؛ به طوری که میانگین تولید $\text{IFN-}\gamma$ در افراد با بروسلوز حاد و مزمن به ترتیب $28.42 \pm 12.57 \text{ pg/ml}$ و $13.46 \pm 4.56 \text{ pg/ml}$ است (نمودار شماره ۳).

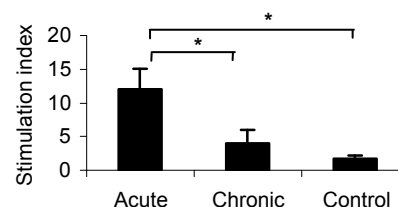


نمودار شماره ۳: تولید $\text{IFN-}\gamma$ در سوپ کشت سلول‌های خون کامل بیماران مبتلا به بروسلوزیس حاد و مزمن و افراد شاهد سالم

IL-13 , IL-10 , IL-12 , $\text{IFN-}\gamma$ در سوپ کشت سلولی ارزیابی گردید. این سیتوکاین‌ها بدین لحاظ که پاسخ‌های سلول‌های T را در شرایط خارج بدن (In vitro) تنظیم می‌نمایند، انتخاب گردیدند. همان‌طور که در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است، تحریک میتوژنیک با پانسورین باعث تولید مقادیر زیاد IL-12 در سلول‌های جدا نشده خون کامل تمامی گروه‌ها گردید. در حالی که تولید اختصاصی IL-12 در هر دو گروه از بیماران نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌دار بیش‌تر می‌باشد. علاوه بر این، تولید IL-12 در پاسخ به آنتی‌ژن‌های پروسلا در بین دو گروه حاد و مزمن تفاوت قابل توجهی را نشان می‌دهد؛ به طوری که میانگین مقدار این سیتوکاین در افراد با بروسلوز مزمن $14.88 \pm 5.60 \text{ pg/ml}$ می‌باشد که با مقدار آن در افراد با بروسلوز حاد $18.91 \pm 3.46 \text{ pg/ml}$ تفاوت معنی‌دار می‌یابد ($P < 0.05$) (نمودار شماره ۲).



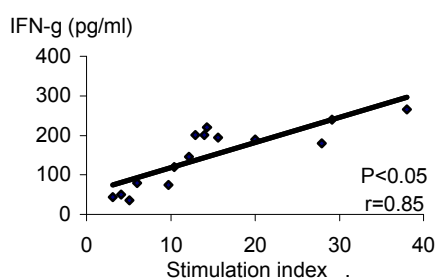
نمودار یک A



نمودار یک B

نمودار شماره ۱: پاسخ‌های پرولیفراتیو (SI) لنفوسیت‌های خون محیطی در گروه‌های تحت مطالعه بر حسب تحریک غیراختصاصی با PHA (نمودار A) و اختصاصی با باکتری‌های کشته شده پروسلا ملی

سنی و توزیع جنسی هر دو گروه مشاهده نشد. هر دو گروه دارای رژیم درمانی یکسانی بوده و هیچ کدام از بیماران عوامل تضعیف سیستم ایمنی با دارویی که باعث تغییر در شمارش لکوسیتی شود را مصرف نمی کردند. همان‌طور که در نمودار شماره ۵ نشان داده شده است، تولید $\text{IFN-}\gamma$ با پاسخ‌های بلاستوزنیک در بیماران مبتلا به بروسلوز ارتباط مستقیم دارد؛ به طوری که در بیماران حاد هر دو متغیر به طور معنی‌داری ($P < 0.05$) افزایش داشته ($r = 0.85$) (Up-regulation). حال آن‌که این ارتباط در بیماران با بروسلوز مزمن معنی‌دار نمی‌باشد. بین مقادیر تولید IL-10 و $\text{IFN-}\gamma$ هر دو گروه از بیماران ارتباط معنی‌دار مشاهده نشد.



نمودار شماره ۵: همبستگی تولید اختصاصی $\text{IFN-}\gamma$ و پاسخ‌های تکثیر و تزاید لنفوسیت‌های خون محیطی بیماران مبتلا به بروسلوز حاد. همان‌طور که دیده می‌شود بین پاسخ‌های تکثیر و تزاید (SI) لنفوسیت‌ها و تولید اختصاصی $\text{IFN-}\gamma$ در سوپ کشت سلولی خون کامل بیماران مبتلا به بروسلوز حاد همبستگی واضح و مثبت $P < 0.05$ و $r = 0.85$ دیده می‌شود.

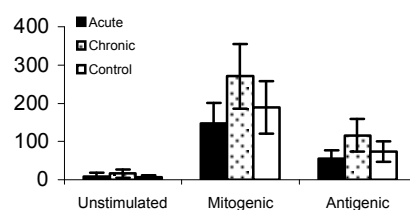
بحث

گونه‌های بروسلوز معمولاً در سلول‌های رتیکولوآندوتلیال تکثیر می‌یابند و پیدایش ایمنی بستگی به پاسخ مناسب سلول‌های میزبان و تولید سیتوکاین‌های $\text{IFN-}\gamma$ و IL-12 دارد (۱۳، ۱۲). به خوبی مشخص شده است که اجزاء ایمنی ذاتی نقش به سزایی در مراحل اولیه ورود عامل عفونی به بدن دارند (۱۰). به همین

در پاسخ به تحریک غیر اختصاصی با میتوژن PHA یا تحریک اختصاصی با باکتری‌های کشته بروسلای ملی تنسیس سویه Rev-1 (* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با $P < 0.05$) می‌باشد).

برخلاف نتایج $\text{IFN-}\gamma$ ، تولید IL-10 در افراد با بروسلوز مزمن نسبت به بیماران مبتلا به فرم مزمن افزایش نشان می‌دهد؛ هرچند این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نیست ($P < 0.061$). میانگین تولید IL-10 در بیماران مبتلا به بروسلوز حاد و مزمن و افراد شاهد سالم به ترتیب 20.60 ± 5.71 ، 43 ± 115.87 ، 26.57 ± 74.14 می‌باشد (نمودار شماره ۴).

IL-10 (pg/ml)



نمودار شماره ۴: IL-10 در سوپ کشت سلول‌های خون کامل بیماران مبتلا به بروسلوز حاد و مزمن و افراد شاهد در پاسخ تحریک غیراختصاصی با میتوژن PHA یا تحریک اختصاصی با باکتری‌های کشته بروسلای ملی تنسیس سویه Rev-1.

مقدار تولید اختصاصی IL-13 در تمام گروه‌های تحت مطالعه به قدری کم بود که در بررسی با آزمون ELISA اختلافی مشاهده نشد (نتایج نشان داده نشده است) ولی با بررسی تولید داخل سلول سیتوکاین‌ها با فلوسیتومتری افزایش تولید IL-13 در بیماران مزمن دیده شد (داده‌ها منتشر نشده است).

به منظور تعیین عوامل مربوط به کاهش تکثیر و تزاید سلولی و تولید سیتوکاین‌های Th1 در پاسخ به آنتی ژن‌های بروسلای در بیماران مبتلا به اشکال حاد و مزمن بروسلوز، برخی از پارامترهای اساسی بین دو گروه بیمار مقایسه گردید. اختلاف معنی‌داری بین میانگین

خاطر، در مطالعه حاضر از کشت خون کامل استفاده گردید تا هم تصویر بهتر و واقعی تر از پاسخ های ایمنی بدن در شرایط آزمایشگاه (In vitro) به دست آید و هم بتوان روشی ساده، سریع و ارزان برای ارزیابی پاسخ های ایمنی به ویژه در مواردی که حجم نمونه به دلایل فیزیولوژیک (اطفال و افراد کهنسال) یا پاتولوژیک (بیماران با نقص ایمنی یا کمبودهای خونی) کم است، در آزمایشگاه های تشخیص طبی ارائه نمود (۲۱ تا ۲۳، ۲۸، ۲۷). علاوه بر این در این مطالعه از باکتری های کشته بروسلا ملی تنسیس به عنوان آنتی ژن استفاده گردید، چون در مطالعات قبلی ما و دیگران مشخص شده است که لیپولی ساکارید (LPS) استخراج شده از این ارگانسیم توانایی ایجاد IFN- γ و IL-12 را در انسان دارند (۲۹، ۱۰). همان طور که نتایج نشان می دهند پاسخ پرولیفراتیو لنفوسیت های T در مقابل میتوز در بیماران با بروسلا حاد یا مزمن قابل مقایسه با گروه شاهد می باشد. پاسخ بلاستوژنیک سلول های بیماران مزمن در برابر Ags بروسلا در مقایسه با گروه حاد به طور قابل توجهی کم تر است. تولید اختصاصی IFN- γ در تمام گروه های مطالعه از جمله گروه شاهد در مقایسه با کشت های بدون تحریک آنتی ژنی، افزایش معنی داری نشان می دهد. با این وجود، تولید IFN- γ در گروه حاد به مراتب بسیار بیش تر از گروه های مزمن و افراد شاهد می باشد.

تولید اختصاصی IFN- γ توسط لنفوسیت های افراد شاهد مطالعه قبلی ما و سایر گزارش ها که نشان می دهد باکتری های کشته شده بروسلا دارای توانایی القای سیتوکاین های Th1 نظیر IFN- γ در انسان هستند را تایید می کند (۲۸، ۲۷، ۱۰).

کاهش تولید IFN- γ و پاسخ های بلاستوژنیک در طی دوره ازمان بیماری (گروه مزمن) با نتایج Guillermo (۲۰۰۲) نیز همراستا می باشد (۲۴)، به طوری

که نتایج آن تحقیق و تحقیقات دیگر بیانگر تنظیم کاهشی پاسخ های Th1 به دنبال بقاء و استقرار داخل سلولی باکتری در طی فاز مزمن بیماری است (۳۰). همچنین Bertotto و همکاران (۱۹۹۳) نشان دادند که لنفوسیت های T $\gamma\delta$ بیماران مبتلا به بروسلا حاد در پاسخ به آنتی ژن های بروسلا به شدت تزايد می یابند و مقادیر فراوانی IFN- γ و IFN- α تولید می نمایند، ولی این پاسخ ها در طی مرحله مزمن بیماری شدیداً کاهش می یابند (۳۱). به عبارت دیگر، بین تمامی گروه های این مطالعه تفاوتی در تولید غیراختصاصی (میتوژنیک) IFN- γ دیده نشد. این یافته با گزارشی که نشان می دهد پاسخ میتوژنیک سلول های T و تولید غیراختصاصی IFN- γ در طی مرحله حاد بیماری کاهش می یابد و بعد از درمان آنتی بیوتیکی طبیعی می شود، همخوانی ندارد (۳۲). قرار داشتن بیماران این مطالعه تحت رژیم درمانی آنتی بیوتیکی، می تواند علت این اختلاف باشد. بنابراین، عدم پاسخ گویی بیماران مزمن به علت اختلال عمومی در پاسخ های ایمنی نبوده بلکه ناشی از اختلال در پاسخ ایمنی اختصاصی بروسلا می باشد.

اینترلوکین ۱۲ باعث تحریک پاسخ های ایمنی ضد تومور و ایمنی سلولی در مقابل پاتوژن های داخل سلولی می شود، این اثرات از طریق فعال کردن لنفوسیت ها ماکروفاژها و سلول های دندریتیک در جهت تولید IFN- α و IFN- γ افزایش فعالیت سیتولیتیک سلول های NK و T تولید نیتریک اکسید و آنژیوتنژ وابسته به IFN- γ انجام می گیرد (۳۳، ۵، ۴). یافته های این مطالعه نشان می دهد که مقادیر IL-12p70 در سوپ کشت سلول های خون کامل تحریک نشده هر دو گروه از بیماران نسبت به افراد شاهد زیاد می باشد. این یافته ها مهر تاییدی بر مطالعات قبلی است که بیانگر حضور مقادیر فراوان IL-12 در سرم بیماران مبتلا به بروسلا می باشد (۲). با این حال، برخلاف نتایج IFN- γ تولید

اختصاصی IL-12p70 در بیماران با بروسلوز مزمن به طور قابل ملاحظه‌ای بیش‌تر از بیماران حاد و افراد سالم است. تمامی گروه‌های مطالعه پاسخ مناسبی در برابر پانسوربین، القاگر IL-12، داشتند. تحقیقات مختلف نشان می‌دهد که نقص در IL-12 با بیان زنجیره $\beta 2$ از گیرنده IL-12 به طور قطع با بروز عفونت‌های داخل سلولی همراه است (۳۳). قابلیت IL-12 در تحریک تولید IL-12 و تکثیر و ترایید سلولی در برخی از بیماران مبتلا به عفونت‌های داخل سلولی شدیداً کاهش می‌یابد (۳۴،۸). بنابراین ناتوانی بیماران با بروسلوز مزمن در کنترل بیماری به طور واضح ناشی از اختلال در تولید IL-12 نیست. کاهش تولید IFN- γ در بیماران با بروسلوز مزمن علی‌رغم وجود مقادیر زیاد IL-12 ممکن است ناشی از وقوع موتاسیون در ژن $\beta 1$ از گیرنده IL-12 باشد که موجب می‌شود قابلیت IL-12 در تقویت فعالیت سیتوتوکسیسته لنفوسیت‌ها کاهش یابد. این نتایج با گزارش‌هایی که نشان می‌دهد ترشح IFN- γ توسط سلول‌های طحالی موش‌های BALB/c آلوده که در آزمایشگاه با باکتری‌های کشته بروسلا تحریک شده‌اند، سه هفته بعد از شروع عفونت متوقف می‌شود ولی تولید IL-12 همچنان ادامه می‌یابد، هماهنگی دارد (۶).

وضعیت تولید IL-10 نیز در این مطالعه بررسی گردید، زیرا این سیتوکاین Th2 نه تنها به عنوان سیتوکاین مهارکننده تولید IFN- γ و دارای خواص قوی غیرفعال‌سازی ماکروفاژها می‌باشد، بلکه دارای تاثیر مهاری قوی نیز بر تولید IL-12 و کاهش بروز IL-12R $\beta 2$ است (۱۰،۸). هرچند بین تولید IL-10 در دو گروه بیمار اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد، میانگین تولید آن در بیماران مزمن به مراتب بیش‌تر از بیماران حاد می‌باشد. افزایش تولید IL-10 در بیماران مزمن نسبت به بیماران حاد بیانگر تاثیر کاهشی این سیتوکاین بر تولید IFN- γ در این گروه است. این یافته‌ها با

گزارشی که نشان می‌دهد IL-10 با تاثیر مهاری بر عملکرد ماکروفاژها و تولید سیتوکاین حفاظت‌دهنده IFN- γ موجب کاهش پاسخ ایمنی در مقابل B.abortus در موش می‌شود، همراستا است (۱۰). با این وجود بین مقادیر IL-10 و IFN- γ در هیچ یک از گروه‌های بیمار ارتباطی معنی‌دار مشاهده نشد.

نتایج این مطالعه بیانگر بروز پاسخ‌های Th1 همراه با پروليفراسیون سلولی و تولید IFN- γ در بیماران با بروسلوز حاد است؛ در حالی که در بیماران مزمن این چنین نیست. در نهایت کاهش تولید IFN- γ و طولانی شدن روند بیماری در افراد مزمن را می‌توان ناشی از کاهش پاسخ‌گویی سلول‌های T اختصاصی آنتی ژن‌های بروسلا دانست که می‌تواند ناشی از موارد زیر باشد:

- ناتوانی IL-12 در جهت فعال کردن مولکول‌های انتقال پیام STAT1، 3 و 5 (۳۴).

- به لحاظ این که کارایی مناسب IL-12 نیازمند همراهی در هر دو جزء آن (P40, P70) می‌باشد، به نظر می‌رسد تولید مقادیر زیاد p40 در سیر بیماری بروسلوز به واسطه اشغال IL-12 بدون داشتن فعالیت - زیستی مناسب، موجب ممانعت از اتصال تحت واحدهای کارآمد شده و باعث عدم کارایی مقادیر زیاد IL-12 اندازه‌گیری شده در بیماری مزمن می‌شود (۴).

- تولید مقادیر زیاد سیتوکاین IL-10 در بیماران مزمن باعث کاهش تولید IFN- γ و همین‌طور کاهش بروز زنجیره $\beta 2$ از گیرنده IL-12 می‌گردد (۱۰).

- افزایش تولید اینترلوکین ۱۳ در بیماران مزمن (داده‌های منتشر نشده) به لحاظ داشتن خواص ضدالتهابی قوی و کاهش عملکرد ماکروفاژها نظیر کاهش تولید IL-12، کاهش تولید آنزیم نیتریک اکسید سنتاز القایی (۱۶) و افزایش تولید IL-10 می‌تواند باعث گرایش پاسخ‌های ایمنی به سمت Th2 و در نهایت طولانی شدن بیماری در این گروه گردد (۱۵).

سلول‌های SC₄T در اثر وقوع آپوپتوز باشد.

- کاهش تولید IFN- γ و پاسخ‌های بلاستوژنیک در بیماران مزمن ممکن است ناشی از کاهش گسترده

فهرست منابع

1. Enright FM. The pathogenesis and pathobiology of brucella infection in domestic animals, P. 301-320: Nielsen K, and Duncan JR.(ed), *Animal brucellosis*. CRC press, Inc, boca raton, fla, 1990.
2. Ahmed K, Al- matrouk KA, martinz G, Oishi K, Rotimi VO, Nagatake T. Increased serum levels of interferon gamma and interleukin -12 during human brucellosis. *Am J Trop med hyg* 1999; 61: 425-417.
3. Young EJ, Human brucellosis. *Rev infect dis* 1983; 5: 821-842.
4. Fernandez Lago L, Rodriguz- tarazona R, vizcaino N. differential secretion of interleukin-12 (IL-12) subunits and heterodimeric IL-12p70 protein by DC-1 mice and murine macrophages in response to intracellular infection by brucella abortus. *J. med microbial* 1999; 48: 1065-1073.
5. Pasquili P, Adone R, Gasbarre L, C, pistoia C, Ciuchini F. effect of exogenous interleukin -18 and IL-12 in the course of brucella abortus 2308 infection in mice. *Clin and Dig Lab immunol*. 2002, 9: 491-492.
6. Murphy E.A, Sathiyaseelan J, Parent M.A, Zou B, Baldwin C.L. Interferon- γ is crucial for surviving a brucella abortus infection in both resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice. *Immunol*. 2001, 103:511-518.
7. Zhan Y, kelso A, cheers C. Differential activation of brucella- reactive CD4+ T cells by brucella infection or immunization with antigenic extracts. *Infect immune* 1995; 63: 969-975.
8. Zhan Y, Liu Z, Cheers C. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-12 contribute to resistance to the intracellular bacterium brucella abortus by different mechanisms. *Infect Immun* 1996; 64: 2782-2788.
9. Zhan Y, Cheers C. Endogenous interleukin-12 is involved in resistance to brucella abortus infection. *Infect Immun* 1995; 63: 1387-1390.
10. Kariminia A, Kavossy G, Khatami S, Zowghi E, Ardestani SK. Study of interleukin-10 and interleukin-12 productions in response to lipopolysaccharides extracted from two different brucella strains. *Comparative Immunol microbial infect Dis* 2002; 25: 85-93.
11. Ferenandes DM, Baldwin CL. Interleukin-10 down regulates protective immunity to brucella abortus. *Infect immune* 1995; 63: 1130-1133.

12. Hoover DL, Crawford RM, Van De verg LL, Izadio MJ, Bhattacharjee AK, Paranaivitana CM, Warren RL, Nikolich MP, Hadifield TL. Protection of mice against brucellosis by vaccination with brucella melitensis WR201 (16M A Pur EK). *Infect Immun* 1999; 67: 5877- 5884.
13. Pasqual P, Adone R, Gasbarre LC, Pistoia C, Ciuchini F. mouse cytokine profiles associated with brucella abortus RB51 vaccination or B. abortus 2308 infection. *Infect Immun* 2001; 69: 6541- 6544.
14. Jiang X, Baldwin CL. Effects of cytokines on intracellular growth of brucella abortus. *Infect immune* 1993; 61: 124-134.
15. Doyle A.G, Herbrin G, Montaner LJ, Minty A.J, Caput D, Ferrara P, Gordon S. Interleukin 13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: comparison with interleukin-4 and interferon- gamma. *Eur J Immunol* 1994; 24: 1441-1445.
16. Alexander J, Brombecher F, McGachy H.A, McKenzie A.N.J, Walker W, Carter C. An for IL- 13 in maintaining a non-healing response following leishmania mexicana infection. *Eur. J. Immunol.* 2002, 32: 2923-2933.
17. Salmeron I, Rodriguez Zapata M, Salmeron O, manzano L, Vaquer S, Alvarez Mon- M. Impaired activity of natural killer cells in patients with acute brucellosis. *clin infect Dis* 1992; 15: 764- 770.
18. Moreno- Lafont MC, Lopez Merino A, Lopez Santiago R. Cell response to a salt extratable and sonicated brucella melitensis 16M antigen in human brucellosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995; 2: 377-380.
19. Jones SM, Winter AJ. Survival of virulent and attenuated strains of brucella abortus in normal and gamma- interferon activated murine peritoneal macrophages. *Infect Immun.* 1992; 60: 3011-3014.
20. Ladel CH, Szalay G, Riedel D, Kaufman SHE. Interleukin-12 secretion by Mycobacterium tuberculosis infected macrophages. *Infect Immun.* 1997; 65: 1936- 1938.
21. Swwak AJ, Van den brink HG, Aarden LA. Cytokine production in whole blood cell cultures of patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 1997; 56: 693- 695.
22. Szopinski J, Von Kleist S, Panorka A. Secretion of interleukin- 2 and interferon (IFN-gamma) in whole blood cell culture stimulated with mitogen in patients with lung neoplasms. *Pneumolol. Alergon, Pol;* 1999; 67: 504-510.
23. Van grevel R, Van der ven- jongerkriig J, Netea MC. Disease specific ex vivo stimulation of whole blood for cytokine production applications in the study of tuberculosis. *J. Immunol Methods.* 1999; 145-153.

24. Giambartolomei GH, Delpino M.V. Diminished production of T helper 1 cytokines correlated with T cell unresponsiveness to brucella cytoplasmic proteins in chronic human brucellosis. *J. Infect Dis* 2002; 186: 252-259.
25. Bloemena E, Roos MLT, Van heijst JLAM. Whole blood lymphocyte cultures. *J Immunol Methods*. 1989; 122: 161- 167.
26. Piekoszewski W, Chow FS, Jusko WJ. Inhibition of phtohaemagglutinin-induced lymphocyte proliferation by immunosuppressive drugs. Use of whole blood cultures. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 1994; 16: 389- 401.
27. Hermann C, Von aulock S, Graf K, hartung T. a model of human whole blood lymphokine release for in vitro and ex vivo use. *J. immunol methods*. 2003; 725: 69-79.
28. Nomural L.E, Walker J.M, Macker H.T. optomization of whole blood antigen specifice cytokine assays for CD4+ cells *cytometry*. 2000; 40: 60- 68.
29. Baldwin C.L, Parent M. Fundamentals of host immune response against brucella abortus: what the mouse model has revealed about control of infection. *Bet microbial* 2002; 90: 367- 382.
30. Rodriguez- Zapata M, Alvarez mon M, Salmeron I, Prieto A, Manzano L, Salmeron OJ, Carballido J. Diminished T lymphocyte proliferation response to polyclonal mitogens in acute brucellosis patients. *Infection* 1996; 24: 15-120.
31. Bertotto A, Gerli R, Spinozzo F. Lymphocytes bearting the γ T cells impair intracellular multiplication of brucella melitensis infection. *Eur J Immunol* 1993; 23: 1177- 1180.
32. Rodrigues- Zapata M, Alvarez- mon M, Salmeron I. Diminshed T lymphocyte proliferative response to polyclonal mitogens in acute brucellosis patients. *Infection* 1996; 24: 115-120.
33. Zhan Y, Cheers C. control of IL-12 and IFN- γ production in response to live dead bacteria by TNF and other factor. *J Immunol*. 1998, 161: 1447- 1453.
34. Gollob J.A, Veenstra K, Jyonouchi H, Kelly A.M, Ferrieri P. Impairment of STAT activation by IL-12 in a patient with atypical mycobacterial and staphylococcal infections. *J Immunol* 2000, 165: 4120-4126.