Archive of SID

کاهش تولید IFN-γ 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 می‌باشد که با عود فراوان و قابلیت مزمن شدن مشخص می‌شود. از آن‌جا که پاسخ‌های ایمنی در بروسلوز انسانی کم‌تر بررسی شده است، در این مطالعه تولید سیتوکاین‌ها در افراد مبتلا به این بیماری و افراد سالم ارزیابی شده است.

مواد و روش‌ها: ۲۷ بیمار مبتلا به فرم حاد(۱۴ نفر) یا مزمن (۱۳ نفر) بروسلوز(با میانگین سنی ۱۸/۲ ± ۳۸/۰۳) و ۲۲ فرد سالم(با میانگین سنی ۲۱ ± ۳۵/۳۳) که از نظر سنی و جنسی با بیماران انطباق داشتند، بررسی شدند. نمونه‌های خون کامل رقیق شده در حضور یا عدم حضور میتوژن یا باکتری‌های کشته شده بروسلا ملی تنسیس سویه Rev-1 کشت داده شد. مقدار IFN-γ, IL-13,IL-10,IL-12 با استفاده از ELISA ساندویچی اختصاصی و پاسخ‌های بلاستوژنیک لنفوسیت‌ها نیز توسط روش سنتیلاسیون مایع (LTT) ارزیابی گردید.

یافته ها: تولید IFN-γ و پاسخ‌های پرولیفراتیو اختصاصی سلول‌های بیماران با بروسلوز مزمن در مقایسه با بیماران حاد به طور معنی‌دار کاهش داشت (P<۰/۰۵) در حالی که تولید IL-12 در سوپ کشت سلولی بیماران مزمن بیش‌تر از گروه حاد بود (P<۰/۰۵). در بیماران مزمن، تولید IL-10 نیز افزایش نشان داد ولی با تولید IFN- γ ارتباطی نداشت.

استنتاج: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد الگوی سیتوکاینی سلول‌های T اختصاصی بروسلا در بیماران مبتلا به بروسلوز بین مراحل حاد و مزمن بیماری متفاوت می‌باشد. این یافته‌ها همچنین بیان می‌نماید که کاهش تولید سیتوکاین‌های Th1 و پاسخ‌های بلاستوژنیک سلول‌های T ممکن است ناشی از عدم پاسخ‌گویی سلول‌های T افراد مبتلا به بروسلوز مزمن در برابر آنتی ژن های بروسلا 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 ✉ ساری: بلوار خزر، روبروی انبار برق، دانشکده پزشکی
** متخصص ایمونولوژی، کشت سلولی (استادیار) انیستیتو پاستور ایران *** متخصص ایمونولوژی و عضو هیأت علمی (دانشیار) دانشگاه علوم پزشکی مازندران
**** 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

www.SID.ir

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-09-22]

Archive of SID

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(۳،۲). 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 Th2 در تشدید وخامت بیماری موثرند(۷). نقش سیتوکاین‌ها دربرقراری مقاومت در این بیماری بیش‌تر در موش مطالعه شده است(۹،۸). اینترلوکین12(IL-12) نقش به سزایی درایجاد پاسخ‌های نوع Th1 از طریق اینترفرون گاما (IFN- γ) و در نهایت پیدایش مقاومت در برابر عفونت‌های داخل سلولی دارد(۱۰،۹). اینترلوکین 10(IL-10) آندوژن نیز نقش موثری در کاهش ایمنی حفاظت دهنده در طی آلودگی با B.abortus دارد(۱۱). اینترفرون گاما (IFN- γ) یکی از عوامل مهم کنترل عفونت با پاتوژن‌های میکروبی داخل سلولی می‌باشد(۱۳،۱۲). تجویز IFN- γ نوترکیب به موش‌هایBALB/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،۶). IFN- γ از طریق فعال نمودن عملکرد ضد بروسلاپی ماکروفاژ به واسطه تشدید تولید واسطه‌های واکنشگر اکسیژن (ROIs) موجب افزایش‌مقاومت می‌شود(۱۳). اینترلوکین۱۳همانند IL-4 موجب کاهش پاسخ‌های Th1 می‌گردد(۱۶،۱۵). 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 (۱۸،۱۷) و متناقض می‌باشد(۱۴،۹،۲). در بیش‌تر بیماری‌های حاصل از باکتری‌های داخل سلولی تغییرات IFN- γ 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 (۲۰،۱۹). این مطالعه علاوه بر این‌که پاسخ‌های ایمنی سلولی Th1 و Th2 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(۲۱تا۲۳).

مواد و روش‌ها

کیت‌های IFN- γ 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

www.SID.ir
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-09-22]

Archive of SID

شرکت Pharmingen، سانتیاگو، آمریکا، پلیت‌های کشت سلولی ۹۶و۲۴ 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 سنی۱۸/۲ ± ۳۸/۰۳ سال) که ابتلای آن‌ها به بروسلوز از نظر آزمایشگاهی و بالینی محرز گردید، انجام شد. از این تعداد، ۱۴ نفر به بروسلوز حاد و ۱۳ نفر به بروسلوز مزمن مبتلا بودند. هیچ یک از بیماران مورد مطالعه شواهدی مبنی بر ابتلا به سایر بیماری‌های عفونی غیر از بروسلوز 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 و۱۲ نفر مرد، با میانگین سنی ۲۱ ± ۳۵/۳۳ سال و تحت هیچ درمانی قرار نداشتند، به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. ابتلا به بروسلوز براساس علایم و نشانه‌های بالینی و آزمایش‌های سرولوژی و باکتری شناسی تعیین گردید. تشخیص بروسلوز حاد براساس دوره بیماری (کم‌تر از شش ماه) و علایم و نشانه‌های بالینی و یافته‌های آزمایشگاهی (کشت خون مثبت و یا تیتر آنتی بادی برابر یا بیش‌تر از $\frac{1}{320}$ در آزمایش رایت(STA) یا افزایش دو برابر در تیترSTA یا 2-ME به فاصله دوهفته انجام شد(۱۸،۱۷). مرحله ازمان بیماری نیز به واسطه تب پایین، علایم 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 پرولیفراسیون لنفوسیتی در خون کامل براساس روش اصلاح شده Bloemena و piekoszew انجام گردید (۲۶،۲۵). 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)، ۱۰۰IU/ml پنی سیلین و ۱۰۰μg/ml استرپتومایسین (سیگما سدگس، فرانسه) در لوله‌های فالکون ۱۵ میلی لیتری استریل مخصوص کشت سلولی (مارتون، لندن، انگلستان) پنج برابر رقیق گردید.

نمونه‌های خون کامل رقیق شده در حضور یا عدم حضور فیتوهماگلوتینین(۲/۵μa/ml,PHA) سیگما، سدگس، فرانسه) یا باکتری‌های کشته شده بروسلا ملی تنسیس سویه Rev-1 (1×10^7 CFU/ml) در پلیت‌های کشت سلولی ۹۶ چاهکی ته گرد به مدت ۷۲ ساعت در اتمسفر حاوی $5CO_2$% در دمای $37\ ^0C$ کشت داده شد. ۱۸ ساعت قبل از اتمام زمان انکوباسیون به هر چاهک ۰/۵μCi از ^3H-3- تیمیدین نشان‌دار با فعالیت ویژه 5Ci/mMol (آمرشام، بوکینگ همشایر، انگلستان) موجود در ۲۰μL 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

www.SID.ir

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-09-22]

Archive of SID

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

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

SI بیش‌تر از 2/5 به عنوان مثبت قلمداد شد. جهت بررسی تولید IL-12 نمونه‌های خون رقیق شده در حضور یا عدم حضور پانسوربین ۱درصد(pansorbin) ، باکتری‌های کشته بروسلا ملی تنسیس سویه واکسنی Rev-1 (۱×۱۰^{۷} CFU/ml) یا محیط کشت تنها، در پلیت ۹۶ چاهگی ته گرد در اتمسفر حاوی CO_2 ۵ درصد در دمای $۳۷^{0}C$ کشت داده شد. ۲۴ ساعت بعد سوپ هریک از چاهک‌ها جمع‌آوری شده و در فریزر $-۷۰^{0}C$ 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 فیتوهماگلوتینین (PHA) ۲/۵ μg/ml، باکتری‌های کشته بروسلا تنسیس سویه Rev-1 (۱×۱۰^{۷} CFU/ml) در اتمسفرمرطوب حاوی $C0_2$ ۵ درصد در دمای $۳۷^{0}C$ کشت داده شد. سوپ کشت های سلولی بعد از گذشت ۷۲ ساعت جمع‌آوری و تا زمان آزمایش در فریزر $-۷۰^{0}C$ نگهداری شد.

از روش ELISA ساندویچی‌برای اندازه‌گیری مقدار IL-12 و IL-10(فارمینژین، هایدلبرگ، آلمان) و IL-13 و IFN- γ (شرکت Bender Med System اتریش) در سوپ کشت سلولی براساس دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. با استفاده از پروکسیداز کونژوگه با استروپتوویدین (Stereptovidin peroxidase) و سوبسترایABTS (2,2-آزینوبیس(۳- اتیل‌بنزتیازولین)- سولفونیک اسید) میزان اتصال آنتی بادی‌های ضد IL-10,IL-12,IL-13 یا IFN- γ کونژوگه با بیوتین ارزیابی شد.

داده‌ها به صورت میانگین ± 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<۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد. برای آنالیز داده‌ها از نرم افزار SPSS استفاده گردید.

یافته ها

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 بروسلوز حاد ۳ ± ۱۲/۰۶ می‌باشد که به طور معنی‌دار بیش از پاسخ بیماران با بروسلوز مزمن است(۲±۳/۹۵). 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 میتوژن PHA تکثیر و تزاید می‌یابند، ولی پاسخ بیماران حاد نسبت به گروه مزمن و شاهد، بیش‌تر می‌باشد (P<۰/۰۵) (نمودار شماره ۱ B). با این وجود لنفوسیت‌های افراد سالم در پاسخ به آنتی‌ژن‌های بروسلا تکثیر و تزاید نشان نمی‌دادند (۰/۴۶ ± ۱/۶۹).

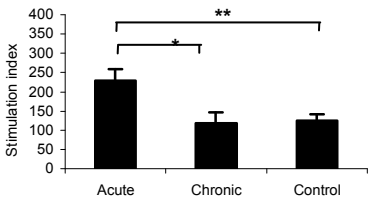
به منظور بررسی تاثیر اختلاف در الگوی ترشح سیتوکاینی در پاسخ سلولی بین بیماران مبتلا به فرم حاد و مزمن بروسلوز، مقادیر تولید اختصاصی (تحریک آنتی‌ژنی) و غیر اختصاصی (تحریک میتوژنیک)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-09-22]

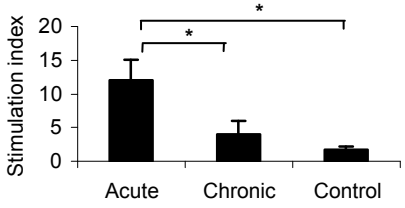
www.SID.ir

Archive of SID

IL-13, IL-10, IL-12, IFN- γ در سوپ کشت سلولی ارزیابی گردید. این سیتوکاین ها بدین لحاظ که پاسخ‌های سلول‌هایT را درشرایط خارج بدن(In vitro) تنظیم می‌نمایند، انتخاب گردیدند. همان‌طور که در نمودار شماره۲ نشان داده شده است، تحریک میتوژنیک با پانسوربین 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 بروسلا 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 pg/ml ۱۴/۸۸ ± ۵۶/۰ می‌باشد که با مقدار آن در افراد با بروسلوز حاد (۳/۴۶±۱۸/۹۱) تفاوت معنی‌دار می‌یابد (P<۰/۰۵) (نمودار شماره ۲).

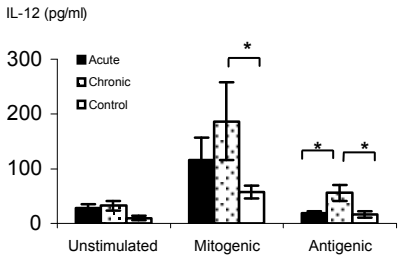


نمودار یک A



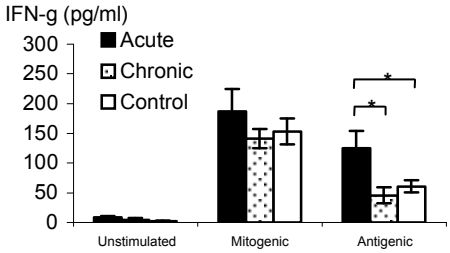
نمودار یک B

نمودار شماره۱: پاسخ‌های‌پرولیفراتیو(SI) لنفوسیت‌های خون‌محیطی در گروه‌های تحت مطالعه برحسب تحریک غیراختصاصی با PHA(نمودارA) و اختصاصی با باکتری‌های کشته شده بروسلا ملی تنسیس سویه Rev-1 (نمودار B)۰(* و** به ترتیب نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با۰/۰۵ >P و ۰/۰۰۱>P می‌باشد)



نمودار شماره ۲: IL-12 در سوپ کشت سلول های خون کامل بیماران مبتلا به بروسلوزیس حادومزمن و افراد شاهد سالم برحسب تحریک غیراختصاصی با میتوژن پانسوربین یا تحریک اختصاصی با باکتری‌های کشته بروسلا مالی تنسیس سویه Rev-1 (* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با ۰/۰۵ >P می‌باشد).

نمودار شماره ۳ نتایج تولید IFN- γ را نشان می‌دهد. همان‌طور که انتظار می‌رفت PHA باعث تولید مقادیر زیاد IFN- γ در تمامی گروه‌ها گردید. افراد شاهد نسبت به آنتی ژن پاسخ داده و میانگین تولید IFN- γ در آن‌ها ۱۰/۴۳ pg ml ± ۶۰/۹۱ است. تحریک آنتی‌ژنی باعث افزایش (Up- regulation) تولید IFN- γ در بیماران مبتلا به بروسلوز حاد می‌شود. در حالی که تولید این سیتوکاین در بیماران مزمن کاهش معنی‌دار می‌یابد؛ به طوری‌که میانگین تولید IFN- γ در افراد با بروسلوز حاد و مزمن به‌ترتیب pg/ml ۲۸/۴۲ ± ۱۲۵/۷۱ و ۱۳/۴۶ ± ۴۵/۶۹ است (نمودار شماره ۳).



نمودار شماره ۳: تولید IFN- γ در سوپ کشت سلول‌های خون کامل بیماران مبتلا به بروسلوزیس حاد و مزمن و افراد شاهد سالم

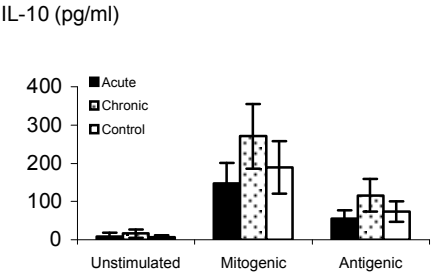
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-09-22]

www.SID.ir

Archive of SID

در پاسخ به تحریک غیر اختصاصی با میتوژن PHA یا تحریک اختصاصی با باکتری‌های کشته بروسلا ملی تنسیس سویه Rev-1 (* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با (P<۰/۰۵) می‌باشد).

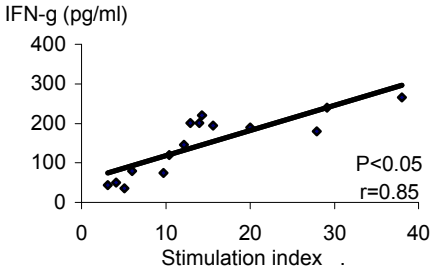
برخلاف نتایج IFN- γ ، تولید IL-10 در افراد با بروسلوز مزمن نسبت به بیماران مبتلا به فرم مزمن افزایش نشان می‌دهد؛ هرچند این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نیست (P<۰/۰۶۱). میانگین تولید IL-10 در بیماران مبتلا به بروسلوزحاد و مزمن وافراد شاهد سالم به ترتیب pg/ml ۲۰/۶۰ ± ۵/۷۱ ، ۴۳ ± ۱۱۵/۸۷ ، ۲۶/۵۷ ± ۷۴/۱۴ می‌باشد (نمودار شماره ۴).



نمودار شماره ۴ : IL-10 در سوپ کشت سلول‌های خون کامل بیماران مبتلا به بروسلوزیس حاد و مزمن و افراد شاهد در پاسخ تحریک غیراختصاصی با میوژن PHA یا تحریک اختصاصی با باکتری‌های کشته بروسلا 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 فلوسیستومتری 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 سیتوکاین های Th1 در پاسخ به آنتی ژن‌های بروسلا در بیماران مبتلا به اشکال حاد و مزمن بروسلوز، برخی از پارامترهای اساسی بین دو گروه بیمار مقایسه گردید. اختلاف معنی‌داری بین میانگین سنی و توزیع جنسی هر دو گروه مشاهده نشد. هر دو گروه دارای رژیم درمانی یکسانی بوده و هیچ کدام از بیماران عوامل مضعف سیستم ایمنی با دارویی که باعث تغییر در شمارش لکوسیتی شود را مصرف نمی‌کردند. همان‌طور که در نمودار شماره ۵ نشان داده شده است، تولید IFN- γ با پاسخ‌های بلاستوژنیک در بیماران مبتلا به بروسلوز ارتباط مستقیم دارد؛ به طوری که در بیماران حاد هر دو متغیر به طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) افزایش داشته (r=۰/۸۵) (Up- regulation) . حال آن‌که این ارتباط در بیماران با بروسلوز مزمن معنی‌دار نمی‌باشد. بین مقادیر تولیدIL-10 و IFN- γ هر دو گروه از بیماران ارتباط معنی‌دار مشاهده نشد.



نمودار شماره ۵ : همبستگی تولید اختصاصی IFN- γ و پاسخ‌های تکثیر و تزاید لنفوسیت‌های خون محیطی بیماران مبتلا به بروسلوزیس حاد. همان‌طور که دیده می‌شود بین پاسخ‌های تکثیر و تزاید(SI) لنفوسیت‌ها و تولید اختصاصی IFN-γ در سوپ کشت سلولی خون کامل بیماران مبتلا به بروسلوز حاد همبستگی واضح و مثبت P<۰/۰۵ و r= ۰/۸۵ دیده می‌شود.

بحث

گونه‌های بروسلا معمولاً در سلول‌های رتیکولوآندوتلیال تکثیر می‌یابند و پیدایش ایمنی بستگی به پاسخ مناسب سلول‌های میزبان و تولید سیتوکاین‌های IFN-γ 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-09-22]

www.SID.ir

Archive of SID

خاطر، در مطالعه حاضر از کشت خون کامل استفاده گردید تا هم تصویر بهتر و واقعی‌تر از پاسخ‌های ایمنی بدن در شرایط آزمایشگاه (In vitro) به دست آید و هم بتوان روشی ساده، سریع و ارزان برای ارزیابی پاسخ‌های ایمنی به ویژه در مواردی که حجم نمونه به دلایل فیزیولوژیک (اطفال و افراد کهنسال) یا پاتولوژیک (بیماران با نقص ایمنی یاکمبودهای خونی)کم است، در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی ارائه نمود(۲۱ تا۲۳، ۲۸،۲۷). علاوه بر این در این مطالعه از باکتری‌های کشته بروسلا ملی تنسیس به عنوان آنتی ژن استفاده گردید، چون در مطالعات قبلی ما و دیگران مشخص شده است که لیپویلی ساکارید(LPS) استخراج شده از این ارگانیسم توانایی ایجاد IFN-γ و IL-12 را در انسان دارند(۲۹،۱۰). همان‌طور که نتایج نشان می‌دهند پاسخ پرولیفراتیو لنفوسیت‌های T در مقابل میتوژن در بیماران با بروسلوز حاد یا مزمن قابل مقایسه با گروه شاهد می‌باشد. پاسخ بلاستوژنیک سلول‌های بیماران مزمن در برابر Ags بروسلا در مقایسه با گروه حاد به طور قابل توجهی کم‌تر است. تولید اختصاصی IFN-γ در تمام گروه‌های مطالعه از جمله گروه شاهد در مقایسه با کشت‌های بدون تحریک آنتی ژنی، افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد. با این وجود، تولید IFN-γ در گروه حاد به مراتب بسیار بیش‌تر از گروه‌های مزمن و افراد شاهد می‌باشد.

تولید اختصاصی IFN-γ توسط لنفوسیت‌های افراد شاهد مطالعه قبلی ما و سایر گزارش‌ها که نشان می‌دهد باکتری‌های کشته شده بروسلا دارای توانایی القای سیتوکاین‌های Th1 نظیر IFN-γ در انسان هستند را تایید می‌کند (۲۸،۲۷،۱۰).

کاهش تولید IFN-γ و پاسخ‌های بلاستوژنیک در طی دوره ازمان بیماری (گروه مزمن) با نتایج Giullermo (۲۰۰۲) نیز همراستا می‌باشد(۲۴)، به طوری که نتایج آن تحقیق و تحقیقات دیگر بیانگر تنظیم کاهشی پاسخ‌های Th1 به دنبال بقاء و استقرار داخل سلولی باکتری در طی فاز مزمن بیماری است(۳۰). همچنین Bertotto و همکاران (۱۹۹۳) نشان دادند که لنفوسیت‌های γδ T بیماران مبتلا به بروسلوز حاد در پاسخ به آنتی ژن‌های بروسلا به شدت تزاید می‌یابند و مقادیر فراوانی IFN-γ و IFN-α تولید می‌نمایند، ولی این پاسخ‌ها در طی مرحله مزمن بیماری شدیداً کاهش می‌یابند (۳۱). به عبارت دیگر،بین تمامی گروه‌های این مطالعه تفاوتی در تولید غیراختصاصی (میتوژنیک) IFN-γ دیده نشد. این یافته با گزارشی که نشان می‌دهد پاسخ میتوژنیک سلول‌های T و تولید غیراختصاصی IFN-γ درطی مرحله حاد بیماری کاهش می‌یابد و بعد از درمان آنتی‌بیوتیکی طبیعی می‌شود، همخوانی ندارد(۳۲). قرار داشتن بیماران این مطالعه تحت رژیم درمانی آنتی بیوتیکی، می‌تواند علت این اختلاف باشد. بنابراین، عدم پاسخ‌گویی بیماران مزمن به علت اختلال عمومی در پاسخ‌های ایمنی نبوده بلکه ناشی از اختلال در پاسخ ایمنی اختصاصی بروسلا می‌باشد.

اینترلوکین ۱۲ باعث تحریک پاسخ‌های ایمنی ضد تومور و ایمنی سلولی در مقابل پاتوژن‌های داخل سلولی می‌شود، این اثرات از طریق فعال کردن لنفوسیت‌ها ماکروفاژها وسلول‌های دندریتیک در جهت تولید IFN- γ و IFN-α افزایش فعالیت سیتولیتیک سلول‌های NK و T تولید نیتریک اکسید و آنژیوژنز وابسته به IFN-γ انجام می‌گیرد (۳۳،۵،۴). یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که مقادیر IL-12p70 در سوپ کشت سلول‌های خون کامل تحریک نشده هر دو گروه از بیماران نسبت به افراد شاهد زیاد می‌باشد. این یافته‌ها مهر تاییدی بر مطالعات قبلی است که بیانگر حضور مقادیر فراوان IL-12 در سرم بیماران مبتلا به بروسلوز می‌باشد(۲). با این حال، برخلاف نتایج IFN-γ تولید

www.SID.ir

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-09-22]

Archive of SID

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 تزاید 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 سیتوتوکسیسیته 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 غیرفعال سازی 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 می دهد IL-10 با تاثیر مهاری بر عملکرد ماکروفاژها و تولید سیتوکاین حفاظت دهنده 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 پرولیفراسیون 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 کارآیی 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 کارآیی 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 بروززنجیره $\beta 2$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 اکسیدستاز القایی(۱۶) و افزایش تولید IL-10 می‌تواند باعث گرایش پاسخ‌های ایمنی به سمت Th2 و در تهایت طولانی شدن بیماری در این گروه گردد(۱۵).

www.SID.ir
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-09-22]

Archive of SID

- کاهش تولید IFN-γ و پاسخ‌های بلاستوژنیک در بیماران مزمن ممکن است ناشی از کاهش گسترده سلول‌های SC_4T در اثر وقوع آپوپتوز باشد.

فهرست منابع

1. Enright FM. The pathogenesis and pathobiolohy 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 inrespoinse to intracellular infection by brucella aborus. J. ***med microbial*** 1999; 48: 1065-1073.
5. Pasquli 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. Interfron- γ is crucial for surviving a brucella aborus 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-09-22]

www.SID.ir

Archive of SID

12. Hoover DL, Crawford RM, Van De verg LL, Izadioo MJ, Bhattachariee AK, Paranavitana CM, Warren RL, Nikolich MP, Hadifield TL. Protection of mice against brucellosis by vaccination with brucella melittensis 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: cpmparison with interleukin-4 and interferon- gamma. ***Eur J Immunol*** 1994; 24: 1441-1445.
16. Alexander J, Brombecher F, Mc Gachy 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. Intereleukin-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 speciic ex vivo stimulation of whole blood for cytokine production applications in the study of tuberculosis. ***J. Immunol Methods.*** 1999; 145-153.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-09-22]

www.SID.ir

Archive of SID

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 immunosupperessive 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-ϒ 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-09-22]

www.SID.ir