

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

علیرضا رفیعی \*<sup>(Ph.D.)</sup>  
آمینا کریمی نیا \*\*<sup>(Ph.D.)</sup>  
ابوالقاسم عجمی \*\*\*<sup>(Ph.D.)</sup>  
سوسن کبودانیان اردستانی \*\*\*\*<sup>(Ph.D.)</sup>

### 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  $\pm ۱۸/۲$ ) و ۲۲ فرد سالم (با میانگین سنی  $\pm ۲۱$ ) 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 تنفسی سویه Rev-1 کشت داده شد. مقدار IL-12, IL-10, IL-13, IL-10, γ-IFN با استفاده از ELISA ساندویچی اختصاصی و پاسخ‌های بلاستوژنیک لنفوسيت‌ها نیز توسط روش ستیلاسیون مایع (LTT) ارزیابی گردید.

یافته‌ها: تولید γ-IFN و پاسخ‌های پرولیفراتیو اختصاصی سلول‌های بیماران با بروسلوز مزمن در مقایسه با بیماران حاد به طور معنی‌دار کاهش داشت ( $P < 0.05$ ). در حالی که تولید IL-12 در سوب کشت سلولی بیماران مزمن بیش‌تر از گروه حاد بود ( $P < 0.05$ ). در بیماران مزمن، تولید IL-10 نیز افزایش نشان داد ولی با تولید γ-IFN 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 آنتی‌ژن‌های بروسلا باشد.

واژه‌های کلیدی: بروسلوز انسانی، ایترلوكین‌ها، ایترفرون نوع ۲ ( بتا )، ایترکولین ۱۰

سازی: بلوار خزر، روبروی انبار برق، دانشکده پزشکی مازندران

\* متخصص ایمونولوژی و عضو هیات علمی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی مازندران

\*\* متخصص ایمونولوژی، کشت سلولی (استادیار) ایستیتو پاستور ایران

\*\*\* متخصص ایمونولوژی، 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

## مقدمه

۱۰ برابر کاهش می‌یابد<sup>(۱۴,۶)</sup>.  $\gamma$ -IFN از طریق فعال نمودن عملکرد ضد بروسلایپی ماکروفاز به واسطه تشدید تولید واسطه‌های واکنشگر اکسیژن (ROIs) موجب افزایش مقاومت می‌شود<sup>(۱۳)</sup>. اینترلوکین ۱۳ همانند IL-4 موجب کاهش پاسخ‌های Th1 می‌گردد<sup>(۱۵,۱۶)</sup>. تحقیقات در موش نشان می‌دهند که IL-13 نقش بسزایی در افزایش و خامت عفونت جلدی لیشمانیازیس داشته و یکی از عوامل مهم در افزایش دوره ازمان بیماری می‌باشد<sup>(۱۶)</sup>. علی‌رغم مطالعات نسبتاً زیاد در مورد نقش سیتوکاین‌ها در بروسلوز موشی، دانسته‌های بشر در مورد پاسخ‌های ایمنی سلولی در انسان بسیار اندک<sup>(۱۷,۱۸)</sup> و متناقض می‌باشد<sup>(۱۴,۹,۲)</sup>. در بیشتر بیماری‌های حاصل از باکتری‌های داخل سلولی تغییرات سیتوکاین کلیدی با و خامت بیماری ارتباط نزدیک دارد<sup>(۱۹,۲۰)</sup>. 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) قربت بیشتری با وضعیت پاسخ‌ها در شرایط بدن داشته باشد<sup>(۲۱,۲۲)</sup>.

### مواد و روش‌ها

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

گونه‌های بروسلزا، باکتری‌های گرم منفی و داخل سلولی اختیاری هستند که موجب بیماری جدی در حیوانات و انسان می‌شوند<sup>(۱)</sup>. بیماری بروسلوز در اکثر کشورهای در حال توسعه، بومی می‌باشد و باعث زیان‌های فراوان در تولیدات دامی و سلامت جوامع انسانی می‌گردد<sup>(۳,۲)</sup>. باکتری‌های بروسلزا اغلب به سلول‌های سیستم رتیکوآندوتیال هجوم می‌برند و می‌توانند در ماکروفازهای آلوود مستقر در نقاط مختلف بدن از جمله طحال، مغز، قلب، کبد و مغز استخوان باقی بمانند<sup>(۴)</sup>. در بین گونه‌های بروسلزا، *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. melitensis* هستند<sup>(۵)</sup>. 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<sup>(۶)</sup>. مطالعات در موش نشان می‌دهد که حفاظت در این بیماری توسط سلول‌های CD4<sup>+</sup>T و CD8<sup>+</sup> صورت می‌گیرد؛ در حالی که پاسخ‌های Th2 در تشدید و خامت بیماری موثرند<sup>(۷)</sup>. نقش سیتوکاین‌ها در برقراری مقاومت در این بیماری بیشتر در موش مطالعه شده است<sup>(۹,۸)</sup>. اینترلوکین 12 (IL-12) نقش به سزایی در ایجاد پاسخ‌های نوع Th1 از طریق اینترفرون گاما ( $\gamma$ -IFN) و در نهایت پیدایش مقاومت در برابر عفونت‌های داخل سلولی دارد<sup>(۹,۱۰)</sup>. اینترلوکین 10 (IL-10) آندوژن نیز نقش موثری در کاهش ایمنی حفاظت دهنده در طی آلوودگی با *B. abortus* دارد<sup>(۱۱)</sup>. اینترفرون گاما ( $\gamma$ -IFN) یکی از عوامل مهم کنترل عفونت با پاتوژن‌های میکروبی داخل سلولی می‌باشد<sup>(۱۲,۱۳)</sup>. تجویز  $\gamma$ -IFN نوترکیب به موش‌های BALB/c موجب افزایش مقاومت در برابر آلوودگی با *B. abortus* می‌گردد؛ به طوری که یک هفته بعد از آلوودگی تعداد باکتری‌های موجود در طحال

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 لفوسیتی در خون کامل براساس روш 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)، L 2mM-گلوتامین (سیگما، Cedex، فرانسه)، ۱۰۰IU/ml پنسی سیلین و ۱۰۰ $\mu$ g/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 (PHA/ $5\mu$ a/ml) سیگما، سدگس، فرانسه) یا باکتری‌های کشته شده بروسلو ملی تنیسیس سویه Rev-1 ( $10^7$  CFU/ml) در پلیت‌های کشت سلولی ۹۶ چاهگی ته گرد به مدت ۷۲ ساعت در اتمسفر حاوی  $5\text{CO}_2\%$  در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  کشت داده شد.

۱۸ ساعت قبل از اتمام زمان انکوباسیون به هر چاهک  $0.5\mu\text{Ci}$  از  $^{3}\text{H}$ -تیمیدین نشان‌دار با فعالیت ویژه  $5\text{Ci}/\text{mMol}$  موجود در  $20\mu\text{L}$  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

شرکت Pharmingen، سانتیاگو، آمریکا، پلیت‌های کشت سلولی ۹۶ و ۲۴ چاهگی و همین‌طور پلیت‌های الیزا از شرکت Maxisorp (Nunc دانمارک) خریداری شد. باکتری بروسلو ملی تنیسیس سویه واکسنی Rev-1 توسط دکتر ذوقی از موسسه واکسن و سرم‌سازی 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 بروسلو از نظر آزمایشگاهی و بالینی محرز گردید، انجام شد. از این تعداد، ۱۴ نفر به بروسلو حاد و ۱۳ نفر به بروسلو مزمن مبتلا بودند. هیچ یک از بیماران مورد مطالعه شواهدی مبنی بر ابتلا به سایر بیماری‌های عفونی غیر از بروسلو 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 آنتی‌بیوتیک‌ها 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  $21 \pm 35/33$  سال و تحت هیچ درمانی قرار نداشتند، به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. ابتلا به بروسلو براساس علایم و نشانه‌های بالینی و آزمایش‌های سرولوژی و باکتری شناسی تعیین گردید. تشخیص بروسلو 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  $\frac{1}{32}$  در آزمایش رایت STA) یا افزایش دو برابر در تیتر STA 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 مفترط و دوره بیماری (بیشتر از شش ماه) و عدم پاسخ مناسب به درمان‌های رایج و یافته‌های

ضد IL-10, IL-12, IL-13, IFN- $\gamma$  کونژوگه 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 بیش تر از ۹۵٪ دامنه اطمینان در تمام آزمایشات با مقدار  $P < 0.05$  از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد. برای آنالیز داده‌ها از نرم افزار SPSS استفاده گردید.

### یافته‌ها

پاسخ اینجی سلولی گروه‌های مختلف در مقابل آنتی‌ژن‌های (Ags) اختصاصی بروسلوز در آزمایشگاه بررسی گردید. همان‌طور که در نمودار شماره یک A دیده می‌شود، اندیکس تحریک (SI) اختصاصی  $\gamma$ -Ag های بروسلوز در بیماران مبتلا به بروسلوز حد  $3 \pm 0.6$  بیش تر از پاسخ بیماران با می‌باشد که به طور معنی دار بیش از پاسخ بیماران با بروسلوز مزمن است ( $2.95 \pm 0.3$ ). 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). لنفوسيت‌های تمام (داده‌ها نشان داده نشده است) گروه‌ها در پاسخ به میتوژن PHA تکثیر و تزايد می‌یابند، ولی پاسخ بیماران حد نسبت به گروه مزمن و شاهد، بیش تر می‌باشد ( $P < 0.05$ ) (نمودار شماره ۱B). با این وجود لنفوسيت‌های افراد سالم در پاسخ به آنتی‌ژن‌های بروسلوز تکثیر و تزايد نشان نمی‌دادند ( $0.46 \pm 0.69$ ). 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)

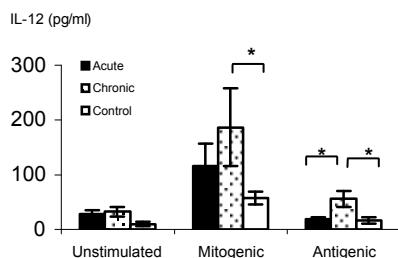
در DNA توسط دستگاه کانتر سینتیلاسیون مایع (باتکانتر) (فارماسیا، گایترسبرگ، مریلند آمریکا) شمارش گردید. نتایج به صورت اندیکس تحریک (SI) ارائه شده است که به صورت زیر محاسبه گردید.

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

SI بیش تر از ۲/۵ به عنوان مثبت قلمداد شد. جهت بررسی تولید IL-12 نمونه‌های خون رقیق شده در حضور یا عدم حضور پانسوربین ادرصد (pansorbin)، باکتری‌های کشته بروسلوز ملی تسمیس سویه واکسینی  $10^7$  CFU/ml Rev-1 یا محیط کشت تنها، در پلیت ۹۶ چاهگی ته گرد در اتمسفر حاوی  $CO_2$  ۵ درصد در دمای  $37^\circ C$  کشت داده شد. ۲۴ ساعت بعد سوب هریک از چاهگی‌ها جمع‌آوری شده و در فریزر  $70^\circ C$ -تا زمان آزمایش نگهداری گردید. جهت بررسی تولید IL-10، IL-13، IFN- $\gamma$ ، IL-10، IL-13،  $10^7$  CFU/ml Rev-1 در پلیت‌های کشت ۲۴ چاهگی پلی استیرنی رقیق شده در پلیت‌های کشت ۲۴ چاهگی پلی استیرنی ته صاف در حضور یا عدم حضور فیتوهم‌گلوتینین ( $2/5 \mu g/ml$ ) PHA سویه  $10^7$  CFU/ml در اتمسفر مرطوب حاوی  $CO_2$  ۵ درصد در دمای  $37^\circ C$  کشت داده شد. سوب کشت‌های سلولی بعد از گذشت ۷۲ ساعت جمع‌آوری و تا زمان آزمایش در فریزر  $70^\circ C$ -نگهداری شد.

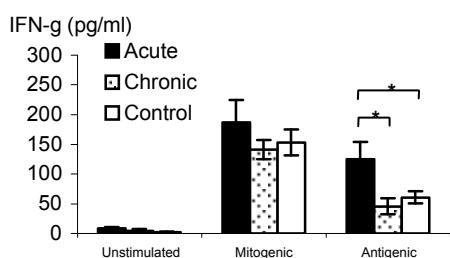
از روش ELISA ساندویچی برای اندازه‌گیری مقدار IL-10 و IL-12 (فارمینثین، هایدلبرگ، آلمان) و IL-13 (Bender Med System) در سوب کشت سلولی براساس دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. با استفاده از پروکسیداز کونژوگه با استروپتوویدین (Stereptavidin peroxidase) و سوبسترات ABTS (2,2-آنیوبیس(۳-ایلبن‌تیازولین)-سولفونیک اسید) میزان اتصال آنتی‌بادی‌های

تنسیس سویه Rev-1 (نمودار B) (\*) و \*\* به ترتیب نشان دهنده اختلاف معنی دار با  $P < 0.001$  و  $P < 0.05$  می باشد)



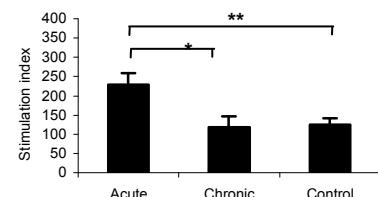
نمودار شماره ۲: IL-12 در سوب کشت سلول های خون کامل بیماران مبتلا به بروسلوزیس حاد و مزمن و افراد شاهد سالم بر حسب تحریک غیراختصاصی با میتوژن پانسورین یا تحریک اختصاصی با باکتری های کشته بروسلا مالی تنسیس سویه Rev-1 (\* نشان دهنده اختلاف معنی دار با  $P < 0.05$  می باشد).

نمودار شماره ۳ نتایج تولید γ IFN- را نشان می دهد. همان طور که انتظار می رفت PHA باعث تولید مقادیر زیاد γ IFN- در تمامی گروهها گردید. افراد شاهد نسبت به آنتی ژن پاسخ داده و میانگین تولید γ IFN- در آنها  $10.43 \pm 1.91$  pg/ml است. تحریک آنتی ژنی باعث افزایش (Up-regulation) تولید γ IFN- در بیماران مبتلا به بروسلوز حاد می شود. در حالی که تولید این سیتوکاین در بیماران مزمن کاهش معنی دار می یابد؛ به طوری که میانگین تولید γ IFN- در افراد با بروسلوز حاد و مزمن به ترتیب  $45.69 \pm 13.46$  و  $28.42 \pm 12.71$  pg/ml است (نمودار شماره ۳).

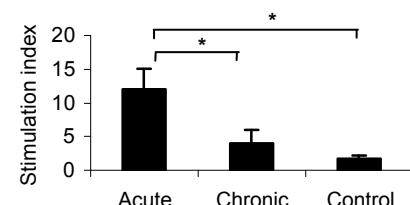


نمودار شماره ۳: تولید γ IFN- در سوب کشت سلول های خون کامل بیماران مبتلا به بروسلوزیس حاد و مزمن و افراد شاهد سالم

IL-13, IL-10, IL-12, IFN- γ ارزیابی گردید. این سیتوکاین ها بدین لحاظ که پاسخ های سلول های T را در شرایط خارج بدن (In vitro) تنظیم می نمایند، انتخاب گردیدند. همان طور که در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است، تحریک میتوژنیک با پانسورین باعث تولید مقادیر زیاد IL-12 در سلول های 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 معنی دار بیش تر می باشد. علاوه بر این، تولید IL-12 در پاسخ به آنتی ژن های بروسلا در بین دو گروه حاد و مزمن تفاوت قابل توجهی را نشان می دهد؛ به طوری که میانگین مقدار این سیتوکاین در افراد با بروسلوز مزمن  $14.88 \pm 1.80$  pg/ml می باشد که با مقدار آن در افراد با بروسلوز حاد ( $18.91 \pm 3.46$ ) تفاوت معنی دار می یابد (نمودار شماره ۲).



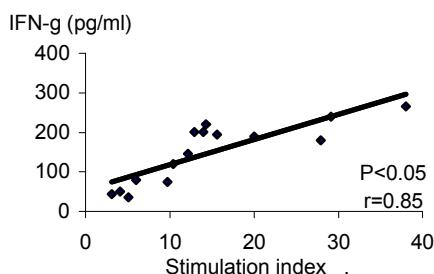
نمودار یک A



نمودار یک B

نمودار شماره ۱: پاسخ های پرولیفرا تیو (SI) لنفو سیت های خون محیطی در گروه های تحت مطالعه بر حسب تحریک غیراختصاصی با (نمودار A) و اختصاصی با باکتری های کشته شده بروسلا مالی (نمودار B) می باشد.

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  $\gamma$  IFN با پاسخ‌های بلاستوژنیک 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 ( $r=0.85$ ). حال آن‌که این ارتباط در بیماران با بروسلوز مزمن معنی‌دار نمی‌باشد. بین مقادیر تولید IL-10 و  $\gamma$  IFN هر دو گروه از بیماران ارتباط معنی‌دار مشاهده نشد.



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

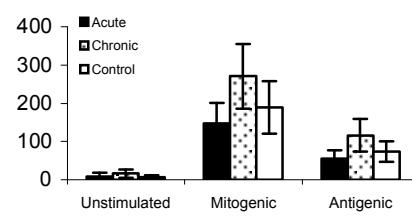
### بحث

گونه‌های بروسلزا معمولاً در سلول‌های رتیکولوآندوتیال تکثیر می‌بیند و پیدایش ایمنی بستگی به پاسخ مناسب سلول‌های میزبان و تولید سیتوکاین‌های IL-12 و  $\gamma$  IFN دارد (۱۲، ۱۳). 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 بروسلزا ملی تنیسیس سویه-1 Rev-1 (\*نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با  $P<0.05$  می‌باشد).

برخلاف نتایج  $\gamma$  IFN-، 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 ( $P<0.61$ ). میانگین تولید IL-10 در بیماران مبتلا به بروسلوز حاد و مزمن و افراد شاهد سالم به ترتیب  $115/87 \pm 43$ ،  $5/71 \pm 20/60$  pg/ml و  $74/14 \pm 26/57$  می‌باشد (نمودار شماره ۴).

IL-10 (pg/ml)



نمودار شماره ۴: IL-10 در سوب کشت سلول‌های خون کامل بیماران مبتلا به بروسلوزیس حاد و مزمن و افراد شاهد در پاسخ تحریک غیراختصاصی با میتوژن PHA یا تحریک اختصاصی با باکتری‌های کشته بروسلزا ملی تنیسیس سویه-1 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 ترازید سلولی و تولید سیتوکاین‌های Th1 در پاسخ به آنتی ژن‌های بروسلزا در بیماران مبتلا به اشکال حاد و مزمن بروسلوز، برخی از پارامترهای اساسی بین دو گروه بیمار مقایسه گردید. اختلاف معنی‌داری بین میانگین

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.<sup>(۳۰)</sup> همچنین Bertotto و همکاران (۱۹۹۳) نشان دادند که لنفوسيت‌های T<sub>γ</sub> بیماران مبتلا به بروسلوز حاد در پاسخ به آنتی‌ژن‌های بروسللا به شدت تزايد می‌ياند و مقادير فراوانی γ IFN و IFN-α توليد می‌نمایند، ولی اين پاسخ‌ها در طی مرحله مزمن بیماری شدیداً کاهش می‌ياند.<sup>(۳۱)</sup> به عبارت دیگر، بين تمامی گروه‌های اين مطالعه تفاوتی در توليد غیراختصاصی (ميتوژنيک) IFN-γ دیده نشد. اين يافته با گزارشي که نشان می‌دهد پاسخ ميتوژنيک سلول‌های T و توليد غیراختصاصی IFN-γ در طی مرحله حاد بیماری کاهش می‌ياند و بعد از درمان آنتی‌بيوتיקی طبیعی می‌شود، همخوانی ندارد.<sup>(۳۲)</sup> قرار داشتن بیماران اين مطالعه تحت رژيم درمانی آنتی بيوتيكى، می‌تواند علت اين اختلاف باشد. بنابراین، عدم پاسخ‌گوبي بیماران مزمن به علت اختلال عمومی در پاسخ‌های ايمى نبوده بلکه ناشی از اختلال در پاسخ ايمى اختصاصى بروسللا می‌باشد.

ایتنولوکین ۱۲ باعث تحريک پاسخ‌های ايمى ضد تومور و ايمى سلولی در مقابل پاتوژن‌های داخل سلولی می‌شود، اين اثرات از طريق فعل کردن لنفوسيت‌ها ماکروفازها و سلول‌های دندريتیک در جهت توليد γ IFN و IFN-α افزایش فعالیت سیتوولیتیک سلول‌های NK و T تولید نيتريک اكسید و آنزیوژن را باسته به انجام می‌گيرد.<sup>(۳۳,۵,۴)</sup> يافته‌های اين مطالعه نشان می‌دهد که مقادير IL-12p70 در سوب کشت سلول‌های خون کامل تحريک نشده هر دو گروه از بیماران نسبت به افراد شاهد زياد می‌باشد. اين يافته‌ها مهر تاييدی بر مطالعات قبلی است که بيانگر حضور مقادير فراوان IL-12 در سرم بیماران مبتلا به بروسلوز می‌باشد.<sup>(۲)</sup> با اين حال، برخلاف نتایج IFN-γ توليد

خاطر، در مطالعه حاضر از کشت خون کامل استفاده گردید تا هم تصوير بهتر و واقعی تر از پاسخ‌های ايمى بدن در شرایط آزمایشگاه (In vitro) به دست آيد و هم بتوان روشي ساده، سريع و ارزان برای ارزیابي پاسخ‌های ايمى به ويژه در مواردی که حجم نمونه به دلایل فيزيولوژيك (اطفال و افراد كهنسال) یا پاتولوژيك (بيماران با نقص ايمى یا كمبودهای خونی) کم است، در آزمایشگاه‌های تشخيص طی ارائه نمود.<sup>(۲۱, ۲۳, ۲۷, ۲۸)</sup> علاوه بر اين در اين مطالعه از باكتري‌های کشته بروسللا ملي تنسيس به عنوان آنتى ژن استفاده گردید، چون در مطالعات قبلی ما و دیگران مشخص شده است که لپويلى ساكاريدي (LPS) استخراج شده از اين ارگانيسم توانايي ايجاد γ IFN و IL-12 را در انسان دارند.<sup>(۱۰, ۲۹)</sup> همان‌طور که نتایج نشان می‌دهند پاسخ پروليفراتيو لنفوسيت‌های T در مقابل ميتوژن در بیماران با بروسلوز حاد یا مزمن قابل مقایسه با گروه شاهد می‌باشد. پاسخ بلاستوژنيک سلول‌های بیماران مزمن در برابر Ags بروسللا در مقایسه با گروه حاد به طور قابل توجهی کم تر است. توليد اختصاصي γ IFN در تمام گروه‌های مطالعه از جمله گروه شاهد در مقایسه با کشت‌های بدون تحريک آنتى ژنی، افزایش معنى‌داری نشان می‌دهد. با اين وجود، توليد γ IFN در گروه حاد به مراتب بسیار ييش تر از گروه‌های مزمن و افراد شاهد می‌باشد.

توليد اختصاصي γ IFN توسط لنفوسيت‌های افراد شاهد مطالعه قبلی ما و سایر گزارش‌ها که نشان می‌دهد باكتري‌های کشته شده بروسللا دارای توانايي القاي سيتوکاين‌های Th1 نظير γ IFN در انسان هستند را تاييد می‌کند.<sup>(۱۰, ۲۷, ۲۸)</sup>

کاهش توليد γ IFN و پاسخ‌های بلاستوژنيک در طی دوره ازمان بیماری (گروه مزمن) با نتایج Giulermo (۲۰۰۲) نيز همراستا می‌باشد.<sup>(۲۶)</sup> به طوري

گزارشی که نشان می‌دهد IL-10 با تاثیر مهاری بر عملکرد ماکروفازها و تولید سیتوکاین حفاظت دهنده B.abortus IFN- $\gamma$  موجب کاهش پاسخ ایمنی در مقابل در موش می‌شود، همراستا است(۱۰). با این وجود بین مقادیر IL-10 و IFN- $\gamma$  در هیچ یک از گروه‌های بیمار ارتباطی معنی دار مشاهده نشد.

نتایج این مطالعه بیانگر بروز پاسخ‌های Th1 همراه با پرولیفراسیون سلولی و تولید IFN- $\gamma$  در بیماران با بروسلوز حاد است؛ در حالی که در بیماران مزمن این چنین نیست. در نهایت کاهش تولید IFN- $\gamma$  و طولانی شدن روند بیماری در افراد مزمن را می‌توان ناشی از کاهش پاسخ‌گویی سلول‌های T اختصاصی آتنی ژن‌های بروسلوا 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 کارآبی 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 کارآبی مقادیر زیاد IL-12 اندازه‌گیری شده در بیماری مزمن می‌شود(۴).

- تولید مقادیر زیاد سیتوکاین IL-10 در بیماران مزمن باعث کاهش تولید IFN- $\gamma$  و همین‌طور کاهش بروز زنجیره ۲ 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 ماکروفازها 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).

اختصاصی IL-12p70 در بیماران با بروسلوز مزمن به طور قابل ملاحظه‌ای بیش تر از بیماران حاد و افراد سالم است. تمامی گروه‌های مطالعه پاسخ مناسبی در برابر پانسورین، القاگر IL-12، داشتند. تحقیقات مختلف نشان می‌دهد که نقص در IL-12 با بیان زنجیره ۲ 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 تزايد سلولی در برخی از بیماران مبتلا به عفونت‌های داخل سلولی شدیداً کاهش می‌یابد(۳۴۸). بنابراین ناتوانی بیماران با بروسلوز مزمن در کنترل IL-12 بیماری به طور واضح ناشی از اختلال در تولید IFN- $\gamma$  در بیماران با بروسلوز مزمن نیست. کاهش تولید IFN- $\gamma$  در بیماران با بروسلوز مزمن علی‌رغم وجود مقادیر زیاد IL-12 ممکن است ناشی از وقوع موتاسیون در ژن ۱ از گیرنده IL-12 باشد که موجب می‌شود قابلیت IL-12 در تقویت فعالیت سیتوتوکسیسیته لنفوسيت‌ها کاهش یابد. این نتایج با گزارش‌هایی که نشان می‌دهد ترشح IFN- $\gamma$  توسط سلول‌های طحالی موش‌های BALB/c آلوده که در آزمایشگاه با باکتری‌های کشتہ بروسلوا 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- $\gamma$  و دارای خواص قوی غیرفعال سازی ماکروفازها می‌باشد، بلکه دارای تاثیر مهاری قوی نیز بر تولید IL-12 و کاهش بروز IL-12R $\beta$  است(۱۰،۸). هر چند بین تولید IL-10 در دو گروه بیمار اختلاف معنی داری مشاهده نشد، میانگین تولید آن در بیماران مزمن به مراتب بیش تر از بیماران حاد می‌باشد. افزایش تولید IL-10 در بیماران مزمن نسبت به بیماران حاد بیانگر تاثیر کاهشی این سیتوکاین بر تولید IFN- $\gamma$  در این گروه است. این یافته‌ها با

سلول‌های SC<sub>4</sub>T در اثر وقوع آپوپتوز باشد.

- کاهش تولید γ-IFN و پاسخ‌های بلاستوژنیک در بیماران مزمن ممکن است ناشی از کاهش گستردگی باشد.

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, Rodriguez- 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

- ### فهرست منابع
- 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, Izadioo MJ, Bhattacharjee AK, Parananitana 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: comparison 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 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 bearing the  $\gamma$  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. Diminished 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- $\gamma$  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.