نفس، سال ۱، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳، صفحات ۴۴ تا ۴۸

تغییر سطوح اینترلوکین‌های ۱۰ و ۱۲ در بیماری سل

سید مهران مرعشیان[۱]، محمد ورهرام[۲]*، پریسا فرنیا[۲]، صابر انوشه[۲]

۱) مرکز تحقیقات بیماری‌های مزمن تنفسی، پژوهشکده سل و بیماریهای ریوی، مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری‌های ریوی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲) مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی، مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری‌های ریوی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده:

از آنجا که اینترلوکین ۱۲ (IL-12) نقش حیاتی در نمو سلول‌های Th1 دارد، بیشترین مطالعات بر روی این سایتوکاین انجام شده است. همچنین، اینترلوکین ۱۰ (IL-10) واسطه (مدیاتور) اصلی در تولید IL-12 و اینترفرون گاما (INF-γ) توسط سلول‌های Th1 در بیماری‌های ناشی از پاتوژن‌های داخل سلولی است.

با توجه به اهمیت ایمنی سلولی در عفونت و بیماری سل، این مطالعه به منظور یافتن نقش پیش‌بینی کننده IL-10 و IL-12 در تشخیص سل در بین افراد علامتداری که به مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری‌های ریوی بیمارستان دکتر مسیح دانشوری (تهران، ایران) مراجعه کردند طراحی و اجرا شد.

سطوح سرمی IL-10 و IL-12 با استفاده از تکنیک الایزا اندازه‌گیری شد. سپس مقادیر تعیین شده سایتوکاین‌ها در نرم‌افزار آماری وارد شد تا رابطه و خصلت پیش‌بینی کنندگی آن‌ها در تشخیص سل روشن گردد.

این مطالعه با استفاده از Roc curve موفق به تعیین سطح برشی برای غلظت سرمی IL-10 در تشخیص سل، با حساسیت و ویژگی به ترتیب معادل ۶۸٪ و ۲۶٪، شد. سطح سرمی IL-12 هیچ رابطه‌ای با IL-10 و نیز ارزش قابل اعتمادی در تشخیص سل را نشان نداد.

در این مطالعه یک رابطه منطقی میان سل و سطوح بالاتر سرمی IL-10 دیده شد که در کنار آزمایش خلط، منافع این آزمایش را در حل محدودیت‌های آزمایشگاهی نشان می‌دهد.

کلمات کلیدی: اینترلوکین ۱۰، اینترلوکین ۱۲، بیماری سل

* **نویسنده مسئول:**

۱) دکتر محمد ورهرام، مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی، بیمارستان دکتر مسیح دانشوری، دارآباد، نیاوران، تهران، ایران، کد پستی ۴۴۴۱۳-۱۹۵۶۹، پست الکترونیک: m.varahram@sbmu.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه:

امروزه بسیاری از پژوهشگرانی که در زمینه بیماری‌های عفونی فعالیت می‌نمایند علاقمند به کار بر روی عوامل ایمیونولوژیک و تاثیر آنها بر عفونت‌ها مانند شدت بیماری، پاتوژنز عامل بیماری‌زا، نتایج و همچنین حساسیت‌پذیری افراد به آن‌ها شده‌اند. یک دسته از این فاکتورهای ایمیونولوژیک، سایتوکاین‌هایی مانند اینترلوکین ۱۰ (IL-10) و اینترلوکین ۱۲ (IL-12) می‌باشند.

بتازگی اینترلوکین ۱۲ بدلیل نقش مهمی که در رشد سلول‌های T helper 1 (Th1) دارد به عنوان یکی از مهمترین سایتوکاین‌ها مورد توجه قرار گرفته است [۱-۱۰]. Th1 سلول کلیدی است که به عنوان واسطه‌ای در فرایند ایمنی سلولی بر علیه بسیاری از عفونت‌های داخل سلولی، مانند سل، عمل می‌نماید. این نکته می‌تواند علت اصلی فراوانی بیشتر سل در بیماران HIV مثبت باشد [۱۰].

اینترلوکین ۱۰، واسطه[1] اصلی پاسخ سرکوب شده اینترفرون گاما[2] (INF-γ) در بیماری‌هایی است که از پاتوژن‌های داخل سلولی حاصل می‌گردند. این پاتوژن‌ها خود از طریق فاگوسیت‌های تک‌هسته‌ای، تولید IL-10 را تحریک می‌کنند [۶-۱۴] در پاسخ به آنتی‌ژن‌های میکروبی، آنتی‌بادی‌های علیه IL-10، تولید IFN-γ را در سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی که با میکوباکتریوم توبرکولوزیس تحریک شده‌اند افزایش می‌دهند [۶،۱۵،۱۶].

همچنین IL-10 سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن[3] را تحت تاثیر قرار می‌دهد بدین صورت که موجب سرکوب بیان مولکول‌های MHC [4] و مهار ساخت مونوکین[5] می‌گردد [۱۷-۲۲]. اینترفرون گاما که بوسیله سلول‌های بالغ Th1 تولید و آزاد می‌شود، واسطه اصلی بسیاری از تظاهرات کلینیکی عوامل عفونت‌زای داخل سلولی مانند مایکوباکتریوم توبرکولوزیس (*M.tb*) است [۱۷،۲۳]. پس از مواجهه با سل (مانند تست پوستی توبرکولین) واکنش‌گرهای سلامت تولید شده و مقدار زیادی INF-γ توسط سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی[6] آزاد می‌شود [۱۷،۲۴،۲۵].

این مطالعه به منظور پیش‌بینی نقش IL-10 و IL-12 در تشخیص سل در افراد علامت‌دار، بنابر اهمیت ایمنی با واسطه سلولی در عفونت و بیماری سل و نیز نقش اصلی سایتوکاین‌های مذکور در نمو سلول‌های ایمنی بدن، طراحی و به اجرا در آمده است.

مواد و روش‌ها:

این مطالعه یک پژوهش مقطعی بود که به شکل مورد شاهدی اجرا گردید.

جمعیت مطالعه:

در مجموع ۱۳۴ نفر واجد معیارهای ورود به طرح بودند که ۷۳ نفر در گروه مورد و ۶۱ نفر در گروه شاهد قرار داشتند. گروه مورد افراد علامت‌داری بودند که به مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری‌های ریوی بیمارستان دکتر مسیح دانشوری مراجعه نموده بودند. این افراد ابتدا از نظر تظاهرات سلی توسط پزشکان معاینه فیزیکی شدند، سپس به منظور یافتن معیارهای تأیید کننده تشخیص سل تحت بررسی‌های رادیولوژیک و یا آزمایشگاهی قرار گرفتند. گروه کنترل افراد سالمی بودند که بنا به اقتضای شغلی و یا زندگی خود در تماس با *M.tb* قرار داشتند.

تکنیک‌های آزمایشگاهی:

سطوح سرمی IL-10 و IL-12 با استفاده از تکنیک الیزا اندازه گیری شد. پلاسما با سانتریفوژ خون کامل وریدی شرکت کنندگان به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سلسیوس و با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه بدست آمد. آنگاه سطوح سایتوکاین‌های IL-10 و IL-12 با انجام الیزا بر روی ۵۰ میکروگرم از پلاسمای هر فرد بدست آمد. مقادیر به‌دست آمده از سایتوکاین‌ها در نرم‌افزار آماری وارد شدند تا ارتباط و یا خصوصیات تشخیصی بیماری بررسی شوند.

آمار:

در این مطالعه بدلیل توزیع غیر نرمال IL-10 و IL-12 از آزمون‌های غیر پارامتریک آماری مانند من‌ویتنی و

[1] Mediator
[2] Interferon gamma (IFN-γ)
[3] Antigen presenting cells
[4] Major Histocompatibility Complex
[5] Monokine
[6] Peripheral Blood Mononuclear Cells

Archive of SID
www.SID.ir

ویل‌کاکسون برای ارزیابی داده‌ها استفاده شد. روایی (اعتبار)[1] و سطح برش[2] آزمون‌های سایتوکاین‌های مذکور نیز با انجام Roc curve بررسی شد. کلیه مطالعات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 به انجام رسید.

اخلاق:

اگرچه مشکل اخلاقی خاصی در این پژوهش متصور نبود، با این حال پژوهشگران پس از تشریح کامل اهمیت، اهداف، فرایند و نتایج این پژوهش برای کلیه شرکت کنندگان، از آنان درخواست کردند تا برای ورود به مطالعه رضایت‌نامه آن را امضا نمایند.

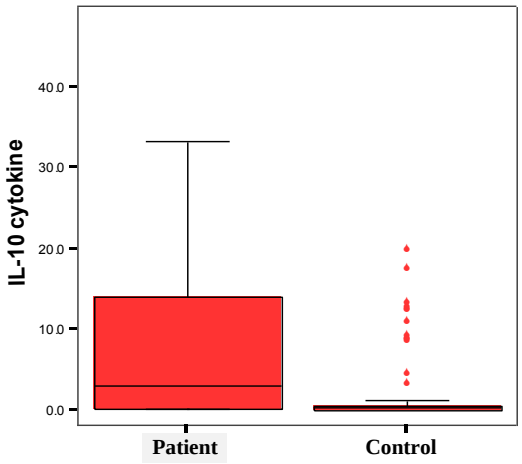
یافته‌ها:

بر طبق معیارها، ۷۳ بیمار و ۶۱ شاهد در این مطالعه شرکت کردند که از این بین ۴۹ مرد (۶۷/۱٪) و ۲۴ زن (۳۲/۹٪) در گروه بیمار و ۳۹ مرد (۶۳/۹٪) و ۲۲ زن (۳۶/۱٪) در گروه شاهد قرار داشتند. سن متوسط در گروه بیمار و شاهد به ترتیب ۲۱±۵۰ و ۱۱±۳۷ تعیین شد که با هم مطابقت نداشتند.

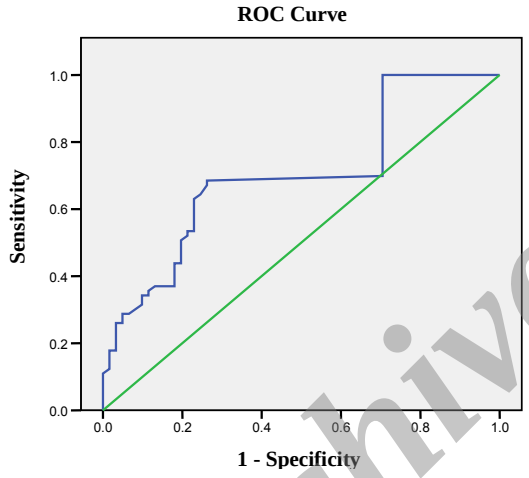
چنانچه در شکل ۱ مشاهده می‌شود سطح IL-10 در گروه‌های مورد و شاهد با هم متفاوت است. آزمون من‌ویتنی نشان داد که سطح بالاتر اینترلوکین ۱۰ در گروه بیماران نسبت به گروه شاهد دارای اختلاف معناداری است (P value<0.001). غلظت متوسط IL-10 برابر ۷/۲ پیکومول بر میلی‌لیتر با دامنه ۰/۱ تا ۳۳/۲ در گروه بیمار و ۲/۴ پیکومول بر میلی‌لیتر با دامنه صفر تا ۱۹/۴ در گروه کنترل بود.

هیچ اختلاف معناداری میان دو گروه برای IL-12 غلظت سرمی یافت نشد (P value<0.96). همچنین این مطالعه هیچ رابطه‌ای میان غلظت پلاسمایی IL-10 و IL-12 پیدا نکرد.

با استفاده از Roc curve این مطالعه به سطح برشی از غلظت سرمی IL-10 با حساسیت ۶۸٪ و ویژگی ۲۶٪ برای تشخیص سل در بیماران دست یافت تا از آن بتوان به عنوان یک تست غربالگری سل مورد استفاده قرار داد. این سطح برش در جدول ۱ و شکل ۲ به نمایش درآمده است.



شکل ۱- سطوح IL-10 در بین موارد سلی، در مقایسه با افراد سالم



شکل ۲- Roc curve برای یافتن سطح برش غلظت سرمی IL-10 در تشخیص سل

بحث:

برخی پژوهشگران مانند Hickman گزارش کرده‌اند که IL-10 نقش سرکوب کننده در تولید IL-12 بویژه در ماکروفاژها در خلال عفونت مایکوباکتریایی دارد [۱]. این نکته شاید دلیل آن باشد که رابطه‌ای میان این سایتوکاین‌ها یافت نشده است. IL-10 و IL-12 پس از عفونت سلی افزایش می‌یابند اما در ادامه تولید IL-12 در اثر IL-10 کاهش می‌یابد [۱۷]. به علاوه Beamer و همکاران عقیده دارند که IL-10 از طریق مهار تولید IL-12 و IFN-γ در سلول‌های Th1 موجب پیشرفت سل می‌گردد [۲۶]. ما موفق به یافتن مطالعه‌ای قبلی که

[1] Validity
[2] Cut-off point

Archive of SID
www.SID.ir

بر سطح سرمی IL-10 و IL-12 یا تعیین سطح برش آنان پرداخته باشد نشدیم.

جدول۱- حساسیت و ویژگی برخی غلظت‌های سرمی IL-10 در تشخیص سل، در حوالی سطح برشی که Roc curve تعیین نمود.

سطح سرمی IL-10	حساسیت	ویژگی
۰/۰۵۶	۱/۰۰۰	۰/۷۰۵
۰/۱۵۰	۰/۷۶۷	۰/۷۰۵
۰/۲۲۰	۰/۷۱۲	۰/۷۰۵
۰/۲۷۰	۰/۶۹۹	۰/۷۰۵
۰/۳۵۰	۰/۶۸۵	۰/۲۶۲
۰/۴۵۰	۰/۶۷۱	۰/۲۶۲
۰/۵۳۰	۰/۶۴۴	۰/۲۴۶
۰/۵۷۰	۰/۶۳۰	۰/۲۳۰
۰/۵۹۰	۰/۶۱۶	۰/۲۳۰
۰/۶۵۰	۰/۵۸۹	۰/۲۳۰
۰/۷۵۰	۰/۵۷۵	۰/۲۳۰
۰/۸۱۰	۰/۵۶۲	۰/۲۳۰

اگرچه آزمایش‌هایی مانند کشت و اسمیر خلط برای تشخیص و تایید وجود سل ریوی در افراد علامت‌دار وجود دارد، ولی ممکن است در کنار آزمایش‌های روتین به آزمایش‌های سرولوژیک دیگری که روش کار و دقت‌های متفاوتی دارند نیاز باشد، چراکه برخی از بیماران یا در ارائه خلط برای آزمایش‌های معمول مشکل دارند و یا خلطی ندارند که به عنوان نمونه از آن بتوان استفاده کرد. در برخی مواقع، بویژه در مورد HIV/AIDS، سل پیشرفت آرامی دارد بطوری که تظاهرات بالینی، یافته‌های رادیوگرافی و نیز خلط یا ترشحات خاص مرتبط با سلی که در آزمایشگاه می‌توانند مورد بررسی قرار گیرند، حاصل نمی‌شوند.

سایتوکاین‌ها که از عوامل ارزشمند ایمنی در عفونت و بیماری سلی هستند می‌توانند به عنوان عوامل تشخیصی در موارد سلی که بدلایل خاص فوق‌الذکر شناسایی نشده‌اند، مورد توجه قرار گیرند.

در این مطالعه ما توانستیم یک رابطه منطقی میان سل و سطوح بالاتر IL-10 پیدا کنیم که در کنار آزمایش خلط، منافع آن در حل محدودیت‌های آزمایشگاهی نشان داده شده است.

با در نظر گرفتن سطح برش IL-10 در شناسایی سل و حساسیت بالای آن، ارزش استفاده از IL-10 در غربالگری جمعیت علامتدار بیماری سل، بیشتر خود را مطرح می‌کند.

اضافه بر آن، IL-10 در موارد شناسایی سل خارج ریوی، نمایش شدت سل یا پاسخ به کموتراپی و متعاقبا نتیجه بیماری (مستقیما و یا در کنار سایر آزمایش‌های سرولوژیک) مد نظر قرار خواهد گرفت.

به دلیل توان پایین (۱۹٪)، این مطالعه موفق به یافتن ارتباطی بین IL-12 و استعداد ابتلا به سل نشد. تداوم کار در این زمینه همراه با توان بیشتر لازم است. در این مورد برای رسیدن به توان ۸۰٪، بررسی بر روی ۸۷۲ نفر در گروه‌های بیمار و شاهد مورد نیاز است.

بدیهی است سایتوکاین‌هایی مانند IL-10 و IL-12 بدلیل آنکه ویژگی پایایی[1] در تشخیص سل ندارند نمی‌توانند مارکر قوی در این زمینه محسوب شوند. بسیاری از سایتوکاین‌ها برای یک بیماری خاص اختصاصی نیستند. آنها تنها واسطه‌ها و مارکرهای پاسخ بدن به یک گروه از بیماری‌ها هستند و عفونت‌های داخل سلولی تنها یک گروه از این بیماری‌هاست. بنابراین استفاده از چنین آزمایش‌های سرولوژیک برای شناسایی سل به تنهایی توصیه نمی‌شود.

منابع:

1) Hickman SP, Chan J, Salgame P. Mycobacterium tuberculosis Induces Differential Cytokine Production from Dendritic Cells and Macrophages with Divergent Effects on Naive T Cell Polarization. Journal of Immunology. 2002;168(9):4636-4642.
2) Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. Journal of Experimental Medicine. 1993;178(6):2249-2254.
3) Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. Journal of Experimental Medicine. 1993;178(6):2243-2247.
4) Cooper AM, Roberts AD, Rhoades ER, Callahan JE, Getzy DM, Orme IM. The role of interleukin-12 in acquired immunity to

[1] Reliable specificity

Archive of SID
www.SID.ir

CTLA-4 expression. Infection and Immunity. 1996;64(3):913-918.
18) Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C. Macrophage deactivation by interleukin 10. Journal of Experimental Medicine. 1991;174(6):1549-1555.
19) D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. Journal of Experimental Medicine. 1993;178(3):1041-1048.
20) de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. Journal of Experimental Medicine. 1991;174(5):1209-1220.
21) de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, et al. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. Journal of Experimental Medicine 1991;174(4):915-924.
22) Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. Journal of Immunology. 1991;147(11):3815-3822.
23) Barnes PF, RL Modlin, JJ Ellner. T-cell responses and cytokines. In: BR Bloom editor. Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control. Washington DC: American Society for Microbiology; 1994. p. 417-435.
24) Sánchez FO, Rodríguez JI, Agudelo G, García LF. Immune responsiveness and lymphokine production in patients with tuberculosis and healthy controls. Infection and Immunity. 1994;62(12):5673-5678.
25) Zhang M, Lin Y, Iyer DV, Gong J, Abrams JS, Barnes PF. T-cell cytokine responses in human infection with Mycobacterium tuberculosis. Infection and Immunity. 1995;63(8):3231-3234.
26) Beamer GL, Flaherty DK, Assogba BD, et al. Interleukin-10 promotes Mycobacterium tuberculosis disease progression in CBA/J mice. Journal of Immunology. 2008;181(8):5545-5550.

Mycobacterium tuberculosis infection. Immunology. 1995;84(3):423-432.
5) Flynn JL, Goldstein MM, Triebold KJ, Sypek J, Wolf S, Bloom BR. IL-12 increases resistance of BALB/c mice to Mycobacterium tuberculosis infection. Journal of Immunology. 1995;155(5):2515-2524.
6) Jouanguy E, Altare F, Lamhamedi S, et al. Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guérin infection. New England Journal of Medicine. 1996;335(26):1956-1961.
7) Newport MJ, Huxley CM, Huston S, et al. A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. New England Journal of Medicine. 1996;335(26):1941-1949.
8) Altare F, Durandy A, Lammas D, et al. Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. Science. 1998;280(5368):1432-1435.
9) de Jong R, Altare F, Haagen IA, et al. Severe mycobacterial and Salmonella infections in interleukin-12 receptor-deficient patients. Science. 1998;280(5368):1435-1438.
10) Estaquier J, Idziorek T, Zou W, Emilie D, Farber CM, Bourez JM, T helper type 1/T helper type 2 cytokines and T cell death: preventive effect of interleukin 12 on activation-induced and CD95 (FAS/APO-1)-mediated apoptosis of CD4+ T cells from human immunodeficiency virus-infected persons. Journal of Experimental Medicine. 1995;182(6):1759-1767.
11) Sudre P, ten Dam G, Kochi A. Tuberculosis: a global overview of the situation today. Bull World Health Organ. 1992;70(2):149-159.
12) Lanzavecchia A, Sallusto F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. Cell. 2001;106(3):263-266.
13) Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. Cell. 2001;106(3):255-258.
14) Trizio D, Cudkowicz G. Separation of T and B lymphocytes by nylon wool columns: evaluation of efficacy by functional assays in vivo. Journal of Immunology. 1974;113(4):1093-1097.
15) Steinman RM, Pack M, Inaba K. Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. Immunological Reviews. 1997;156:25-37.
16) Shu U, Kiniwa M, Wu CY, et al. Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction. European Journal of Immunology. 1995;25(4):1125-1128.
17) Gong JH, Zhang M, Modlin RL, et al. Interleukin-10 downregulates Mycobacterium tuberculosis-induced Th1 responses and

Archive of SID
www.SID.ir