

بررسی تولید سایتوکاین ها در بیماران مبتلا به بروسلوز حاد

مرتضی حقیری زاده رودان* ، دکتر محمدباقر اسلامی* ،

دکتر سیدمحمد علوی** ، دکتر محمد پزشکی*

خلاصه:

سایتوکاین ها موادی هستند که در سلولهای مختلفی بویژه لنفوسیت های T تولید و ترشح می شوند و در روند پاسخ ایمنی دخالت دارند. با توجه به اینکه بیماری بروسلوز ناشی از باکتریهای درون سلولی است، ایمنی سلولی در این بیماری نقش مهمی در پاسخهای ایمنی به هنگام عفونت ناشی از این باکتریها به عهده دارد و بررسی تغییرات سایتوکاین ها در این بیماری اطلاعات مفیدی در ارتباط با فعالیت سیستم ایمنی سلولی بدست می دهد.

در این تحقیق ۷۱ بیمار مبتلا به بروسلوز حاد و ۱۲ فرد طبیعی نیز از بین دانشجویان پزشکی و اهداء کنندگان خون در این تحقیق شرکت داده شدند. تشخیص بیماری با توجه به سابقه بیماری، معاینات بالینی و آزمونهای سرولوژی انجام پذیرفت. میزان سایتوکاین های IL-2، IL-12، انترفرون گاما، IL-4، IL-10 در سرم بیماران بروش الیزا سنجیده شد.

نتایج نشان داد که میزان IL-2 و IL-4 در سرم بیماران نسبت به افراد طبیعی کمی افزایش یافته بود و در بین همه سایتوکاین های بررسی شده، میزان انترفرون گاما در سرم بالاترین افزایش را نشان داد. میزان IL-10، IL-12 در سرم بیماران اختلاف معنی داری را با افراد طبیعی نشان نداد. این نتایج حاکی از یک پاسخ ایمنی سلولی از نوع Th1⁺ در بیماران مبتلا به بروسلوز حاد می باشد.

واژه های کلیدی: بروسلوز حاد، سایتوکاین، IL-12، IL-2، انترفرون گاما، IL-4، IL-10.

مقدمه:

زیادی در ارتباط با تولید آنتی بادی در بدن برضد این باکتریها در هنگام ابتلا به بروسلوز انجام شده است (۱). ولی چون باکتریهای مسبب این بیماری درون سلولی هستند، ایمنی سلولسی^۱ نهایتاً نقش آنها را در باکتری در درون سلولها و بهبودی از پاتوژن را بعهده دارد (۶:۵).

بیماری بروسلوز در نقاط وسیعی از جهان بین انسان و حیوانات اهلی شایع است (۱، ۲). عامل این بیماری باکتریهای از خانواده بروسله هستند که پاتوژنهای درون سلولی می باشند (۳، ۴). تاکنون مطالعات

* بخش پاتوبیولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

** بخش عفونی بیمارستان رازی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اهواز

1- Interleukin 2,12

2- Cell Mediate Immunity

3- T Helper

تحقیق مشارکت داده شدند. پس از بررسی بالینی توسط متخصصین عفونی نمونه خون وریدی از بیماران تهیه و نمونه‌های سرم جدا شده از خون بیماران تا زمان سنجش آنتی بادیها و سایتوکاین‌ها در فریز ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و در هر یک از سرم‌ها میزان آنتی بادی و سایتوکاین‌ها تعیین گردید. در این تحقیق سنجش آنتی بادیها بعنوان یک هدف منظور محققین نبوده بلکه صرفاً بعنوان یک معیار برای کمک به تشخیص بروسلوز انجام شد. تشخیص بروسلوز حاد با توجه به سابقه کوتاه ابتلا به این بیماری، معاینات بالینی، نتایج آزمونهای سرولوژی انجام گرفت، تیتراسیون آنتی بادی در سرم‌ها با روش رایست باکتریال آگلوتیناسیون^۴ و 2ME^۵ با آنتی ژن انستیتو رازی، حصارک، ایران انجام گرفت (۱۰). سنجش میزان سایتوکاین‌ها در سرم با استفاده از کیت‌های IL-12 Quantikine به شماره D1200 و IL-2 به شماره D2050 و IL-4 به شماره D4050 و IL-10 به شماره D1000 و انترفرون گاما به شماره DIF50 از R&D System و بروش الیزا انجام گرفت (۱۰). دستگاه الیزا خوان بهره‌رنگ برای خواندن نتایج الیزا استفاده شد.

تعداد ۱۲ نفر از هر دو جنس از بین اهداء کنندگان خون در شهر اهواز و دانشجویان دانشگاه اهواز که نرمال و سابقه بیماری بروسلوز نداشتند بعنوان شاهد در این تحقیق مشارکت داده شدند. به دنبال استخراج اطلاعات مورد نظر ارزیابی‌های آماری بر روی متغیرهای فوق‌الذکر با نرم افزار رایانه‌ای SPSS (Version 8.0) از آزمون Tukey برای تجزیه و تحلیل یافته‌ها استفاده گردید.

مطالعات مربوط به ایمنی سلولی تاکنون عمدتاً در مدل‌های حیوانات آزمایشگاهی انجام شده است و در اینگونه مطالعات محققین نشان داده‌اند که سایتوکاینهای تومور نکروز فاکتور آلفا^۱ و انترلوکین ۱۲^۲ نقش مهمی در مقاومت علیه بروسلا آبورتوس دارند (۷) در هنگام ابتلا به عفونت بروسلائی در مدل‌های حیوانی و در افراد مبتلا به بروسلوز، میزان اینترفرون گاما^۳ بشدت افزایش می‌یابد و اگر بیماران نتوانند بمیزان کافی انترفرون گاما تولید نمایند عفونت در بدن بیماران ادامه می‌یابد (۸ و ۹).

مطالعات انجام شده در ارتباط با تولید سایتوکاین‌ها در افراد انسانی مبتلا به بروسلوز بسیار محدود بوده است. در بررسی‌های برخی از محققین میزان انترفرون گاما و انترلوکین ۱۲ در بیماران در مقایسه با اشخاص طبیعی افزایش نشان می‌دهد ولی آنها در گزارش خود مشخص نمودند که بیماران مورد مطالعه مبتلا به بروسلوز حاد یا مزمن بوده‌اند (۸).

هدف از مطالعه حاضر این است که تولید سایتوکاین‌ها در بیماران مبتلا به بروسلوز حاد مورد بررسی قرار گیرد و تعداد بیشتری از سایتوکاین‌های Th1 و Th2 در این تحقیق منظور گردد و تغییرات سایتوکاین‌های انترلوکین‌های ۲ و ۱۲، انترفرون ۲، انترلوکین‌های ۱۰ و ۱۴ در سرم بیماران مبتلا به بروسلوز حاد مسورد سنجش قرار گیرد.

مواد و روشها:

تعداد ۷۱ بیمار مبتلا به بروسلوز از مراکز درمانی استان خوزستان بصورت نمونه‌گیری آسان در این

1- Tumor Necrosis Factor Alfa (TNF a)

2- Interleukin 12

3- γ -Interferon

4- Wright Bacterial Agglutination

5- 2- Mercaptoethanol

که این سایتوکاین عمدتاً از لنفوسیت‌های Th1 ترشح و این سلولها نقش مهمی در ایمنی سلولی دارند. سایتوکاین‌ها مواد محلولی هستند که عمدتاً از لنفوسیت‌ها و بخصوص لنفوسیت‌های T پس از تحریک آنتی ژنی تولید و ترشح می‌شوند و با اثر بر سلولهای نظیر ماکروفاژها، سلول NK^۱ و سلولهای دیگر در تنظیم پاسخ ایمنی مشارکت دارند (۱۱).

انترلوکین ۱۲ عمدتاً بوسیله ماکروفاژها در پاسخ به برخی آنتی ژنها نظیر پاتوژنهای داخل سلولی تولید می‌شود، و عامل مهمی برای لنفوسیت‌های T و سلولهای NK در تولید انترفرون گاما می باشد (۱۲). محققین متعددی از نقش مرکزی انترلوکین ۱۲ در مقاومت به عفونت بروسلرا را از طریق تحریک تولید انترفرون گاما و تقویت فعالیت سلولهای NK گزارش کرده اند (۷، ۱۳، ۱۴).

افزایش سطح انترلوکین ۱۲ در بروسلوز انسانی گزارش شده است (۸) با اینحال در بررسی حاضر افزایش انترلوکین ۱۲ در بیماران با بروسلوز حاد یافت نگردید، سطح پائین این سایتوکاین در بیماران ما می‌تواند مربوط به زمان جمع آوری نمونه خون از بیماران باشد. در برخی نواحی ایران از جمله منطقه خوزستان مراجعه به پزشک متخصص با تأخیر انجام می‌شود که همین تأخیر ممکن است علت پایین بودن سطح انترلوکین ۱۲ در خون بیماران باشد، عامل دیگر کاهش انترلوکین ۱۲ سرم، در بیماران ما ممکن است دروهایی باشد که بیماران در دوره عفونت مصرف کرده اند. در بررسی حاضر افزایش سطح انترلوکین ۲ سرم بیماران در مقایسه با کنترل طبیعی تفاوت معنی داری نداشت. احمد و همکاران نیز انترلوکین ۲ را در سرم بیماران

بخاطر رعایت اخلاق پزشکی هیچگونه تغییر یا تداخلی در روش درمانی بیماران انجام نگرفت. بیماران مبتلا به بروسلوز اغلب تحت درمان با استرپتومایسین داکسی سیکلین یا ریفامپین بوده و یا کوتریموکسازول دریافت می‌کردند.

نتایج:

عبارت رایت در ۹۰٪ بیماران مبتلا به بروسلوز حاد از $\frac{1}{160}$ تا $\frac{1}{1280}$ بود و تیتراژ آزمون 2ME در ۹۰٪ در همین بیماران از $\frac{1}{80}$ تا $\frac{1}{320}$ را تشکیل می‌داد. نتایج سنجش میزان سایتوکاین‌های IL-12، انترفرون‌های ۲، IL-4، IL-2، IL-10. در بیماران مبتلا به بروسلوز حاد و افراد طبیعی در جدول ۱ منعکس شده است. افزایش انترفرون ۲ بخصوص در بیماران چشمگیر می‌باشد. میزان IL-10 در بیماران نسبت به طبیعی کاهش نشان می‌دهد.

جدول ۱ - میانگین میزان سایتوکاینها (پیکوگرم در میلی‌لیتر) در اشخاص نرمال و مبتلا به بروسلوز حاد

P. value	میانگین (M ± SD) ^۱		سایتوکاین
	نرمال کنترل	بیماران بروسلوز حاد	
۰/۹۸۵	۱/۱۱ ± ۲/۰۲	۱/۲۶ ± ۲/۶۱	IL - 12
..	غیر قابل سنجش	۸/۱۳ ± ۱۱/۵۴	IL - 2
..	غیر قابل سنجش	۳۲/۴۷ ± ۶/۸۹	IFN - ۲
..	غیر قابل سنجش	۸/۱۱ ± ۱۱/۶۱	IL - 4
۰/۷۱۰	۴/۶۴ ± ۶/۹۱	۳/۱۵ ± ۵/۷۷	IL - 10

بحث:

از یافته‌های مهم این تحقیق افزایش سایتوکاین انترفرون ۲ در بیماران مبتلا به بروسلوز حاد می‌باشد

طبیعی نشان نداد (جدول ۱). ما گزارشی مربوط به انترلوکین ۱۰ در بروسلوز انسانی نیافتیم، با اینحال، Fernandez - Logo سطح قابل توجه انترلوکین ۱۰ در سلولهای طحال موش آلوده به بروسلوز آبورتوس را یافتند و فرو تنظیمی^۱ پاسخ ایمنی حفاظتی بوسیله این سایتوکاین را در این موشها نشان دادند (۱۶). از یافته های مهم تحقیق حاضر بالا بودن میزان انترفرون گاما و همچنین انترلوکین ۲ سرم بیماران مبتلا به بروسلوز حاد است. این سایتوکاین ها در زمره سایتوکاین های Th1 طبقه بندی می شوند. سایتوکاین های Th1 پاسخ CM1^۲ را بسمت یک دفاع مؤثر و کارآمد علیه پاتوژنهای درون سلولی پیش می برند و احتمالاً نقش مؤثری در بهبودی از این عفونت دارند (۱۷).

انترفرون گاما سایتوکاینی است که علاوه بر لنفوسیت های Th1 از سلولهای NK و لنفوسیت های T CD 8+ تولید می شود و ماکروفاژها را در انهدام درون سلولی باکتریها فعال می نماید (۱۷). یافته های تحقیق حاضر دلالت بر این نکته دارد که پاسخ Th1 در بروسلوز حاد در مقایسه با پاسخ Th2 غلبه داشته و تداوم این پاسخ در بهبودی بیماران مبتلا نقش مؤثری دارد.

References:

1. The development of New / Improved brucellosis vaccines : Report of WHO meeting , Geneva , Switzerland 11 – 12 Dec 1997: 4.
2. Isreal J. Brucellosis: an overview. Emerging infectious disease. April–June 1997; 3 (2): 213 – 221.
3. Oliveria S C, Harms J S, Rech E L, Robate RS, Bacca AL, Goes AM, et al. The role of T-Cell subsets and cytokines in the regulation of intracellular bacterial infection. Braz J Med Bio Res 1998; 31 (1): 77.

1- Down-regulation

2- Cell Mediate Immunity

بروسلوزی نیافتند (۸). Zhan و همکاران دریافتند که سلولهای طحال موشهای آلوده به بروسلوز آبورتوس سطح پائینی از انترلوکین ۲ را تولید می کنند (۹).

انترفرون گاما که سایتوکاین دیگر گروه Th1 می باشد هر دو سلولهای ماکروفاژ و NK را فعال می کند و نقش مهمی در ایمنی بر علیه پاتوژنهای داخل سلولی دارد (۱۵). در بررسی حاضر میزان انترفرون گاما در مقایسه با سایر سایتوکاین هائی که در این مطالعه مورد سنجش قرار گرفت بالاترین سطح سرمی را در بیماران مبتلا به بروسلوز حاد نشان داد در حالیکه این سایتوکاین در سرم افراد گروه طبیعی غیر قابل سنجش بود (جدول ۱). سطح سرمی بالای انترفرون گاما در بیماران با بروسلوز توسط احمد و همکاران گزارش شده است (۸). در بررسی حاضر سطوح سرمی انترلوکین های ۴ و ۱۰ که سایتوکاین های گروه Th2 می باشند در بیماران با بروسلوز حاد و نیز در افراد نرمال اندازه گیری شد، افزایش اندک سطوح انترلوکین های ۴ در بیماران مشاهده شد (جدول ۱).

احمد و همکاران انترلوکین های ۴ را در بیماران بروسلوزی نیافتند (۸)، سطح سرمی انترلوکین ۴ در سرم بیماران ما با یافته ایشان مطابقت ندارد، این تفاوت همانطوریکه قبلاً ذکر شد می تواند به دلیل زمانی باشد که نمونه خون از بیمار گرفته شده است، بنظر می رسد که با گذشت زمان (تأخیر در مراجعه به متخصص) و پیشرفت بیماری و نیز در نتیجه عدم درمان کافی، تولید انترلوکین ۴ شروع می شود و سطح آن بتدریج در سرم افزایش می یابد و چون این سایتوکاین تولید سایتوکاین های Th1 را مهار می کند (۱۶). پس ممکن است یکی از عوامل مسئول در طولانی شدن بیماری و هدایت آن به حالت مزمن در برخی بیماران باشد. سطح انترلوکین ۱۰ در بیماران با بروسلوز حاد تفاوت معنی داری در مقایسه با کنترل

11. Trinchieri G. Interleukin 12: A Proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annual Review of Immunology* 1995; 13: 251-276.
12. Abbas, AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. 4th ed. W. B Saunders. 2000: 235-269.
13. Zhan Y, Cheers C. Endogenous interleukin-12 is involved in resistance to brucella abortus infection. *Infect Immun.* Apr 1995; 163 (4): 1387-1390.
14. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. Kuby immunology. 4th ed. Freeman & CO. 2000: 319.
15. Faver N, Bordman G, Rudin W. Comparison of cytokine measurements using ELISA, ELISPOT, and semi-quantitative RT-PCR. *J Immunol Meth.* 1997; (204): 57-66.
16. Fernandez-Lago L, Monte M, Chordi A. Endogenous gamma interferon and interleukin-10 in brucella abortus 2308 infection in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* Sep 1996; 15 (2-3): 109-114.
17. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne B. A Kuby immunology. 4th ed. Freeman & CO. 2000: 351-370.
4. Sathiyaseelan Y, Jiang X, Baldwin C L. Growth of brucella abortus in macrophages from resistant and susceptible mouse strains. *Clin EXP Immunol.* 2000 AUG; 121 (2): 289.
5. Kaufmann SH E. Immunosity to intracellular microbial pathogens. *Immunology Today* 1995; 16 (7): 338-341.
6. Splitter G, Oliveira S, Garey M, Miller C, Ko J, Covert Y. Lymphocyte mediated protection against facultative intracellular bacteria. *Vet Immunol & Immunopath* 1996; 54:309-319.
7. Zhan Y, Liu Z, Cheers C. Tumor necrosis factor alpha and IL-12 contribute to resistance to the intracellular bacterium brucella abortus by different mechanisms. *Infection and Immunity.* July 1996; 2782-2786.
8. Ahmed K, Kismat A, Rouk AL, Martinez G, Oishi K, Rotimi OY, et al. Levels of interferon-gamma and interleukin-12 during human brucellosis. *AM J Trop Med Hyg.* 1999; 61 (3): 425-427.
9. Rodriguez-Zapata M, Salmeron I, Manzano L, Salmerin OJ, Prieto A, Alvarezmon M. Defective Interferon gamma production by T-Lymphocytes from patients with acute brucellosis. *Eur J Clin Invest.* 1996 Feb; 26(2): 136-40.
10. Rose, N R, Friedman H, Fahey JL, Manual of clinical immunology, 3Th ed American Society for Microbiology. 1988: 385-7.