Archive of SID

بررسی تغییرات زیر گروه های لنفوسیت T در گردش خون محیطی در بیماران مبتلا به بروسلوز حاد و مزمن

مرتضی حقیری زاده* ، محمدباقر اسلامی** ، عبدالفتاح صراف نژاد**

خلاصه:

بیماری بروسلوز ناشی از عفونت باکتریهای بروسلا می باشد که پاتوژنهای درون سلولی هستند. در اینگونه پاتوژنها ، سیستم ایمنی سلولی نقش مهمی در دفاع و بهبودی بیماران از این عفونت دارد . در تحقیق حاضر ، تغییرات زیر گروه های لنفوسیت[1] T که سلولهای سیستم ایمنی سلولی هستند ، در بیماران مبتلا به بروسلوز حاد و مزمن بررسی شده است . در این تحقیق ۷۱ بیمار مبتلا به بروسلوز حاد و ۲۸ بیمار مبتلا به بروسلوز مزمن شرکت داده شده اند . تشخیص بیماری براساس سابقهٔ بیماری ، معاینات بالینی و آزمایشات سرولوژی انجام گرفت . لنفوسیت های T خون بیماران که دارای شاخصهای CD_8 ,[2] CD_3 ,CD_4[3] بود با استفاده از آنتی بادیهای مونوکلونال اختصاصی برضد این شاخص ها و به کمک دستگاه فلوسایتومتری شمارش شدند . نتایج بدست آمده نشان می دهد که لنفوسیت‌های CD_3 در بیماران مبتلا به بروسلوز حاد و مزمن تفاوت چندانی ندارند ($P = ۰/۱۳۱$) ولی درصد لنفوسیت های CD_4 در بیماران مبتلا به بروسلوز مزمن نسبت به بیماران بروسلوز حاد کاهش چشمگیری یافته است ($P = ۰/۰۰۷$) و برعکس درصد لنفوسیت های CD_8 خون محیطی بیماران مبتلا به بروسلوز مزمن نسبت به بیماران مبتلا به فرم حاد این بیماری بطور چشمگیر افزایش یافته است ($P = ۰/۰۰۸$) . تغییر در نسبت سلولهای CD_4 به سلولهای CD_8 حاکی از اختلال شدیدی است که پاتوژنی در سیستم ایمنی سلولی بوجود آورده است و این اختلال تأثیر خود را بخصوص در روند تکثیر لنفوسیت های T و احتمالاً عملکرد سلولهای CD_4 نشان داده است .

واژه های کلیدی: بروسلوز حاد ، بروسلوز مزمن ، لنفوسیت های T ,CD_3 ، زیرگروه CD_4 ، زیرگروه CD_8

مقدمه :

بیماری بروسلوز در نقاط وسیعی از جهان بین انسان و حیوانات اهلی شایع است (۲،۱) . هنوز واکسن مؤثری که بتوان از آن در پیشگیری از ابتلا به این بیماری در افراد انسانی استفاده نمود تولید نشده است (۱) . از دلایل آن این است که هنوز

* بخش ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اهواز

** بخش پاتوبیولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

1 - Thymus lymphocyte
2 - Cluster designation (T. Supprosor)
3- T. Helper

دریافت مقاله: ۸۰/۳/٦ دریافت مقاله اصلاح شده: ۸۱/۳/۲۹ اعلام قبولی: ۸۱/٤/۹

www.SID.ir

Archive of SID

در ارتباط با فعالیت سیستم ایمنی سلولی در هنگام عفونت بروسلائی دانش کافی وجود ندارد . در هنگام ابتلا به بروسلوز ، بیمار بر ضد عامل این بیماری آنتی بادی تولید می کند که بروش های مختلف از جمله آزمون سرولوژی رایت و 2ME[1] سنجش و ارزیابی می شود (۳) ولی چون باکتریهای مسبب این بیماری درون سلولی هستند ، ایمنی سلولی در مورد اینگونه باکتریها نقش اساسی را در دفاع و بهبودی از عفونت بعهده دارد . مطالعات مربوط به ایمنی سلولی در بروسلوز تاکنون عمدتاً در مدلهای حیوانات آزمایشگاهی انجام شده است (۵،٤) ولی چنین بررسی هائی در افراد انسانی مبتلا به بروسلوز بسیار محدود و نادر است و تاکنون محققین در ارتباط با تغییرات زیرگروه های لنفوسیت T در بیماران مبتلا به بروسلوز یافته ای را ارائه نداده‌اند. هدف از مطالعه حاضر این است که تغییرات لنفوسیت T گردش خون محیطی بیماران مبتلا به بروسلوز حاد و مزمن را بررسی نماید زیرا که این سلولها با کشتن سلولهای آلوده به پاتوژنها یا با تولید سایتوکاین‌های مختلف نقش مهمی در کنترل عفونت ونهایتاً بهبودی از بیماری را بعهده دارند . همچنین تغییرات سلولها در گردش خو ن محیطی که در آزمایش خون بیماران مشخص می شود برای تشخیص بیماری ارزشمند می‌باشد.

مواد و روش کار:

۷۱ بیمار مبتلا به بروسلوز حاد (۳۵ بیمار مؤنث و ۳٦ بیمار مذکر) و ۲۸ بیمار مبتلا به بروسلوز مزمن (۱۰ بیمار مؤنث و ۱۸ بیمار مذکر) در این تحقیق شرکت نمودند.

بیمارانی که در مراکز درمانی استان خوزستان مراجعه می کردند توسط متخصص عفونی مورد معاینه بالینی قرار می گرفتند . نمونه از خون وریدی آنها تهیه و بدو قسمت تقسیم می شد که به یک قسمت نمونه خون آنها ماده ضد انعقاد اضافه نمی شد و پس از لخته شدن خون ، سرم آنها جمع آوری و برای سنجش آنتی بادی مورد استفاده قرار می گرفت .

آزمونهای سرولوژی رایت[2] و 2ME برای همه‌سرم ها با استفاده از آنتی ژن بروسلوز تهیه شده از انستیتو رازی در حصارک کرج انجام گرفت (۳) . در مطالعه حاضر ، تقسیم بندی بیماران به بروسلوز حاد و مزمن براساس سابقه بیماری ، معاینه بالینی و آزمونهای سرولوژی انجام گردید .

زمان کوتاه ابتلا و علائم شدید بیماری و تیتر آنتی بادی رایت که مساوی یا بالاتر از $\frac{۱}{۸۰}$ در سرم بیماران بود از جمله معیارهائی بودند که بیماران مبتلا به بروسلوز حاد شناسائی شدند .(٦) آنهائی که سابقه طولانی ابتلا به بیماری (یکسال و یا بیشتر) داشتند (۷) و علائم بالینی و همچنین در آزمون سرولوژی رایت تیتر $\frac{۱}{۸۰}$ و بالاتر که در اثر افزودن ماده شیمیایی 2ME تیتر سرم کاهش نمی یافت بعنوان بیماران مبتلا به بروسلوز مزمن تلقی شدند.

1- 2 Merlapto - Ethanol
2 - Wright Agglutination

www.SID.ir

Archive of SID

به قسمت دیگر خون وریدی بیماران ماده ضد انعقاد EDTA[3] (بمیزان ۵٪) اضافه می شد و این نمونه خون برای شمارش لنفوسیت های خون بیماران مورد استفاده قرار گرفت . این نمونه های خون در همان روزیکه تهیه می شد در بخش ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی اهواز آزمایشات لازم روی خون انجام می گرفت و سپس در شرایط مناسب و در داخل فلاسک در دمای ٤ تا ٦ درجه سانتی گراد با هواپیما به بخش ایمونوژنتیک دانشگاه علوم پزشکی تهران منتقل می شد . در بخش فوق ، تعیین لنفوسیت های T و شمارش آنها بروش فلوسیتومتری انجام می گرفت . آنتی بادیهای مونوکلونال CD3 / CD8 به شماره ٣٤٠٠٤٤ و CD3 / CD4 به شماره ٣٤٠٠٤٣ کنژوگه شده با FITC[1] و RPE[2] بر ضد مارکرهای سطحی لنفوسیت های T CD3 , CD4 , CD8 از شرکت DAKO خریداری گردید . از دستگاه فلوسیتومتر Becton Dikinson FACS M . برای شمارش زیر گروههای لنفوسیت‌های T بیماران استفاده شد (۸) .

بدنبال استخراج اطلاعات مورد نظر ارزیابی آماری بر روی متغیرهای فوق الذکر با نرم افزار رایانه ای SPSS (Version 8) از آزمون Tukey برای تجزیه و تحلیل یافته ها استفاده گردید .

نتایج:

تیتر آزمون رایت در ۹۰ ٪ بیماران مبتلا به بروسلوز حاد از $\frac{1}{160}$ تا $\frac{1}{1280}$ بود و تیتر آزمون 2ME در ۹۰ ٪ همین بیماران از $\frac{1}{80}$ تا $\frac{1}{320}$ را تشکیل می داد .

۷۸/۵ درصد بیماران مبتلا به بروسلوز مزمن در آزمون رایت دارای تیتر $\frac{1}{160}$ تا $\frac{1}{320}$ بودند و همچنین همین درصد از بیماران مبتلا به نوع مزمن بیماری یعنی ۷۸/۵ درصد آنها دارای تیتر $\frac{1}{160}$ تا $\frac{1}{320}$ بودند .

نتایج شمارش لنفوسیت های T گردش خون محیطی با توجه به مارکرهای CD3 , CD4 , CD8 نشان می دهد که درصد لنفوسیتهای CD3 در بیماران مبتلا به بروسلوز حاد و مزمن تفاوت چندانی ندارد ولی درصد لنفوسیت های CD4 در بیماران مبتلا به بروسلوز مزمن نسبت به بیماران بروسلوز حاد کاهش چشمگیری یافته است ، و برعکس درصد لنفوسیت های CD8 خون محیطی بیماران مبتلا به بروسلوز مزمن نسبت به بیماران مبتلا به فرم حاد این بیماری بطور چشمگیری افزایش یافته است (جدول ۱).

جدول ۱ ـ درصد لنفوسیت های T در گردش خون محیطی بیماران مبتلا به بروسلوز حاد و مزمن

لنفوسیت‌های T	M ± SD (درصد میانگین)		P.value
	بروسلوز حاد	بروسلوز مزمن	
CD3	۷۸/۱۵ ± ۸/۹۳	۷٦/۹۰ ± ۱۲/۹۰	۰/۱۳۱
CD4	۳۷/۲۷ ± ٦/٥۹	۳۲/۳٥ ± ۱۰/٤۷	۰/۰۰۷
CD8	۳۲/٥۳ ± ٦/٥۳	۳۸/۰۲ ± ۸/٥۸	۰/۰۰۸

3 - Ethylen Diamine Tetra Acetic Acid
1- Fluorescein Isothiocyanate
2- Rhodamine Phycoerythrin

www.SID.ir

Archive of SID

بحث:

از یافته‌های مهم تحقیق حاضر کاهش چشمگیر درصد لنفوسیت های T ، CD4 در بیماران مبتلا به بروسلوز حاد و مزمن و افزایش درصد لنفوسیت‌های CD8 در بیماران مبتلا به بروسلوز حاد و مزمن نسبت به حالت نرمال می باشد . لنفوسیت‌های T سلولهائی هستند که یا مستقیماً با شناسائی سلولهائی که آلوده به پاتوژن هستند با روندی که سیتوتوکسی‌سیتی[1] نام گرفته است موجب انهدام چنین سلولهائی می شوند و پاتوژن را از یک محیط مناسب برای رشد و تکثیر محروم می سازند و یا با تولید سایتوکاین هائی نظیر انترفرون گاما[2] سلولهای دیگر را بویژه ماکروفاژها را در انهدام پاتوژن در درون سیتوپلاسم کمک و یاری می دهند . هر دو زیرگروه CD4 و CD8 توانائی سیتوتوکسی‌سیتی دارند ولی توانائی سلولهای CD8 در این عملکرد بالاتر است (۱۰،۹) . سلولهای CD4 از بیشمارترین زیر گروه های لنفوسیت های T هستند و حدود ٦٠ – ٤٠ ٪ کل سلولهای T خون را تشکیل می دهند . این سلولها با تولید سایتوکاین های Th1 و Th2 در ایجاد مصونیت نقش حیاتی دارند (۱۱) .

با اینحال ، در بررسی حاضر درصد لنفوسیت های T در گردش خون محیطی در بیماران مبتلا به بروسلوز حاد و مزمن که دارای مولکول CD3 هستند و هر دو زیرگروه CD4 و CD8 را شامل می‌شوند تغییری نشان نداد ولی درصد لنفوسیت‌های CD4 خون کاهش ، در حالیکه درصد سلولهای CD8 افزایش نشان داد . در مرحلهٔ مزمن بیماری ، روند کاهش درصد CD4 و افزایش CD8 همچنان ادامه یافت و حتی تشدید گردید (جدول ۱).

تاکنون مطالعه ای که افزایش تعداد سلولهای CD8 را در بیماران مبتلا به بروسلوز گزارش دهد منتشر نشده است . در مطالعه حاضر افزایش تعداد سلولهای CD8 در این بیماران که مبتلا به یک پاتوژن درون سلولی شده اند احتمالاً بمنظور یک پاسخ ایمنی مؤثر با تولید سایتوکاین هائی نظیر انترفرون گاما و همچنین با روند سیتوتوکسی‌سیتی می باشد. در تأیید اهمیت نقش سلولهای CD8 عفونت بروسلائی ، اولی‌وریا[3] و همکاران با استفاده از موشهای فاقد MHC Class I[4] و یا MHC Class II نشان دادند که ایمنی حفاظتی علیه بروسلا بخصوص به سلولهای CD8 وابسته است (٤) .

در اشخاص نرمال بین سلولهای CD4 و CD8 تعادلی برقرار است و همواره درصد سلولهای CD4 بر CD8 فزونی دارد و اغلب نسبت CD4 به CD8 دو به یک می‌باشد (۱۱) . کاهش درصد لنفوسیت‌های CD4 ممکن است ناشی از سرکوب سیستم ایمنی سلولی باشد (۱) . سرکوب سیستم ایمنی[5] در عفونت ناشی از بروسلا در موش آزمایشگاهی گزارش شده است (۱۲) . در ارتباط با اینکه چگونه باکتری بروسلا باعث اختلال در سیستم ایمنی سلولی و سرکوب سیستم ایمنی می شود هنوز نمی توان به صراحت اظهار نظر

1- Cytotoxicity
2- γ - Interferon
3 - Oliveria
4 - Major Histocompatibility Compelex class I, II
5 - Immunosuppression

www.SID.ir

Archive of SID

نمود ولی با توجه به بررسی‌های و همکاران (٤) در مورد نقش لنفوسیت‌های CD8 در بروسلوز تجربی در موش، مشاهدات ما نیز دلالت بر اهمیت سلولهای CD8 در بروسلوز انسانی دارد و احتمالاً این سلولها با روند سیتو توکسیسیتی و تولید انترفرون گاما در دفاع علیه این پاتوژن درون سلولی مشارکت دارند . ولی چون در حالت سلامت ، تعداد سلولهای CD4 بمراتب از تعداد سلولهای CD8 بیشتر است و از آنجائی که سلولهای CD4 یکی از منابع مهم تولید اینترفرون‌گاما می باشند (۱۰) ، لذا کاهش تدریجی و مستمر سلولهای CD4 در بیماران مبتلا به بروسلوز حاد، باعث کاهش تولید اینترفرون‌گاما می شود و بیماری بسوی مزمن شدن سوق می‌یابد و عفونت در بدن ریشه کن نمی شود و بیمار از اینکه یک دفاع مؤثر علیه این پاتوژن درون سلولی ایجاد نماید ناتوان است.

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) Meyer M E. Immune response to brucellae in rose N R, Friedman H, Fahey J L. Manual of clinical laboratory immunology. 3th ed. American Society for Microbiology 1986:385– 6.
4) Oliveira S C, Harms J S, Rech E L, Rodate R S, Bocca A L, Goes AM, et al. The role of T cell subset and cytokines in the regulation of intracellar bacterial infection. Braz J Med Biol Res. 1998; 31 :77 -84.
5) Kaufmann S HE, Immunity to intracellular bacteria. Ann Rev Immunology. 1993; 11: 129 – 53.

٦. کمیته علمی مبارزه با بیماری تب مالت ، برنامهٔ کشوری مبارزه با بیماری تب مالت ، ادارهٔ کل مبارزه با بیماری واگیردار (مرکز مدیریت بیماریها) واحد بیماریهای مشترک انسان و دام . ۱۳۷۸ ، ص: ۱٤۳-۱٤٤.

www.SID.ir