Archive of SID

مقاله پژوهشی

ارزیابی پرولیفراسیون سلولی و بیان داخل سلولی اینترفرون گاما (IFN-γ) در بیماران مبتلا به بروسلوز

دکتر علیرضا رفیعی* ، دکتر مینو محرز** ، دکتر آمینا کریمی نیا***

دریافت : ۸۳/۳/۲۶ ، پذیرش : ۸۳/۱۱/۵

چکیده:

تکثیر سلولهای T روش استانداردی برای ارزیابی ایمنی سلولی در مقابل عفونتهای داخل سلولی می باشد. علاوه برآن، امروزه بررسی سیتوکاینهای داخل سلولی ابزار مهمی برای بررسی پاسخهای ایمنی در مقابل محرکهای مختلف از جمله عوامل عفونی داخل سلولی محسوب می شود. این مطالعه با سنجش پاسخهای پرولیفراسیون سلولهای T و بررسی تولید داخل سلولی اینترفرون گاما (IFN-γ) به ارزیابی پاسخهای ایمنی سلولی در خون کامل افراد سالم و بیماران مبتلا به دو فرم حاد و مزمن بروسلوز می پردازد.

نمونه های خون کامل رقیق شده ۲۷ بیمار مبتلا به بروسلوز حاد (۱٤ نفر) یا مزمن (۱۳ نفر) (با میانگین سنی ۱۸/۲ ± ۳۸/۰۳ سال) و ۲۲ داوطلب سالم (با میانگین سنی ۲۱ ± ۳۵/۳۳ سال) در حضور میتوژن، باکتریهای کشته شده بروسلا ملی تنسیس یا محیط کشت تنها، کشت داده شد. تولید داخل سلولی IFN–γ در سلولهای $CD3^+$ با روش فلوسیتومتری (CFC) بررسی گردید. پاسخهای بلاستوژنیک لنفوسیتها نیز با سنجش میزان ورود تیمیدین نشاندار در روند سنتزDNA توسط روش سنتیلاسیون مایع (LTT) ارزیابی شد.

در تمامی گروههای تحت مطالعه، انکوباسیون لنفوسیتهای خون محیطی در حضور میتوژن موجب بیان داخل سلولیIFN-γ و پرولیفراسیون لنفوسیتهای T گردید. در حالی که تنها سلولهای بیماران مبتلا به بروسلوز در پاسخ به آنتی ژنهای بروسلا ملی تنسیس تکثیر و تزاید یافته و IFN-γ تولید نمودند. با این حال بیان اختصاصی IFN-γ در سلولهای T $CD3^+$ و پاسخهای بلاستوژنیک لنفوسیتی در بیماران مبتلا به بروسلوز مزمن بطور معنی داری نسبت به بیماران مبتلا به بروسلوز حاد کاهش نشان داد (P<۰/۰۰۱). وجود ارتباط مستقیم بین درصد سلولهای $CD3^+$ تولید کننده IFN–γ با اندیکس تحریک پذیری (SI) در بیماران با بروسلوز حاد بیانگر گرایش پاسخهای ایمنی به سمت Th1 در این بیماران است.

شیوه های ارایه شده در این مطالعه برای ارزیابی پاسخهای ایمنی سلولی در مقابل تحریک آنتی ژنی یا پلی کلونال روشهای مفید و قابل اعتمادی می باشند. بر اساس یافته های این مطالعه، بیماران مبتلا به بروسلوز حاد با تولید IFN–γ و تکثیر و تزاید سلولی در مقابل آنتی ژنهای بروسلا، پاسخهای تیپ Th1 را نشان می دهند در حالیکه در بیماران مبتلا به فرم مزمن بیماری چنین وضعیتی دیده نمی شود.

کلید واژه ها : اینترفرون گاما / بروسلوزانسانی / پرولیفراسیون سلولی / سیتو کاینهای داخل سلولی

* استادیار گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مازندران (E-mail : rafiei1710@yahoo.com)

** دانشیار گروه بیماریهای عفونی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

*** استادیار گروه ایمونولوژی انستیتو پاستور ایران

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه :

بروسلوز انسانی یک عفونت سیستمیک می باشد که بسیاری از اندامهای بدن را درگیر می سازد(۱).علایم بیماری غیراختصاصی بوده و عموماً ۶-۴ هفته بعد از ورود باکتریهای بروسلا به بدن ایجاد می شوند. اکثر نشانه های بیماری، شکایتهای جسمانی نظیر تب مواج، تعریق، بی اشتهایی، خستگی، کاهش وزن و افسردگی ناشی از سردرد می باشد (۲). وضعیت مقاومت میزبان در برابر بروسلا عمدتا در موش مطالعه شده است. مطالعات قبلی در موشهای آزمایشگاهی نشان می دهد که سلولهای $CD4^+$ T ترشح کننده سیتوکاین، اجزاء اصلی ایمنی در مقابل بروسلا محسوب می شوند(۳). با این حال لنفوسیتهای $CD8^+$T نیز نقش بسزایی در ایجاد ایمنی حفاظت دهنده دارند (۴) بطوریکه این سلولها دارای فعالیت سیتوتوکسیک در مقابل ماکروفاژهای آلوده به بروسلا هستند(۵).

روشهای متداول ارزیابی پاسخهای اختصاصی سلولهای T شامل اندازه گیری تکثیر و تزاید سلولی با استفاده از بررسی ورود تیمیدین نشاندار ([^{3}H]TdR) در سنتز DNA یا بیان سیتوکاینها در محیط کشت سلولهای PBMC می باشد که با انکوباسیون طولانی این سلولها در مقابل آنتی ژن خاص انجام می پذیرد (۶). این روشها قابلیت ارزیابی پاسخهای سلولهای منفرد را در میان سایر سلولها نداشته و امکان بررسی بیان بیش از یک سیتوکاین را در هر سلول فراهم نمی سازند. علاوه بر این با این روشها نمی توان پاسخهای سلولی را در جمعیتهای سلولی بسیار اندک بررسی نمود(۷). بیان سیتوکاینها در سلولهای T بالغ در پاسخ به آنتی ژن، نخستین مکانیسم دفاع ایمنی سلولی می باشد که در پاسخهای طبیعی و همینطور در بیماریها تاثیر می گذارد. چگونگی بیان سیتوکاینها ابزار با ارزشی برای شناسایی عملکرد طبیعی یا غیر عادی سلولهای T در شرایط مختلف می باشد (۸). ارزیابی سیتوکاینها در سطح سلولی اهمیت به سزایی در بدست آوردن اطلاعات صحیح در مورد نوع و نسبت سلولهای T پاسخگو در مقابل آنتی ژنهای اختصاصی دارد (۶). بررسی تولید داخل سلولی سیتوکاینها با استفاده از فلوسیتومتری امکان شناسایی همزمان دستجات مختلف سلولی و تولید سیتوکاین را در آنها فراهم می آورد (۸). با این روش امکان اندازه گیری سریع تولید سیتوکاینها در هزاران سلول مجزا و همینطور شناسایی همزمان چندین سیتوکاین در هر سلول میسر می گردد. بلحاظ اینکه پاسخهای ایمنی در اکثر بیماریها دارای اساس Th1 و Th2 می باشد این تکنیک برای پژوهش روند بیماریزایی و تعقیب پیشرفت بیماری نیز سودمند می باشد(۹). از آنجا که حد پایه بیان خودبخودی سیتوکاینها اندک می باشد، بدنبال فعال سازی کوتاه مدت ، با این روش فراوانی بسیار اندک سلولهای تحریک شده قابل شناسایی است (۸).

دراین مطالعه پاسخهای لنفوسیتهای T در مقابل آنتی ژنهای اختصاصی بیماران مبتلا به بروسلوز حاد یا مزمن در برابر آنتی ژنهای بروسلا ملی تنسیس بررسی گردید. علاوه بر این پاسخهای سلولی و سیتوکاینی بیماران مبتلا به بروسلوز و افراد سالم در مقابل فیتوهماگلوتینین(PHA) نیز بعنوان کنترل مثبت مورد ارزیابی قرار گرفت. .

روش کار:

این مطالعه بر روی ۲۷ بیمار (۱۲ نفر زن، ۱۵ نفر مرد با میانگین سنی ۱۸/۲± ۳۸/۰۳ سال) که ابتلای آنها به بروسلوز از نظر آزمایشگاهی و بالینی محرز گردید، انجام شد. از این تعداد ۱۴ نفر مبتلا 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، 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 براین ۲۲ نفر از افراد داوطلب سالم که از نظر سنی و جنسی با بیماران نزدیک بودند (۱۰ نفر زن و ۱۲ نفر مرد، با میانگین سنی ۲۱± ۳۵/۳۳ سال) بعنوان شاهد در نظر گرفته شدند.

ابتلا به بروسلوز بر اساس جداسازی باکتریهای بروسلا ازخون، ردیابی آنتی بادیهای اختصاصی با استفاده از تست رزبنگال، تست اگلوتیناسیون لوله ای استاندارد (SAT) و تست ۲- مرکاپتواتانل (2-ME) و علائم و نشانه های بالینی و یافته های اپیدمیولوژیک تعیین گردید. تشخیص بروسلوز حاد براساس دوره بیماری (کمتر از یک سال) و علائم و نشانه های عمومی نظیر: ضعف و بیحالی ،آرترالژی و میالژی، تعریق، تب و بی اشتهایی و یافته های

www.SID.ir

Archive of SID

آزمایشگاهی (نتایج SAT و 2-ME) انجام شد (۱۰). بروسلوز مزمن یا رجعت نیز بر اساس دوره بیماری (بیش از یک سال از شروع علایم) و سرولوژی مثبت (آزمایش SAT و کومبس رایت) و علایم بیماری مشخص گردید. فرد مبتلا دچار دوره هایی از دپرسیون و سپس تعریق شده علایم اغلب موضعی بوده، درگیری کبد و طحال نادر می باشد ولی اسپوندیلیت شایعتر است. در مجموع علایم ابتلا به بروسلوز مزمن بسیار شبیه سندرم خستگی مفرط دیده می شود (۱،۱۰) و اغلب به درمانهای ضد بروسلایی رایج پاسخ مناسب داده نمیشود (۱۱).

تمامی افراد مطالعه بعد از اطلاع یافتن از ماهیت و اهداف طرح، فرم رضایتنامه را که بر اساس دستورالعملهای کمیته اخلاق پزشکی وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشکی مبنی بر اجازه اخذ خون، تنظیم شده بود، امضاء کردند. نمونه های خون با استفاده از لوله های خلا دار استریل (venipuncture) دارای ماده ضد انعقاد هپارین سدیم (10 IU/ml) اخذ گردید. نمونه ها در کمتر از ۴ ساعت بعد از نمونه گیری مورد آزمایش قرار گرفتند .

کشت خون کامل : فیتوهماگلوتینین (PHA) و باکتریهای کشته شده بروسلا ملی تنسیس به ترتیب به عنوان کنترل مثبت و آنتی ژن اختصاصی بروسلا استفاده گردید. هر نمونه خون با افزودن محیط کشت سلولی کامل RPMI 1640 حاوی ۳٪ سرم غیر فعال شده گوساله نوزاد (FCS) (سیگما، سدگس، فرانسه)، 2mM L-گلوتامین (سیگما، Cedex، فرانسه)، ۱۰۰ IU/ml پنی سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین (سیگما، سدگس، فرانسه) پنج برابر رقیق گردید. سپس نمونه های خون کامل رقیق شده در پلیت های کشت سلولی ۹۶ چاهگی ته صاف در حضور یا در غیاب 1×10^{7} CFU/ml باکتری کشته شده بروسلا ملی تنسیس سویه Rev-1 در اتمسفر حاوی CO_2 ۵٪ در دمای ۳۷°C کشت داده شدند.

سنجش تکثیر و تزاید سلولی: سنجش پرولیفراسیون لنفوسیتی در خون کامل براساس روش اصلاح شده Piekoszew (۱۲) انجام گردید. بطور خلاصه، نمونه های خون کامل با استفاده از محیط کشت کامل RPMI1640 حاوی ۳٪ سرم گوساله نوزاد (FCS) (سیگما، سدگس، فرانسه)، 2mM L-گلوتامین (سیگما، Cedex، فرانسه)، ۱۰۰IU/ml پنی سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین (سیگما، سدگس، فرانسه) در لوله های فالکون ۱۵میلی لیتری استریل مخصوص کشت سلول (ماراتون، لندن، انگلستان) پنج برابر رقیق گردید. نمونه های خون کامل رقیق شده در حضور یا عدم حضور 2.5µg/ml فیتوهماگلوتینین (PHA)(سیگما، سدگس، فرانسه) یا باکتریهای کشته شده بروسلا ملی تنسیس سویه Rev-1 (1×10^{7} CFU/ml) در پلیتهای کشت سلولی ۹۶ چاهگی ته گرد بمدت ۷۲ ساعت در اتمسفر حاوی ۵٪CO_2 در دمای ۳۷°C کشت داده شد. ۱۸ ساعت قبل از اتمام زمان انکوباسیون به هر چاهک ۰/۵µCi از ^{3}H- تیمیدین نشاندار (با فعالیت ویژه ۵Ci/mMol) (آمرشام، بوکینگ همشایر، انگلستان) موجود در ۲۰µl محیط کشت اضافه گردید. سپس سلولها توسط دستگاه هاروستر و با استفاده از آب مقطر بداخل فیلترهای پشم و شیشه ای شسته شده و بعد از خشک شدن فیلترها، مقدار تیمیدین نشاندار وارد شده در DNA توسط دستگاه کانتر سینتیلاسیون مایع (بتاکانتر) (فارماسیا، گایترسبرگ، مریلند آمریکا) شمارش گردید. نتایج بصورت اندیکس تحریک (SI) ارائه شده است که بصورت زیر محاسبه گردید.

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

SI بیشتر از ۲ بعنوان مثبت قلمداد شد.

شناسایی داخل سلولی سیتوکاین ها:

آماده سازی سلولی و تحریک آنتی ژنی: نمونه های خون کامل رقیق شده در حضور یا عدم حضور باکتریهای کشته شده *B. melitensis* سویه *Rev-1* در پلیتهای ۹۶ چاهکی ته صاف در دمای ۳۷°C و اتمسفر حاوی CO_2 ۵٪ کشت داده شد. ۱۸ ساعت بعد سلولها به لوله های پلی اتیلنی ۱۵ml فالکون منتقل گردید. با افزودن فربل ۱۲- میریستات ۱۳- استات (PMA) و اینومایسین (I) در حضور مننزین بر اساس دستور العمل شرکت سازنده بمدت ۵ ساعت دوباره تحریک گردید.

بعد از تمام انکوباسیون، ۱۰۰ µL/ml از محلول ۲۰ mM EDTA در هر لوله اضافه گردید و نمونه ها حداقل ۱۰ ثانیه ورتکس شده و ۱۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه و دوباره ورتکس گردید. سپس سلولهای قرمز خون با افزودن ۹ حجم محلول ACK سرد (PH,7.2, 0/1mM Na2 EDTA, 1mM KHCO3 , 150 mM NH4CI) و ۲۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق لیز گردیده، ۱۰ دقیقه در ۵۰۰g سانتریفوژ شده و مایع رویی دور ریخته شد.

www.SID.ir

Archive of SID

سلولهای باقیمانده بعد از دو مرحله شستشو با محلول شستشوی FACS(محلول PBS حاوی FCS 1٪ و 0.1% NaN3)، در غلظت $۱۰^۶ \times ۱$ سلول در هر میلی لیتر تنظیم شد .

رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس : نمونه ها در لوله های پلی استیرنی ۷۵mm ×۱۲ (فالکون شماره ۲۰۵۲) به میزان ۲۰۰ µL در لوله مربوطه منتقل شده و به هر لوله µL ۱۰ آنتی بادی مونوکلونال ضد CD3 انسانی کونژوگه با CYQ اضافه گردید و بمدت ۱۵ دقیقه در تاریکی و دمای۴°C انکوبه شد. پس از دوبار شستشو با محلول شستشوی FACS، سلولها با افزودن محلول پارافرمالدئید ۱٪ درPBS (محلول تثبیت ،IQP) تثبیت شدند. بعد از دوبار شستشو با محلول شستشو، با افزودن محلول نفوذ پذیر کننده حاوی ساپونین جدار سلولها نفوذ پذیرگردید . آنگاه با افزودن آنتی بادیهای کونژوگه مونوکلونال FITC-IFN-γ و ۲۰ دقیقه انکوباسیون در تاریکی در دمای ۴°C، سیتوکاینهای داخل سلولی رنگ آمیزی شد. سرانجام پس از شستشو، سلولها در µL ۵۰۰ از محلول PBS سوسپانسیون گردیده و با دستگاه فلوسیتومتری FACScan و نرم افزار lysis II (بکتون- دیکینسون، سانخوزه، کالیفورنیا) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

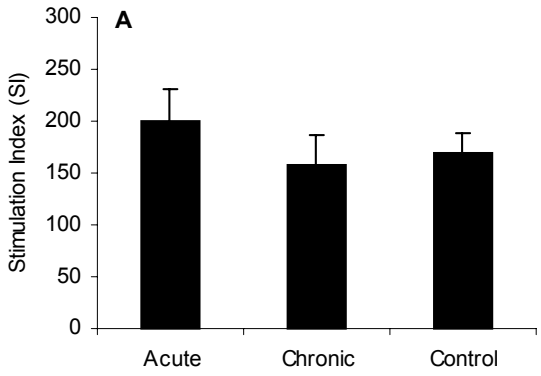
لوله های کنترل ایزوتیپی نیز همانند روش بالا ولی با مونوکلونال آنتی بادی سازگار ایزوتیپی برای IFN-γ رنگ آمیزی گشت. این لوله ها برای تنظیم حد FL1 و FL2 استفاده شد. سلولهای آن در نخستین مبنا از مبنای حد چهار لگاریتمی تنظیم گشت. همچنین سلولهای تحریک شده در غیاب مننزین که برای شناسایی وجود سیتوکاینها رنگ آمیزی شده بودند برای تعیین ۹۵٪ دامنه اطمینان رنگ آمیزی زمینه، به کار رفتند.

طرح بندی فلوسیتومتری و تجزیه و تحلیل داده ها: پس از شناسایی موقعیت لنفوسیتها با استفاده از پرتوهای پراکنش جانبی(SSc) و پرتوهای مستقیم (FSc)، سلولهای $CD3^+$ بر اساس پرتوی پراکنش جانبی (SSc) و بروز مولکول CD3 حد بندی شدند. در این محدوده بین ۱۰۰۰۰-۱۵۰۰۰ رویداد برای هر نمونه جمع آوری گردید. داده ها با استفاده از نرم افزار lysis II تجزیه و تحلیل شده و بصورت درصد سلولهای بیان کننده سیتوکاین در بین کل سلولهای $CD3^+$ با هیستوگرام طرح نقطه ای (dot plat) نمایش داده شد.

داده ها بصورت 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 مقدارP<۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد. برای آنالیز داده ها از نسخه ۱۰ نرم افزار SPSS استفاده گردید.

نتایج :

پاسخهای بلاستوژنیک اختصاصی لنفوسیتهای بیماران مبتلا به بروسلوز : همانطور که در نمودارA۱ دیده می شود افراد سالم و بیمار در تحریک پلی کلونال با PHA، بعنوان کنترل مثبت، تقریبا به یک نسبت تکثیر و تزاید می یابند (P>۰/۰۵) ولی تنها سلولهای بیماران مبتلا به بروسلوز در برابر آنتی ژنهای بروسلا پرولیفراسیون نشان می دهند و لنفوسیتهای افراد سالم در پاسخ به آنتی ژنهای بروسلا تکثیر و تزاید نشان ندادند (۰/۴۶ ± ۱/۶۹).

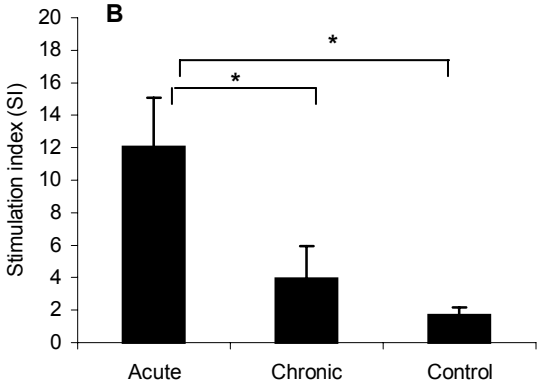


نمودارA ۱: پاسخهای تکثیر و تزاید (SI) لنفوسیتهای خون محیطی در گروههای تحت مطالعه بر حسب تحریک غیر اختصاصی با PHA

علاوه بر این اندیکس تحریک (SI) لنفوسیتهای بیماران مبتلا به بروسلوز مزمن در برابر آنتی ژنهای اختصاصی بروسلا بطور معنی داری کمتر از بیماران با بروسلوز حاد می باشد (نمودار ۱B) بطوریکه اندیکس تحریک در بیماران مبتلا به بروسلوز حاد ۳ ± ۱۲/۰۶ می باشد که بطور معنی دار بیش از پاسخ بیماران با بروسلوز مزمن است (۲/۰ ± ۳/۹۵). اختلاف در پاسخهای پرولیفراتیو بعلت تفاوت در پاسخهای زمینه ای نمی باشد بطوریکه کشتهای تحریک نشده (کنترل) در بین سه گروه اختلاف معنی داری نداشت (داده ها نشان داده نشده است).

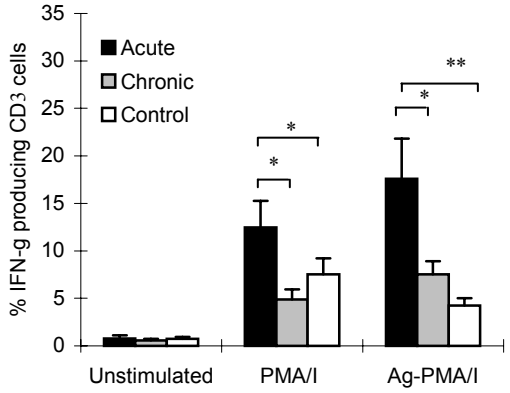
www.SID.ir

Archive of SID



نمودار B ۱: پاسخهای تکثیر و تزاید (SI) لنفوسیتهای خون محیطی در گروههای تحت مطالعه بر حسب تحریک اختصاصی با باکتریهای کشته شده بروسلا ملی تنسیس سویه Rev-1
(* نشان دهنده اختلاف معنی دار با P<۰/۰۵ می باشد).

ارزیابی بیان IFN-γ در سلولهای $CD3^+$: برای شناسایی سیتوکاینهای داخل سلولی، ابتدا سلولها در حضور یا عدم حضور آنتی ژنهای اختصاصی بروسلا بمدت ۱۸ ساعت تحریک شدند. سپس به منظور افزایش سیگنالهای سیتوکاینی سلولهای تحریک شده با افزودن محرکهای PMA و آینومایسین (PMA/I) دوباره تحریک گردیدند. در هرگروه هنگامیکه سلولها ابتدا با آنتی ژنهای اختصاصی برانگیخته شده و دوباره با PMA/I تحریک می گشت درصد سلولهای $CD3^+$ بارز کننده سیتوکاین نسبت به سلولهایی که تنها PMA/I دریافت داشته اند، افزایش چشمگیر نشان داد. در این ارتباط درصد سلولهای $CD3^+$ بیان کننده سیتوکاین در گروه شاهد حتی اگر پس از تحریک اختصاصی با آنتی ژن، دوباره با PMA/I نیز تحریک می گشتند باز هم نسبت به سلولهایی که تنها PMA/I دریافت داشته بودند، کمتر بود. نتایج سلولهایی که تنها با آنتی ژن تحریک شده بودند بدلیل ناچیز بودن سیگنال سیتوکاینی نشان داده نشده است. همانطور که در نمودار ۲ دیده می شود تحریک آنتی ژنی باعث افزایش (Up-regulation) در صد سلولهای $CD3^+$ تولید کننده IFN-γ در بیماران مبتلا به بروسلوز حاد گردید در حالیکه درصد این سلولها در افراد مبتلا به بروسلوز مزمن بطور معنی دار کمتر از بیماران با بروسلوز حاد است (۷/۵±۱/۴ در مقابل ۴/۲ ± ۱۷/۶، P<۰/۰۵). گروه کنترل تفاوت معنی داری با گروه مبتلا به بروسلوز حاد نشان داد.



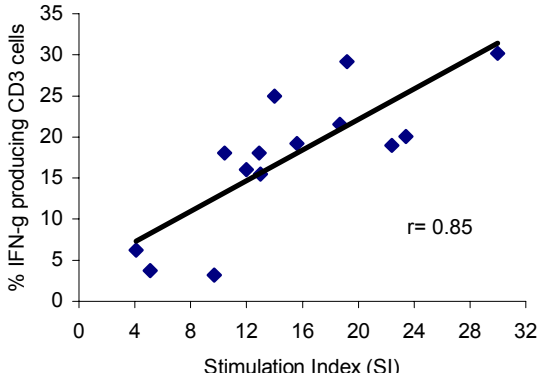
نمودار ۲: میزان بیان داخل سلولی IFN-γ را در سلولهای $CD3^+$ T بیماران مبتلا به بروسلوز حاد یا مزمن و یا افراد سالم نشان می دهد. نمونه های خون کامل رقیق شده پس از تحریک یا عدم تحریک اولیه(۱۸ ساعت) با باکتریهای کشته بروسلا ملی تنسیس سویه Rev1، بمدت ۵ ساعت توسط PMA/I در حضور منتزین دوباره تحریک شدند. رنگ آمیزی سطحی برای مولکول CD3 و IFN-γ داخل سلولی انجام شده است. داده ها، میانگین درصد سلولهای دوگانه مثبت [$CD3^+$ IFN-γ^+] ± SEM را نشان می دهند. ستاره ها اختلافات معنی دار را به ترتیب بین تحریک آنتی ژنی و غیر اختصاصی در گروه حاد در مقایسه با گروه مزمن و افراد شاهد را نشان می دهند.
(* و ** به ترتیب نشان دهنده اختلاف معنی دار با P<۰/۰۵ و P< ۰/۰۰۱ می باشد).

آنالیز بیان داخل سلولی IFN-γ در مقایسه با پرولیفراسیون لنفوسیتی در بیماران مبتلا به اشکال بالینی بیماری بروسلوز:

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 معنی داری 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 یا دارویی که باعث تغییر در شمارش لکوسیتی شود را مصرف نمی کردند. همانطور که در نمودار ۳ نشان داده شده است میزان تولید IFN-γ در سلولهای $CD3^+$ با پاسخهای بلاستوژنیک در بیماران مبتلا به بروسلوز حاد ارتباط مستقیم دارد. بطوریکه در بیماران حاد هر دو متغیر بطور معنی داری(P<۰/۰۵)افزایش داشت (r=۰/۸۵). حال آنکه ارتباط معنی داری در بیماران با بروسلوز مزمن دیده نشد (P>۰/۰۵).

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار۳ : همبستگی درصد سلولهای $CD3^+$ تولید اختصاصی IFN-γ و پاسخهای تکثیر و تزاید لنفوسیتهای خون محیطی بیماران مبتلا به بروسلوزیس حاد. همانطور که دیده می شود بین پاسخهای بلاستوژنیک (SI) لنفوسیتها و تعداد سلولهای $CD3^+$ تولید کننده IFN-γ بیماران مبتلا به بروسلوز حاد همبستگی واضح و مثبت $P<0/05$ و $r=0/85$ دیده می شود.

بحث:

بیماری بروسلوز یکی از مشکلات مهم بهداشتی در کشورهای در حال توسعه می باشد که کشاورزی و دامپروری سنتی به عنوان یکی از منابع اصلی درآمد خانواده ها محسوب می شود (۱۳). باکتریهای بروسلا معمولا سلولهای رتیکولوآندوتلیال را مورد حمله قرار می دهند و تقریبا تمامی گونه های بروسلا با مهار الحاق فاگوزوم و لیزوزوم قابلیت بقا در ماکروفاژهای موش، گاو و انسان را دارند (۱۴). پیدایش ایمنی در بروسلوز بستگی به پاسخ مناسب سلولهای دفاعی میزبان و تولید سیتوکاینهایی نظیر IFN-γ دارد.

سلولهای Th1 و Tc1 بعنوان مکانیسمهای اجرایی لازم برای برقراری مقاومت در مقابل پاتوژنهای داخل سلولی محسوب می شوند در حالیکه سلولهای Th2 با ساپرس مکانیسمهای دفاعی ماکروفاژهای فعال شده، موجب وخیم تر شدن وضعیت بیماری می گردند (۱۵). امروزه ارزیابی بیان سیتوکاین ها ابزار با ارزشی برای شناخت وضعیت ایمنی سلولی گشته است (۱۶). گرایش زیاد به تعیین نقش این مولکولهای مهم در شرایط مختلف بالینی و تحقیقاتی، باعث انگیزه ایجاد روشهای جدید برای بررسی تولید سیتوکاینها در نمونه های بالینی شده است (۱۷). روشهای متداول بررسی پاسخهای سلولی در برابر آنتی ژنهای اختصاصی نظیر بررسی تکثیر و تزاید لنفوسیتها (LTT) یا ارزیابی تولید سیتوکاین ها در برابر تحریک اختصاصی می باشد. بررسی میزان تولید سیتوکاینهای مترشحه در سوپ کشت سلولی اغلب به علت حضور غلظتهای مختلف پذیرنده های سلولی یا محلول ممکن است در نتایج نهایی اختلال ایجاد نماید (۱۸). علاوه بر آن، با این روشها نمی توان بروز بیش از یک سیتوکاین را در هر سلول یا پاسخ سلولی را در جمعیتهای بسیار کم ارزیابی نمود (۱۷).

در این مطالعه از روش فلوسیتومتری برای شناسایی تولید داخل سلولی IFN-γ در افراد سالم و بیماران مبتلا به فرم حاد و مزمن بروسلوز استفاده شد تا بتوان نوع و نسبت سلولهای پاسخگو را بطور دقیق تر مشخص ساخت(۸). همچنین از خون کامل، که بیشترین تشابه فیزیولوژیک با شرایط بدن را دارد، بعنوان نمونه آغازین استفاده شد تا نتایج آزمایشگاهی (in vitro) همخوانی بیشتری با وضعیت بدن (in vivo) داشته باشد. به لحاظ اینکه فعال سازی سلولها با PMA ممکن است بروز سطحی برخی از مولکولهای نظیر CD4 و CD56 را با تغییر کاهشی مواجه سازد (۱۸) در این مطالعه درصد سلولهای $CD3^+$ بارز کننده IFN-γ ارائه شده است.

نتایج تولید اختصاصی IFN-γ نشان می دهد که الگوی تولید سیتوکاینی در لنفوسیتهای $CD3^+$ T در بین مراحل حاد و مزمن بیماری در بیماران مبتلا به بروسلوز متفاوت می باشد. لنفوسیتهای $CD3^+$ T بیماران مبتلا به بروسلوز حاد نسبت به آنتی ژنهای اختصاصی بروسلا پاسخ داده و مقادیر فراوانی IFN-γ تولید نمودند در صورتیکه سلولهای بیماران مبتلا به فرم مزمن بیماری در برابر آنتی ژنهای اختصاصی بروسلا پاسخ چندانی ندادند. گرچه مطالعات مربوط به بررسی پاسخهای ایمنی در بیماران مبتلا به بروسلوز بسیار ناچیز می باشد(۱۳) ولی گرایش پاسخهای ایمنی سلولی در این بیماری با وضعیت ایمنی سلولی در بیماریهای عفونی انگلی نظیر فیلاریازیس و باکتریهای داخل سلولی مثل سل و جزام (۱۹) شباهت زیادی دارد. در این بیماریها الگوی سیتوکاینی نوع Th1 طیف گسترده ای از پاسخهای ایمنی و علایم بالینی را کنترل می نمایند (۱۳).

کاهش تولید IFN-γ و پاسخهای بلاستوژنیک در مرحله مزمن بیماری با نتایج Giambartolomi و همکاران نیز همراستا می باشد (۲۰). بطوریکه نتایج آن تحقیق نیز بیانگر تنظیم کاهشی پاسخهای Th1 بدنبال بقاء و استقرار

www.SID.ir

Archive of SID

داخل سلولی باکتری در طی فاز مزمن بیماری است (۲۰). همچنین Bertotto و همکاران نشان دادند که لنفوسیتهای γδT بیماران مبتلا به بروسلوز حاد در پاسخ به آنتی ژنهای بروسلا بشدت تزاید می یابند و مقادیر فراوانی IFN-γ و TNF-α تولید می نمایند ولی این پاسخها در طی مرحله مزمن بیماری شدیدا کاهش می یابند (۲۱). این یافته ها با نتایج سایر محققین همخوانی دارند که نشان داده اند سلولهای Th1 نقش به سزایی در برقراری مقاومت در عفونت اولیه با بروسلا، لیستریا و مایکوباکتریوم دارند (۲۲). این سلولها با تولید IFN-γ موجب حذف باکتریهای بروسلا از بدن شده و برای بقای میزبان در مقابل چالش با بروسلا های بیماریزا لازم می باشند (۲۳). IFN-γ ممکن است مستقیما باعث تولید مدیاتورهای واکنشگر اکسیژنی (ROIs) یا نیتروژنی (RNIs) توسط ماکروفاژهای فعال شده و یا موجب بروز مرگ سلولی یا آپوپتوز در سلولهای آلوده گردد (۱۳).

بین تمامی گروههای تحت مطالعه ما تفاوتی در پاسخهای بلاستوژنیک در مقابل تحریک پلی کلونال (PHA) دیده نشد. این یافته با گزارشی که نشان میدهد پاسخ میتوژنیک سلولهای T و تولید غیر اختصاصی IFN-γ در طی مرحله حاد بیماری کاهش و بعد از درمان آنتی بیوتیکی طبیعی می شود، همخوانی ندارد (۲۴). قرار داشتن بیماران مطالعه ما تحت رژیم درمانی آنتی بیوتیکی، می تواند علت این اختلاف باشد. بنابراین، عدم پاسخگویی بیماران مزمن بعلت اختلال عمومی در پاسخهای ایمنی نبوده بلکه ناشی از اختلال در پاسخ ایمنی اختصاصی بروسلا می باشد. همچنین کاهش معنی دار پاسخگویی لنفوسیتهای بیماران مبتلا به بروسلوز مزمن در برابر آنتی ژنهای اختصاصی بروسلا و عدم مشاهده تفاوت معنی دار پاسخ این گروه نسبت به سایر گروههای تحت مطالعه در برابر تحریک غیر اختصاصی، نشان می دهد که عدم پاسخگویی بیماران مبتلا به شکل مزمن بیماری ناشی از اختلال در کل پاسخهای ایمنی نبوده بلکه اختلال آنها ناشی از اشکال در پاسخ ایمنی اختصاصی به بروسلا می باشد. این یافته با مطالعات دیگر که نشان داده اند که تولید IFN-γ و پاسخهای بلاستوژنیک در طی مرحله مزمن بیماری کاهش می یابد، همراستا می باشد (۲۰،۲۵).

وجود ارتباط مستقیم بین تولید IFN-γ در سلولهای $CD8^+$ T با پاسخهای بلاستوژنیک اختصاصی در افراد مبتلا به بروسلوز حاد نشان می دهد که در این افراد سلولهای تولید کننده IFN-γ جمعیت اصلی لنفوسیتهای تکثیر و تزاید یافته را تشکیل می دهند. از آنجا که هم سلولهای $CD8^+$ T و هم سلولهای $CD8^+$ T دارای مولکولهای CD3 می باشند بنابراین هر دو دسته از لنفوسیتهایT در ایمنی مقابل بروسلوز انسانی نقش دارند. نتایج حاصل از بروسلوز موشی نیز بیانگر نقش سلولهای CD8 T در ایجاد ایمنی اولیه و ثانویه است (۲۸-۲۶). استقرار باکتریهای بروسلا در ماکروفاژها مستقر در برخی اندامها، هرچند باعث کاهش شانس مواجهه سلولهای CD4 T با آنتی ژنهای بروسلا در بیماران مبتلا به بروسلوز حاد می شود (۲۹،۳۰) ولی شرایط لازم برای فعالیت و تکثیر و تزاید سلولهایT $CD8^+$ سیتوتوکسیک را در موش و انسان فراهم می سازد (۳۱).

منابع :

1. Zavala I, Nava A, Guerra J, Quiros C. Brucellosis. Infect Dis Clin North Am 1994; 8:225-241.
2. Young EJ. An overview of human brucellosis. Clin Infect Dis 1995; 21: 283-290.
3. Zhan Y, Kelso A, Cheers C. Cytokine production in the murine response to brucella infection or immunization with antigenic extracts. Immunology. 1993; 80:458-64.
4. Oliveira SC, Splitter GA. CD8+ type 1 CD44hi CD45 RBlo T lymphocytes control intracellular Brucella abortus infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I- and class II-deficient mice. Eur J Immunol 1995; 25:2551-7.
5. Oliveira SC, Harms JS, Rech EL, Rodarte RS, Bocca AL, Goes AM, et al. The role of T cell subsets and cytokines in the regulation of intracellular bacterial infection. Braz J Med Biol Res 1998; 31(1):77-84.
6. Ferry B, Antrobus P, Huzicka I, Farrell A, Lane A, Chapel H. Intracellular cytokine expression in whole blood preparation from normals and patients with atopic dermatitis. Clin Exp Immunol 1997; 110:410-417.
7. Prussin C, Metcalf D. Detection of intracytoplasmic cytokine using flow

www.SID.ir

cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. J. Immunol Methods 1995; 188:117-128.
8. Asanuma H, Sharp M, Maecker HT, Maino VC, Arvin AM. Frequencies of memory T cells specific for varicella-zoster virus, herpes simplex virus, and cytomegalovirus by intracellular detection of cytokine expression. J Infect Dis 2000; 181:859-866.
9. Karanikas V, Lodding J, Maino VC, McKenzie IF. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines detects immune responses in MUCI immunotherapy. Clin Cancer Res 2000; 6:829-837.
10. Gotuzzo E. Brucella. In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR (eds) , Infections diseases. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders 1837-1844.
11. Irmak H, Buzgan T, Karahocagil MK, Evirgen O, Akdeniz H, Demiroz AP. The effect of levamisole combined with the classical treatment in chronic brucellosis. Tohoku J Exp Med 2003; 201:221-8.
12. 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.
13. Yingst S, Hoover DL. T cell immunity to brucellosis. Criti Rev Microbiol 2003; 29:313-331.
14. Baldwin CL, Parent M. Fundamentals of host immune response against Brucella abortus: what the mouse model has revealed about control of infection. Vet Microbiol 2002; 90: 367-382.
15. Moreno-Lafont MC, Lopez-Santiago R, Paredes-Cervantes V. Activation and proliferation of T lymphocyte subpopulations in patients with brucellosis. Archi Med Res 2003; 34:184-193.
16. Jiang X, Baldwin CL. Effects of cytokines on intracellular growth of Brucella abortus. Infect Immun 1993; 61:124-134.
17. Nomural LE, Walker JM, Maecker HT. Optimization of whole blood antigen–specific cytokine assays for $CD4^+$ cells. Cytometry 2000; 40: 60-68.
18. Bromelow KV, Hisrt W, Mendes RL, Winkley AR, Smith IE. Whole blood assay for assessment of the mixed lymphocyte reaction. J Immunol Methods 2001; 247:1-8.
19. Feng CG, Britton WJ. CD4+ and CD8+ T cells mediate adoptive immunity to aerosol infection of Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Gu inverted question markerin. J Infect Dis 2000; 181(5):1846-1849.
20. Giambartolomi GH, Cahanovich ME, Wallach JC, Baldi PC, Velikovsky CA, Fossati CA. Diminished production of T helper 1 cytokines correlates with T cell unresponsiveness to brucella cytoplasmic proteins in chronic human brucellosis. J Infect Dis 2002; 86: 252-259.
21. Bertotto A, Gerli R, Spinozzo F. Lymphocytes bearing the $\delta\gamma$ T cells impair intracellular multiplication of Brucella melitensis infection. Eur J Immunol 1993; 23: 1177-1180.
22. Stevens MG, Pugh GW Jr, Tabatabai LB. Effects of gamma interferon and indomethacin in preventing Brucella abortus infections in mice. Infect Immun 1992; 60(10):4407-9.
23. Murphy EA, Sathiyaseelan J, Parent MA, Zou B, Baldwin CL. Interferon-gamma is crucial for surviving a Brucella abortus infection in both resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice. Immunology 2001; 103(4):511-8.
24. Rodriguez-Zapata M, Alvarez-Mon M, Salmeron I. Diminshed T lymphocyte proliferative response to polyclonal mitogens in acute brucellosis patients. Infection 1996; 24:115-120.
25. Fernandes DM, Baldwin CL. Interleukin-10 down regulates protective immunity to Brucella abortus. Infect Immun 1995; 63: 1130-1133.
26. Huang L, Krieg AM, Eller N, Scott DE. Induction and regulation of Th1-inducing cytokines by bacterial DNA, lipopolysaccharide, and heat-inactivated bacteria. Infect Immun

www.SID.ir

Archive of SID

1999; 67(12):6257-63.
27. Zaitseva M, Golding H, Manischewitz J, Webb D, Golding B. Brucella abortus as a potential vaccine candidate: induction of interleukin-12 secretion and enhanced B7.1 and B7.2 and intercellular adhesion molecule 1 surface expression in elutriated human monocytes stimulated by heat-inactivated B. abortus. Infect Immun 1996; 64(8):3109-17.
28. Zhan Y, Kelso A, Cheers C. Differential activation of Brucella-reactive CD4+ T cells by Brucella infection or immunization with antigenic extracts. Infect Immun 1995; 63:969-975.
29. Gross A, Spiesser S, Terraza A, Rouot B, Caron E, Dornand J. Expression and bactericidal activity of nitric oxide synthase in Brucella suis-infected murine macrophages. Infect Immun 1998; 66(4):1309-16.
30. Eze MO, Yuan L, Crawford RM, Paranavitana CM, Hadfield TL, Bhattacharjee AK, Warren RL, et al. Effects of opsonization and gamma interferon on growth of Brucella melitensis 16M in mouse peritoneal macrophages in vitro. Infect Immun 2000; 68(1):257-63.
31. Moreno-Lafont MC, Lopez-Santiago R, Paredes-Cervantes V, et al. Activation and proliferation of T lymphocyte subpopulations in patients with brucellosis. Arch Med Res 2003; 34: 184-193.

www.SID.ir