Archive of SID

ارزیابی ایمنی سلولی بیماران مبتلا به بروسلوز با اندازه گیری گاما اینترفرون (IFN-γ) و اینترلوکین ۱۳ (IL-13) با روش فلوسیتومتری و الایزا

دکتر علیرضا رفیعی *- دکتر آمینا کریمی نیا**

*استادیار ایمونولوژی، دانشکده پزشکی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
**استادیار ایمونولوژی، گروه ایمونولوژی و کشت سلولی انیستیتو پاستور ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۸۳/۳/۲۳
تاریخ پذیرش: ۸۳/۷/۲۵

چکیده

مقدمه: ارزیابی تولید سیتوکاین‌ها به ویژه سیتوکاین های داخل سلولی ابزار مهمی در بررسی پاسخ‌های ایمنی در مقابل محرک‌هایی نظیر عوامل بیماریزا، واکسن‌ها و سایر چالش‌های ایمنی می‌باشد. مطالعات انجام شده در موش نشان می دهد آلودگی به بروسلا موجب فعال شدن پاسخ‌های ایمنی سلولی می‌گردد. برخی از سیتوکاین‌ها نقش بسزایی در ایجاد مقاومت در برابر عفونت بروسلایی دارند.

هدف: به منظور ارائه روشی دقیق، قابل استفاده در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی برای بررسی وضعیت ایمنی، تولید سیتوکاین‌های داخل سلولی IFN-γ و IL-13 در خون کامل افراد سالم و بیماران مبتلا به دو فرم حاد و مزمن بروسلوز مطالعه شده است.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های خون کامل رقیق شده ۲۷ بیمار مبتلا به بروسلوز حاد (۱۴ 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. مقدار IFN-γ و IL-13 داخل سلولی این سیتوکاین‌ها در سلول‌های $CD3^+$ با روش فلوسیتومتری(CFC) و در سوپ کشت سلولی با روش ELISA ساندویچی اختصاصی بررسی گردید.

نتایج : در بیماران مبتلا به بروسلوز حاد تولید اختصاصی IFN-γ خارج سلولی و داخل سلولی افزایش قابل توجهی یافت ($P<0/001$). در حالی‌که در بیماران با بروسلوز مزمن نه تنها تولید اختصاصی IFN-γ بلکه تعداد سلولهای $CD3^+$ تولید کننده IFN- γ بطور معنی داری کاهش می یابد. وجود ارتباط معکوس بین درصد سلول‌های $CD3^+$ تولید کنندهIFN-γ باسلول‌های $CD3^+$ تولید کننده IL-13 در گروه حاد بیانگر گرایش پاسخهای ایمنی به سمت Th1 در این بیماران است.

نتیجه گیری: گرچه درصد سلول‌های $CD3^+$ تولید کننده IL-13 به‌طور چشمگیر در بیماران با بروسلوز مزمن زیاد است ولی ارتباط معنی داری بین تعداد سلول‌های $CD3^+$ تولید کننده IFN- γ با سلول‌های $CD3^+$ $IL\text{-}13^+$ پیدا نشد. در نتیجه نمیتوان ارتباط بین ایجاد پاسخ‌های Th2 و پیشرفت بیماری بروسلوز مزمن را اثبات کرد. با این وجود، کاهش تولید سیتوکاین‌های Th1 در گروه مزمن ممکن است ناشی از عدم پاسخگویی سلول‌های T اختصاصی بروسلا باشد که به طولانی شدن سیر بیماری در این گروه از بیماران می انجامد.

کلید واژه‌ها: اینترفرون‌ها / اینترلوکین‌ها / تب مالت / فلوسایتومتری

مقدمه

گونه‌های بروسلا باکتری‌های داخل سلولی اختیاری گرم منفی هستند که بیماری شدید در انسان و حیوان بوجود می‌آورند. بروسلاها اغلب به دستگاه رتیکولوآندوتلیال دست‌اندازی می‌کنند و استقرار ماکروفاژهای آلوده در مناطق بخصوصی از بدن (نظیر طحال، مغز، قلب، کبد و مغز استخوان)، موجب ایجاد عفونت موضعی می‌شود(۱). سیتوکاین‌ها، مولکول‌هائی پلی‌پپتیدی هستند که در تنظیم رشد، تمایز و عملکرد سلول‌های خونساز و غیر خونساز

نویسنده مسئول: علیرضا رفیعی؛ ساری- بلوار خزر- دانشکده پزشکی ساری

www.SID.ir

Archive of SID

دخالت دارند (۲). نخستین مکانیسم دفاع ایمنی سلولی، بیان سیتوکاین‌ها در سلول‌های T بالغ در پاسخ به آنتی‌ژن است، که در بروز پاسخ‌های طبیعی و همین‌طور در بیماری‌ها تاثیر می‌گذارد. چگونگی بیان سیتوکاین‌ها، ابزار با ارزشی برای شناختن عملکرد طبیعی یا غیرعادی سلول‌های T در شرایط مختلف است(۳). ارزیابی سیتوکاین‌ها در سطح سلولی اهمیت بسزائی در کسب اطلاعات صحیح در مورد نوع و نسبت سلول‌های T پاسخگو در مواجهه با آنتی ژن‌های اختصاصی دارد(۲). روش‌های متداول ارزیابی پاسخ‌های اختصاصی این سلول‌ها شامل اندازه‌گیری تکثیر سلولی یا بیان سیتوکاین‌ها در محیط کشت سلول‌های PBMC است که با انکوباسیون طولانی این سلول‌ها در برابر آنتی‌ژن خاص انجام می‌شود(۴). این روش‌ها توان ارزیابی پاسخ سلول‌های منفرد را از سایر سلول‌ها و امکان بررسی بیان بیش از یک سیتوکاین را در هر سلول ندارد. علاوه بر این با این روش‌ها نمی‌توان پاسخ‌های سلولی را در جمعیت‌های سلولی بسیار اندک مورد بررسی قرار داد(۲). روش‌هایی نظیر ELISPOT، آنالیز محدودسازی رقت و هیبریداسیون در جا، گرچه امکان ارزیابی سیتوکاین‌ها را در سطح سلولی فراهم می‌سازند، ولی بسیار وقت گیر و توان‌فرسا هستند(۵). بررسی تولید داخل سلولی سیتوکاین‌ها با استفاده از فلوسیتومتری، امکان شناسایی هم‌زمان دسته‌های مختلف سلولی و تولید سیتوکاین را در آنها فراهم می‌آورد(۳). با این روش امکان اندازه‌گیری سریع تولید سیتوکاین‌ها در هزاران سلول مجزا و نیز شناسایی همزمان چندین سیتوکاین در هر سلول میسر می‌شود. چون پاسخ‌های ایمنی بر عملکرد Th1 و Th2 استوار است، در اکثر بیماری‌ها بکارگیری این روش برای بررسی سیر بیماری نیز سودمند است(۶). در حالت طبیعی لکوسیت‌های تحریک نشده سیتوکاین را بیان نمی‌کنند. با این روش چون حد پایه بیان خودبخودی سیتوکاین‌ها اندک است، با فعال کردن کوتاه‌مدت، این فراوانی بسیار اندک‌سلول‌های تحریک‌شده قابل شناسایی خواهد بود(۳).

نحوه مقاومت میزبان در برابر بروسلا عمدتا در موش‌ها مورد مطالعه قرار گرفته‌است. بر اساس این مطالعه‌ها سیتوکاین‌ها هدایتگر سیستم ایمنی هستند و سرنوشت بیماری را تعیین می‌کنند (۷و۸). انترفرون گاما (IFN-γ) با فعال‌کردن ماکروفاژها برای تولیداکسید نیتریک (NO) (۹)، مقاومت در برابر بروسلوز را تقویت می‌کند(۱۰). انترلوکین۱۳ مانند انترلوکین٤ ترشح IFN- γ را توسط سلول‌های CD_4^+ T دچار تنظیم کاهشی می‌کند و به این ترتیب عفونت بروسلایی (۱۱ و ۱۲). را تشدید می‌کند.

در این مقاله برای ارائه روش مستقیم ارزیابی سلول‌های پاسخگو درحالت‌های فیزیولوژیک و پاتولوژیک، ایمنی اختصاصی در بروسلوز با بررسی تولید اختصاصی IFN- γ و IL-13 مورد مطالعه قرار گرفته است. برای ارزیابی بهتر پاسخ‌های طبیعی و تعامل سلولی در برابر باکتری بروسلا و بررسی آزمایشگاهی سیتوکین‌ها از کشت خون کامل استفاده شد.

مواد و روش‌ها

مواد: پادتن‌های اختصاصی برای CD3 انسانی(IgG موشی، کونژوگه با CYQ) ، IFN- γ انسانی (IgG1 موشی، کونژوگه با FITC)، IL-13 انسانی (IgG1 موشی، کونژوگه با فیکواریترین)، کنترل‌های ایزوتیپی، کیت Cytodetect شامل بافر نفوذ پذیرکننده، بافر تثبیت کننده و محلول‌های محرک، همه از شرکت IQP (گرونینژن، هلند) تهیه شد. بروسلا ملی تنسیس سویه واکسنی Rev-1 را دکتر ذوقی از موسسه رازی (حصارک، کرج) اهدا کرد. کیت الایزا برای اینترفرون گاماواینترلوکین ۱۳ از شرکت Bender Med system، اتریش خریداری شد.

جمعیت مورد مطالعه: این مطالعه بر 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 تایید شده بود، انجام شد. از این تعداد ۱۴ نفر به بروسلوز حاد و ۱۳ نفر به بروسلوز مزمن مبتلا بودند. هیچ یک از این بیماران شواهدی از ابتلای به سایر بیماری‌های عفونی،

www.SID.ir

Archive of SID

قبل یا در طی مطالعه نداشتند. همچنین هیچ کدام از آنها قبل از ورود به مطالعه تحت درمان با داروهای ضدالتهاب مثل کورتیکواستروئیدها یا سایر آنتی بیوتیک‌ها به غیر از داروهای انتخابی درمان تب مالت قرار نداشتند. علاوه براین ۲۲ نفر از افراد داوطلب سالم که از نظر سن و جنس مشابه این بیماران بودند(۱۰ نفر زن و ۱۲ نفر مرد، با میانگین سنی ۲۱±۳۵/۳۳ سال) به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند.

تشخیص بروسلوز بر اساس نشانه‌های بالینی، آزمایش‌های سرولوژی و باکتری‌شناسی و بروسلوز حاد برحسب دوره بیماری(زیریک سال)، علائم بالینی ویافته‌های‌آزمایشگاهی داده شد. مرحله مزمن با تب پائین، علائم موضعی بیماری، خستگی، ضعف مفرط، دوره بیماری (بیش از یک سال) و پاسخ نامناسب به درمان‌های رایج ضدبروسلایی تعریف شد. تمامی افراد مورد مطالعه پس از آگاهی از ماهیت و هدف‌های طرح، برگه رضایتنامه را که براساس دستورالعمل‌های کمیته اخلاق پزشکی وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی مبنی بر اجازه خون گرفتن، تنظیم شده‌بود، امضاء کردند. نمونه‌های خون با استفاده از لوله‌های خلاءدار استریل (Venipuncture) حاوی ماده ضد انعقاد هپارین سدیم (10 IU/ml) گرفته شد. نمونه‌ها در کمتر از ٤ ساعت بعد از نمونه‌گیری مورد آزمایش قرار گرفتند.

کشت خون کامل: 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)،IU/ml ۱۰۰ پنی‌سیلین و µg/ml ۱۰۰ استرپتومایسین (سیگما، سدگس، فرانسه) پنج برابر رقیق شد. سپس نمونه‌های خون کامل رقیق شده در پلیت‌های کشت سلولی ۹٦ چاهگی ته صاف در حضور یا در غیاب CFU/ml ۱×۱۰^{۷} باکتری کشته شده بروسلا ملی تنسیس سویه Rev-1 در اتمسفر حاوی $۵\%CO_2$ در دمای $۳۷^{o}C$ کشت داده شدند.

تولید و اندازه گیری IFN-γ و IL-13 : نمونه‌های خون کامل رقیق شده در حضور یا بدون فیتوهماگلوتینین (2/5 mg/ml ,PHA) (سیگما، سدگس، فرانسه) یا باکتری‌های کشته شده بروسلا ملی تنسیس سویه Rev-1 (FU/ml ۱×۱۰^{۷}CFU/ml) در پلیت های ٢٤ چاهگی کشت داده‌شدو در اتمسفرحاوی CO_2 ۵٪ در دمای $۳۷\ ^{o}C$ به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شد. سپس سوپ هر کدام از چاهک‌ها جمع‌آوری و در فریزر $-۷۰^{o}C$ تا زمان آزمایش نگهداری شد. سیتوکاین‌های IFN-γ و IL-13 با استفاده از کیت‌های ایمونواسی آنزیمی (ELISA) و نیز با استفاده از جفت آنتی‌بادی‌های مونوکلونال اختصاصی، براساس دستورالعمل شرکت‌های سازنده اندازه‌گیری شد. حد شناسایی هر کیت تقریبا pg/ml ۱۰ است.

شناسایی‌داخل سلولی سیتوکاین‌ها: ۱–آماده‌سازی سلولی و تحریک آنتی ژنی: نمونه‌های خون کامل رقیق شده در حضور یا بدون باکتری‌های کشته شده B. melitensisسویه Rev-1) در پلیت‌های ۹٦ چاهکی ته‌صاف در دمای $۳۷^{o}C$ و اتمسفر حاوی CO_2 ۵٪ کشت داده شد. ۱۸ ساعت بعد، سلول‌ها به لوله‌های پلی‌اتیلنی ml ۱۵ فالکون منتقل شدند. برطبق دستورالعمل شرکت سازنده با افزودن فربل ۱۲– میریستات ۱۳–استات (PMA) و اینومایسین (I) در حضور منتزین به‌مدت ۵ ساعت آنها را دوباره تحریک کردند.

بعدازاتمام انکوباسیون، µL/m l۱۰۰ از محلول (۲۰ mµ)، EDTA به هر لوله اضافه شد و نمونه ها حداقل به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شدند و ۱۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه و دوباره ورتکس شدند. سپس گلبول‌های قرمز خون را با افزودن ۹ حجم محلول ACK سرد (PH,7.2, 0/1mM Na2 EDTA, 1mM KHCO3 , 150 mM NH4Cl) و ۲۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق لیز و ۱۰ دقیقه در ۵۰۰g سانتریفوژ کرده، مایع رویی را دور ریختند. سلول‌های باقیمانده بعد از دو مرحله شستشو با محلول شستشوی FACS (محلول PBS حاوی FCS ۱٪ و NaN3 0.1%)، در غلظت ۱×۱۰^{۶}سلول‌درهرمیلی لیتر تنظیم شد .

www.SID.ir

Archive of SID

۲- رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس: نمونه‌ها در لوله‌های پلی‌استیرنی mm ۷۵ ×۱۲ (فالکون شماره ۲۰۵۲) به مقدار µL ۲۰۰ به لوله مربوطه منتقل شده و به هرلوله µL ۱۰ آنتی بادی مونوکلونال ضد CD3 انسانی کونژوگه با CYQ اضافه شده، به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی و دمای ٤°C انکوبه شد. پس از دوبار شستشو با محلول شستشوی FACS، سلول‌ها با افزودن محلول پارافرمالوئید ۱٪ در PBS (محلول تثبیت IQP،) تثبیت شدند و پس از دوبار شستشو با محلول شستشو، با افزودن محلول نفوذ پذیر کننده حاوی ساپونین جدار سلول‌ها نفوذپذیر شد. آنگاه با افزودن آنتی‌پادتن‌های کونژوگه مونوکلونال FITC-IFN-γ یا PE-IL-13 و ۲۰ دقیقه انکوباسیون در تاریکی و دمای ۴°C، سیتوکاین‌های داخل سلولی رنگ‌آمیزی شد. سرانجام پس از شستشو، سلول‌ها را در ۵۰۰µL از محلول PBS، به صورت سوپاسپانسیون درآورده و با دستگاه فلوسیتومتری FACScan و نرم افزار lysis II (بکتون- دیکینسون، سانخوزه، کالیفورنیا) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

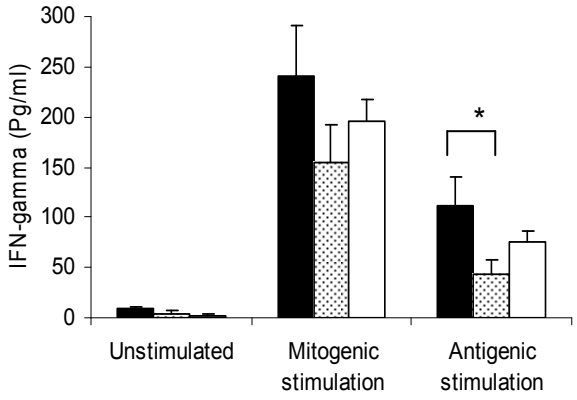
لوله‌های کنترل ایزوتیپی نیز همانند روش بالا ولی با مونوکلونال آنتی بادی سازگار ایزوتیپی برای IFN-γ یا IL-13 رنگ آمیزی شد. این لوله‌ها برای تنظیم حد FL1 و FL2 استفاده شد. سلول‌های آن در نخستین مبنا از مبنای حد چهار لگاریتمی تنظیم شد. همچنین سلول‌های تحریک شده در غیاب مننزین که برای شناسایی وجود سیتوکاین‌ها رنگ‌آمیزی شده بودند برای تعیین ۹۵٪ دامنه اطمینان رنگ آمیزی زمینه، به کار رفتند.

۳- طرح‌بندی‌فلوسیتومتری و تجزیه و تحلیل داده‌ها: 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 ۱۵۰۰۰ – ۱۰۰۰۰ رویداد برای هر نمونه جمع آوری شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار lysis II تجزیه و تحلیل شد و به صورت درصد سلول‌های بیان کننده سیتوکاین در بین کل سلول‌های $CD3^+$ با هیستوگرام طرح نقطه‌ای (dot plat) نمایش داده شد.

آنالیز آماری: داده‌ها به صورت 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 شد. اختلاف بیش از ۹۵٪ دامنه اطمینان در تمام آزمایش با مقدار $P<۰/۰۵$ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد. برای آنالیز داده ها از نرم افزار SPSS استفاده شد.

نتایج

تنظیم کاهشی تولید اینترفرون گاما(IFN-γ) در بیماران مبتلا به بروسلوز مزمن: همانطور که در نمودار یک دیده می شود PHA، موجب القای سطح بالایی از IFN-γ در تمام گروه‌ها می‌شود. افراد شاهد سالم به آنتی‌ژن پاسخ دادند ومیانگین‌میزان IFN-γ در آنها ۶۰/۹۱±۱۰/۴۳ pg ml بود. تولید IFN-γ در بیماران مبتلا به بروسلوز حاد افزایش قابل‌توجهی‌نسبت به‌گروه بروسلوزمزمن‌داشت($P<۰/۰۵$). به طوری‌که‌میانگین تولید IFN-γ در گروه اول(حاد) نسبت به گروه دوم (مزمن) به ترتیب ۱۲۵/۷۱±۲۸/۴۲ pg ml و ٤۵/٦۹±۱۳/۴٦pg ml بود. میزان تولید IL-13 در هر سه گروه به اندازه‌ای ناچیز بود که در حد شناسایی کیت مورد استفاده عملا اختلافی بین گروه‌ها مشاهده نشد.



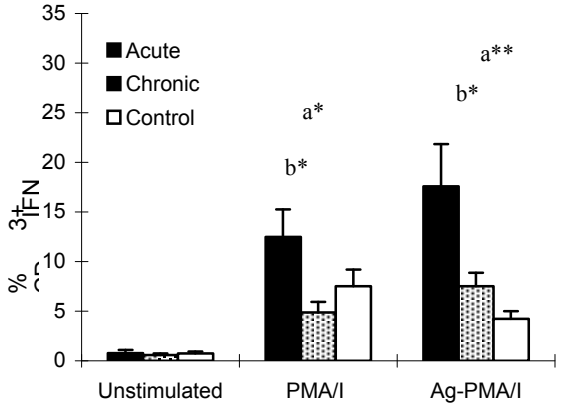
www.SID.ir

Archive of SID

نمودار ۱: تولید IFN-γ توسط سلول‌های خون کامل افرادسالم و بیماران مبتلا به بروسلوز حاد یا مزمن. سلول‌های خون در حضور یاعدم حضورPHA یا باکتری‌های کشته بروسلا ملی تنسیس سویه Rev1 بەمدت ۷۲h کشت داده شد. میزان سیتوکاین‌ها در سوپ کشت‌سلولی باELISA ساندویچی اندازه‌گیری شد. نتایج بصورت میانگیـــن±SEM نشان داده شده است. ستاره‌ها اختلاف معنی‌دار آماری رابین‌گروهمزمن با گروه حادبا P<۰/۰۵ نشان می‌دهد.

ارزیابی بیان IFN-γ در سلولهای $CD3^+$: برای شناسایی سیتوکاین‌های داخل سلولی، ابتدا سلول‌ها در حضور یا بدون حضور آنتی‌ژن‌های اختصاصی بروسلا به مدت ۱۸ ساعت تحریک شدند. سپس برای افزودن سیگنال‌های سیتوکاینی سلول‌های تحریک شده، با اضافه کردن محرک‌های PMA و آینومایسین (PMA/I) دوباره آنها را تحریک کردند. در هرگروه هنگامی‌که سلول‌ها ابتدا با آنتی‌ژن‌های اختصاصی و دوباره با PMA/I برانگیخته می‌شدند، درصد سلول‌های $CD3^+$ بارز کننده سیتوکاین نسبت به سلول‌هایی که تنها PMA/I دریافت داشته‌اند، افزایشی چشمگیر نشان دادند و درصد سلول‌های $CD3^+$بیان کننده سیتوکاین در گروه شاهد حتی اگر پس از تحریک اختصاصی با آنتی ژن، دوباره با PMA/I نیز تحریک می‌شدند باز هم نسبت به سلول‌هایی که تنها PMA/I دریافت کرده‌بودند، کمتر بود. نتایج سلول‌هایی که تنها با آنتی‌ژن تحریک شده بودند به علت ناچیز بودن سیگنال سیتوکاینی نشان داده نشده است.

همانطور که در نمودار ۲ دیده می‌شود درصد سلول‌های $CD3^+$ تولید کننده IFN-γ در افراد مبتلا به بروسلوز مزمن به طور معنی دار کمتر از بیماران دچار بروسلوز حاد است (به ترتیب ۱/٤ ± ۷/۵ در مقابل ٤/۲ ± ۱۷/٦، P<۰/۰۵). گروه کنترل تفاوت معنی‌داری با گروه مبتلا به بروسلوز حاد نشان داد (P<۰/۰۰۱).

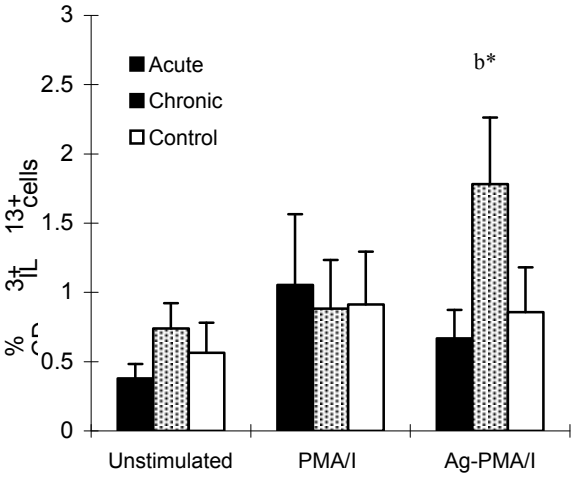


نمودار ۲: میزان بیان داخل سلولی IFN-γ رادرسلول‌های $CD3^+$ T بیماران مبتلا به بروسلوز حاد یا مزمن و یا افراد سالم نشان می دهد. نمونه‌های‌خون کامل رقیق شده پس ازتحریک یا عدم‌تحریک اولیه باکتری‌های‌کشته(۱۸ ساعت)، بمدت ۵ ساعت توسط PMA/I در حضور یا عدم حضور منتزین (monensin) دوباره تحریک شدند. رنگ آمیزی سطحی برای مولکول CD3 و IFN-γ داخل سلولی انجام شده‌است. داده‌ها، میانگین درصد سلول‌های دوگانه مثبت[$CD3^+$ IFN-γ^+]±SEM را نشان می‌دهند. ستاره‌ها اختلاف معنی‌دار را به ترتیب بین تحریک آنتی ژنی و غیر اختصاصی درگروه حاد درمقایسه باگروه مزمن [*b] (P< ۰/۰۵) و افراد شاهد (P< ۰/۰۰۱ و P< ۰/۰۵) را نشان می دهند.

ارزیابی بیان IL-13 در سلولهای $CD3^+$: در تمام گروه‌ها بروز داخل سلولی IL-13 در حضور تحریک PMA/I تنها درحد بروز مختصر شناسایی شد. بعد از فعال شدن اختصاصی، بروز IL-13 تنها در گروه مزمن (در مقایسه با گروه حاد) و گروه شاهد افزایش نشان داد (به ترتیب ۰/٤۸ ± ۱/۷۸، ۰/۲۰ ± ۰/٦۷ و ۰/۳۲ ± ۰/۸۵) (نمودار ۳). از نظر آماری این اختلاف‌ها تنها بین دو گروه بیمار معنی‌دار است(P<۰/۰۵). شکل یک نمونه، هیستوگرام طرح نقطه ای نتایج فلوسیتومتری تولید IFN-γ و IL-13 داخل سلولی را توسط سلول‌های +CD3 در دو گروه بیماران مبتلا به بروسلوز حاد و مزمن و افراد شاهد سالم نشان می دهد.

www.SID.ir

Archive of SID

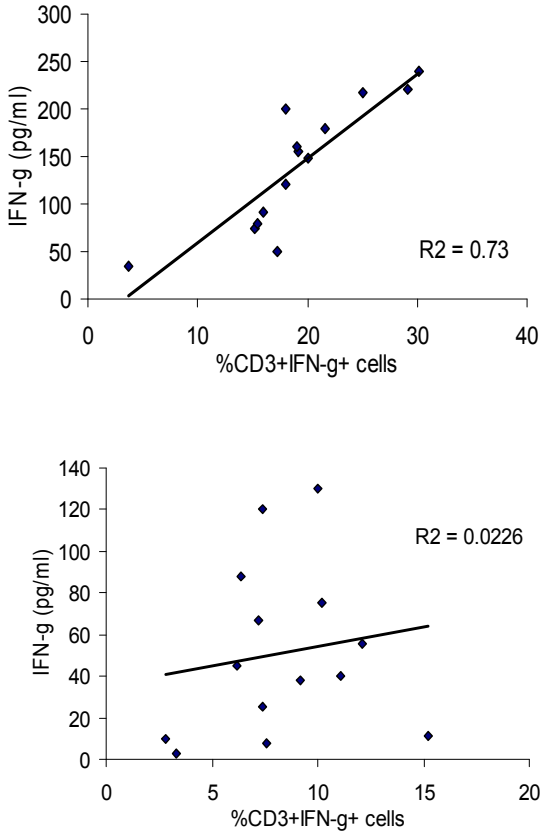


نمودار۳: میزان بیان داخل سلولی IL-13 را درسلول‌های $CD3^+$ T بیماران مبتلا به بروسلوزحاد یامزمن ویاافراد سالم نشان می‌دهد. نمونه‌های خون کامل رقیق شده پس از تحریک یا عدم تحریک اولیه‌باکتری‌های‌کشته(۱۸ساعت)، به‌مدت۵ ساعت توسط PMA/I در حضور یا عدم حضور منتزین دوباره تحریک شدند. رنگ‌آمیزی سطحی برای مولکولCD3 و IL-13 داخل سلولی انجام گردید. داده‌ها، میانگین درصدسلول‌های دوگانه مثبت ($CD3^+$ IL-13$^+$) ± SEM را نشان می دهند. علامت ستاره بیانگر اختلاف معنی دار بین گروه مبتلا به بروسلوز حادباگروه مزمن در تحریک اختصاصی

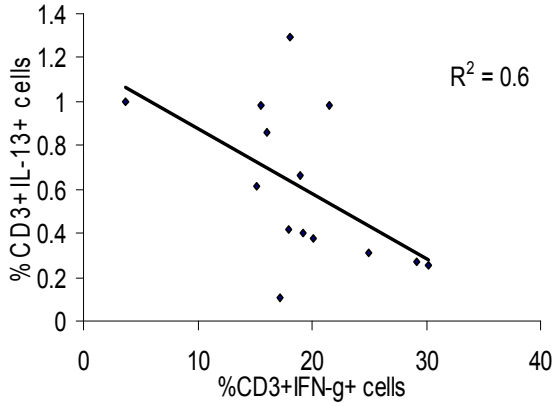
می باشد (P< ۰/۰۵).

ارتباط تولید سیتوکاین‌ها با اشکال بالینی بیمار:

همانطور که شکل ۲A نشان می‌دهد بین درصد سلول‌های$CD3^+$ تولید کننده IFN-γ و تولید این سیتوکاین در مایع رویی کشت سلولی بیماران مبتلا به بروسلوز حاد ارتباط مستقیم و مشخص وجود داشت(r=۰/۸، P= ۰/ ۰۰۱۸) با این وجود، این همبستگی در مورد بروسلوز مزمن صادق نبود(شکل 2B). همچنین در مبتلایان به شکل حاد بیماری ارتباط معکوس بین میزان بیان IFN-γ و IL-13 داخل سلولی دیده شد(شکل ۳). این همبستگی در گروه مزمن وجود نداشت.



شکل ۲: ارتباط تولید IFN-γ در سوپ کشت سلولهای خون کامل را با درصد سلول‌های $CD3^+$ IFN-γ^+ را در گروه حاد (نمودار بالا) یا مزمن (نمودار پایین) نشان می دهد . تنها در گروه حاد یک ارتباط مستقیم دیده می‌شود(r= ۰/۸۲ و P= ۰/۰۰۱۸) .



شکل ۳: ارتباط درصد سلول‌های $CD3^+$ IFN-γ^+ با سلولهای $CD3^+$ IL-13^+ بیماران مبتلا به بروسلوز حاد . تنها در گروه حاد بین‌سلول‌های$CD3^+$ تولیدکننده IFN-γ و IL-13 ارتباط معکوس وجود دارد (r= -۰/۷۸ و P<۰/۰۵) .

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه‌گیری

سلول‌های $CD4^+T$ میانجی‌های ایمنی سلولی هستند که سیستم ایمنی را از دو راه تنظیم می‌کنند سلول‌های Th1 باعث پیشبرد پاسخ‌های سلول‌های T سیتوتوکسیک و پاسخ‌های حساسیت شدید تاخیری می‌شوند(۱۳). در صورتی‌که سلول‌های Th2 پاسخ‌های آلرژیک و ضد التهابی را هدایت می‌کنند و به برخی از پاسخ‌های سلول‌هایB کمک می‌کنند(۱۴). تکامل یک پاسخ ایمنی مناسب موجود زنده را در برابر عوامل بیماریزا می‌تواند حفاظت کند، در صورتی‌که پاسخ‌های نامناسب وضعیت موجود را وخیم‌تر(نظیر واکنش‌های خود ایمنی) یا امکان بقا و انتشار عوامل بیماریزا را فراهم می‌کند(۱۵).

امروزه ارزیابی بیان سیتوکاین‌ها تبدیل به ابزار با ارزشی برای شناخت وضعیت‌ایمنی‌سلولی شده‌است(۱۶). گرایش زیاد به تعیین نقش این مولکول‌های مهم در شرایط مختلف بالینی و تحقیقاتی، انگیزه یافتن روش‌های جدید برای بررسی تولید سیتوکاین‌ها در نمونه‌های بالینی شده است(۱۷). دراین مطالعه از خون کامل، که بیشترین تشابه فیزیولوژیک را با شرایط بدن دارد، به عنوان نمونه آغازین استفاده شد تا نتایج آزمایشگاهی (in vitro) همخوانی بیشتری با وضعیت بدن (in vivo) داشته باشد.علاوه‌براین، برای ارزیابی پاسخ‌های ایمنی بویژه در مواردی که حجم نمونه به دلایل فیزیولوژیک (اطفال و افراد کهنسال) یا پاتولوژیک(بیماران دچار نقص ایمنی یا کمبودهای خونی) کم باشد، استفاده می‌شود. چون ممکن است فعال‌کردن سلول‌ها با PMA بروز سطحی برخی از مولکول‌های نظیر CD4 و CD56 را با تغییر کاهشی مواجه کند، (۱۸). در این مطالعه درصد سلول‌های $CD3^+$ بارز کننده IFN-γ یا IL-13ارائه شده است.

علاوه بر این از باکتری‌های کشته شده بروسلا ملی تنسیس به عنوان آنتی‌ژن استفاده شد، چون قبلا نشان داده شده است که لیپوپلی ساکارید (LPS) استخراج شده از این ارگانیسم‌ها توانایی ایجاد IFN-γ و IL-12 را در انسان دارند(۴و ۱۸). تولید اختصاصی IFN-γ به طور معنی‌داری در تمام گروه‌ها از جمله گروه شاهد، در مقایسه با کشت‌های بدون آنتی‌ژن، افزایش نشان داد. با این حال تولید IFN-γ تنها در گروه مبتلا به بروسلوز حاد، به طور معنی‌دار از گروه شاهد و گروه مبتلا به بروسلوز مزمن بیشتر بوده است. تولید اختصاصی این سیتوکاین در افراد سالم مشابه یافته مطالعه‌های قبلی ما و دیگر گزارش‌ها نیست که بیانگر القای تولید سیتوکانی‌های Th1، نظیر IFN-γ توسط باکتری‌های کشته شده بروسلا هستند، (۲۰-۱۹). همانطور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود از نظر تولید غیر اختصاصیIFN-γ (تحریک با میتوژن) در تمامی گروه‌ها اختلاف معنی‌دار بدست نیامد. این یافته‌ها با گزارش نشان دهنده کاهش پاسخ میتوژنی سلول‌های Tو تولید غیراختصاصی IFN-γ درمرحله حاد بیماری و رسیدن آن به حد طبیعی پس از درمان آنتی‌بیوتیکی(۲۱) تفاوت داشت. این اختلاف می‌تواند ناشی از این باشد که بیماران ما عموما تحت درمان آنتی‌بیوتیک بودند. در گروه مزمن پاسخ به آنتی‌ژن‌های اختصاصی نسبت به گروه حاد کاهش داشت ولی در مقایسه با گروه شاهد، تفاوت معنی‌دار نبود. در حالی‌که چنین اختلافی بین بیماران مزمن و حاد در تحریک غیراختصاصی (با میتوژن) وجود نداشت. این یافته مشابه مطالعه‌هایست که نشان داده‌اند تولید IFN-γ و پاسخ‌های بلاستوژنیک در دوره مزمن بیماری نسبت به مرحله حاد کاهش می‌یابد(۲۲و ۲۷).

همانطور که در نمودار ۲ دیده می‌شود، افراد سالم در برابر آنتی‌ژن‌های اختصاصی پاسخ نمی‌دهند به طوری‌که در صد سلول‌های $CD3^+$ تولید کننده IFN-γ تیمار شده با g+PMA/I درمقایسه با سلول‌هایی که تنها با PMAتحریک شده‌اند، در روش فلوسیتومتری تفاوت معنی‌دار ندارد، در حالی‌که با روش الایزا این تفاوت معنی‌دار است. این یافته دقت روش CFC را در برابر روش‌های متداول نظیر ELISA نشان می‌دهد. به طوری‌که در روش CFC تنها سلول‌های $CD3^+$ ارزیابی می‌شوند. از

www.SID.ir

Archive of SID

طرف دیگر در شرایط کشت در روش CFC تحریک آنتی‌ژنی کوتاه مدت (۱۸ ساعت) باعث می‌شود تا تنها سلول‌های خاطره که قبلا با آنتی‌ژن‌های بروسلا تحریک شده بودند(priming) با تحریک اختصاصی مجدد، فعال شوند.

یافته‌های مشابه بیانگر کاهش تولید IFN-γ در پاسخ به آنتی‌ژن‌های سیتوپلاسمی بروسلا در بیماری مزمن است (۱۸ و ۲۳).

وجود ارتباط مستقیم بین تولید IFN-γ در سوپ کشت سلولی و بیان داخل سلولی این سیتوکاین در بروسلوز حاد نشان می‌دهد که در این بیماران نه تنها سلول‌های تولید کننده IFN-γ افزایش پیدا می‌کنند، بلکه تعداد مولکول‌های آن نیز در هر سلول افزایش چشمگیر نشان می‌دهد. در حالی‌که کاهش تعداد سلول‌های تولید کننده IFN-γ در گروه مزمن می‌تواند ناشی از القای آپوپتوز توسط ارگانیسم باشد.

انترلوکین۱۳ به علت اثر ضدالتهابی قوی و کاستن عملکرد ماکروفاژها نظیر کاهش تولید IL-12 ، کاهش تولید آنزیم اکسیدنیتریک‌سنتتاز القایی و نیز افزایش تولید IL-10، (۲۵-۲۴) در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. چون تشخیص تولید این سیتوکاین با روش الایزا دشوار بود (داده‌ها نشان داده نشده‌است)، درصد سلول‌های $CD3^+$ تولید کننده IL-13 اختصاصی آنتی‌ژن تعیین شد. تعداد سلول‌های دوگانه مثبت ($IL\text{-}13^+CD3^+$) تنها در گروه مزمن افزایش چشمگیر داشت در حالی‌که در گروه حاد و گروه شاهد این اختلاف معنی‌دار نبود. اگرچه، یافته‌های ما حاکی از وجود ارتباط معکوس بین درصد سلول‌های $CD3^+$ تولیدکننده IFN-γ و سلول‌های $CD3^+$ تولید کننده IL-13 در بیماران مبتلا به بروسلوز حاد است ولی چنین ارتباطی در گروه مزمن وجود نداشت.

این تحقیق، نشان می دهد که در افراد مبتلا به فرم حاد بیماری، پاسخ سلول‌های $CD3^+T$ به سمت Th1 گرایش می‌یابد. به طوری‌که درصد سلول‌های $CD3^+$ تولید کننده IFN-γ افزایش می‌یابد و درصد سلول‌های $CD3^+$ تولید کننده IL-13 (سلولهای Th2) نیز کاهش پیدا می‌کند. در نوع مزمن بیماری، هماهنگی و ارتباط تولید سیتوکاین‌های Th2 با پیشرفت بیماری در جهت مزمن شدن بدست نیامد. با این وجود، افزایش معنی‌دار تولید IL-13 در بیماران نوع مزمن می‌تواند یکی دیگر از دلایل کاهش تولید IFN-γ ، علاوه بر افزایش تولید IL-10 (۲۷) و کاهش بروز پذیرنده IL-12 (IL-12 Rβ2) باشد که

ما در این گروه، مورد مطالعه قرار داده‌ایم(داده‌ها منتشر نشده است). همچنین نشان‌داده‌شده است که IL-13، تولید PGE2 را توسط ماکروفاژها افزایش می‌دهد(۲۶). این پروستاگلاندین نه‌تنهاعرضه‌زنجیره‌β2 رسپتورIL-12 (۱۱) را کاهش می‌دهد بلکه تولید نوع غیرفعال انترلوکین ۱۲ (IL-12p40) را هم القاء می‌کند. بنابراین عفونت‌مزمن بروسلا هم به طور مستقیم (القای تولید IL-13) و هم به صورت غیرمستقیم (تحریک تولید PGE2) باعث کاهش پاسخ‌های محافظت کننده می‌شود.

علاوه بر آن، روش بررسی به صورت سیتوکاین‌های داخل سلولی و تعیین شاخص‌های سطحی در نمونه‌های خون کامل، نسبت به روش تعیین سیتوکاین‌های خارج سلولی برتری دارد زیرا حذف نکردن فاکتورهای محلول پلاسما، امکان بررسی دقیق و هم‌زمان چندین سیتوکاین و تعیین نوع و فنوتیپ سلول‌های پاسخگو را در کمترین زمان، بویژه در نمونه‌های با حجم کم (1ml) فراهم می‌آورد.

منابع

www.SID.ir

Archive of SID

1. Zavala I, Nava A, Guerra J, Quiros C. Brucellosis. Infect Dis Clin North Am 1994; 8:225-241.

2. 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.

3. Prussin C, Metcalf D. Detection of Intracytoplasmic Cytokine Using flow Cytometry and Directly Conjugated Anti-Cytokine Antibodies. J Immunol Methods 1995; 188:117-128.

4. 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.

5. 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.

6. Maino VC. Rapid Assessment of Antigen Induced Cytokine Expression in memory T cells by flow Cytometry. Vet. Immunol. Immunopathol. 1998; 63:199-207.

7. 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.

8. Jiang X, Baldwin CL. Effects of Cytokines on Intracellular Growth of Brucella Abortus. Infect Immun 1993; 61:124-134.

9. 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.

10. Zhan Y, Cheers C. Endogenous Interleukin-12 is Involved in Resistance to Brucella Abortus Infection. Infect Immun 1995; 63:1387-1390.

11. Wynn TA. IL-13 Effector Functions. Annu Rev Immunol 2003; 21:415-456.

12. Galanakis E, Makis A, Bourantas KL, Papadopoulou ZL. Interleukin-3 and Interleukin-4 in Childhood Brucellosis. Infection 2002; 30 33-34.

13. 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.

14. Huang LY, Krieg AM, Eller N, Scott DE. Induction of Regulation of Th1-Inducing Cytokines by Bacteria DNA, Lipopolysaccharide, and Heat-Inactivated Bacteria. Infect Immun 1999; 67:6257-6263.

15. Scharf O, Aqranovich I, Lee K, Eller NL, Inman J, Scott DE, Golding B. Ontology of Th1 Memory Responses Against a Brucella Abortus Conjugate. Infect Immun 2001; 69:5417-5422.

16. Fernandes DM, Baldwin CL. Interleukin-10 Down Regulates Protective Immunity to Brucella Abortus. Infect Immun 1995; 63:1130-1133.

17. Nomural LE, Walker J M, Maecker HT. Optimization of Whole Blood Antigen– Specific Cytokine Assays for CD4+ Cells. Cytometry 2000; 40: 60-68.

18. Bromelow, KV, Hisrt W, mendes R L, winkley AR, smith IE, et al. Whole Blood Assay for Assessment of the Mixed Lymphocyte Reaction. J. Immunol Methods 2001; 247: 1-8.

19. Kariminia A, Kavoossy 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 Microbiol Infect Dis 2002; 25:85-93.

20. Ahmed K, Al-Matrouk KA, Martinez 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.

21. 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: 115-120.

22. 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.

23. Baldwin C. L, 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.

24. Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X Schofield B, Neben TY, Karp KC, Donaldson DD. Interleukin-13: Central Mediator of Allergic Asthma. Science 1998; 282:2258-2261.

25. 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

www.SID.ir

Archive of SID

۲۷- رفیعی، ع؛ کریمی نیا، آ؛ عجمی، ا؛ کبودانیان اردستانی، س: کاهش تولید IFN-γ همراه با افزایش تولید IL-12 در بیماران مبتلا به بروسلوز مزمن. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی مازندران، سال ۱۳۸۳، جلد ۱٤، شماره ٤۲، صص: ۱۱-۲۱.

in Vitro: Comparison With Interleukin-4 and Interferon-Gamma. Eur J Immunol 1994; 24:1441-1445.

26. Alexander J, Brombacher F, McGachy HA, McKenzie ANJ, Walker W, Carter KC. An Essential Role for IL-13 in Maintaining a Non Healing Response Following Leishmania Maxicana Infection. Eur J Immunol 2002; 32:2923-2983.

www.SID.ir

Archive of SID

Evaluation of Cellular Immunity of Patients with Brucellosis by Measuring Interferon Gamma (IFN-γ) and Interleukin-13 (IL-13) By Flow Cytometry and ELISA

Rafiei AR. Ph.D., Karimi nia A. Ph.D.

Abstract

Introduction: The analysis of cytokine production is a valuable component of studies of immune response to stimulation such as pathogens, vaccines, and other immunological challenges. The animal findings Show that brucella infection induces cell-mediated responses. Some cytokines have an Important role in resistance to brucella infection.

Objective: This Study is don't to Poesent a orecise an useful unseparated whole blood of healthy normal and patients with acute and chronic brucellosis as the source of cells evaluation of interferon gamma (IFN-γ) and interleukin-13 expression.

Materials and Methods: Diluted whole blood samples of 27 patients with acute (14) and chronic brucellosis (n13), and sex and age-matched healthy volunteers (n=22) With Meanage of 35-33+ 21 were cultured in the presence of either mitogen; heat inactivated bacteria or medium alone. Intracellular IL-13 and IFN-γ were measured by specific sandwich ELISA and flow Cytometry was detected by the number of cytokine-producing $CD3^+$ cells.

Results: Findings indicated that extrandintracellular specific IFN-Y in creased Cansiderably ($P<0.001$) in cute brucelles patients. not only IFN-γ production but also the number of IFN-γ- producing CD3 cells were significantly decreased in response to antigen in chronic group of patients. There was a reverse correlation between the number of IFN-γ-producing and IL-13-producing CD3 cells only in acute group which shows polarization of immune responses to Th1 in them.

Conclusion: Although the percentage of CD3 IL-13-producing cells was dramatically high in the chronic group of patients, no correlation was found between the number of IFN-γ-producing and IL-13-producing CD3 cells. In conclusion, the correlation of Th2 cytokines production and progression of chronic human brucellosis was not demonstrated. Nevertheless, diminished production of Th1 cytokines production in chronic group may suggest T cells unresponsiveness to Brucella antigen which helps prolongation of brucellosis in chronic patients.

Key word: Brucellosis/Flow Cytometry/Interforous/ Interleukins

www.SID.ir