جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله دانشکده پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی تهران
سال ۶۲ ، شماره ۵، صفحات ۳۶۳ تا ۳۷۱، (۱۳۸۳)

شناسایی بروز سیتوکاین‌های داخل سلولی در خون کامل افراد سالم و بیماران مبتلا به بروسلوزیس

دکتر علیرضا رفیعی (استادیار)*، دکتر عبدالحسین کیهانی (دانشیار)* ، دکتر آمینا کریمی‌نیا (استادیار)**، دکتر سوسن کبودانیان‌اردستانی (استادیار)***، دکتر مینو محرز (دانشیار)****، دکتر علی امیرخانی (دانشیار)*****

* گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

** گروه ایمونولوژی، انستیتوپاستور ایران

*** آزمایشگاه ایمونولوژی، گروه بیوشیمی، مرکز بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه علوم پزشکی تهران

**** گروه بیماری‌های عفونی، بیمارستان امام خمینی (ره)، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

***** گروه آمار و اپیدمیولوژی، انستیتوپاستور ایران

چکیده

مقدمه: بروسلوز انسانی یک بیماری عفونی قابل انتقال بین انسان و دام در سراسر جهان می‌باشد که توسط باکتری‌های داخل سلولی جنس بروسلا ایجاد می‌شود. مطالعات انجام شده در موش نشان می‌دهد که مقاومت در این بیماری مربوط به پاسخ‌های Th_1 می‌باشد. در حالیکه پاسخ‌های Th_2 در تشدید وخامت بیماری نقش دارند. ارزیابی تولید سیتوکاین‌ها بویژه سیتوکاین‌های داخل سلولی ابزار مهمی در بررسی پاسخ‌های ایمنی در مقابل محرکهایی نظیر عوامل بیماریزا، واکسن‌ها و سایر چالش‌های ایمنی می‌باشد. در این مقاله به منظور ارائه روشی ساده، سریع، دقیق و 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 بیماران (۱۵ نفر با میانگین سنی ۱۸/۲ ± ۳۹/۵۳ سال) و داوطلبان سالم (۱۴ نفر با میانگین سنی ۱۲± ۳۶/۳۳ سال) در حضور میتوژن، باکتریهای کشته شده بروسلا ملی تنسیس یا محیط کشت تنها، کشت داده شد و IFN– γ و IL-13 در سوپ کشت سلولی با ELISA ساندویچی اختصاصی و تولید داخل سلولی این سیتوکاینها در سلولهای $CD3^+$ با روش فلوسیتومتری (CFC) بررسی گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان می‌دهد که نه تنها تولید اختصاصی IFN– γ بلکه تعداد سلولهای $CD3^+$ تولید کننده IFN– γ در بیماران با بروسلوز مزمن بطور معنی دار کاهش می‌یابد. وجود ارتباط معکوس بین درصد سلولهای $CD3^+$ تولید کننده IFN– γ با سلول‌های $CD3^+$ تولید کننده IL-13 در گروه حاد بیانگر انحراف پاسخ‌های ایمنی به سمت Th1 در این بیماران است. گرچه درصد سلول‌های $CD3^+$ تولید کننده IL-13 بطور چشمگیر در بیماران با بروسلوز مزمن زیاد است ولی ارتباط معنی‌داری بین تعداد سلول‌های $CD3^+$ تولید کننده IFN– γ با سلولهای $CD3^+$ IL-13$^+$ پیدا نشد.

نتیجه گیری و توصیه ها: 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 می‌انجامد.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

سیتوکاین‌ها هورمونهای پلی‌پپتیدی هستند که در تنظیم رشد، تمایز و عملکرد سلول‌های خونساز و غیر خونساز دخالت دارند (١). بیان سیتوکاین‌ها در سلولهای T بالغ در پاسخ به آنتی ژن، نخستین مکانیسم دفاع ایمنی سلولی می‌باشد 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 باشد (٢). 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 (١). روش‌های متداول ارزیابی پاسخهای اختصاصی سلولهای T شامل اندازه‌گیری تکثیر و تزاید سلولی یا بیان سیتوکاین‌ها در محیط کشت سلولهای PBMC می باشد که با انکوباسیون طولانی این سلولها در مقابل آنتی‌ژن خاص انجام می پذیرد (٣). 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 نمی‌سازند. علاوه بر این با این روش‌ها نمی‌توان پاسخ‌های سلولی را در جمعیت‌های سلولی بسیار اندک بررسی نمود (١). روش‌هایی نظیر ELISPOT ، آنالیز محدودسازی رقت و هیبریداسیون در جا، گرچه امکان ارزیابی سیتوکاین‌ها را در سطح سلولی می‌دهند ولی بسیار وقت‌گیر و توان فرسا می‌باشند(٤). بررسی تولید داخل سلولی سیتوکاین‌ها با استفاده از فلوسیتومتری امکان شناسایی همزمان دستجات مختلف سلولی و تولید سیتوکاین را در آنها فراهم می آورد (٢). با این روش امکان اندازه‌گیری سریع تولید سیتوکاینها در هزاران سلول مجزا و همینطور شناسایی همزمان چندین سیتوکاین در هر سلول میسر می گردد. به لحاظ 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 می‌باشد (٥). لکوسیت‌های تحریک نشده در حالت طبیعی سیتوکاین را بیان نمی‌کنند. از آنجا که حد زمینه‌ای بیان خودبخودی سیتوکاین‌ها اندک می باشد، بدنبال فعال‌سازی کوتاه مدت، با این روش فراوانی بسیار اندک سلول‌های تحریک شده قابل شناسایی است (٢). وضعیت مقاومت میزبان در برابر بروسلا عمدتاً در موش مطالعه شده است. این مطالعات نشان می‌دهند که سیتوکاین‌ها نقش هدایتگر سیستم ایمنی را بعهده داشته و سرانجام بیماری را متاثر می‌سازند (٦). اینترفرون گاما (IFN-γ) با فعال کردن ماکروفاژها در جهت تولید نیتریک اکسید (NO)، موجب تقویت مقاومت در برابر بروسلوز می‌شود (٦). اینترلوکین-١٣ همانند اینترلوکین-٤ می‌تواند ترشح IFN-γ را توسط سلولهای CD_4^+ T دچار تنظیم کاهشی نماید و باعث شدیدتر شدن عفونت بروسلایی گردد (٨،٧).

دراین مقاله به منظور ارائه روش مستقیم ارزیابی سلولهای پاسخگو درحالتهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک، وضعیت ایمنی اختصاصی در بیماری بروسلوز با بررسی تولید اختصاصی IFN-γ و IL-13 مطالعه شده است. به منظور داشتن تصویر بهتری از پاسخ‌های طبیعی در مقابل باکتری‌های بروسلا ، برای بررسی سیتوکاین‌ها در آزمایشگاه از کشت خون کامل استفاده گردید (٩).

مواد و روش‌ها

آنتی‌بادی‌های اختصاصی برای CD3 انسان (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 نفوذپذیر کننده، بافر تثبیت کننده و محلول‌های محرک، همگی از شرکت IQP (گرونینژن، هلند) تهیه گردید. باکتری بروسلا ملی تنسیس سویه واکسنی Rev-1توسط دکتر ذوقی از موسسه رازی (حصارک، کرج) اهدا گردید. کیت اینترفرون گاما نیز از شرکت Bender Med system، اتریش خریداری شد.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

جمعیت مورد مطالعه:

این مطالعه بر روی ۱۵ بیمار (٦ نفر زن، ۹ نفر مرد با میانگین سنی ۱۸/۲± ۳۹/۵۳ سال) که ابتلای آنها به بروسلوز از نظر آزمایشگاهی و بالینی محرز گردید، انجام شد. هیچ یک از بیماران مورد مطالعه شواهدی مبنی بر ابتلا به سایر بیماریهای عفونی غیر از بروسلوز یا بیماریهای التهابی، قبل یا در طی مطالعه نداشتند. همچنین هیچکدام 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 ١٤ نفر از داوطلبین سالم که از نظر سنی و جنسی با بیماران نزدیک بودند (شش نفر زن و ۸ نفر مرد، با میانگین سنی ۱۲± ۳٦/۳۳ سال) و تحت هیچ درمانی قرار نداشتند بعنوان شاهد در نظر گرفته شدند.

ابتلا به بروسلوز بر اساس علائم و نشانه‌های بالینی و آزمایشات سرولوژی و باکتری‌شناسی تعیین گردید. تشخیص بروسلوز حاد بر اساس دوره بیماری (کمتر از شش ماه) و علائم و نشانه‌های بالینی و یافته‌های آزمایشگاهی انجام شد. مرحله ازمان بیماری نیز به واسطه تب پائین، علائم موضعی بیماری و خستگی و ضعف مفرط مشخص گردید. 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. نمونه‌های خون با استفاده از لوله‌های خلا دار استریل (venipuncture) دارای ماده ضد انعقاد هپارین سدیم (10 IU/ml) اخذ گردید. 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)، 100 IU/ml پنی‌سیلین و 100 μg/ml استرپتومایسین (سیگما، سدگس، فرانسه) پنج برابر رقیق گردید. سپس نمونه‌های خون کامل رقیق شده در پلیت‌های کشت سلولی ۹٦ چاهکی ته صاف در حضور یا در غیاب $1x10^7$ CFU/ml باکتری کشته شده بروسلا ملی تنسیس سویه Rev-1 در اتمسفر حاوی CO_2 ۵٪ در دمای ۳۷°C کشت داده شدند.

تولید و اندازه‌گیری IFN-γ و IL-13:

نمونه‌های خون کامل رقیق شده در حضور یا عدم حضور فیتوهماگلوتینین (PHA, 2/5 mg/ml) (سیگما، سدگس، فرانسه) یا باکتری‌های کشته شده بروسلا ملی تنسیس سویه Rev-1 ($1x10^7$ CFU/ml) در پلیت‌های ٢٤ چاهکی کشت داده شد و در اتمسفرحاوی CO_2 ۵٪ در دمای 37°C به مدت ۷۲ ساعت انکوبه گردید. سپس سوپ هر کدام از چاهک‌ها جمع‌آوری شد و در فریزر ۷۰°C- تا زمان آزمایش نگهداری گردید. سیتوکاین‌های IFN-γ و IL-13 با استفاده از کیت‌های ایمونواسی آنزیمی (ELISA) با استفاده از جفت آنتی‌بادی‌های مونوکلونال اختصاصی و بر اساس دستورالعمل شرکتهای سازنده اندازه‌گیری گردید. حد شناسایی هر کیت تقریبا ۷/۵ pg/ml می‌باشد.

شناسایی داخل سلولی سیتوکاین‌ها:

آماده سازی سلولی و تحریک آنتی ژنی:

نمونه‌های خون کامل رقیق شده در حضور یا عدم حضور باکتریهای کشته شده *B.melitensis* سویه *Rev-1* ($1x10^7$ CFU/ml) در پلیت‌های ۹٦ چاهکی ته صاف در دمای 37°C و اتمسفر CO_2 ۵٪ کشت داده شد. ۱۸ ساعت بعد سلولها به لوله‌های پلی‌اتیلنی 15ml فالکون منتقل گردید و سلولهای تحریک شده با آنتی ژن‌های بروسلایی یا نیمی از سلول‌های تحریک نشده، با افزودن فربل ۱۲- میریستات ۱۳- استات (PMA) و اینومایسین (PMA/I) در حضور منتزین بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده به مدت ۵ ساعت دوباره تحریک گردید. بعد از تمام انکوباسیون، 100 μL/ml از محلول 20 mM EDTA در هر لوله اضافه گردید و نمونه‌ها 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 m M NH4CI) و ٢٠ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق لیز گردیده، ١٠ دقیقه در ٥٠٠g سانتریفوژ شده و مایع رویی دور ریخته شد. سلول‌های باقیمانده بعد از دو مرحله شستشو با محلول شستشوی FACS (محلول PBS حاوی FCS ١٪ و NaN3 ٠/١%)، در غلظت ١٠^٦ x١ سلول در هر میلی‌لیتر تنظیم شد.

رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس:

نمونه‌ها در لوله‌های پلی استیرنی mm ٧٥ x١٢ (فالکون شماره ٢٠٥٢) به میزان μL ٢٠٠ در لوله مربوطه منتقل شده و به هرلوله μL ١٠ آنتی‌بادی مونوکلونال ضد CD3 انسانی کونژوگه با CYQ اضافه گردید و بمدت ١٥ دقیقه در تاریکی و دمای ٤°C انکوبه شد. پس از دو بار شستشو با محلول شستشوی FACS، سلول‌ها با افزودن محلول پارافرمالوئید ١٪ درPBS (محلول تثبیت، IQP) تثبیت شدند. بعد از دو بار شستشو با محلول شستشو، با افزودن محلول نفوذ پذیر کننده حاوی ساپونین جدار سلول‌ها نفوذپذیر گردید. آنگاه با افزودن آنتی‌بادی‌های کونژوگه مونوکلونال FITC-IFN-γ یا PE-IL-13 و ٢٠ دقیقه انکوباسیون در تاریکی در دمای 4°C سیتوکاین‌های داخل سلولی رنگ‌آمیزی شد. سرانجام پس از شستشو، سلول‌ها در 500 μL PBS سوپاسپانسیون گردیده و با دستگاه فلوسیتومتری FACScan و نرم افزار lysis II (بکتون- دیکینسون، سانخوزه، کالیفورنیا) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یک لوله نیز بعنوان کنترل ایزوتیپی استفاده شد که همانند روش بالا ولی با مونوکلونال آنتی‌بادی سازگار ایزوتیپی برای IFN-γ یا IL-13 رنگ آمیزی گشت. این لوله 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 رنگ‌آمیزی شده بودند برای تعیین ٩٥٪ دامنه اطمینان رنگ آمیزی زمینه، بکار رفتند.

طرح‌بندی فلوسیتومتری و تجزیه و تحلیل داده‌ها:

سلولهای $CD3^+$ براساس پرتوی پراکنش جانبی (SSc) و بروز مولکول CD3 حدبندی شدند. در این محدوده بین ١٠٠٠٠-١٥٠٠٠ رویداد برای هر نمونه جمع آوری گردید. داده‌ها 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 نقطه‌ای نمایش داده شد.

آنالیز آماری:

داده‌ها بصورت میانگین ± انحراف معیار نمایش داده شده است. برای مقایسه بین گروه‌ها از آزمون mann-whitney و آزمون kruskal-wallis استفاده شد. بررسی ارتباط بین پارامترها با استفاده از ضریب همبستگی پیرسون انجام گرفت. اختلافات بیشتر از ٩٥٪ دامنه اطمینان در تمام آزمایشات با مقدار P<0/05 از نظر آماری معنی دار بود. برای آنالیز داده‌ها از نسخه دهم نرم افزار SPSS استفاده شد.

یافته‌ها

تنظیم کاهشی تولید اینترفرون گاما(IFN-γ)در بیماران مبتلا به بروسلوز مزمن:

همانطور که در نمودار ١ دیده می شود PHA، موجب القای سطح بالایی از IFN-γ در تمام گروهها می‌شود. افراد شاهد سالم با آنتی ژن پاسخ داده و میانگین میزان IFN-γ در آنها pg/ml ١٠/٨٥ ± ٧٥ است. تولید IFN-γ در بیماران مبتلا به بروسلوز حاد افزایش قابل توجهی نسبت به گروه مبتلا به بروسلوز مزمن داشت (P<٠/٠٥) بطوریکه میانگین تولید IFN-γگروه اول (حاد) نسبت به گروه دوم (مزمن) به ترتیب pg/ml ٣٤/٧ ±١١١/٦٧ و pg/ml ١٧/١٢ ± ٤٣/٦٧ می‌باشد. میزان تولید IL-13 در هر سه گروه به قدری ناچیز بود که در حد شناسایی کیت الیزای بکار رفته عملاً اختلافی بین گروه‌ها مشاهده نشد.

نقش تنظیم افزایشی IL-۱۳ در پیشرفت بیماری بروسلوز مزمن در انسان:

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 میتوژن‌های PMA/I دوباره تحریک گردیدند. درصد سلولهای دوگانه مثبت برای سلولهای زیر تعیین شد:

۱- سلول‌های تحریک شده با PMA/I بدون تیمار با منزین برای تعیین میزان رنگ‌آمیزی زمینه.

۲- سلول‌های تحریک شده با PMA/I در حضور منزین به منظور انباشته شدن سیتوکین‌های تولید شده در سلول در اثر تحریک.

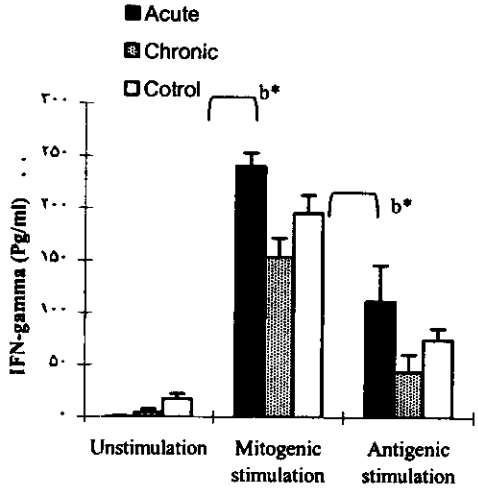
۳- سلول‌های تحریک شده با آنتی‌ژن که تحت تاثیر PMA/I در حضور منزین دوباره تحریک گشته‌اند.

نتایج سلولهایی که تنها با آنتی‌ژن تحریک شده بودند بدلیل ناچیز بودن سیگنال سیتوکاینی نشان داده نشده است.

در هر گروه هنگامیکه سلولها ابتدا با آنتی ژن‌های اختصاصی برانگیخته شده و دوباره با PMA/I تحریک میگشت درصد سلول‌های $CD3^+$ بارز کننده سیتوکاین نسبت به سلولهایی که تنها PMA/I دریافت می‌گردند، افزایش چشمگیر می‌یافت.

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 می‌گشتند باز هم نسبت به سلولهایی که تنها PMA/I دریافت داشته بودند، کمتر بود. همانطور که در نمودار ۲A دیده می‌شود

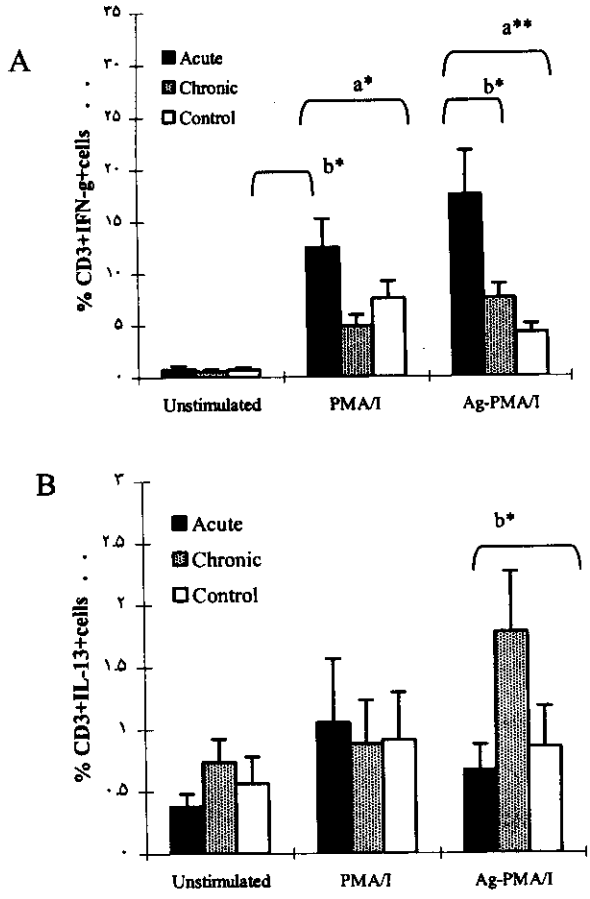
درصد سلولهای $CD3^+$ تولید کننده IFN-γ در افراد مبتلا به بروسلوز مزمن بطور معنی دار کمتر از بیماران با بروسلوز حاد است (به ترتیب ۱/٤ ± ۷/۵ در مقابل ٤/۲ ± ۱۷/٦، P<۰/۰۵). گروه کنترل تفاوت معنی‌داری با گروه‌های بیمار نشان می‌دادند (P<۰/۰۵) . در تمام گروه‌های مطالعه بروز داخل سلولی IL-13 در حضور تحریک PMA/I تنها بطور مختصر شناسایی گردید. بعد از فعال شدن اختصاصی، بروز IL-13 تنها در گروه مزمن در مقایسه با گروه شاهد و گروه حاد افزایش نشان می‌دهد (به ترتیب ۰/٤۸ ± ۱/۷۸، ۰/۲۰ ± ۰/٦۷ و ۰/۳۲ ± ۰/۸۵) (نمودار ۲B). این اختلافات از نظر آماری تنها بین دو گروه از بیماران معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۵). شکل یک نمونه هیستوگرام طرح نقطه‌ای 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 می‌دهد.



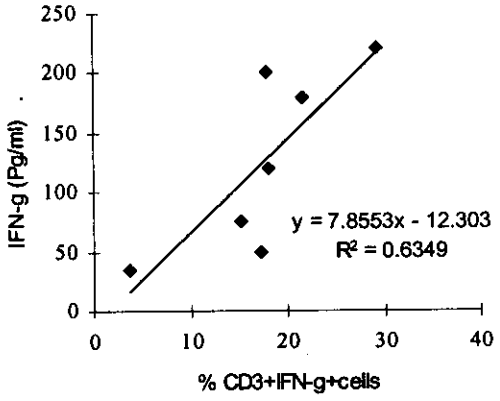
نمودار ۱- تولید IFN-γ توسط سلولهای خون کامل افرادسالم و بیماران مبتلا به بروسلوز حاد یا مزمن. سلول‌های خون در حضور یا عدم حضور PHA یا باکتری‌های کشته بروسلا ملی تنسیس سویه Rev1 به مدت ۷۲h کشت داده شد. میزان سیتوکاین‌ها در سوپ کشت سلولی با ELISA ساندویچی اندازه‌گیری شد. نتایج به صورت میانگین ±SEM نشان داده شده است. ستاره‌ها اختلاف معنی‌دار آماری را بین گروه مزمن با گروه حاد با P<۰/۰۵ نشان می‌دهد.

ارتباط تولید سیتوکاین‌ها با اشکال بالینی بیمار:

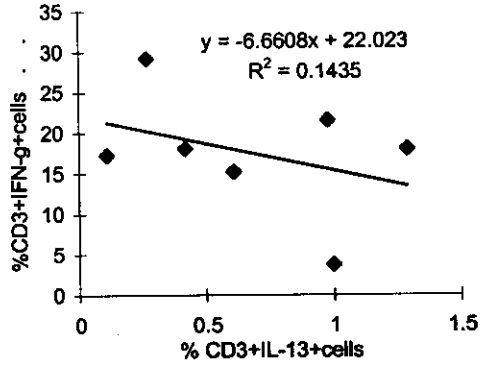
همانطور که نمودار۳ نشان می‌دهد بین درصد سلولهای$CD3^+$ تولید کننده IFN-γ و تولید این سیتوکاین در مایع رویی کشت سلولی بیماران مبتلا به بروسلوز حاد ارتباط مستقیم و مشخص وجود دارد (r=۰/۸، P= ۰/ ۰۰۱۸) با این وجود، این همبستگی در مورد بروسلوز مزمن دیده نشد. همچنین در مبتلایان به شکل حاد بیماری یک ارتباط معکوس بین میزان بیان IFN-γ و IL-13 داخل سلولی دیده می شود (نمودار۴). این هماهنگی در گروه مزمن وجود ندارد.



نمودار ٢- تعیین سیتوکاین‌های داخل سلولی IFN-γ و IL-13 را در سلول‌های $CD3^+$ T بیماران مبتلا به بروسلوز حاد یا مزمن و یا افراد سالم نشان می‌دهد. نمونه‌های خون کامل رقیق شده پس از تحریك یا عدم تحریك اولیه باکتری‌های کشته (١٨ ساعت)، بمدت ٥ ساعت توسط PMA/I در حضور یا عدم حضور منزین دوباره تحریك شدند. رنگ‌آمیزی سطحی برای CD3 و سیتوکاین‌های داخل سلولی(IFN-γ و IL-13) انجام شده است. داده‌ها، میانگین درصد سلول‌های دوگانه مثبت [$CD3^+$ $IFN\text{-}\gamma^+$] (قسمت A) یا $CD3^+$ $IL\text{-}13^+$ (قسمت B) ± SEM را نشان می‌دهند. ستاره‌ها در نمودار A اختلافات معنی‌دار را بین تحریك آنتی‌ژنی یا میتوژنی در گروه حاد در مقایسه با گروه مزمن [b*] (P< ٠/٠٥) و افراد شاهد (P< ٠/٠٠١ و P< ٠/٠٥) را بیان می‌کند. ستاره در نمودار B بیانگر اختلاف معنی‌دار بین گروه مبتلا به بروسلوز حاد با گروه مزمن در تحریک اختصاصی می‌باشد (P< ٠/٠٥).



نمودار٣- مقایسه پاسخ‌های ایمنی بیماران مبتلا به بروسلوز . تولید IFN-γدر سوپ کشت سلول‌های خون کامل تنها در گروه حاد با درصد سلول‌های $CD3^+$ $IFN\text{-}\gamma^+$ارتباط مستقیم نشان می‌دهد (P= ٠/٠٠١٨ و r= ٠/٨٢) .



نمودار۴- ارتباط درصد سلول‌های $CD3^+$ $IFN\text{-}\gamma^+$ با سلول‌های $CD3^+$ $IL\text{-}13^+$ بیماران مبتلا به بروسلوز. همانطور که دیده می‌شود تنها در گروه حاد بین سلول‌های $CD3^+$ تولید کننده IFN-γ و IL-13 ارتباط معکوس وجود دارد (P<٠/٠٥ و r= -٠/٧٨) .

بحث

سلول‌های $CD4^+T$ میانجی‌های ایمنی سلولی هستند که سیستم ایمنی را از دو راه تنظیم می‌نمایند سلول‌های Th1 موجب پیشبرد پاسخ های سلول‌های T سیتوتوکسیک و حساسیت شدید تاخیری می‌شوند در صورتیکه سلولهای Th2 پاسخهای آلرژیک و ضدالتهابی را هدایت کرده و با برخی پاسخهای سلولهای B مساعدت دارند (١٠). تکامل یک پاسخ ایمنی مناسب می‌تواند موجود را در برابر عوامل بیماریزا حفاظت کند، در صورتیکه پاسخهای نامناسب وضعیت وجود

را وخیمتر نموده (نظیر واکنش‌های خود ایمنی) یا امکان بقاء و انتشار عوامل بیماریزا را فراهم می‌سازد.

امروزه ارزیابی بیان سیتوکاین‌ها ابزار با ارزشی برای شناخت وضعیت ایمنی سلولی گشته است. گرایش زیاد به تعیین نقش این مولکولهای مهم در شرایط مختلف بالینی و تحقیقاتی، باعث انگیزه ایجاد روش‌های جدید برای بررسی تولید سیتوکاین‌ها در نمونه‌های بالینی شده است (۱۱). در این مطالعه از روش فلوسیتومتری برای شناسایی تولید سیتوکاین‌های (CFC) داخل سلولی IL-13 و 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 دقیق‌تر مشخص ساخت. در روش‌های متداول بررسی پاسخهای سلولی در برابر آنتی ژن‌های اختصاصی نظیر بررسی تکثیر و تزاید لنفوسیت‌ها (LTT) یا بررسی سیتوکاین‌های مترشحه در سوپ کشت سلولی علاوه بر آنکه به ترتیب بعلت طولانی بودن زمان انکوباسیون امکان بروز آپوپتوز و پیدایش نتایج کاذب در آزمایش LTT داشته و حضور غلظتهای مختلف پذیرنده‌های سلولی یا محلول بر ارزیابی کمی تولید سیتوکاین‌ها توسط ELISA تاثیر سوء گذارد (۱۲)، با این روش‌ها نمی‌توان بروز بیش از یک سیتوکاین را در هر سلول یا پاسخ سلولی را در جمعیت‌های بسیار کم ارزیابی نمود. در روش CFC بعلت کوتاه بودن دوره فعال‌سازی (۵ ساعت)، پروفایل سیتوکاینی دست‌خوش اثرات جانبی (۱۱) یا جذب سیتوکاینی ناشی از پذیرنده‌های محلول یا سلولی نشده و بدلیل استفاده از مهار کننده‌های ترشح پروتئین و نشاندار کردن سطح سلولهای پاسخگو با استفاده از رنگهای فلورسانس، بررسی تولید مقادیر اندک سیتوکاین‌ها در جمعیت‌های سلولی بسیار کم و پراکنده، امکان‌پذیر می‌گردد.

همچنین در این مطالعه از خون کامل، که بیشترین تشابه فیزیولوژیک با شرایط بدن را دارد، بعنوان نمونه آغازین استفاده شد تا هم نتایج آزمایشگاهی (in vitro) همخوانی بیشتری با وضعیت بدن (in vivo) داشته باشد و هم بتوان روشی ساده، سریع و ارزان برای ارزیابی پاسخهای ایمنی بویژه در مواردی که حجم نمونه بدلایل فیزیولوژیک (اطفال و افراد کهنسال) یا پاتولوژیک (بیماران با نقص ایمنی یا کمبودهای خونی) کم است، در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی ارائه نمود. به لحاظ اینکه فعال‌سازی سلول‌ها با PMA ممکن است بروز سطحی برخی از مولکول‌های نظیر CD4 و CD56 را با تغییر کاهشی مواجه سازد (۱۱) در این مطالعه درصد سلول‌های $CD3^+$ بارز کننده IFN-γ یا IL-13 ارائه شده است.

علاوه بر این، ما از باکتریهای کشته بروسلا ملی تنسیس بعنوان آنتی‌ژن استفاده کردیم چون قبلا نشان داده‌ایم که لیپوپلی‌ساکارید (LPS) استخراج شده از این ارگانیسم‌ها توانایی ایجاد IFN-γ و IL-12 را در انسان دارند (۱۳) تولید اختصاصی IFN-γ بطور معنی داری در تمام گروهها از جمله گروه شاهد در مقایسه با کشتهایی که با آنتی ژن تحریک نشده‌اند، افزایش نشان می‌دهد. با این حال تولید IFN-γ تنها در گروه مبتلا به بروسلوز حاد بطور معنی دار از گروه شاهد و گروه مبتلا به بروسلوز مزمن بیشتر است. تولید اختصاصی این سیتوکاین درافراد سالم با مطالعات قبلی ما و سایر گزارشاتی که بیانگر القای تولید سیتوکین‌های Th1 نظیر IFN-γ توسط باکتری‌های کشته بروسلا می‌باشد، همخوانی دارد (۱۳-۱۰). به عبارت دیگر بین تولید غیر اختصاصیIFN-γ در تمامی گروه‌های مورد مطالعه اختلافی مشاهده نشد. این یافته‌های با گزارشی که نشان می‌دهد پاسخ میتوژنی سلولهای Tو تولید غیر اختصاصی IFN-γ در طی مرحله حاد بیماری بروسلوز کاهش می‌یابد و بعد از درمان آنتی‌بیوتیکی طبیعی می‌شود (۱۴) همخوانی نداشت. این اختلاف می‌تواند ناشی از این باشد که بیماران ما عموماً تحت رژیم درمانی آنتی‌بیوتیکی قرار داشتند. هم چنین کاهش معنی دار پاسخگویی لنفوسیتهای بیماران مبتلا به بروسلوز مزمن در برابر آنتی ژنهای اختصاصی بروسلا و عدم مشاهده تفاوت معنی‌دار پاسخ این گروه نسبت به سایر گروههای مطالعه در برابر تحریک غیر اختصاصی، نشان می‌دهد 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 می‌باشد. این یافته با مطالعات دیگر که نشانگر عدم افزایش موارد بروز بروسلوز در افراد مبتلا به ایدز می‌باشد همخوانی دارد (۱۵). همانطور که در شکل مشاهده می‌شود افراد سالم به آنتی ژن‌های اختصاصی پاسخ نمی‌دهند بطوریکه

در صد سلول‌های $CD3^+$ تولید کننده IFN-γ تیمار شده با Ag+PMA/Iدرمقایسه با سلول‌هایی که تنها با PMA تحریک شده اند، تفاوت معنی‌دار نشان نمی دهد. این یافته دقت عمل روش CFC را در برابر روشهای متداول نظیر ELISA نشان می‌دهد بطوریکه در روش CFC تنها سلولهای $CD3^+$ مورد ارزیابی قرار می گیرند. از طرف دیگر تحریک آنتی‌ژنی کوتاه مدت (١٨ ساعت) در شرایط کشت در روش CFC باعث می شود تا تنها سلول‌های خاطره‌ای بیماران که قبلا آنتی ژن‌های بروسلایی را دیده‌اند (priming) در اثر تحریک اختصاصی مجدد فعال گردند. یافته‌های مشابهی توسط سایر محققین ارائه شده است که بیانگر کاهش تولید IFN-γ در پاسخ به آنتی‌ژنهای سیتوپلاسمی بروسلا در بیماران مزمن است (١٦). وجود ارتباط مستقیم بین تولید IFN-γ در سوپ کشت سلولی و بیان داخل سلولی این سیتوکاین در افراد مبتلا به بروسلوز حاد نشان می‌دهد که در این افراد نه تنها تعداد سلولهای تولید کننده IFN-γ افزایش می‌یابد بلکه بیان تعداد مولکولهای آن نیز در هر سلول افزایش چشمگیر می‌یابد. در حالیکه کاهش تعداد سلول‌های تولید کننده IFN-γ در گروه مزمن می‌تواند ناشی از القای آپوپتوز توسط ارگانیسم باشد.

اینترلوکین ١٣ به لحاظ داشتن خواص ضد التهابی قوی و کاهش عملکردهای ماکروفاژها نظیر کاهش تولید IL-12 ، کاهش تولید آنزیم نیتریک اکسید سنتاز القایی و همینطور افزایش تولید IL-10، (١٨-١٧) نیز در این مطالعه بررسی گشت. از آنجا که تولید این سیتوکاین به سختی با روش الیزا قابل شناسایی بود (داده‌ها نشان داده نشده است)، درصد سلول‌های $CD3^+$ تولید کننده IL-13 اختصاصی آنتی ژن بررسی گردید. تعداد سلولهای دوگانه مثبت ($IL\text{-}13^+$ $CD3^+$) تنها در گروه مزمن افزایش چشمگیر نشان می‌دهد در حالیکه در گروه حاد و گروه شاهد این اختلاف معنی‌دار نیست. اگر چه بین درصد سلولهای $CD3^+$ تولید کننده IFN-γ و سلولهای $CD3^+$ تولید کننده IL-13 در بیماران مبتلا به بروسلوز ارتباط معکوس وجود دارد ولی ما نتوانستیم چنین ارتباطی را برای گروه مزمن نشان دهیم.

این امر نشان می‌دهد که در افراد مبتلا به فرم حاد بیماری پاسخ سلول‌های $CD3^+T$ بسمت Th1 گرایش می‌یابد. بطوریکه هم درصد سلولهای $CD3^+$ تولید کننده IFN-γ افزایش می‌یابد و هم درصد سلول‌های $CD3^+$ تولید کننده IL-13(سلولهای Th2) کاهش مییابد. در افراد مبتلا به فرم مزمن بیماری نمی توان هماهنگی و ارتباط تولید سیتوکاین‌های Th2را با پیشرفت بیماری به سمت ازمان اثبات نمود. با این وجود، افزایش معنی‌دار تولید IL-13 در بیماران مزمن می‌تواند یکی دیگر از دلایل کاهش تولید IFN-γ علاوه بر افزایش تولیدIL-10 و کاهش بروز پذیرنده IL-12 (IL-12 Rβ2) که ما در این گروه مطالعه کرده ایم، باشد (داده‌ها منتشر نشده است). درمجموع، روش بررسی سیتوکاین‌های داخل سلولی و تعیین مارکرهای سطحی در نمونه‌های خون کامل به سبب عدم نیاز به جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMCs)، عدم حذف فاکتورهای محلول پلاسما، امکان بررسی دقیق چندین سیتوکاین بطور همزمان، تعیین نوع و فنوتیپ سلول‌های پاسخگو در کمترین زمان در نمونه‌های کم (1ml) بیماران را فراهم می‌آورد.

منابع

1. Ferry B., Antrobus P., Huzicka I., Farrell A., Lane A., and Chapel H. Intracellular cytokine expression in whole blood preparation from normals and patients with atopic dermatitis. Clin Exp Immunol. 1997, 110:410-417.

2. Prussin C., and Metcalf D., Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. J. Immunol Methods. 1995, 188:117-128.

3. Asanuma.H., Sharp M., Maecker H.T., Maino, V.C. and Arvin A.M. 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.

4. Karanikas V., Lodding J., Maino V.C. and Mckenzie I.F. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines detects immune responses in MUCI immunotherapy. Clin. Cancer Res. 2000, 6:829-837.

5. Maino V.C. Rapid assessment of antigen induced cytokine expression in memory T cells by flow cytometry. Vet. Immunol. Immunopathol. 1998, 63:199-207.

6. Pasqual P, Adone R, Gasbarre LC, Pistoia C, and Ciuchini F. Mouse cytokine profiles associated with *Brucella abortus* RB51 vaccination or *B.abortus* 2308 infection. Infect Immun 2001; 69:6541-6544.

7. Zhan Y, Kelso A, and Cheers C. Differential activation of *Brucella*-reactive CD4+ T cells by Brucella infection or immunization with antigenic extracts. Infect Immun 1995; 63:969-975.

8. Scharf O, Aqranovich I, Lee K, Eller NL, Inman J, Scott DE, and Golding B. Ontology of Th1 memory responses against a *Brucella abortus* conjugate. Infect Immun 2001; 69:5417-5422.

9. Nomural L.E. Walker J. M. and Maecker H.T. Optimization of whole blood antigen–specific cytokine assays for CD4+ cells. Cytometry. 2000. 40: 60-68.

10. Huang LY, Krieg AM, Eller N, and Scott DE. Induction of regulation of Th1-inducing cytokines by bacteria DNA, Lipopolysaccharide, and heat-inactivated bacteria. Infect Immun 1999; 67:6257-6263.

11. Bromelow , K.V,. Hisrt W. mendes , R. L., winkley A.R, smith I.E. et al. Whole blood assay for assessment of the mixed lymphocyte reaction. J . Immunol Methods, 2001. 247: 1-8.

12. Kariminia A, Kavoossy G, Khatami S, Zowghi E, and 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.

13. Rodriguez-Zapata M, Alvarez-Mon M, Salmeron I, Prieto A, Manzano L, Salmeron OJ, and Carballido J. Diminished T lymphocyte proliferation response to polyclonal mitogens in acute brucellosis patients. Infection 1996; 24: 115-120

14. Baldwin C. L, and 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. Magnan AO, Mely LG, Camilla C, Badier MM, Montero-Julian FA, Guillot CM, Casano BB, Prato SJ, Fert V, Bongrand P, and Vervloet D. Assessment of the Th1/Th2 paradigm in whole blood in atopy and asthma: increased IFN-gamma producing CD8+ T cells in asthma. Am J Respir Crit Care Med 2000; 161:1790-1796.

16. Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X Schofield B, Neben TY, Karp KC, and Donaldson DD. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. Science 1998; 282:2258-2261.

17. Doyle A. G, Herbrin G, Montaner LJ, Minty A J, Caput D, Ferrara P, and Gordon S. Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages *in vitro*: comparison with interleukin-4 and interferon-gamma. Eur J Immunol 1994; 24:1441-1445.