اثر کمبود شدید پروتئین برروی پاسخهای خاطره‌ای سیستم ایمنی

(۱)زهراعلی نژاد زنجانی - (۲)دکتر ناهید محقق پور

خلاصه :

دراین بررسی کمبود شدید پروتئین درپاسخهای اولیه و ثانویه درموش مورد مطالعه قرارگرفته است . چهارگروه موش انتخاب شدند . گروههای یک ودو تحت رژیم کمبود شدید پروتئین (رژیم غذایی با۴ درصد کازئین) بودند و گروههای سه وچهار یاگروههای کنترل ازرژیم غذایی محتوی ۲۱ درصد کازئین بهره‌مند بودند . بیست و هشت روز پس ازشروع رژیم غذایی $10^8 \times 5$گلبول قرمز گوسفند ازطریق صفاقی به گروههای یک وسه تزریق شد . ۱۲ هفته بعد،تزریق مجدد به همان گروهها و همزمان باآن به موشهای گروههای دو وچهار نیز صورت گرفت .شش روز پس از تزریق حیوانات گروه‌های اول وسوم ازنظرپاسخ ایمنی ثانویه و حیوانات گروههای دوم و چهارم ازنظر پاسخ ایمنی اولیه باروشهای پلاک مستقیم وغیر مستقیم و هما گلوتیناسیون میکروتایتر مورد مطالعه قرارگرفتند .

نتایج حاصله نشان می دهدکه وسعت و شدت پاسخهای ایمنی درگروههای دچار به کمبود پروتئین به مراتب کمترازحیوانات هم سن خود درگروههای کنترل می باشد . پاسخهای ثانویه (خاطره‌ای) درموش های مبتلا به سوء تغذیه شدید ایجاد شده است ولی درمقایسه باحیوانات گروه کنترل ، کاهش معنی داری یافته است .

مقدمه :

شواهد بالینی و آزمایشگاهی نشان می دهدکه سوء تغذیه ازجمله کمبود پروتئین دررژیم غذایی برتوانایی دفاعی وسیستم‌ایمنی موجودزنده موثراست . دراغلب گزارشهاکاهش ایمنی سلولی و ایمنی هومورال‌ازنوع آنتی بادیهای مجاری‌ترشحی‌ارائه شده‌ولی مقادیر آنتی بادیهای‌های سیستمیک(گردشی)درموارد مختلف متفاوت است (۲).

درپاسخهای خاطره‌ای (ثانویه) ایمنی هومورال و سلولی وابسته به یکدیگرند و اختلال دراثر سوء تغذیه وابسته به پروتئین می‌تواند درجریان پاسخهای خاطره‌ای نقش مهمی داشته باشد . مطالعه درمورد این تاثیر بااینکه ازنظر کاربردی (ایمن سازی وواکسیناسیون) اهمیت زیادی دارد ولی محدود بوده است .

---

۱ - مربی ایمنی شناسی دانشگاه علوم پزشکی گیلان - دانشکده پزشکی - رشت

۲ - استادیارسابق دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

مواد و روش کار :

الف - دراین آزمایش‌ازموشهای نروماده نژاد A/JAX استفاده شده‌است . موش های نوزاد بیست و یک تا بیست و سه روز پس از دوران شیرخوارگی از مادر جداشدند وتحت دو نوع رژیم غذایی ، کمبود شدید پروتئین (۴درصد) و رژیم غذایی با پروتئین کافی (۲۱درصد)،قرارگرفتند . تفاوت رژیم های غذایی حیوانات تنها درمیزان پروتئین آنهابوده است . ماده پروتئینی مورد استفاده کازئین می‌باشد . به موشهای گروههای مختلف غذابه اندازه کافی داده می‌شد (ad libitum).موش های نروماده درقفسهای جداگانه نگهداری شدند . استفاده ازروش Mitchell(1)بیست وهشت روز پس ازشروع رژیم غذایی باتزریق آنتی ژن سیستم ایمنی حیوانات مورد بررسی قرارگرفت .

ب - آنتی ژن : برای ایمن سازی ازگلبول قرمز گوسفند استفاده شد . خون گوسفند درمحلول ضد انعقادی آلسیور(Alsever)جمع آوری شد وقبل ازتزریق سه بار باسرم فیزیولوژی شسته و سوسپانسیون ده درصد تهیه شد و برای ثابت بودن غلظت آنتی ژن درتزریقات مختلف ، دانسیته نوری یک میلی لیترازسوسپانسیون یک درصد آن راباچهار میلی لیتر آب مقطر درطول موج ۵۴۰ میلی میکرون دردستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری نمودیم . دانسیته نوری گلبولهای قرمز گوسفند درتمام آزمایشات در ۴۹٪ تنظیم گردید .

به هرموش درهرتزریق ۰/۲۵میلی لیتراز سوسپانسیون ده درصد (۵×۱۰^{۸}) گلبول قرمز گوسفند ازراه صفاقی تزریق شد.

ج - روش ها :

۱ - تهیه سرم وسلول جهت آزمایشات :خون حیوان ازطریق ورید چشمی گرفته شد وبرای تهیه سوسپانسیون سلولی پس ازکشتن حیوان ، طحال راخارج کرده و پس ازطی مراحل خرد کردن ، صاف کردن و شستشو، سوسپانسیون سلولی باغلظت مناسب تهیه شد .

۲ - روش تعیین تعداد سلولهای سازنده آنتی بادی: برای شمارش سلولهای سازنده آنتی بادی ازروش‌تشکیل پلاک plaque forming cells(PFCs)استفاده شد.دراین روش سلولهای لنفوئیدی طحالی ، گلبولهای قرمز گوسفند و کمپلمان خوکچه هندی درمجاورت یکدیگر قرارمی‌گیرند . به این ترتیب سلولهای سازنده IgMتعیین وشمارش می‌شوند (پلاک مستقیم).برای شمارش سلولهای سازنده IgGآنتی بادی ضد IgGموش نیز اضافه می‌گردد(پلاک غیر مستقیم) . تعداد پلاک غیر مستقیم نماینده تعداد پلاک تام است و محاسبه تعداد پلاک IgGازطریق کم کردن تعدادپلاک مستقیم IgMازتعداد پلاک غیر مستقیم (پلاک تام) صورت می‌گیرد . برای هرنمونه تعداد سلولهای سازنده IgMوIgGدریک میلیون سلول طحالی تعیین گردید .

۳ - روش سنجش آنتی بادی،آزمایش هماگلوتیناسیون به روش میکروتایتر مورد استفاده قرارگرفت . سرم حیوان بارّقت های بالارونده درمجاورت سوسپانسیون ۰/۵ درصد گلبولهای سرخ گوسفند قرارگرفت . آخرین رقتی که هماگلوتیناسیون مشخص دارد تعیین کننده تیتر آنتی بادی IgMاست. برای سنجش مقدار IgGاز ۲- مرکاپتواتانول (2-ME)استفاده شد.

نتایج :

هرگروه‌از حیوانات شامل ۵۰ تا ۵۵ موش بودند و نتایج باروش آماری Student's,T-testمورد مقایسه‌قرارگرفتند.مقایسه تعداد پلاک های سازنده IgGو تیتر آنتی بادی ازکلاس IgG پس ازدوبار تزریق آنتی ژن نشان می دهدکه پاسخ ثانویه (خاطره‌ای) درهردوگروه موشهای سالم ومبتلا به کمبود پروتئین بوجود آمده است ،زیرا تعداد پلاک های سازنده IgGپس ازدومین تزریق درهرگروه افزایش یافته است : ۶۰۳ پلاک درمقایسه

با ۱۰۳۹ پلاک درگروه مبتلابه کمبود پروتئین ($P<0.005$) و۸۶۷ پلاک درمقایسه با ۱۳۸۹ پلاک درگروه کنترل ($P<0.001$) (جدول‌شماره‌یک).

مقایسه تعدادپلاک سازنده IgG دردوگروه مبتلا به کمبود پروتئین و گروه کنترل درپاسخ اولیه معنی داراست : ۶۰۳ پلاک درمقایسه با ۸۶۷ پلاک ($P<0.001$)و به همین ترتیب تعداد پلاک سازنده IgG دردو گروه درپاسخ ثانویه معنی داراست : ۱۰۳۹ پلاک درمقایسه با ۱۳۸۹ پلاک ($P<0.025$)(جدول‌شماره یک).

جدول شماره‌یک:اثرکمبودشدید پروتئین درتعدادسلول های تشکیل دهنده‌پلاک دریک میلیون سلول طحالی

رژیم غذایی (درصد پروتئین)	ایمنی اولیه		ایمنی ثانویه	
	پلاک مستقیم(IgM)	پلاک IgG	پلاک مستقیم(IgM)	پلاک IgG
۴ درصد	۱۵۴±۳۳	۶۰۳±۸۸*	۷۲±۱۱	۱۰۳۹±۱۸۰**
۲۱درصد	۲۰۲±۹۰	۸۶۷±۶۹*	۸۰±۲۹	۱۳۸۹±۳۴۶**

* $P<0.001$ تفاوت آماری‌پلاک IgG درایمنی اولیه دوگروه ۴ درصدو۲۱ درصد پروتئین

** $P<0.025$ تفاوت آماری پلاک IgG درایمنی ثانویه دوگروه ۴ درصدو۲۱ درصد پروتئین

لگاریتم تیتر آنتی بادی ازکلاس IgGدرگروه مبتلا به کمبود پروتئین - کالری درپاسخ اولیه و ثانویه به ترتیب ۵/۸ و ۹/۶ ($P<0.005$) ودرگروه کنترل نیز اختلاف لگاریتم تیتر آنتی بادی از ۷/۱ به ۱۱/۳ ($P<0.005$)معنی داراست که نشان دهنده بوجودآمدن خاطره ایمنی درهردوگروه می‌باشد . مقایسه لگاریتم تیتر آنتی بادی از کلاس IgG دردوگروه مبتلا به‌کمبود پروتئین و گروه‌کنترل درپاسخ اولیه وثانویه ازنظرآماری معنی داراست : ۵/۸ درمقایسه با ۷/۱ ($P<0.05$) و ۹/۶ درمقایسه با ۱۱/۳ ($P<0.05$) (جدول شماره دو).

نتایج حاصله نموداری ازایجاد خاطره ایمنی درگروه دچار به کمبود شدید پروتئینی می باشد ولی شدت پاسخ خاطره‌ای به مراتب کمتراز حیوانات هم سن درگروه شاهد است .

جدول شماره دو : اثر کمبودشدید پروتئین برتیترآنتی بادی (log2)

رژیم غذایی (درصد پروتئین)	ایمنی اولیه		ایمنی ثانویه	
	IgM	IgG	(IgM)	IgG
۴ درصد	۷/۸±۰/۵	۵/۸±۱*	۱۰/۷±۱	۹/۶±۱/۲**
۲۱درصد	۸±۰/۹	۷/۱±۰/۸*	۱۱/۵±۰/۸	۱۱/۳±۰/۷**

* $P<0.05$تفاوت آماری‌تیترآنتی بادی IgG درایمنی اولیه دوگروه ۴ درصدو۲۱ درصد پروتئین

** $P<0.05$تفاوت آماری‌تیتر آنتی بادی IgG درایمنی ثانویه دوگروه ۴ درصدو۲۱ درصد پروتئین

بحث :

توانایی سلول های سیستم ایمنی پس از برخورد مجددبایک ماده آنتی ژنی برای پاسخگویی به همان آنتی ژن افزایش می‌یابد . این افزایش تحریک پذیری وپاسخگویی به سلولهای خاطره (Memory cells)نسبت داده می‌شود . برای ایجاد پاسخ ایمنی اولیه وثانویه (پاسخ خاطره‌ای) دربرابر آنتی ژن های وابسته به تیموس ، وجود لنفوسیت های($CD4^+T$اهمیت زیادی دارد .مطالعات اخیر سلولهای خاطره ایمنی راسلولهای فعال شده باماركر) $CD45RO^+$ معرفی می‌کند (۲).

کمبود پروتئین دررژیم غذایی به سیستم ایمنی سلولی آسیب بیشتری می‌زند (۲و۳) که می‌تواند بر پاسخ آنتی بادی (ایمنی هومورال) نسبت به آنتی ژنهای وابسته به تیموس نیز اثر بگذارد .زیراسایتوکاین هادرتولید آنتی بادی از کلاس IgG دخالت دارند . بنابراین مقدار IgM ممکنست تغییری نیابد ولی درتبدیل سلولهای سازنده IgMبه سلولهای سازنده IgG(isotype Switching) می تواندداختلال مشاهده گردد.

گزارشات متفاوتی درمورد تأثیر کمبود پروتئین برسیستم ایمنی هومورال وجود دارد،این گزارشات ازکاهش تاافزایش آنتی بادیهای گردشی دسته بندی شده است (۴) . دلایل مختلف مانند نوع آنتی ژن ، مقدار آن وطریقه ایمن سازی، شدت سوء تغذیه ، نژاد حیوان ، وجود عفونت ، کاهش انتخابی ایمونوساپرسورها ویاافزایش هورمون های تیموسی و غیره آورده شده است .

تاثیر سوء تغذیه پروتئینی درا یمنی ثانویه همانند ایمنی اولیه است (۳). یعنی کاهش ایمنی سلولی و کاهش آنتی بادیهای مجاری ترشحی (۵ و۶و۷) و متفاوت بودن گزارشات درمورد آنتی بادیهای سیستمیک (گردشی) گزارش شده است .

دراین بررسی که حیوانات چهارماه تحت رژیم غذایی باکمبود شدید پروتئین قرارداشتند . تعداد سلولهای سازنده IgMوتیتر آن درپاسخ اولیه وثانویه همانند گروه شاهد است ولی درمورد تعدادسلولهای سازنده IgGوتیتر آن تفاوت معنی داری مشاهده می‌گردد. کاهش پاسخهای ثانویه دراثر کمبود پروتئین - کالری توسط سایر محققین نیز گزارش شده است (۵ و ۸ و ۹) .

این یافته هانشان می دهدکه وجودپروتئین دررژیم غذایی درسیستم ایمنی بویژه ایمنی سلولی اهمیت دارد و کمبود پروتئین علاوه براینکه باعث آتروفی بافت های لنفوئیدی می‌شود ممکنست برتولید سایتوکاین ها ویاهورمون های مختلف که درفعالیت سیستم ایمنی نقش مستقیم دارند موثر باشد .

کاهش فعالیت سلولهای Bویاسلولهای T بطور جداگانه ویادرمرحله همکاری بدلیل تأثیر عمل سایتوکاین ها و یاهورمون ها می‌تواند دلیل کاهش جمعیت سلولهای خاطره ایمنی و عملکرد آنها باشد .

باوجود اختلال ایمونولوژیکی که درپی سوء تغذیه پروتئینی دراغلب شرایط مشاهده می گردد،مساله واکسیناسیون همچنان تأکید می‌گردد.درگزارشات مختلف بااستفاده ازآنتی ژنهای مختلف و انتخاب آجوان های مناسب،تولید پاسخ آنتی بادی درکودکان مبتلا به سوء تغذیه پروتئینی قابل اجراست (۸) ویااستفاده از تزریقات مکرر برای افزایش تیتر آنتی بادی در حیوانات (۷) آمده است . واکسیناسیون درحیوانات دچار سوء تغذیه پروتئینی با وجود تیتر پائین تر آنتی بادی موجب زنده ماندن آنهاشده است درحالیکه حیوانات مشابه که واکسینه نشده بودند مردند (۹). بنابراین انجام واکسیناسیون دراغلب موارد تأیید می‌گردد.

باآنالیز زیرگروههای سلولهای $CD4^+$ Tازنظر تعدادوعمل توجه به سایتوکاین هاو هورمون های موثر درایجاد پاسخهای خاطره‌ای درمدل های دچار به سوء تغذیه پروتئینی ، می‌توان دیدگاه جدیدی برای ادامه تحقیق دراین زمینه راداشت .

REFERENCES:

1-Mitchell,G.F. et al .Immunological Memory in Mice .J.Exp.Med .135:165,1972.

2-Roitt,I.Essential Immunology ,8th Ed ,Blackwell Scinetific publication, P 190, 1994.

3-Chandra R.K.Nutrition and Immunity, Am.J.clin.Nutr;53:1087 -101,1991.

4-Steihm ,ER.Humoral Immunity in malnutrition, Fed .Proc 39:3093-7,1980.

5-Sullivan ,DA.Vaerman ,JP .Soo,C.Influence of sever protein malnutrition on rat lacrimal ,salivary and gastrointestinal immune expression during development ,adulthood and ageing. Immunology Feb;78(2) :308-17,1993.

6-Mc Gee ,DW.MC Murray ,DN.The effect of protein malnutrition on the IgA Immune response in Mice .Immunology 63:25,1988.

7 - Flo ,J.Massouh,EJ.Roux,ME.long term effect of malnutrition during lactation on GALT,Reg .Immunol ,Mar -Apr;5(2):100-5,1993.

8- Dao,H.Delisle ,H.Fournier P. Anthropometric Status ,serum prealbumin level and immune response to measles Vaccination in Mali children .J.Trop.Pediatr Aug;38(4):179-84,1992.

9-Payne ,CJ.Scott,TR .Dick ,JW .Gliek ,B . Immunity to pasteurella multocida in protein deficient chickens,poult .Sci Dec;69 (12):2134 -42,1990.

Influence of Severe Protien Deficiency on Immunological Memory Responses in Mice:

Ali-Nezhad Zanjani Z.,MS

Mohaghgheghpoor N.,MD

ABSTRACT:

The effect of protein deficiency on the immune response upon primary and secondary stimulation with 5×10^8 sheep red blood cells (SRBC) was studied in 4 groups of mice fed by diets containing 4 or 21 percent of protein.Primary and secondary immune response were assessed by quantification of direct and indirect plaque forming cells (PFC) in immune spleens and by titration of serum hemagglutinins.

Dietary protein restriction did not inhibit the capacity of these mice to elicit memory response to SRBC ,but in contrast with control groups it markedly showed decrease of IgG response in protein deficient mice during both primary and Secondary response.

Some mechanisms which may explain the differences are the effect of protein restriction on the switching IgM producing cells to IgG and effect on B cells and T cells or Cooperating in the immune response and regulatory function.