

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 سیتوکاین‌های داخل سلولی ابزار مهمی در بررسی پاسخ‌های ایمنی در مقابل محرک‌هایی نظیر عوامل بیماری‌زا، واکنش‌ها و سایر چالش‌های ایمنی می‌باشد. مطالعات انجام شده در موش نشان می‌دهد آلودگی به بروسلوز 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 $38/03 \pm 18/2$ سال) و ۲۲ داوطلب سالم (با میانگین سنی $35/33 \pm 21$ سال) در حضور میتوزن، باکتری‌های کشته شده بروسلای 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 ساندریجی 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 می‌یابد. وجود ارتباط معکوس بین درصد سلول‌های CD3⁺ تولید کننده IFN- γ با سلول‌های 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 IL-13⁺ CD3⁺ 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 بروسلای باشد که به طولانی شدن سیر بیماری در این گروه از بیماران می‌انجامد.

کلید واژه‌ها: اینترفرون‌ها / اینترلوکین‌ها / تب مالت / فلوسیتومتری

مقدمه

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

گونه‌های بروسلای باکتری‌های داخل سلولی اختیاری گرم منفی هستند که بیماری شدید در انسان و حیوان بوجود می‌آورند. بروسلایا اغلب به دستگاه رتیکولوآندوتلیال دست‌اندازی می‌کنند و استقرار ماکروفاژهای آلوده در

نحوه مقاومت میزبان در برابر بروسلا عمدتاً در موش‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است. بر اساس این مطالعه‌ها سیتوکاین‌ها هدایتگر سیستم ایمنی هستند و سرنواشت بیماری را تعیین می‌کنند (۸ و ۷). انترفرون گاما (γ -IFN) با فعال کردن ماکروفاژها برای تولید اکسید نیتریک (NO) (۹)، مقاومت در برابر بروسلوز را تقویت می‌کند (۱۰).

انترلوکین ۱۳ مانند انترلوکین ۴ ترشح γ -N را توسط سلول‌های $CD4^+$ 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 γ -IFN و IL-13 مورد مطالعه قرار گرفته است. برای ارزیابی بهتر پاسخ‌های طبیعی و تعامل سلولی در برابر باکتری بروسلا و بررسی آزمایشگاهی سیتوکاین‌ها از کشت خون کامل استفاده شد.

مواد و روش‌ها

مواد: پادتن‌های اختصاصی برای CD3 انسانی (IgG موشی، کونژوگه با CYQ)، γ -IFN 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 الیزا برای اینترفرون گاما و اینترفرون 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 $38/03 \pm 18/2$ 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،

دخالته 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 آنتی‌ژن‌های 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 توان فرسا 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 اندک سلول‌های تحریک شده قابل شناسایی خواهد بود (۳).

تولید و اندازه گیری γ -IFN و IL-13: نمونه‌های خون کامل رقیق شده در حضور یا بدون فیتوهمگلوتینین (2/5 PHA), mg/ml (سیگما، سدگس، فرانسه) یا باکتری‌های

کشته شده بروسلا ملی تنسیس سویه Rev-1 (FU/ml) 1×10^7 CFU/ml) در پلیت های ۲۴ چاهگی کشت داده‌شده در اتمسفر حاوی CO_2 ۵٪ در دمای $37^\circ C$ به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شد. سپس سوپ هر کدام از چاهک‌ها جمع‌آوری و در فریزر $-70^\circ C$ تا زمان آزمایش نگهداری شد. سیتوکاین‌های γ -IFN 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 تقریباً 10 pg/ml است.

شناسایی داخل سلولی سیتوکاین‌ها: ۱-آماده‌سازی سلولی و تحریک آنتی ژنی: نمونه‌های خون کامل رقیق شده در حضور یا بدون باکتری‌های کشته شده *B. melitensis* سویه Rev-1) در پلیت‌های ۹۶ چاهگی ته‌صاف در دمای $37^\circ C$ و اتمسفر حاوی CO_2 ۵٪ کشت داده شد. ۱۸ ساعت بعد، سلول‌ها به لوله‌های پلی‌اتیلنی ۱۵ ml فالكون منتقل شدند. برطبق دستورالعمل شرکت سازنده با افزودن فربل ۱۲- میریستات ۱۳-استات (PMA) و اینومایسین (I) در حضور منزین به مدت ۵ ساعت آنها را دوباره تحریک کردند.

بعد از اتمام انکوباسیون، $1100 \mu\text{L/m}$ از محلول ($20 \text{ m}\mu$)، EDTA به هر لوله اضافه شد و نمونه‌ها 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) ۲۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق لیز و ۱۰ دقیقه در 500 g سانتریفوژ کرده، مایع رویی را دور ریختند. سلول‌های باقیمانده بعد از دو مرحله شستشو با محلول شستشوی FACS (محلول PBS حاوی ۱٪ FCS و ۰.۱٪ NaN₃)، در غلظت 1×10^6 سلول در هر میلی لیتر تنظیم شد.

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 بر این 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 $21 \pm 35/33$ 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 و یافته‌های آزمایشگاهی 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 ضدبروسلائی 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 شده بود، 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 ۴ ساعت بعد از نمونه‌گیری مورد آزمایش قرار گرفتند.

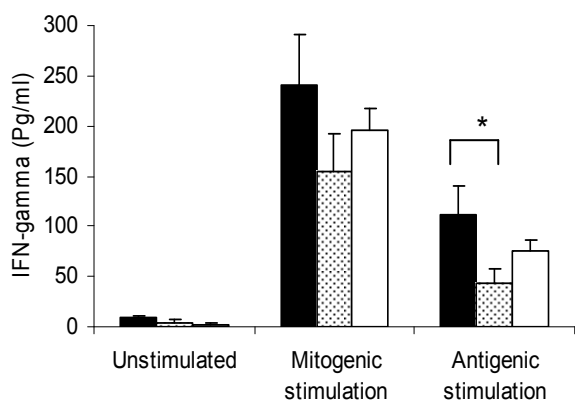
کشت خون کامل: هر نمونه خون با افزودن محیط کشت سلولی کامل RPMI 1640 حاوی ۳٪ سرم غیر فعال شده گوساله نوزاد (FCS) (سیگما، سدگس، فرانسه)، 2 mM -L گلوتامین (سیگما، Cedex، فرانسه)، 100 IU/ml پنی‌سیلین و $100 \mu\text{g/ml}$ استرپتومایسین (سیگما، سدگس، فرانسه) پنج برابر رقیق شد. سپس نمونه‌های خون کامل رقیق شده در پلیت‌های کشت سلولی ۹۶ چاهگی ته‌صاف 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 $37^\circ C$ کشت داده شدند.

بین کل سلول‌های $CD3^+$ با هیستوگرام طرح نقطه‌ای (dot plat) نمایش داده شد.

آنالیز آماری: داده‌ها به صورت میانگین \pm 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 $P < 0.05$ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد. برای آنالیز داده‌ها از نرم افزار SPSS استفاده شد.

نتایج

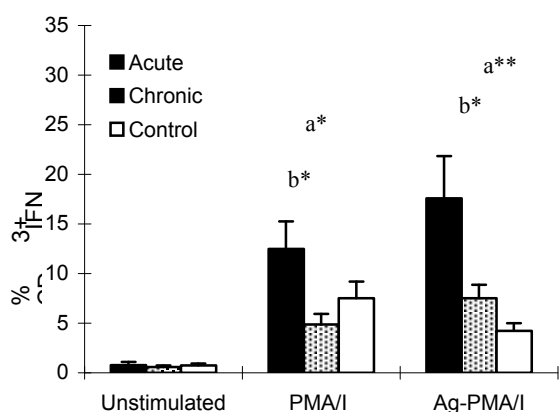
تنظیم کاهشی تولید اینترفرون گاما ($IFN-\gamma$) در بیماران مبتلا به بروسلوز مزمن: همانطور که در نمودار یک دیده می‌شود PHA، موجب القای سطح بالایی از $IFN-\gamma$ در تمام گروه‌ها می‌شود. افراد شاهد سالم به آنتی‌ژن پاسخ دادند و میانگین میزان $IFN-\gamma$ در آنها $60/91 \pm 10/43$ pg/ml بود. تولید $IFN-\gamma$ در بیماران مبتلا به بروسلوز حاد افزایش قابل توجهی نسبت به گروه بروسلوز مزمن داشت ($P < 0.05$). به طوری که میانگین تولید $IFN-\gamma$ در گروه اول (حاد) نسبت به گروه دوم (مزمن) به ترتیب $125/71 \pm 28/42$ pg/ml و $45/69 \pm 13/46$ pg/ml بود. میزان تولید IL-13 در هر سه گروه به اندازه‌ای ناچیز بود که در حد شناسایی کیت مورد استفاده عملاً اختلافی بین گروه‌ها مشاهده نشد.



۲- رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس: نمونه‌ها در لوله‌های پلی‌استیرنی 12×75 mm (فالكون شماره ۲۰۵۲) به مقدار $200 \mu L$ به لوله مربوطه منتقل شده و به هر لوله $10 \mu L$ آنتی بادی مونوکلونال ضد $CD3$ انسانی کونژوگه با CYQ اضافه شده، به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی و دمای $4^\circ C$ انکوبه شد. پس از دوبار شستشو با محلول شستشوی FACS، سلول‌ها با افزودن محلول پارافارمولوئید 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 نفوذ پذیر شد. آنگاه با افزودن آنتی‌بادتن‌های کونژوگه مونوکلونال FITC- $IFN-\gamma$ یا PE-IL-13 و ۲۰ دقیقه انکوباسیون در تاریکی و دمای $4^\circ C$ ، سیتوکاین‌های داخل سلولی رنگ‌آمیزی شد. سرانجام پس از شستشو، سلول‌ها را در $500 \mu L$ از محلول PBS، به صورت سوپاسپانسیون درآورده و با دستگاه فلوسیتومتری FACScan و نرم افزار lysis II (بکتون- دیکنسون، سانخوزه، کالیفرنیا) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

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

۳- طرح‌بندی فلوسیتومتری و تجزیه و تحلیل داده‌ها: پس از شناسایی موقعیت لئوسیت‌ها 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 جمع‌آوری شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار lysis II تجزیه و تحلیل شد و به صورت درصد سلول‌های بیان کننده سیتوکاین در



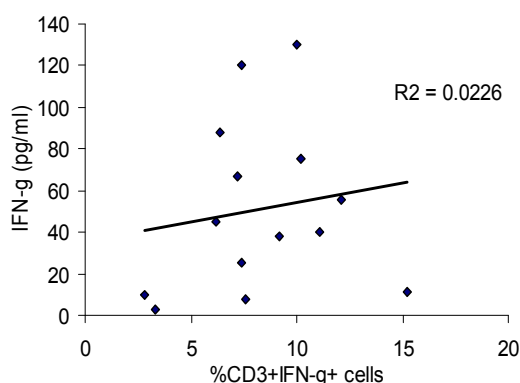
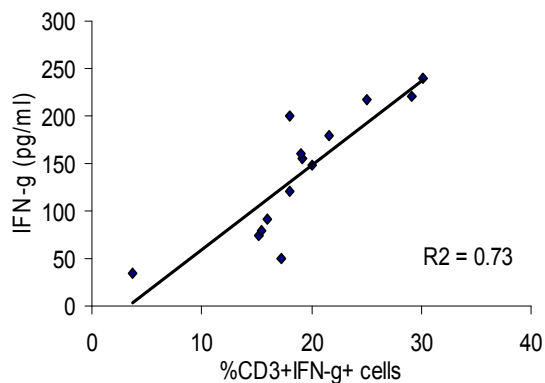
نمودار ۱: تولید IFN- γ توسط سلول‌های خون کامل افراد سالم و بیماران مبتلا به بروسلوز حاد یا مزمن. سلول‌های خون در حضور یا عدم حضور PHA یا باکتری‌های کشته بروسلا ملی تنسیس سویه Rev1 به مدت ۷۲h کشت داده شد. میزان سیتوکاین‌ها در سوپ کشت سلولی با ELISA ساندویچی اندازه‌گیری شد. نتایج بصورت میانگین \pm SEM نشان داده شده است. ستاره‌ها اختلاف معنی‌دار آماری را بین گروه‌های مزمن با گروه حاد با $P < 0.05$ نشان می‌دهد.

نمودار ۲: میزان بیان داخل سلولی IFN- γ رادرسول‌های $CD3^+$ T بیماران مبتلا به بروسلوز حاد یا مزمن و یا افراد سالم نشان می‌دهد. نمونه‌های خون کامل رقیق شده پس از تحریک یا عدم تحریک اولیه باکتری‌های کشته (۱۸ ساعت)، بمدت ۵ ساعت توسط PMA/I در حضور یا عدم حضور مننزین (monensin) دوباره تحریک شدند. رنگ آمیزی سطحی برای مولکول $CD3$ و IFN- γ داخل سلولی انجام شده است. داده‌ها، میانگین درصد سلول‌های دوگانه مثبت $[CD3^+ IFN-\gamma^+]$ را نشان می‌دهند. ستاره‌ها اختلاف معنی‌دار را به ترتیب بین تحریک آنتی ژنی و غیر اختصاصی در گروه حاد در مقایسه با گروه مزمن [b^*] ($P < 0.05$) و افراد شاهد ($P < 0.001$ و $P < 0.05$) را نشان می‌دهند.

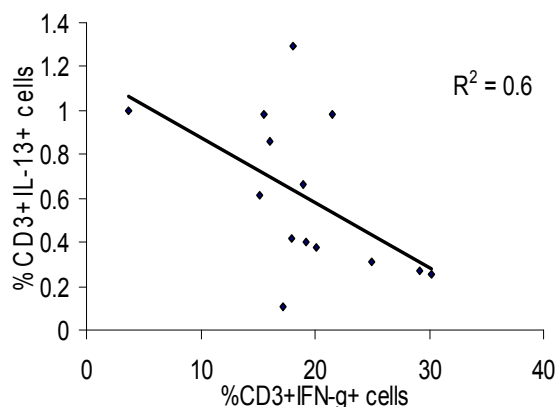
ارزیابی بیان IFN- γ در سلول‌های $CD3^+$: برای شناسایی سیتوکاین‌های داخل سلولی، ابتدا سلول‌ها در حضور یا بدون حضور آنتی‌ژن‌های اختصاصی بروسلا به مدت ۱۸ ساعت تحریک شدند. سپس برای افزودن سیگنال‌های سیتوکاینی سلول‌های تحریک شده، با اضافه کردن محرک‌های PMA و اینومایسین (PMA/I) دوباره آنها را تحریک کردند. در هر گروه هنگامی که 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، افزایش 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 کرده بودند، کمتر بود. نتایج سلول‌هایی که تنها با آنتی‌ژن تحریک شده بودند به علت ناچیز بودن سیگنال سیتوکاینی نشان داده نشده است.

ارزیابی بیان IL-13 در سلول‌های $CD3^+$: در تمام گروه‌ها بروز داخل سلولی IL-13 در حضور تحریک PMA/I تنها در حد 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 0.178 ± 0.048 ، 0.20 ± 0.067 و 0.32 ± 0.085) (نمودار ۳). از نظر آماری این اختلاف‌ها تنها بین دو گروه بیمار معنی‌دار است ($P < 0.05$). 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 می‌دهد.

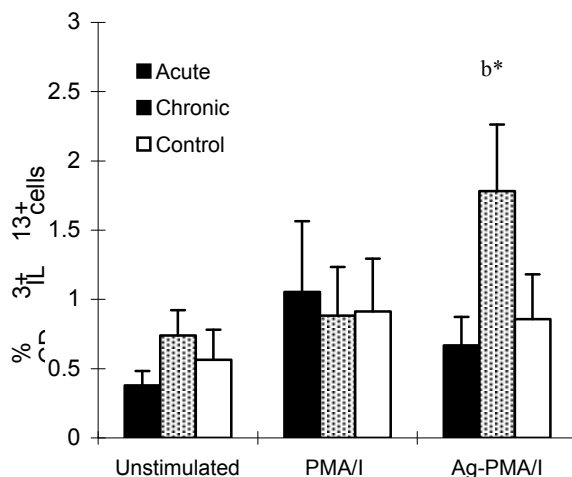
همانطور که در نمودار ۲ دیده می‌شود درصد سلول‌های $CD3^+$ تولید کننده IFN- γ در افراد مبتلا به بروسلوز مزمن به طور معنی‌دار کمتر از بیماران دچار بروسلوز حاد است (به ترتیب $1/4 \pm 7/5$ در مقابل $4/2 \pm 17/6$ ، $P < 0.05$). گروه کنترل تفاوت معنی‌داری با گروه مبتلا به بروسلوز حاد نشان داد ($P < 0.001$).



شکل ۲: ارتباط تولید $IFN-\gamma$ در سوپ کشت سلولهای خون کامل را با درصد سلولهای $CD3^+ IFN-\gamma^+$ در گروه حاد (نمودار بالا) یا مزمن (نمودار پایین) نشان می دهد. تنها در گروه حاد یک ارتباط مستقیم دیده می شود ($r=0.82$ و $P=0.0018$).



شکل ۳: ارتباط درصد سلولهای $CD3^+ IFN-\gamma^+$ با سلولهای $CD3^+ IL-13^+$ بیماران مبتلا به بروسلوز حاد. تنها در گروه حاد بین سلولهای $CD3^+$ تولیدکننده $IFN-\gamma$ و $IL-13$ ارتباط معکوس وجود دارد ($r=-0.78$ و $P<0.05$).



نمودار ۳: میزان بیان داخل سلولی $IL-13$ 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 با کتری های کشته (۱۸ ساعت)، به مدت ۵ ساعت توسط PMA/I در حضور یا عدم حضور مننژین دوباره تحریک شدند. رنگ آمیزی سطحی برای مولکول $CD3$ و $IL-13$ داخل سلولی انجام گردید. داده ها، میانگین درصد سلولهای دوگانه مثبت ($CD3^+ IL-13^+$) را نشان می دهند. علامت ستاره بیانگر اختلاف معنی دار بین گروه مبتلا به بروسلوز حاد با گروه مزمن در تحریک اختصاصی می باشد ($P<0.05$).

ارتباط تولید سیتوکاین ها با اشکال بالینی بیمار: همانطور که شکل ۲A نشان می دهد بین درصد سلولهای $CD3^+$ تولید کننده $IFN-\gamma$ و تولید این سیتوکاین در مایع رویی کشت سلولی بیماران مبتلا به بروسلوز حاد ارتباط مستقیم و مشخص وجود داشت ($P=0.0018$ ، $r=0.8$) با این وجود، این همبستگی در مورد بروسلوز مزمن صادق نبود (شکل ۲B). همچنین در مبتلایان به شکل حاد بیماری ارتباط معکوس بین میزان بیان $IFN-\gamma$ و $IL-13$ داخل سلولی دیده شد (شکل ۳). این همبستگی در گروه مزمن وجود نداشت.

بحث و نتیجه گیری

سلول های $CD4^+T$ میانجی های ایمنی سلولی هستند که سیستم ایمنی را از دو راه تنظیم می کنند سلول های $Th1$ باعث پیشبرد پاسخ های سلول های T سیتوتوکسیک و پاسخ های حساسیت شدید تاخیری می شوند (۱۳). در صورتی که سلول های $Th2$ پاسخ های آلرژیک و ضد التهابی را هدایت می کنند و به برخی از پاسخ های سلول های B کمک می کنند (۱۴). تکامل یک پاسخ ایمنی مناسب موجود زنده را در برابر عوامل بیماریزا می تواند حفاظت کند، در صورتی که پاسخ های نامناسب وضعیت موجود را وخیم تر (نظیر واکنش های خود ایمنی) یا امکان بقا و انتشار عوامل بیماریزا را فراهم می کند (۱۵).

امروزه ارزیابی بیان سیتوکاین ها تبدیل به ابزار با ارزشی برای شناخت وضعیت ایمنی سلولی شده است (۱۶). گرایش زیاد به تعیین نقش این مولکول های مهم در شرایط مختلف بالینی و تحقیقاتی، انگیزه یافتن روش های جدید برای بررسی تولید سیتوکاین ها در نمونه های بالینی شده است (۱۷). در این 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. علاوه بر این، برای ارزیابی پاسخ های 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 می شود. چون ممکن است فعال کردن سلول ها با PMA بروز سطحی برخی از مولکول های نظیر $CD4$ و $CD56$ را با تغییر کاهشی مواجه کند، (۱۸). در این مطالعه درصد سلول های $CD3^+$ بارز کننده $IFN-\gamma$ یا $IL-13$ ارائه شده است.

علاوه بر این از باکتری های کشته شده بروسلا ملی تنسیس به عنوان آنتی ژن استفاده شد، چون قبلا نشان داده شده است که لیپوپلی ساکارید (LPS) استخراج شده از این ارگانسیم ها توانایی ایجاد $IFN-\gamma$ و $IL-12$ را در

انسان دارند (۴ و ۱۸). تولید اختصاصی $IFN-\gamma$ به طور معنی داری در تمام گروه ها از جمله گروه شاهد، در مقایسه با کشت های بدون آنتی ژن، افزایش نشان داد. با این حال تولید $IFN-\gamma$ تنها در گروه مبتلا به بروسلوز حاد، به طور معنی دار از گروه شاهد و گروه مبتلا به بروسلوز مزمن بیشتر بوده است. تولید اختصاصی این سیتوکاین در افراد سالم مشابه یافته مطالعه های قبلی ما و دیگر گزارش ها نیست که بیانگر القای تولید سیتوکاین های $Th1$ ، نظیر $IFN-\gamma$ توسط باکتری های کشته شده بروسلا هستند، (۲۰-۱۹). همانطور که در نمودار ۱ مشاهده می شود از نظر تولید غیر اختصاصی $IFN-\gamma$ (تحریک با میتوژن) در تمامی گروه ها اختلاف معنی دار بدست نیامد. این یافته ها با گزارش نشان دهنده کاهش پاسخ میتوژنی سلول های T و تولید غیر اختصاصی $IFN-\gamma$ در مرحله حاد بیماری و رسیدن آن به حد طبیعی پس از درمان آنتی بیوتیکی (۲۱) تفاوت داشت. این اختلاف می تواند ناشی از این باشد که بیماران ما عموماً تحت درمان آنتی بیوتیک بودند. در گروه مزمن پاسخ به آنتی ژن های اختصاصی نسبت به گروه حاد کاهش داشت ولی در مقایسه با گروه شاهد، تفاوت معنی دار نبود. در حالی که چنین اختلافی بین بیماران مزمن و حاد در تحریک غیر اختصاصی (با میتوژن) وجود نداشت. این یافته مشابه مطالعه هایست که نشان داده اند تولید $IFN-\gamma$ و پاسخ های بلاستوژنیک در دوره مزمن بیماری نسبت به مرحله حاد کاهش می یابد (۲۲ و ۲۷).

همانطور که در نمودار ۲ دیده می شود، افراد سالم در برابر آنتی ژن های اختصاصی پاسخ نمی دهند به طوری که در صد سلول های $CD3^+$ تولید کننده $IFN-\gamma$ بیمار شده با $g+PMA/I$ در مقایسه با سلول هایی که تنها با PMA تحریک شده اند، در روش فلوسیتومتری تفاوت معنی دار ندارد، در حالی که با روش الیزا این تفاوت معنی دار است. این یافته دقت روش CFC را در برابر روش های متداول نظیر ELISA نشان می دهد. به طوری که در روش CFC تنها سلول های $CD3^+$ ارزیابی می شوند. از

طرف دیگر در شرایط کشت در روش CFC تحریک آنتی ژنی کوتاه مدت (۱۸ ساعت) باعث می شود تا تنها سلول های خاطره که قبلا با آنتی ژن های بروسلا تحریک شده بودند (priming) با تحریک اختصاصی مجدد، فعال شوند.

یافته های مشابه بیانگر کاهش تولید IFN- γ در پاسخ به آنتی ژن های 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 می دهد که در این بیماران نه تنها سلول های تولید کننده IFN- γ افزایش پیدا می کنند، بلکه تعداد مولکول های آن نیز در هر سلول افزایش چشمگیر نشان می دهد. در حالی که کاهش تعداد سلول های تولید کننده IFN- γ در گروه مزمن می تواند ناشی از القای آپوپتوز توسط ارگانسیم باشد.

انترلوکین ۱۳ به علت اثر ضد التهابی قوی و کاستن عملکرد ماکروفاژها نظیر کاهش تولید IL-12، کاهش تولید آنزیم اکسیدانتریک سنتتاز القایی و نیز افزایش تولید IL-10، (۲۴-۲۵) در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. چون تشخیص تولید این سیتوکاین با روش الیزا دشوار بود (داده ها نشان داده نشده است)، درصد سلول های CD3⁺ تولید کننده IL-13 اختصاصی آنتی ژن تعیین شد. تعداد سلول های دوگانه مثبت (IL-13⁺CD3⁺) تنها در گروه مزمن افزایش چشمگیر داشت در حالی که در گروه حاد و گروه شاهد این اختلاف معنی دار نبود. اگرچه، یافته های ما حاکی از وجود ارتباط معکوس بین درصد سلول های CD3⁺ تولید کننده IFN- γ و سلول های 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 سلول های CD3⁺T به سمت Th1 گرایش

منابع

می یابد. به طوری که درصد سلول های CD3⁺ تولید کننده IFN- γ افزایش می یابد و درصد سلول های CD3⁺ تولید کننده IL-13 (سلول های Th2) نیز کاهش پیدا می کند. در نوع مزمن بیماری، هماهنگی و ارتباط تولید سیتوکاین های Th2 با پیشرفت بیماری در جهت مزمن شدن بدست نیامد. با این وجود، افزایش معنی دار تولید IL-13 در بیماران نوع مزمن می تواند یکی دیگر از دلایل کاهش تولید IFN- γ ، علاوه بر افزایش تولید IL-10 (۲۷) و کاهش بروز پذیرنده IL-12 (IL-12 R β 2) باشد که

ما در این گروه، مورد مطالعه قرار داده ایم (داده ها منتشر نشده است). همچنین نشان داده شده است که IL-13، تولید PGE2 را توسط ماکروفاژها افزایش می دهد (۲۶). این پروستاگلاندین نه تنها عرضه زنجیره β 2 رسپتور IL-12 (۱۱) را کاهش می دهد بلکه تولید نوع غیرفعال انترلوکین ۱۲ (IL-12p40) را هم القاء می کند. بنابراین عفونت مزمن بروسلا هم به طور مستقیم (القای تولید IL-13) و هم به صورت غیرمستقیم (تحریک تولید PGE2) باعث کاهش پاسخ های محافظت کننده می شود.

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

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 MUC1 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, Aqravovich 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, Hirt 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, Kavossy 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

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.

۲۷- رفیعی، ع؛ کریمی نیا، آ؛ عجمی، ا؛ کبودانیان اردستانی، س: کاهش تولید $IFN-\gamma$ همراه با افزایش تولید IL-12 در بیماران مبتلا به بروسلوز مزمن. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی مازندران، سال ۱۳۸۳، جلد ۱۴، شماره ۴۲، صص: ۱۱-۲۱.

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 orecese 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 Considerably (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