ایمونوفنوتایپینگ سلول‌های ایمنی در خون محیطی بیماران مسلول خلط مثبت ریوی قبل از درمان

دکتر شکور امیدی* - دکتر علی سرشاد** - احسان کاظم نژاد*** - دکتر معصومه عبدالباقی **** - دکتر احمد مسعود *****- فریده خسروی ******

* ایمونولوژیست، دانشگاه علوم پزشکی گیلان
** استادیار عفونی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان
*** مربی آمار، دانشگاه علوم پزشکی گیلان
**** استادیار عفونی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
***** استاد ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
****** عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

با توجه به نقش ایمنی سلولی و سیستم ماکروفاژی در کنترل و ابتلا بیماری سل و همچنین شیوع بیماری سل در استان گیلان و نظر به اینکه بیشتر مطالعات در مورد بیماری سل در مراحل پیشرفته حاد و مزمن در حین یا بعد از دریافت دارو انجام شده است مطالعه ما بررسی سلولهای ایمنی در خون محیطی بیماران خلط مثبت ریوی قبل از دریافت هرگونه داروی ضد سل که برای اولین بار به بیمارستان رازی مراجعه کرده بودند می‌باشد. افراد مسلولی که داروهای کورتیکواستروئیدی و ایمونوسوپرسیو دریافت می‌کردند و یا بیماری سیستمیک دیگری داشتند از مطالعه حذف گردیدند.

میانگین درصد بدست آمده برای هر مارکر سطح سلولی در بیماران مورد مطالعه و افراد +PPD بدون علائم بالینی با میانگین درصد همین مارکرها در افراد سالم مقایسه گردید.

مطالعه آماری افزایش معنی داری در تعداد سلولهای حامل CD19 در بیماران نسبت به نرمال ($P<0/0001$) و نسبت به افراد +PPD($P<0/01$) و افزایش معنی‌داری در مارکر CD16-56 در بیماران نسبت به افراد نرمال ($P<0/0001$) و افزایش معنی داری در مارکر CD8 در بیماران نسبت به افراد نرمال ($P<0/0001$) و نسبت به افراد +PPD بدون علایم بالینی ($P<0/01$) نشان داد و همچنین کاهش معنی داری در مارکر +CD4 در بیماران نسبت به افراد نرمال ($P<0/01$) مارکر در CD25 در بیماران نسبت به افراد نرمال ($P<0/0001$) و افراد +PPD بدون علایم بالینی و کاهش معنی داری در مارکر CD3 بیماران نسبت به افراد سالم نشان داد.

در مورد مارکر CD14 (رده منوسیتی) کاهش میانگین مشاهده شد ولی طبق بررسی آماری ملاحظه و معنی دار نبود.

کلید واژه‌ها: ایمنی / ایمنی سلولی / سل ریه / گیرنده‌های اینترلوکین ۲ / لنفوم یاخته T

مقدمه

سل از دیرباز یکی از بیماریهای خطرناک و مرگباری شناخته شده است در حال حاضر یکی از عوامل مرگ و میر

حتی در کشورهای پیشرفته می‌باشد.(۱و۲و۳).

بیشتر مطالعات در ایمونولوژی سل در مراحل حاد و مزمن و پیشرفته بیماری انجام گرفته است علت توجه به مراحل اولیه و قبل از درمان در این مطالعه نقش سیستم دفاع سلولی در جلوگیری از درمان و پیشرفت و انتشار بیماری، و محصور و محدود کردن میکروب سل قبل از برجاگذاشتن عوارض مهم و انتشار میکروب سل که بیماران خلط مثبت به شدت آلوده کننده می‌باشند(۶و۷و۸). هدف مطالعه این است که آیا در مراحل اولیه سل ریوی قبل از درمان تغییرات قابل ملاحظه‌ای در تعادل زیر جمعیت‌های لنفوسیتی و رسپتورانترلوکین ۲ ایجاد میشود یا خیر؟

به علت آندمیک بودن و شیوع بالای سل در استان گیلان مکان مطالعه انتخاب گردید گروههای مطالعاتی گزارشات مختلفی را در مورد زیر جمعیت‌های سلولهای ایمنی در خون محیطی و مایع پلورال بیماران مسلول انجام داده‌اند اهمیت مطالعه ما در مراحل اولیه بیماری سل قبل از هرگونه درمان با دارو که میتواند در سیستم ایمنی تاثیر بگذارد و در نتایج مطالعات مؤثر افتد میباشد و حتی افرادی که بدلیل زندگی با افراد مسلول پروفیلاکسی سل انجام داده‌اند از مطالعه حذف گردیدند.

دارو درمانی باعث کندی رشد میکروب سل در داخل سلولها میشود ولی دفاع سیستم ایمنی سلولی است که نقش اساسی دارد(۴و۵) و در واقع میتوان انتظار داشت که با تقویت ایمنی میتوان کمکی موازی با دارو درمانی به بیماران مسلول نمود و مؤثرترین زمان که امکان کمک برای مسلولین فراهم است زمانی است که بیماری سل وارد مراحل پیشرفته و مزمن نشده و عوارض جبران‌ناپذیر ایجاد نکرده است. (علاج واقعه را قبل از وقوع باید کرد)

در سال ۱۹۹۹ آقای Hirsch کاهش سلولهای +TCD4 را در سل ریوی فعال گزارش نمود و علت آنرا اپوپتوزیس عنوان کرد(۱۱).

مطالعه OKABO-Y و همکارانش در سل ریوی مزمن افزایش فعالیت سلولهای NK را در مایع پلورال نشان دادند(۱۲).

مطالعات TOOSSI-Z و همکارانش افزایش رسپتور اینترلوکین ۲ را در سطح منوسیتهای خون محیطی در سل ریوی فعال گزارش کردند(۱۳).

سوالاتی که در این تحقیق در پی پاسخ آن هستیم:

۱. آیا میانگین درصد زیر جمعیتهای لنفوسیتی و رسپتورانترلوکین ۲ در بیماران خلط مثبت ریوی قبل از درمان تغییرات معنی داری نسبت به افراد نرمال و افراد +PPD بدون علایم بالینی دارد یا خیر؟

۲. این تغییرات چگونه قابل توجیه است و چه پیشنهاداتی برای حفظ تعادل زیر جمعیتهای مورد بررسی می‌توان کرد؟

مشکل اساسی در این تحقیق پیدا کردن بیمار مسلول خلط مثبت ریوی قبل از درمان و انتقال سریع نمونه‌ها به تهران و گرانی مونوکلونال آنتی بادیها و تاریخ مصرف آنها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه بصورت مقطعی می‌باشد. از بیماران مسلول خلط مثبت ریوی با تشخیص متخصص عفونی که درمان نشده بودند و برای اولین بار به بیمارستان رازی رشت مراجعه نموده بودند ۴ سی سی خون با ضد انعقاد EDTA اخذ گردید. این نمونه‌ها در کمتر از ۸ ساعت جهت بررسی فلوسایتومتری به بخش ایمونوژنتیک دانشگاه علوم پزشکی تهران ارسال گردید. هرچند که سل در استان گیلان اندمیک می‌باشد ولی پیدا کردن بیمارانی که در مراحل اولیه سل باشند و دارو دریافت نکرده باشند بسیار مشکل و متضمن شکیبایی و زمان نسبتاً طولانی بود با این حال با نظر مشاورین آمار در این تحقیق ۳۰ نفر بیمار و ۳۰ نفر کنترل سالم و همچنین ۱۰ نفر افراد +PPD بدون علایم بالینی (قطر حلقه بیش از ۱۲mm) مورد بررسی قرار گرفتند. جمعیت مورد مطالعه مسلولین خلط مثبت ریوی قبل از درمان بودند که هیچگونه بیماری سیستمتیک دیگری نیز نداشته و افرادی که به هر عنوان داروهای کورتیکواستروئیدی و سرکوب کننده سیستم ایمنی استفاده می‌نمودند و یا در سنین خیلی بالا و خیلی پایین بودند از مطالعه حذف گردیدند.

با استفاده از دستگاه فلوسیتومتر و مونوکلونال آنتی بادیهای ویژه هر مارکر که از شرکت DAKO تهیه شده بودند آزمایشات مورد نظر انجام شد. لیست مونوکلونال آنتی بادیهای بکار گرفته شده به شرح زیر می‌باشد:

1. CD3: F- 0818(Pan t Cells) DAKO
2. CD4: FR- 868(T- Helper - inducer)
3. CD8: FR- 868(T- Cytotoxic- Suppressor)
4. CD16-56: R- 7011(NK Cells)
5. CD19: FR- 0768 (B Cells)

6. CD14: FR- 0844 (Monocyte)
7. CD25: R- 0811 (IL -2 Receptor)

روش عملی انجام آزمایشات

در حال حاضر جهت انجام بررسی‌های لنفوسیتی و لوکوسیتی روش مطلوب به کاربردن خون تام است چرا که روش‌های تخلیص لنفوسیت‌ها از خون محیطی بر توزیع نرمال زیر گروههای سلولهای T تأثیر نامطلوب خواهد داشت.

به ازای هر شاخص و نیز برای هر کنترل یک لوله آزمایش به اندازه ۱۲ ضربدر ۷۵ میلی متر در نظر گرفته شد ابتدا به لوله‌ها ۱۰ میکرولیتر مونوکلونال آنتی بادی و ۱۰۰ میکرولیتر خون کامل اضافه گردید. سپس با دستگاه VORTEX و به همزدن محتویات لوله‌ها ۱۰ دقیقه انکوباسیون در هوای آزمایشگاه انجام گرفت و سپس به محتویات لوله‌ها ۲۰ میلی لیتر Lysing Bufer اضافه گردید و سپس دوباره با VORTEX مخلوط گردید و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و محیط تاریک انکوباسیون انجام گرفت و سپس به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ با دور G ۲۰۰ انجام گرفت و مایع رویی لوله‌ها خالی (Decant) شد و سپس با دو میلی لیتر از محلول ایزوتون به عنوان شستشو دهنده سلولها (Cellwash) سلولها شسته شد و باز مجدداً ۱۰ دقیقه سانتریفوژ انجام گرفت و مجدداً مایع رویی لوله‌ها خالی شد و سپس نیم میلی لیتر محلول Cell Fix جهت تثبیت استفاده گردید و تا ۴۸ ساعت نمونه‌ها در یخچال قابل بررسی می‌باشند ولی در مطالعه ما در کمتر از ۸ ساعت نمونه‌ها به بخش ایمونوژنتیک انتقال و بلافاصله مورد بررسی فلوسایتومتریک قرار گرفت. پس از آماده شدن نمونه‌ها به شرح فوق نمونه‌ها در دستگاه فلوسیتومتر خوانده شد که سیستم کامپیوتری اندازه (Size) و غلظت (گرانولیتی) سلولها را به ما می‌دهد.

آنالیز آماری:

نتایج تحقیق بصورت میانگین (Mean) و خطای معیار (Standard error) و فاصله اطمینان 95% Confidence (Interval) بیان شده است.

آنالیز آماری نتایج برای مقایسه چندگانه گروهها از آزمون آنالیز واریانس کورسکال والیس (Kruskal Wallis One Way Anova) -1 و برای مقایسه گروههای دوگانه از آزمون مان ویتنی (Two tailed mann- whintney U. test) استفاده شده است.

همچنین جهت ارتباط بین مارکرهای گروهها ضریب همبستگی اسپیرمن (Spearman Correlation) بکار برده شد و سطح معنی داری کوچکتر از ۰/۰۵ (P Value <0.05) معنی دار در نظر گرفته شد.

در دستگاه فلوسیتومتر در موقعیت Forward scater اندازه سلولها و در موقعیت Side Scater گرانولیتی سلولها مشخص می‌شود که به صورت نمودارهای روی دیسکت‌های کامپیوتری مشخص که معمولاً در محور افقی اندازه سلولها و در محور عمودی غلظت (گرانولیتی) ترسیم می‌گردد.

نتایج به صورت میانگین درصد برای هر سلول گزارش گردید و در نمونه‌گیری افراد سالم نیز جهت همسان سازی بیشتر سعی شده است، از خانواده‌های مسلولین مورد بررسی که در همان منطقه زندگی می‌نمایند بدون در نظر گرفتن سن و جنس نمونه‌گیری انجام گیرد هر چند که در پایان نمونه‌گیری متوجه شدیم بیش از ۹۵٪ بیماران مورد مطالعه در محدوده سنی ۲۱ تا ۴۵ سال بوده‌اند و لذا سنین خیلی بالا و خیلی پایین بدلیل اختلال در نتایج مطالعه حذف گردیدند.

نتایج:

در جدول شماره ۱ میانگین درصد سلولهای ایمنی در سه گروه بیماران و نرمال و افراد +PPD بدون علایم بالینی با خطای استاندارد با ۹۵٪ اطمینان محاسبه شده است.

کاهش معنی دار در سلولهای TCD4+(Helper-inducer) بیماران نسبت به نرمال مشاهده گردید. (P<0/001) ولی نسبت به افراد +PPD بدون علایم بالینی کاهش معنی دار نداشته‌اند (جدول شماره ۲)

همچنین در بیماران کاهش معنی دار سلولهای CD3+(Pan T Cells) نسبت به افراد نرمال را شاهد بودیم (P<0/002) ولی این کاهش نسبت به افراد +PPD بدون علایم بالینی قابل ملاحظه نبود (جدول شماره ۲)

در مورد بررسی رسپتورایترلوکین ۲ (CD25) کاهش معنی دار (P<0/0001) بیماران نسبت به نرمال را شاهد بودیم و این کاهش بین بیماران نسبت به افراد +PPD نیز معنی دار بود (P<0/02) (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۱: میانگین درصد شمارش سلولهای ایمنی در خون محیطی بیماران مسلول ریوی خلط مثبت قبل از درمان و افراد نرمال و افراد +PPD بدون علایم بالینی

مارکر	گروه	بیماران	PPD+	طبیعی
CD ۲۵	شمارش	۳۰	۱۰	۳۰
	میانگین	۱۷/۷	۲۱	۲۷/۳
	خطای استاندارد	۱/۰۸	۰/۸۹	۰/۱۸
	۹۵٪ با درجه اطمینان	۱۵/۵۳-۱۹/۹	۱۸/۹۸-۲۳	۲۶/۹۲-۲۷/۶
CD ۱۶/۵۶	شمارش	۳۰	۱۰	۳۰
	میانگین	۳۷/۰۸	۲۴/۰۱	۶/۰۹
	خطای استاندارد	۳/۳۵	۳/۶۹	۰/۱۵
	۹۵٪ با درجه اطمینان	۳۰/۲۱-۴۳/۹	۱۵/۸۱-۳۲/۵	۵/۷۸-۶/۴
CD۸	شمارش	۳۰	۱۰	۳۰
	میانگین	۳۷/۰۸	۲۴/۰۱	۶/۰۹
	خطای استاندارد	۳/۳۵	۳/۶۹	۰/۱۵
	۹۵٪ با درجه اطمینان	۲۲/۰۴-۲۸/۶	۱۴/۲۱-۲۰/۹	۱۶/۵۵-۱۷/۱
CD۴	شمارش	۳۰	۱۰	۳۰
	میانگین	۳۱/۶۴	۲۸/۷۱	۳۸/۰۳
	خطای استاندارد	۲/۱۴	۲/۱۷	۰/۲۱
	۹۵٪ با درجه اطمینان	۲۷/۲۵-۳۶/۰	۲۳/۷۹-۳۳/۶	۳۷/۵۹-۳۸/۴
CD۳	شمارش	۳۰	۱۰	۳۰
	میانگین	۵۳/۲۳	۵۳/۹۶	۶۵/۳۷
	خطای استاندارد	۳/۳۶	۴/۴۱	۰/۱۵
	۹۵٪ با درجه اطمینان	۴۶/۳۶-۶۰/۱	۴۳/۹۷-۶۳/۹	۶۵/۰۵-۶۵/۶
CD۱۹	شمارش	۳۰	۱۰	۳۰
	میانگین	۱۶/۰۱	۱۲/۴۰	۱۰/۳۶
	خطای استاندارد	۰/۸۲	۰/۴۳	۰/۱۵
	۹۵٪ با درجه اطمینان	۱۴/۳۲-۱۷/۷	۱۱/۴۱-۱۳/۳	۱۰/۰۴-۱۰/۶
CD۱۴	شمارش	۳۰	۱۰	۳۰
	میانگین	۶۲/۴۴	۷۴/۷۶	۷۳/۷
	خطای استاندارد	۴/۴۰	۱/۵۹	۰/۲۴
	۹۵٪ با درجه اطمینان	۵۳/۴۴-۷۱/۴	۷۱/۱۶-۷۸/۳	۷۳/۲۱-۷۴/۲
CD۴	شمارش	۳۰	۱۰	۳۰
CD۸	میانگین	۱/۲۸	۱/۶۶	۲/۲
	خطای استاندارد	۰/۰۷	۰/۱۰	۰/۰۲
	۹۵٪ با درجه اطمینان	۱/۱۳-۱/۴۲	۱/۴۳-۱/۹۰	۲/۲۱-۲/۳۰

جدول شماره ۲: تست‌های آماری و سطوح اختلاف معنی داری زیر رده‌های سلولهای ایمنی در خون محیطی بیماران مسلول ریوی خلط مثبت و افراد کنترل سالم و افراد +PPD بدون علایم بالینی

تست‌های آماری و سطح اختلاف معنی‌دار بین ۳گروه	طبیعی	PPD+	بیماران	گروه	مارکر
کورسکال- والیس P<۰/۰۰۰۱	تست مان ویتنی P<۰/۰۰۰۱	تست مان ویتنی P<۰/۰۲		بیماران	CD ۲۵
	تست مان ویتنی P<۰/۰۰۰۱		تست مان ویتنی P<۰/۰۲	PPD+	
		تست مان ویتنی P<۰/۰۰۰۱	تست مان ویتنی P<۰/۰۰۰۱	طبیعی	
کورسکال- والیس P<۰/۰۰۰۱	تست مان ویتنی P<۰/۰۰۰۱	معنی دار نیست		بیماران	CD
	تست مان ویتنی P<۰/۰۰۰۱		معنی دار نیست	PPD+	۱۶/۵۶
		تست مان ویتنی P<۰/۰۰۰۱	تست مان ویتنی P<۰/۰۰۰۱	طبیعی	
کورسکال- والیس P<۰/۰۰۰۱	تست مان ویتنی P<۰/۰۰۰۱	تست مان ویتنی P<۰/۰۱		بیماران	CD۸
	معنی دار نیست		تست مان ویتنی P<۰/۰۱	PPD+	
		معنی دار نیست	تست مان ویتنی P<۰/۰۰۰۱	طبیعی	
کورسکال- والیس	تست مان ویتنی P<۰/۰۰۲۶	معنی دار نیست P<۰/۰۱		بیماران	CD۴
	تست مان ویتنی P<۰/۰۰۰۴		معنی دار نیست	PPD+	
		تست مان ویتنی P<۰/۰۰۰۴	تست مان ویتنی P<۰/۰۱	طبیعی	
کورسکال- والیس P<۰/۰۰۱۸	تست مان ویتنی P<۰/۰۰۲	معنی دار نیست		بیماران	CD۳
	تست مان ویتنی P<۰/۰۰۴		معنی دار نیست	PPD+	
		تست مان ویتنی P<۰/۰۰۴	تست مان ویتنی P<۰/۰۰۲	طبیعی	

مطالعه نسبت CD4:CD8 که شاخص ایمنی سلولی است در بیماران نسبت به نرمال کاهش معنی دار (P<0/0001) و نسبت به افراد +PPD نیز کاهش معنی دار (P<0/002) نشان می‌دهد (جدول شماره ۳).افزایش معنی داری در سلولهای (Tc/Ts) +TCD8 در بیماران نسبت به نرمال (P<0/0001) و همچنین نسبت به افراد +PPD(P<0/01) مشاهده کردیم. در مورد سلولهای NK و مارکر CD16/56 افزایش معنی‌داری در بیماران نسبت به نرمال(P<0/0001)مشاهده کردیم‌ولی‌این‌افزایش در بیماران نسبت به افراد +PPD معنی دار نبود (جدول شماره ۲).

و همچنین اختلاف معنی دار بین گروه +PPD و گروه افراد نرمال نیز دیده می‌شود که افزایش معنی دار سلولهای حاوی مارکرهای CD16/56 را در افراد +PPD نسبت به افراد نرمال داریم. (P<0/0001) (جدول شماره ۲).

در سلولهای حاوی مارکر (B Cells) افزایش معنی داری (P<0/0001) در بیماران نسبت به نرمال و همچنین در بیماران نسبت به افراد +PPD (P<0/01) و همچنین اختلاف معنی دار (P<0/002) بین افراد +PPD و افراد نرمال وجود دارد و شاهد افزایش سلولهای B در افراد +PPD نسبت به جمعیت سالم بودیم (جدول شماره ۳).

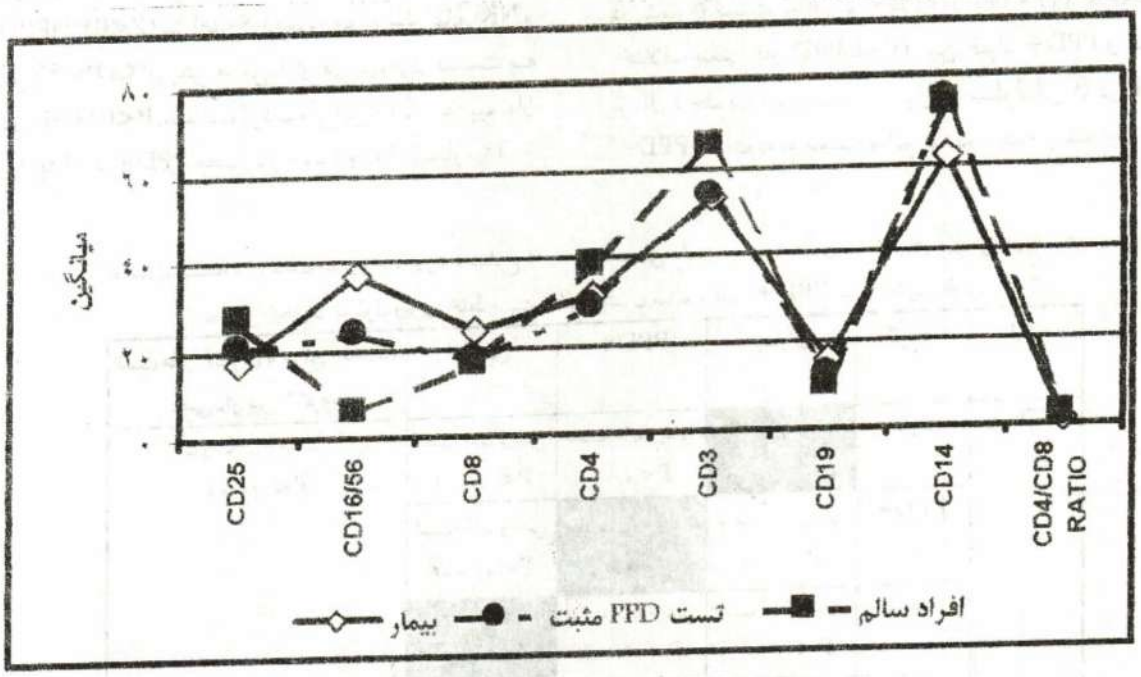
جدول شماره ۳: تست‌های آماری و سطوح اختلاف معنی داری زیر رده‌های سلولهای ایمنی در خون محیطی بیماران مسلول ریوی خلط مثبت و افراد کنترل سالم و افراد +PPD بدون علایم بالینی

تست‌های آماری و سطح اختلاف معنی‌دار بین ۳گروه	طبیعی	PPD+	بیماران	گروه	مارکر
کورسکال- والیس P<۰/۰۰۰۱	تست مان ویتنی P<۰/۰۰۰۱	تست مان ویتنی P<۰/۰۱		بیماران	CD ۱۹
	تست مان ویتنی P<۰/۰۰۰۲		تست مان ویتنی P<۰/۰۱	PPD+	
		تست مان ویتنی P<۰/۰۰۰۳	تست مان ویتنی P<۰/۰۰۰۱	طبیعی	
کورسکال- والیس معنی‌دار نیست	معنی‌دار نیست	معنی‌دار نیست		بیماران	CD ۱۴
	معنی دار نیست		معنی دار نیست	PP+	
		معنی دار نیست	معنی دار نیست	طبیعی	
کورسکال- والیس P<۰/۰۰۰۱	تست مان ویتنی P<۰/۰۰۰۱	تست مان ویتنی P<۰/۰۰۲		بیماران	CD ۴ CD۸
	تست مان ویتنی P<۰/۰۰۰۱		تست مان ویتنی P<۰/۰۰۲	PPD+	
		تست مان ویتنی P<۰/۰۰۰۱	تست مان ویتنی P<۰/۰۰۰۱	طبیعی	

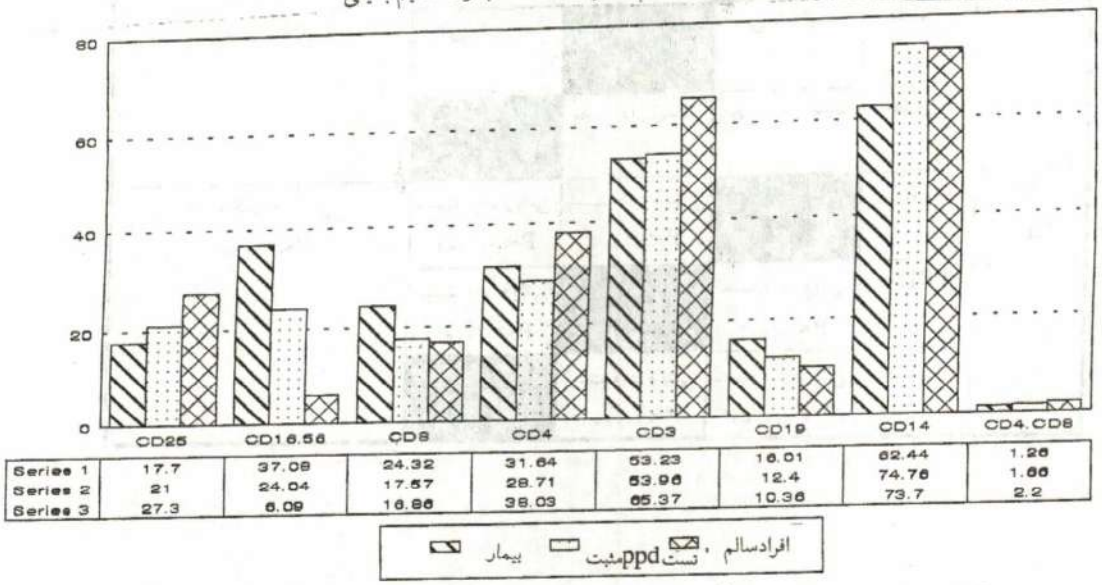
هر چند کاهش میانگین سلولهای منوسیت (+CD14) در افراد بیمار نسبت به نرمال را مشاهده کردیم ولی این کاهش از نظر آماری معنی دار نبود (جدول شماره ۳).

در جدول شماره ۲ و ۳ مقایسه ۳ گروه بیمار و +PPD بدون علایم بالینی و افراد نرمال از لحاظ بررسی سطح اختلاف آماری (معنی دار بودن و یا معنی دار نبودن) با محاسبه مقدار P value و نوع تستهای آماری پیشرفته برای میانگین متغیرهای مورد مطالعه آورده شده است.

در نمودار ۱ مقایسه میانگین‌ها برای متغیرهای مورد مطالعه در هر سه گروه با هم ترسیم شده است و در نمودار ۲ نیز نمودار ستونی برای مقایسه میانگین درصد متغیرهای مورد مطالعه در هر سه گروه مشخص می‌باشد.



نمودار ۱: مقایسه میانگین زیرجمعیتهای لنفوسیتهای T و رسپتور اینترلوکین ۲ در سه گروه بیماران و افراد سالم و افراد +PPD بدون علایم بالینی

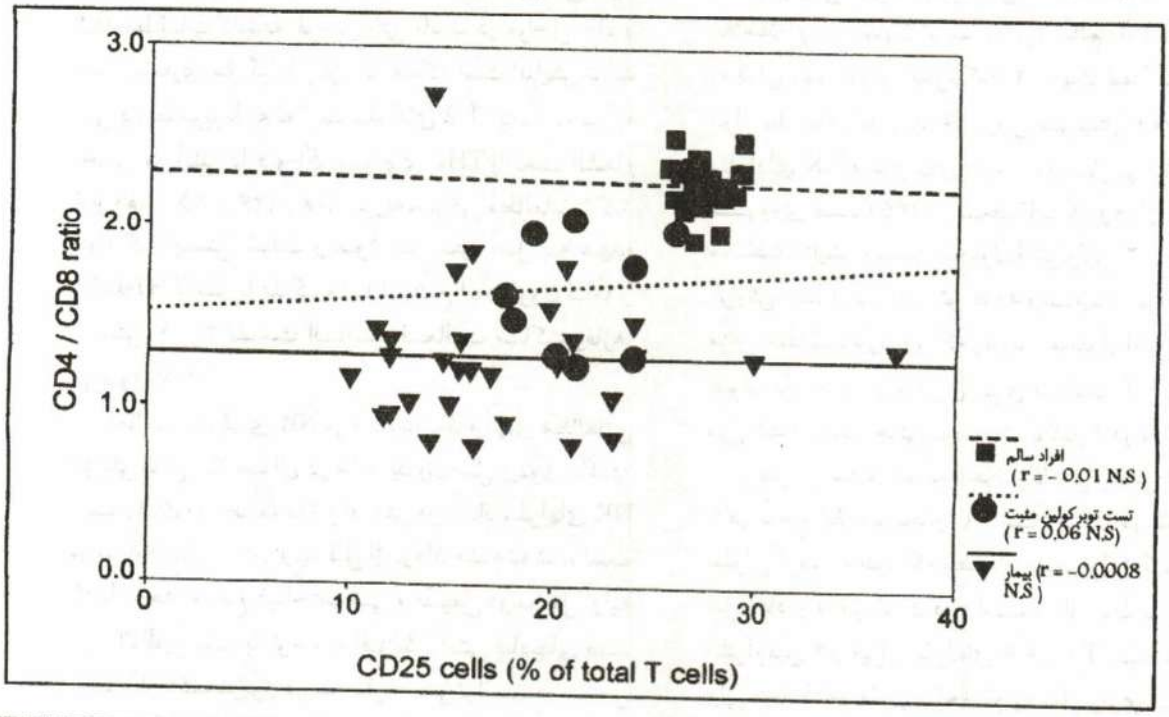


نمودار ۲: نمودار ستونی مقایسه میانگین درصد زیرجمعیتهای لنفوسیتهای T و رسپتور اینترلوکین ۲ در سه گروه بیماران و افراد سالم و افراد +PPD بدون علایم بالینی

در نمودار ۳ نیز همبستگی و ارتباط تعداد سلولهای CD4+ T با نسبت CD4:CD8 با میزان رسپتور اینترلوکین ۲ ترسیم شده است.

بحث

درمطالعه گروههای تحقیقاتی کاهش سلولهای TCD4+ در مراحل فعال سل ریوی گزارش شده است و علت آنرا نیز Appoptosis ذکر کرده‌اند(۱۴و۱۵) و گروههای مطالعاتی دیگرافزایش TNFαو رسپتورFas- Fsaligandراعلت‌ایجاد Appoptosisداشته‌اند(۱۵و۱۶و۱۷و۱۸)وهمچنین گروهی دیگر افزایش سایتوکاین‌های TGFB,IL-10 در سل مزمن را در کاهش پاسخ دهی CD4+ T مطرح نمودند (۱۹و۲۰). در تحقیق ما با کاهش معنی داری سلولهای TCD4+ در بیماران مورد مطالعه و همچنین افراد PPD+ بدون علایم بالینی نسبت به جمعیت نرمال روبرو شدیم. با توجه به نقش سلولهای TCD4+ در دفاع بر علیه میکروب سل که یک میکروب درون سلولی و فرصت طلب می‌باشد این کاهش باعث ازمان و پیشرفت و پخش میکروب سل می‌گردد(۲۱و۲۲). همانطوریکه می‌دانیم CD4+ T به عنوان نقطه عطف و مرکزی فعالیت سلولهای ایمنی و دخالت در ایمنی اختصاصی سلولی و ترشح انواع سایتوکاین‌ها و همکاری دوجانبه با متوسیتها می‌باشد(۲۳) مخصوصاً که در این تحقیق با افزایش سلولهای CD8+ T در بیماران نیز روبرو هستیم که این موضوع باعث کاهش نسبت CD4:CD8 که شاخص ایمنی سلولی از اهمیت زیادی برخوردار است می‌گردد.



نمودار ۳: تعیین همبستگی میانگین درصد سلولهای T حاوی رسپتور (IL-2) با نسبت CD۸: CD۴ بیماران با افراد PPD+ و افراد کنترل سالم.

کاهش معنی داری در سلولهای +CD3 T در بیماران مورد مطالعه مشاهده گردید. پس به این ترتیب با کاهش کلی درصد لنفوسیتی در بیماران روبرو هستیم که در زیر گروههای دیگر نیز تأثیر خواهد گذاشت اما باید مورد بررسی قرار گیرد که آیا در فعالیت این سلولها نیز تغییرات قابل ملاحظه‌ای ایجاد شده است در برخی مطالعات افزایش Auto Reactive Cell گزارش شده است (۲۲). در مطالعات دیگر افزایش فعالیت لنفوسیت‌های +CD3 T در مرحله سل فعال گزارش شده است(۲۸).

در بررسی لنفوسیتهای B خون محیطی که توسط گروهها مطالعاتی مختلف انجام گرفته است افزایش تولید آنتی بادیها را گزارش کرده‌اند که در ایمنی برعلیه سل نقش چندانی ندارند و در بعضی مواقع باعث افزایش ورود میکروب به درون سلولها می‌شود(۲۴).

در مطالعه ما نیز افزایش لنفوسیت‌های B (CD19) مشاهده شده است که با مطالعات گذشته تطبیق می‌نماید البته مطالعات گذشته افزایش آنتی بادیها در مراحل حاد و مزمن بیماری سل گزارش کرده‌اند ممکن است افزایش تولید آنتی بادیها مربوط به فعالیت سلولهای TH2 باشد که نیاز به تحقیق در آینده دارد و اگر سلولهای TH2 را تحت الشعاع قرار دهند (۲۵ و ۲۶) و همانطوریکه برخی مطالعات تاکید دارند که ایمنی غالب و موثر بر علیه سل به عهده TH1-Like می‌باشد که با ترشح اینترفرون گاما و اینترلوکین ۲ باعث افزایش فعالیت ماکروفاژها می‌شود(۲۷).

فعالیت سلولهای NK در مطالعات گروههای مطالعاتی افزایش قابل ملاحظه‌ای در مایع پلورال سل ریوی داشته است (۲۹). در مطالعه ما نیز افزایش در تعداد سلولهای NK در بیماران سل ریوی اولیه قبل از درمان مشاهده شده است که با توجه به دفاع غیراختصاصی و طبیعی در مراحل اولیه قابل انتظار است. با توجه به افزایش آنتی بادیهای ضد مایکوباکتریوم در سل می‌توانند در عمل ADCC(Anti Body Depen Dent Cytotoxicity Cell) سلولهای NK مشارکت نمایند باعث مهار فعالیت میکروبی در مراحل اولیه گردند.

همانطور که در نتایج اشاره شده سلولهای منوسیت (+CD14) در افراد بیمار نسبت به نرمال کاهش معنی‌دار نشان ندادند ولی میانگین کاهش یافته است با توجه به نقش منوسیت‌ها و ماکروهاژها در دفاع بر علیه سل بررسی فعالیت این سلولها نیز در مراحل اولیه ضروری می‌باشد. با توجه به این نکته که نقش ماکروفاژهای مهاری (ساپرسوری) نیز در سل مزمن گزارش شده است که با ترشح فاکتورهای مهاری جلوی فعالیت سلولهای ایمنی را گرفته و باعث ازمان بیماری سل میشود(۳۰و ۳۱و۳۳). در مطالعات دیگران که در مراحل سل فعال انجام گرفته است علت کاهش منوسیت‌ها را به افزایش فاکتورهای کموتاکسی مثل اینترلوکین ۸ نسبت داده‌اند که باعث هجوم منوسیت‌ها به نواحی التهابی میشود و در نتیجه در خون محیطی کاهش نشان می‌دهد (۳۴و۳۶و۹) که لازم است در آینده این موضوع در سل اولیه نیز مورد بررسی قرار گیرد.

در واقع در ایمونوتراپی بر علیه بیماریهای مختلف برای افزایش فعالیت سلولهای سیستم ایمنی بیشترین سلولهای درگیر ماکروفاژها و لنفوسیتهای T و سلولهای NK می‌باشند.

در بررسی رسپتوراینترلوکین ۲ (CD25) کاهش قابل ملاحظه‌ای در بیماران نسبت به افراد سالم دیده شد. با توجه به نقش مهم رسپتوراینترلوکین ۲ جهت فعالیت و تکثیر انواع سلولهای ایمنی به خصوص سلولهای +CD4 T و سلولهای NK و سلولهای مادر خون ساز در مغز استخوان ضروری است (۳۵) در تحقیقات گروههای مطالعاتی مختلف افزایش رسپتور محلول اینترلوکین ۲ در سل مزمن گزارش شده است که با توجه به وضعیت آنرژی در سل مزمن مطابقت دارد. زیراکه رسپتور محلول اینترلوکین ۲ به عنوان یک فاکتور مهاری برای فعالیت T لنفوسیت‌ها می‌باشد و باعث خنثی کردن اینترلوکین ۲ در سرم می‌گردد.

بنظرمی‌رسد در مطالعه حاضر کاهش رسپتور اینترلوکین ۲ در سطح لنفوسیت‌های T باعث اختلال در پاسخ ایمنی سلولی گردد. به طوریکه مطالعات ایمونولوژیک در مراحل سل حاد و مزمن نشان داده است که ارتباط بین رسپتور اینترلوکین ۲ و میزان سلولهای +CD4 T مستقیم می‌باشد ولی در مطالعه ما در مراحل اولیه سل ریوی این ارتباط دیده نشده است. به بیان دیگر همبستگی معنی داری بین کاهش رسپتوراینترلوکین ۲ (CD25) در بیماران مورد مطالعه به کاهش نسبت CD4:CD8 وجود ندارد.

در ایمونولوژی سل علاوه بر تعادل زیر رده‌های لنفوسیتی باید به فعالیت سلولها نیز توجه کرد و ممکن است با کاهش بعضی از زیر رده‌های لنفوسیتی و منوسیتی فعالیت آنان کاهش چشمگیری پیدا نکرده باشد(نمودار۳).

نتیجه نهایی اینکه در بیماران خلط مثبت ریوی قبل از درمـان بـه دلیـل کـاهش سـلولهای سیستم ایـمنی بـرای جلوگیری از ازمان و انتشار میکروب سـل و قـبل از بـروز عوارض جبران‌ناپذیر با درمان دارویی بـه تـقویت سـیستم ایمنی توسط ایمونواستیمولاتور انواع داروهـا و تـرکیبات روی ویتامینهای مختلف پرداخت (۱۰) که فواید زیادی را همانطوریکه در مقدمه گفته شد برای جلوگیری از انتشار و ازمان و مقاومت دارویی برای بیماران داشته باشد.

منابع

1. Iseman MD, Sbarbaro JA. The Increasing Prevalence of Resistance to Antituberculosis Chemoth Erapeutic Agents Implications for Global Tuberculosis Control. Currclin top Infect Dis 1992: 12: 188-207.
2. Iseman MD. Treatment of Multidrug-Resistant Tuberculosis. N Eng J Med 1993: 329: 784-791.
3. Smith MH, Strok JR, Marquis JR. Tuberculosis and other Opportunistis Mycobacterial Infection. In: Feigio RD, Cherry JD. Pediatrics Infections Disease. 3rd Ed. Philadelphia: WB Saunders, 1992: 1321-1362.
4. Chan CH, et al. Tlymphocyte Activation in Patients with Active Tuberculosis. Am Rev Respir Dis 1991:
5. An drade- Ar2abe- R. etal. Cellular Immunity in Current Active Pulmonary Tuberculosis. Am Rev Respir Dis 1991: 143(3): 496-500.
6. Dannenberg AM. Jr Delayed- Type Hypersensitivity and cell Mediated Immunity in the pathogenesis of Tuberculosis. Immonology Today 1991: 228-233.
7. Deneil T. Harrison Principles of Internal Medicine. 13 thed. Philadelphia: WB Saunders, 1994: 710-17.
8. Wolinsky E. Conventional Diagnostic Methods for Tuberculosis. Clin Infect Dis 1994: 19: 396.
9. Sindor DE. BCG Vaccinations and Tuberculin Skin Testes. JAMA 1998: 253: 3430- 8.
10. Beach RS, etal. Nutritional factors and Autoimmunity, Immunopathology of Zinc Deprivation in new Zeland mice. J Immunol 1990: 126: 1981.
11. Hirsch CS, Toosi Z, etal. Apoptosis and T-cell Hyporesponsivenes in PulmonaryTuberculosis. Infect Dis 1999: 179(4): 945-53.
12. Okabo Y, etal. Analysis of Immunologic Mechanism of High NK Cells Activity in Tuberculosis Pleural Effusion. Am Rev Respir Dis 1990: 142 (1): 29-33.
13. Toosi Z, etal. Expression of Functional Interleukin- 2 Receptors by Peripheral Blood Monocytes from Patients with Active Pulmonary Tuberculosis. J Clin Invest 1990: 85(6): 1777-84.
14. Molloy A, etal. Apoptosis, but not Necrosis of Infected Monocyte is Coupled with Killing of Intracellular Bacillus Calmefte- Guren. J Exp Med 1994: 180: 1499- 509.
15. Zhengl, etal. Induction of Apoptosis in Mature T Cells by Tumor Necrosis Factor. Nature 1995: 377: 348-51.
16. Alderson MR, etal. Fas ligand Mediates Activation - Induced Cell Death in Human Tiymphocyte. J Exp Med 1995: 181: 71-7.
17. Just Panka DJ, etal. Fas Fasligand Interaction Required for Programmed Cell Death after T- Cell Activation. Nature 1995: 373: 444-8.
18. Lynch DH, etal. Fas and Fasl in the Hemostatic Regulation of Immuno Responses. Immunol Today 1995: 16: 569-74.
19. Tossiz, Gogate, Shira Taachi H, Youny T. Ellner JJ. Enhanced Production of Transforming Growth Factor- Bta Blood Monocyte from Patient with Active Tuberculosis and Presence of TGFB in

Tuberculosis Granulomatous Luy Lesions. Infect Human 1996: 64: 913-18.

20. Hiesch S, etal. Gross Modulation by TGFB in Human Tuberculosis: Suppression of Antigen- Driven Blasto Genesis and Inter Feron Gamma Production. Proc Natl Acad Sci USA 1996: 93: 3193-8.
21. Sharma SK, etal. Pulmonary Function and Immunologic Abnormalities in Miliary Tuberculosis. Am Rev Respir Dis 1992: (5): 1167-71.
22. Del Gallo F, etal. Increassed Autoreactive T- Cell Frequency in Tuberculosis Patient. Int Arch Allergy APPI Immunol 1990: 91(1):36-42.
23. Havlir DV, etal. Human Immune Response to M. Tuberculosis Antigens. Infect Immuno 1991: 59: 729.
24. Kaus to va J. Serological Ig G, JgM and IgA Diagnosis and Prognosis of Mycobacterial Disease in Routine Practice. Eur J Med Res 1996: 24(1): 393-403.
25. Lyashchenko K, Colangeli R, etal. Heterogeneneous Antibody Responses in Tuberculosis. Infect Immun 1998: 66(8): 3936-40.
26. Heinzel FP. Th1 and Th2 cells in the Cure and Pathogenesis of Infectious Disease. Curr Opin Inf Dis 1995: 8: 151-155.
27. Robinson DS etal. Evidence of a Th1-Like Bronchoalveolar T Cell Subset and Predominance of Interferon- Gamma Gene Activation Pulmonary Tuberculosis. Am J Respir 1994: 149: 989- 993.
28. Stenger S, etal. Differe Trial Effectors of cytolytic T Cell Subsets on Cellular Infection. Science 1997: 276: 1684-7.
29. Res trepo LM, et al. Natural Killer Cell Activity in Patients with Pulmonary Tuberculosis and in Healthy Controls. Tubercle 1990: 71(2): 95-102.
30. Antonacis, et al. Evaluation of Phagocyte Function, Inflammatory lymphoking Activities and in Vitor Antibody Synthesis in Patients With Active and Chronic Pulmonary Tubercolosis. Cytobios 1991: 67(270-271): 135-44.
31. Tomioka H, et al. Characteristics of Immuno Suppressive Macrophages Induced in Spleen Cells by Myco Bacterium Avium Complex Infection in Mice. J Gen Microbiol 1990: 136: 965- 73.
32. Fuji Ware H, et al. Release of Suppressor Cell- Inducing Factor by Monocytes from Patients with Pulmonary Tuberculosis. Immuonology 1991: 72(2): 194-8.
33. Zhany Y, et al. Enhaneed Interleukin- 8 Release and Gene Expression in Macrophage Following Exposure to Mycobactreium Tuberculosis and it's Companents. J Chin Invest 95: 586- 592.
34. Sindor DE BCG Vaccinations and Tuberculin askin testes. JAMA 1998: 253: 3430-8.
35. Johnson BJ et al. Clinical and Immune Responses of Tuberculosis Patients Treated with Low- Dose LL-2 and Multidrug Therapy. Cytokines Mol Ther 1995: 1(3): 183 - 96.
36. Stam Ford JL, et al. Immunotherapy with Mycobacterium Vaccae as an Adjuvant to Chemotherapy in the Treatment of Pulmonary Tuberculosis. Tubercle 1990: 71(2): 87-93.

Immunophenotyping of Immune Cells in Peripheral Blood of TB Patient with Positive Smear Before Treatment

Omidi SH, Sarshad A, Kazem Nezhad E, Abdolbaghi M, Masood A, Khosravi F

ABSTRACT

Regarding cellular immunity function and macrophage system in tuberculosis infection control and also tuberculosis high spread in Gilan province and as many studies about tuberculosis has done in chronic and acute progressive process. This study was examined thirty persons smear positive with clinical symptoms and recognition infections expert before Treatment.

Tuberculosis patients who recieved corticostroid and Immunosupresion drugs or they had another systemic disease and studies were not examined on them.

The percent mean which resulted of each cellular surface marker were compared studied patients and PPD^+ individuals without clinical symptoms with percent mean markers in healthy individuals. Statistical studies were showed significant increase in the number of PPD^+ cells in patients ratio of ($P<0.0001$) normal and ratio of PPD^+ ($P<0.01$) individuals and significant increase in $CD_{16\text{-}56}$ Marker in patients ratio of ($P<0.0001$) normal individuals and significant increase in CD_8 marker in patients ratio of ($P<0.0001$) normal individuals and ratio of PPD^+ ($P<0.01$) individuals.

Also, it showed significant decrease in PPD^+ marker patients ratio of ($P<0.01$) normal individuals and CD_{25} patients ratio of ($P<0.0001$) normal individuals and PPD^+ ($P<0.02$) individuals and meaningful decrease in CD_3 marker patients ratio of ($P<0.002$) healthy individuals.

Mean decrease was observed in CD_{14} marker (monocytic class), but it was not considerable and meaningful occording to statistical studies.

Keywords: Immunity/ Immunity, Cellular/ Lymphoma, T- Cell/ Receptors, Interleukin-2 / Tuberculosis, Pulmonary