

## مقاله اصلی

# بررسی نقش سایتوکاین ها در عفونت بروسلوز، آرتریت و کمردرد بروسلایی

مرکز تحقیقات روماتولوژی و ایمونولوژی

تاریخ دریافت: ۸۸/۲/۱۲ - تاریخ بازنگری: ۸۸/۷/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۰/۲۶

### خلاصه

#### مقدمه

سایتوکاین ها موادی هستند که در سلول های مختلفی به ویژه لنفوسیت های T تولید و ترشح می شوند و در روند پاسخ ایمنی دخالت دارند. با توجه به اینکه بیماری بروسلوز ناشی از باکتری های درون سلولی است، ایمنی سلولی در این بیماری نقش مهمی در پاسخ های ایمنی به هنگام عفونت ناشی از این باکتریها برعهده دارد و بررسی تغییرات سایتوکاین ها در این بیماری اطلاعات مفیدی در ارتباط با فعالیت سیستم ایمنی سلولی به دست می دهد.

#### روش کار

این مطالعه مورد شاهدهی در سال های ۸۵-۸۷ در دو مرکز، بیمارستان های قائم (عج) و امام رضا(ع) وابسته به دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام شده است. ۴۰ بیمار مبتلا به کمردرد آرتریت بروسلایی و ۴۰ فرد طبیعی در این مطالعه شرکت داده شدند. تشخیص بیماری با توجه به سابقه بیماری، معاینات بالینی و آزمونهای سرولوژی انجام پذیرفت. پس از استخراج اطلاعات مورد نظر ارزیابی های آماری با آزمون آماری کولموگراف اسمیرنت و کورسکال والیس و آزمون تی انجام شد.

#### نتایج

میزان سایتوکاین های انترفرون گاما، اینترلوکین ۲، اینترلوکین ۴، اینترلوکین ۱۰ و فاکتور نکروز تومور آلفا در سرم بیماران به روش الیزا سنجیده شد (سطح معنی داری  $p < 0/05$ ) آزمون کولموگراف اسمیرنت حاکی از طبیعی بودن توزیع متغیرهای میزان IL-2 و IL-10 می باشد. بقیه متغیرها شامل، IL4، و انترفرون گاما و TNF آلفا در سرم بیماران غیر طبیعی بودند. آزمون آماری t حاکی از تفاوت معنی دار در میزان IL-10 در دو گروه می باشد ( $p < 0/002$ ). سطح IL-2، IL-4، و TNF- $\alpha$  در دو گروه تفاوت معنی داری نداشت ( $p > 0/1$ ). اما آزمون آماری کورسکال والیس حاکی از تفاوت معنی دار انترفرون گاما در گروه بیماران و شاهد است ( $p < 0/05$ ).

#### نتیجه گیری

این نتایج حاکی از آن است که انترفرون گاما و اینترلوکین ۱۰ در سرم بیماران مبتلا به آرتریت و کمردرد بروسلایی نقش تائید کننده ای دارد.

**کلمات کلیدی:** بروسلوز، آرتریت و کمردرد بروسلایی، سایتوکاین

<sup>۱</sup> نیره سعادتى\*

<sup>۲</sup> رضا فرید حسینی

<sup>۳</sup> جلیل توکل افشاری

<sup>۴</sup> امیر رضا خلیقی

<sup>۵</sup> بهرام نقیب زاده

۱- استادیار روماتولوژی، مرکز تحقیقات روماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۲- استاد ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۳- دانشیار ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، پژوهشکده بوعلی، مشهد، ایران

۴- متخصص عفونی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۵- اینترن، بیمارستان امام رضا (ع)، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

\*مشهد- بیمارستان قائم، دفتر گروه داخلی

تلفن: ۹۱۵۵۰۹۰۴۰۸-۹۸

email:nsaadatimd@gmail.com

## مقدمه

گونه های بروسلا، باکتری های گرم منفی و داخل سلولی اختیاری هستند که موجب بیماری جدی در حیوانات و انسان می شوند (۱). بیماری بروسلوز در اکثر کشورهای در حال توسعه باعث زیان های فراوان در تولیدات دامی و سلامت جوامع انسانی می گردد (۳،۲). تا کنون مطالعات زیادی در ارتباط با تولید آنتی بادی در بدن بر ضد این باکتریها در هنگام ابتلا به بروسلوز انجام شده است. ولی چون باکتریهای مسبب این بیماری درون سلولی هستند، ایمنی سلولی نهایتاً نقش انهدام باکتری در درون سلولها و بهبودی را برعهده دارد. مطالعات مربوط به ایمنی سلولی تا کنون عمدتاً در حیوانات آزمایشگاهی انجام شده است، در اینگونه مطالعات محققین نشان داده اند که سایتوکاین های فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF<sup>1</sup>) و اینترلوکین ۱۲ نقش مهمی در مقاومت علیه بروسلا آبورتوس دارند (۴) در هنگام ابتلا به عفونت بروسلایی در مدل های حیوانی و در افراد مبتلا به بروسلوز، میزان اینترفرون گاما<sup>۲</sup> به شدت افزایش می یابد. اگر بیماران نتوانند به میزان کافی اینترفرون گاما تولید نمایند، عفونت در بدن بیماران ادامه می یابد (۵). مطالعات انجام شده در ارتباط با تولید سایتوکاین ها در انسان های مبتلا به بروسلوز بسیار محدود بوده است. در بررسی های برخی از محققین میزان اینترفرون گاما و اینترلوکین ۱۰ در بیماران در مقایسه با اشخاص طبیعی افزایش نشان می دهد ولی آنها در گزارش خود مشخص نموده اند که آیا بیماران مورد مطالعه مبتلا به آرتریت و کمردرد بروسلایی بوده اند یا خیر (۵). هدف از مطالعه حاضر این است که تولید سایتوکاین ها در بیماران مبتلا به کمردرد و آرتریت بروسلایی مورد بررسی قرار گیرد و تغییرات اینترفرون گاما، TNF آلفا، اینترلوکین های ۲، ۴، ۱۰ در سرم بیماران مبتلا به آرتریت و کمردرد بروسلایی مورد سنجش قرار گیرد.

## روش کار

در این مطالعه مورد شاهده طی سال های ۱۳۸۵-۱۳۸۷ تعداد ۴۰ بیمار مبتلا به کمردرد آرتریت بروسلایی از دو مرکز

بیمارستان قائم (عج) و امام رضا (ع) وابسته به دانشگاه علوم پزشکی مشهد در این مطالعه مشارکت داده شدند. از این تعداد، ۲۳ نفر مرد و ۱۷ نفر زن بودند، سن بیماران  $23/2 \pm 39/6$  سال بود. پس از بررسی بالینی توسط متخصصین عفونی نمونه خون وریدی از بیماران تهیه و نمونه های سرم جدا شده از خون بیماران تا زمان سنجش آنتی بادیها و سایتوکاین ها در فریز ۷۰- درجه سانتی گراد نگاهداری شدند و در هر یک از سرم ها میزان آنتی بادی و سایتوکاین ها تعیین گردید. در این تحقیق سنجش آنتی بادیها به عنوان یک هدف منظور محققین نبوده بلکه صرفاً به عنوان یک معیار برای کمک به تشخیص آرتریت و کمردرد بروسلایی انجام شد. تشخیص کمردرد و آرتریت بروسلایی با توجه به سابقه ابتلا به این بیماری، معاینات بالینی و نتایج آزمون های سرولوژی انجام گرفت، تیتراسیون آنتی بادیها در سرم به روش رایت باکتریال، آگلوتیناسیون و ME-2 انجام گرفت. سنجش میزان سایتوکاین ها در سرم با استفاده از کیت های IL-2، IL-4، IL-10 و اینترفرون گاما و TNF آلفا با R&D System (از کشور کانادا) و به روش الیزا انجام گرفت. تعداد ۴۰ نفر از هر دو جنس (۲۲ مرد و ۱۸ زن) که سن آنها  $17/8 \pm 30/6$  بود از بین اهداء کنندگان خون در شهر مشهد و دانشجویان دانشگاه مشهد که سابقه بیماری بروسلوز نداشتند، افرادی سالم، تقریباً همسن گروه بیمار بودند، به عنوان شاهد انتخاب شدند. این افراد هیچ دارویی مصرف نمی کردند، سیگاری و حامله نبودند. در صورت نداشتن هریک از این شرایط، بویژه قرارنگرفتن در رده سنی همسان بیماران، در مجموعه شاهد قرار نمی گرفتند. به دنبال استخراج اطلاعات مورد نظر ارزیابی های آماری بر متغیرهای فوق الذکر با آزمون آماری کولموگروف اسمیرنوف و کورسکال والیس انجام شد و آزمون آماری تی برای تجزیه و تحلیل یافته ها استفاده گردید. به علت رعایت اخلاق پزشکی هیچگونه تغییر یا مداخله ای در روش درمان بیماران انجام نگرفت. بیماران بعد از تشخیص، طبق برنامه سازمان بهداشت جهانی (WHO) تحت درمان قرار گرفتند (۶).

## نتایج

در این مطالعه ۴۰ بیمار مبتلا به کمردرد آرتریت بروسلایی از دو مرکز بیمارستان قائم (عج) و امام رضا (ع) وابسته به دانشگاه

<sup>1</sup>Tumor Necrosis Factor Alfa (TNF- $\alpha$ )<sup>2</sup>Interleukin 2- 4--10

است. این اطلاعات حاکی از تفاوت معنی دار انترفرون  $\gamma$  در گروه مورد و شاهد است ( $p < 0/05$ ). آزمون آماری تی حاکی از تفاوت معنی دار در میزان IL-10 در دو گروه می باشد ( $p < 0/001$ ).

این نتایج حاکی از آن است که انترفرون گاما و سایتوکاین IL-10 در پاتوژن آرتریت و کمردرد بروسلائی نقش تأیید کننده ای دارد و مشاهده شده که این نتایج لازم نیست که با وسعت فعالیت بیماری همراه باشد.

### بحث

از نتایج مهم این تحقیق افزایش سایتوکاین ها و  $\gamma$ -INF در بیماران مبتلا به آرتریت و کمردرد بروسلائی می باشد. که این سایتوکاین عمدتاً از لنفوسیت های Th1 ترشح و این سلولها نقش مهمی در ایمنی سلولی دارند. سایتوکاین ها مواد محلولی هستند که عمدتاً از لنفوسیت ها و بخصوص لنفوسیت های T پس از تحریک آنتی ژنی تولید و ترشح می شوند و با اثر بر سلولهای نظیر ماکروفاژها، سلول NK<sup>1</sup> و سلولهای دیگر در تنظیم پاسخ ایمنی مشارکت دارند (7) انترلوکین 12 عمدتاً بوسیله ماکروفاژها در پاسخ به برخی آنتی ژنها نظیر پاتوژنهای داخلی سلولی تولید می شود و عامل مهمی برای لنفوسیت های T و سلولهای NK در تولید انترفرون گاما می باشد (8). محققین متعددی از نقش مرکزی انترلوکین 12 در مقاومت به عفونت بروسلا را از طریق تحریک تولید انترفرون گاما و تقویت فعالیت سلولهای NK گزارش کرده اند (4، 9). افزایش سطح انترلوکین 2 در بروسلاز انسانی گزارش شده است (5). با اینحال در بررسی حاضر افزایش انترلوکین 2 و 4 در بیماران با آرتریت کمردرد بروسلائی با کنترل طبیعی تفاوت معنی دار نداشت. احمد و همکاران انترلوکین های 2 را در بیماران بروسلازی نیافتند (5). اسکندروس<sup>2</sup> و همکاران نیز انترلوکین 2 را در سرم بیماران بروسلازی نیافتند (10). ژان<sup>3</sup> و همکاران دریافتند که سلولهای طحال موشهای آلوده به بروسلا آبوروس سطح پائینی از انترلوکین 2 را تولید می کنند. انترفرون گاما سایتوکاینی است که علاوه بر لنفوسیت های Th1 از سلولهای NK و لنفوسیت های CD 8 تولید می شود و

علوم پزشکی مشهد و 40 فرد طبیعی نیز از بین دانشجویان پزشکی و اهداء کنندگان خون که تست رایت و کومبس رایت آنها منفی بود، به عنوان شاهد در این تحقیق شرکت داده شدند. تشخیص بیماری با توجه به سابقه کوتاه این بیماری، معاینات بالینی و آزمون های سرولوژی انجام پذیرفت. میزان سایتوکاین ها IL-2، IL-4، IL-10، TNF آلفا و انترفرون گاما در سرم بیماران به روش الیزا سنجیده شد. آزمون کولموگراف اسمیرنف حاکی از طبیعی بودن توزیع متغیرهای میزان IL-2 و IL-10 می باشد. بقیه متغیرها شامل IL-4 و انترفرون گاما و TNF آلفا در سرم بیماران طبیعی نبودند. آزمون آماری تی حاکی از تفاوت معنی دار در میزان IL-10 در دو گروه می باشد ( $p < 0/001$ ). میزان IL-2 در دو گروه تفاوت معنی داری نداشت ( $p < 0/1$ ) آزمون آماری کورسکال والیس حاکی از تفاوت معنی دار انترفرون گاما در گروه بیماران و شاهد است ( $p < 0/05$ ). ولی میزان TNF آلفا و IL-4 در دو گروه تفاوت معنی دار ندارد ( $p < 0/1$ ). این نتایج حاکی از یک پاسخ ایمنی سلولی از نوع Th1 بیماران مبتلا به کمردرد و آرتریت بروسلائی می باشد عیار رایت در 90٪ بیماران مبتلا به کمردرد آرتریت بروسلائی 1/160 تا 1/1280 بود و تیتراژ آزمون 2ME در 90٪ در همین بیماران از 1/80 تا 1/320 را تشکیل می داد.

### جدول 1 - میانگین سایتوکاین (پیکوگرم در میلی لیتر) در

اشخاص نرمال و مبتلا به آرتریت کمردرد بروسلائی

سایتوکاین	میانگین (M±SD)		P-Value
	بیماران آرتریت و کمردرد بروسلائی	نرمال کنترل	
TNF- $\alpha$	270/36-1069/50	667/65-862/11	>0/1
IL-2	334/03-544/87	281/02-254/56	>0/1
IFN- $\gamma$	49/72-243/32	119/44-155/73	<0/05
IL-4	42/41-26/04	8/46-7/21	>0/1
IL-10	154/72-522/97	69/29-119/12	<0/001

نتایج سنجش میزان سایتوکاین های IL-2، IL-4، IL-10 و TNF آلفا و انترفرون های  $\gamma$  در بیماران مبتلا به آرتریت و کمردرد بروسلائی و افراد طبیعی در جدول 1 منعکس شده

<sup>1</sup> Natural Killer

<sup>2</sup> Skendros

<sup>3</sup> Zhan

پاتوزنهای درون سلولی پیش می برند و احتمالاً نقش موثری در بهبودی از این عفونت دارند (۱۱). پاسکولی<sup>۳</sup> و همکارانش گزارش کرده اند که IL-4 در موش ها واکسینه شده بروسلای گاوی پیدا نکردند. در تعداد محدودی از مطالعات سطح IL-1 و IL-4 در سرم غیرقابل ارزیابی است (۱۶). شریف<sup>۴</sup> و همکارانش سطح TNF- $\alpha$  را پایین گزارش کردند (۱۷). در این مطالعه نیز در آرتریت و کمردرد بروسلای TNF- $\alpha$  یافته نشد. یافته های تحقیق حاضر دلالت بر این نکته دارد که پاسخ Th1 در بروسلوز حاد در مقایسه با پاسخ Th2 غلبه داشته و تداوم این پاسخ در بهبودی فرد مبتلا نقش موثری دارد.

### نتیجه گیری

این نتایج حاکی از آن است که انترفرون گاما و اینترلوکین ۱۰ در سرم بیماران مبتلا به آرتریت و کمردرد بروسلای نقش تأیید کننده ای دارد و مشاهده شده که این نقش لازم نیست که با وسعت فعالیت بیماری همراه باشد. انترفرون گاما مسئول یک پاسخ ایمنی سلولی از نوع Th1 در بیماران مبتلا به کمردرد و آرتریت بروسلای می باشد.

### تشکر و قدر دانی

انجام این بررسی از حمایت های معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد برخوردار بوده است. از همکاری های بی دریغ آنان سپاسگزاری می گردد. همچنین از سرکارخانم اعظم بروک صمیمانه تشکر و قدردانی می شود.

ماکروفاژها را در انهدام درون سلولی باکتریها فعال می نماید، و هر دو سلولهای ماکروفاژ و NK را فعال می کند و نقش مهمی در ایمنی بر علیه پاتوزنهای داخل سلولی دارد (۱۱،۱۲). در بررسی حاضر میزان انترفرون گاما در مقایسه با سایر سایتوکاین هائی که در این مطالعه مورد سنجش قرار گرفت بالاترین سطح سرمی را در بیماران مبتلا به آرتریت کمردرد بروسلای نشان داد. سطح سرمی بالای انترفرون گاما در بیماران با بروسلوز توسط احمد و همکاران گزارش شده است (۵). در بررسی حاضر سطوح سرمی اینترلوکین های ۲ و ۴ در بیماران با آرتریت کمردرد بروسلای نیز در افراد طبیعی اندازه گیری شد، افزایش اندک سطوح اینترلوکین های ۴ در بیماران مشاهده شد (جدول ۱). بعضی مقالات سطح اینترلوکین ۴ را بالا گزارش کرده اند (۱۳،۱۴). سطح اینترلوکین ۲ در بیماران با بروسلوز حاد تفاوت معنی داری در مقایسه با کنترل طبیعی نشان نداد (جدول ۱). گزارشی مربوط به اینترلوکین ۲ در بروسلوز انسانی دریافت نشد، با این حال فرناندز- لوگو<sup>۱</sup> سطح قابل توجه اینترلوکین ۱۰ در سلولهای طحال موش آلوده به بروسلای آورتوس را یافتند و فرو تنظیمی<sup>۲</sup> پاسخ ایمنی حفاظتی بوسیله این سایتوکاین را در این موشها نشان دادند (۱۵). از یافته های مهم تحقیق حاضر بالا بودن میزان انترفرون گاما و همچنین اینترلوکین ۱۰ سرم بیماران مبتلا به بروسلوز است. این سایتوکاین ها در زمره سایتوکاین های Th1 طبقه بندی می شوند. سایتوکاین های Th1 پاسخ CMI را به سمت یک دفاع موثر و کارآمد علیه

<sup>3</sup> Pasquali  
<sup>4</sup> Sherif

<sup>1</sup> Fernondez – Logo  
<sup>2</sup> Dawn-regulation

**References:**

- 1- Enright FM. The pathogenesis and pathobiology of brucella infection in domestic animals. In: Nielsen K, Duncan JR. editors. Animal brucellosis. CRC press; Inc., boca raton, fla, 1990.
- 2- Ahmed K, Al- matrouk KA, Martinz 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.
- 3- Young EJ, Human brucellosis. *Rev infect dis* 1983; 5:821-842.
- 4- Zhan Y, LIU Z, Cheers C. Tumor necrosis factor alfa and Il-12 contribute to resistance to the intracellular bacterium brucella abortus by different mechanisms. *Infect Immun* 1996 ; 2782 – 2786.
- 5- Ahmed K, Kismat A, Rouk AL, Martinez G, Oishi K, Rotimi OY, *et al.*, Levels of interferon  $\gamma$  and interleukin – 12 during human brucellosis. *AM J Trop Med Hyg* 1999 ; 61:425 – 427.
- 6- Firestein GS, Budd RC, Harris ED, McInnes I, Ruddy S, Sargent J. Saunders Elsevier Kelley's Textbook of Rheumatology. 8<sup>th</sup> ed. WB Saunders Company; 2008.p.1226-12227.
- 7- Trinchieri G, Interleukin 12. A Proinflammatory eytokine with immuno regulatory functions that bridge innate resistance and antigen – specific adaptive immunity. *Ann Rev Immun* 1995; 13:251- 276.
- 8- Abbas AK , Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. 4<sup>th</sup> ed. WB Saunders; 2000.p. 235 – 269.
- 9- Zhan Y, Cheers C. Endogenous interleukin -12 is involed in resistance to brucella abortus infection. *Infect Immun* 1995; 163:1387 – 1390.
- 10- Skendros P, Boura P, Chrisagis D, Raptopoulou-Gigi M. Diminished percentage of CD4+ T-lymphocytes expressing interleukine-2 receptor alpha in chronic brucellosis. *J Infect* 2007; 54:192-197.
- 11- Goldsby RA, Kindt TJ, Obrane BA. Kuby immunology. 4<sup>th</sup> ed. Freeman & Co;2000.p. 351 – 370.
- 12- Faver N, Bordman G, Rudin W. Comparison of cytokine measurements using ELISA ELISPOT, and semi – quantitative RT-PCR. *J Immunol Methods* 1997 ; 57 – 66.
- 13- Rezazadeh M, Hajilooi M, Haidari M, Rafiei A, Alavi SA, Keramat F. Association of susceptibility to brucellosis and interleukin-4 promoter polymorphism. *Scand J Infect Dis* 2006; 38:1045-1049.
- 14- Gaupp S, Cannella B, Raine CS. Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-4R{alpha}-/-Mice implicates compensatory Up-regulation of Th2-Type cytokines. *Am J Pathol* 2008; 173:119 - 129.
- 15- Fernandez-Lago L, Monte M, Chordi A. Endogenous gamma interferon and interleukin – 10 in brucella abortus 2308 infection in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1996 ; 15:109 – 114.
- 16- Akbulut H, Celik I, Akbulut A. Cytokine levels in patients with Brucellosis and their relations with the treatment. *Indian J Med Microbiol* 2007; 25:387-390.
- 17- El-Saadany SA, EL-Bassat H, EL-Yamany S, EL-Bendary A, Hassan A. Role of T Helper-1 Cytokine and Nitric Oxide Production in Patients with Acute Brucellosis, *knol.google.com*, 2008.